

非生物胁迫下耐辐射异常球菌 *drB0118* 基因功能分析

刘盈盈¹ 张陈¹ 江世杰^{1,2} 周正富¹ 陈明¹ 张维¹ 王劲^{1*}

(1. 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

(2. 四川大学 生命科学学院 四川 成都 610065)

摘要:【目的】鉴定和确定被预测为编码干燥相关蛋白的耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans*) *drB0118* 基因功能, 探讨该基因对盐、渗透和氧化胁迫抗性的作用。【方法】构建 *drB0118* 基因缺失突变株($\Delta B0118$), 通过氯化钠、D-山梨糖醇和过氧化氢等胁迫冲击实验及氧化胁迫条件下 qRT-PCR 分析, 研究 *drB0118* 突变对非生物胁迫反应及氧化胁迫相关基因表达的影响。【结果】*drB0118* 突变导致菌株对 NaCl 和 D-sorbitol 胁迫的抗性降低; 对氧化胁迫(H_2O_2)敏感; qRT-PCR 分析显示, *drB0118* 突变引起氧化胁迫抗性基因 *pod* 和 *oxyR* 分别下调 4 倍和 10 倍。【结论】*D. radiodurans* 中 *drB0118* 参与了盐、渗透和氧化等多种非生物胁迫反应。

关键词: 耐辐射异常球菌, *drB0118*, qRT-PCR, 非生物胁迫

Functional analysis of *drB0118* gene in response to abiotic stress in *Deinococcus radiodurans*

LIU Ying-Ying¹ ZHANG Chen¹ JIANG Shi-Jie^{1,2} ZHOU Zheng-Fu¹
CHEN Ming¹ ZHANG Wei¹ WANG Jin^{1*}

(1. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(2. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

Abstract: [Objective] *drB0118* gene in *Deinococcus radiodurans* is predicted to encode a protein associated with the desiccation tolerance. The purpose of this study is to identify and determine the function of *drB0118* gene, especially its effects on the bacterial resistance to salt, osmotic and oxidative stresses. [Methods] The *drB0118* mutant was constructed and its tolerance to salt, osmotic and oxidative stresses was investigated by the NaCl, D-sorbitol or H_2O_2 shock experiments. The expression of the genes involved in oxidative stress response was measured by qRT-PCR assay under the oxidative stress. [Results] The mutant $\Delta B0118$ was more sensitive to NaCl, D-sorbitol and H_2O_2 stresses than the wild type strain. The inactivation of *drB0118* resulted in 4-fold or 10-fold decrease in the relative expression of *pod* and *oxyR* genes respectively. [Conclusion] The results suggested that *drB0118* gene was involved in salt, osmotic and antioxidant stress in *D. radiodurans*.

Keywords: *Deinococcus radiodurans*, *drB0118*, qRT-PCR, Abiotic stress

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2013CB733903); 国家自然科学基金项目(No. 31370126, 31170105); 农业部公益性行业科研专项(No. 201103007)

*通讯作者: ✉: wangjin@caas.cn

收稿日期: 2014-11-07; 接受日期: 2015-02-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-06

耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans*, DR)是目前地球上已发现的最具辐射抗性的微生物之一^[1-2], 其对电离辐射、紫外线、长期干燥、氧化损伤等具有超强的抗性。其高效的抗氧化保护机制和干燥胁迫抗性已成为当前的研究热点^[3-4]。

水分缺失是最重要的胁迫因素, 环境中的高盐、高渗透压和干燥都会间接造成细胞的水分胁迫。水分缺失导致 DNA 双链断裂、蛋白变性聚合, 几乎对生物体所有生物学功能产生影响^[5-6]。然而, 耐辐射异常球菌能够通过阻止这种伤害抵抗极端环境。2001 年, Mattimore 等报道了 *D. radiodurans* R1 菌株置于相对湿度低于 5% 的干燥器中, 6 周后仍有 85% 的存活率^[7]。更有趣的是, 此培养物在经 6 年的干燥处理后仍有 10% 的存活率^[8-9]。此外, 该菌对多种形式的氧化胁迫也具有很高的抗性^[10]。Slade 等指出 *D. radiodurans* R1 经 40 mmol/L 过氧化氢处理 60 min, 90% 仍保持存活能力^[8]。

D. radiodurans R1 基因组分析显示该基因组含有 4 个与干燥胁迫抗性相关的蛋白, 分别由 *drB0118*、*dr1172*、*dr1372* 及 *dr0105* 基因编码, 氨基酸序列分析发现 *drB0118* 基因编码的蛋白为“复苏植物”还魂草(*Craterostigma plantagineum*)干燥胁迫抗性相关蛋白同源物, 与植物的干旱胁迫抗性密切相关^[11]。2001 年 Battista 等对 *D. radiodurans* R1 中 *drB0118* 基因进行了初步研究, 认为 *drB0118* 基因对干燥胁迫起着重要作用, 对电离辐射抗性无作用^[11-14]。至今有关 *D. radiodurans* R1 *drB0118* 基因的研究报道甚少, 对该基因功能仍缺乏了解。本研究采用融合 PCR 技术和体内重组技术构建了 *drB0118* 基因的缺失突变株($\Delta B0118$), 分析该基因在氧化、盐及渗透等胁迫反应的作用, 进一步分析在过氧化氢胁迫下 *drB0118* 基因缺失对氧保护相关基因表达的影响, 探讨 DRB0118 的抗逆功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及培养条件: 耐辐射异常球菌(*D.*

radiodurans R1)由本实验室保存; 高频转化受体菌大肠杆菌 *Escherichia coli* trans10 购自北京全式金生物技术有限公司; pJET1.2/Blunt 克隆载体购自 Thermo 公司; 载体 pKatAPH3 由本实验室保存。

大肠杆菌用 LB 培养基^[15](g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.0 或固体加入琼脂 15.0, 37 °C 培养; 耐辐射异常球菌用 TGY 培养基^[16](g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 葡萄糖 1.0, pH 7.0 或固体加入琼脂 15.0, 30 °C 培养; 突变株在含有 10 mg/L 的卡那霉素(K_m)的 TGY 培养基中培养。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, 购自 New England Biolabs 公司; 细菌基因组提取试剂盒、质粒小提试剂盒及胶回收纯化试剂盒, 购自北京天根科技有限公司; PrimeStar HS DNA Polymerase、消化反转一体试剂盒、qRT-PCR 所需试剂, 购自 TaKaRa 公司; RNA 提取试剂盒, 购自 Life 公司; 其他生化试剂均为分析纯。引物合成由擎科生物技术公司完成; 测序由华大基因生物技术公司完成。

1.2 DRB0118 蛋白的生物信息学分析

使用 NCBI 数据库获取 *drB0118* 基因序列及蛋白序列; 使用 KEGG 数据库预测 DRB0118 蛋白结构域; 使用 ProtParam 软件分析 DRB0118 蛋白的基本特性及蛋白一级结构; 在经 PubMed 上 BLAST 在线分析与 DRB0118 蛋白同属的干燥相关蛋白序列、其他菌种中干燥相关蛋白及复苏植物中干燥相关蛋白序列, 使用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

1.3 缺失突变株 $\Delta B0118$ 的构建

$\Delta B0118$ 突变株构建所用引物如表 1 所示, 根据 *drB0118* 及其上下游基因序列和 pKatAPH3 载体序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物并用 DANMAN 软件对目的基因酶切位点进行分析。

本实验采用融合 PCR 方法构建 $\Delta B0118$ 突变株。以 *D. radiodurans* R1 基因组 DNA 为模板, 分别用 B0118U-F/R 引物扩增 *drB0118* 基因上游序列,

表 1 PCR 扩增所用的引物
Table 1 Primers for PCR amplification

PCR 扩增片段 Fragments for PCR amplification	引物 Primers	引物序列 Primer sequences (5'→3')
<i>drB0118</i> 基因上游序列 The upstream of <i>drB0118</i> gene	B0118U-F B0118U-R	CGACTCGTTCTGGCACCT gttttctaatacaggatcctctagGACTTTTATCTTCTCTTT
<i>drB0118</i> 基因下游序列 The downstream of <i>drB0118</i> gene	B0118D-F B0118D-R	atatcaagcttatcgataaccgATTCTCAGGCTCAGTAGG CCAGCGATGCCCCGCACTTAC
K _m 抗性盒 K _m resistant cassette	B0118K-F B0118K-R	aaagagaagataaaaagtcCTAGAGGATCCTGATTAGAAAAAC cctactgagcctgagaatACGGTATCGATAAGCTTGATAT
$\Delta B0118$ 中 K _m 抗性盒验证 Verification of K _m resistant cassette	YZK-F YZK-R	ACGGTATCGATAAGCTTGAT CTAGAGGATCCTGATTAGAA
$\Delta B0118$ 中 <i>drB0118</i> 基因验证 Verification of <i>drB0118</i> gene	YZB0118-F YZB0118-R	ACCGTGCTTTGCTTGTCTTCTGT TGAAAGCGATACCGTTACTGTCCGT
$\Delta B0118$ 中融合片段全长验证 Verification of fusion fragment	QB0118-F QB0118-R	GTGGCTGCCGGCCTGCTGA TGGTGGCCGATCGGGAGTTCAT

注: 大写序列表示扩增片段的特异性引物序列, 小写序列表示相邻片段的互补序列。

Note: Uppercase represent the specific primer sequences for amplified fragments; Lowercase represent the complementary sequences of adjacent fragments.

扩增产物 P1 长度为 639 bp; 用 B0118D-F/R 引物扩增 *drB0118* 基因下游序列, 扩增产物 P2 长度为 616 bp; 以 pKatAPH3 质粒为模版, 用 B0118K-F/R 引物扩增卡那抗性基因片段, 扩增产物 P3 长度为 1 006 bp。分别对各扩增产物进行纯化回收, 在反应体系中加入等摩尔的三片段产物, 引物 B0118U-F 和 B0118D-R, 采用一步融合法进行融合 PCR 反应, 得到三片段的融合产物。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 5 min, 17 个循环; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

用 *Xho* I/*Nco* I 酶切获得验证后的融合片段, 通过同源重组转化野生型 *D. radiodurans* R1。在含有 10 mg/L 的 K_m 平板上筛选缺失突变株 $\Delta B0118$ 。通过 PCR 方法对 $\Delta B0118$ 进行鉴定。以基因组为模板, 用 YZ-B0118F/R 引物扩增 *drB0118* 基因片段 882 bp; 用 YZKF/R 引物扩增 K_m 基因片段 970 bp; 同时以 *D. radiodurans* R1 基因组作对照。

1.4 不同浓度盐对菌株的冲击实验

将活化的野生型 DR 和突变株 $\Delta B0118$ 分别转接至 20 mL 新鲜 TGY 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养至生长对数初期(*OD*₆₀₀ 为 0.6–0.8), 分别取 1 mL DR 和 $\Delta B0118$ 菌液, 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 1 mL 4 mol/L 和 5 mol/L 的 NaCl 溶液重悬后, 30 °C、220 r/min 培养 4 h, 并设置对照。处理后的菌液用无菌水进行梯度稀释, 每个稀释度各取 10 μ L 点接种于 TGY 固体培养基上。30 °C 培养 2–3 d 后观察结果, 试验进行 3 次重复。

1.5 不同浓度山梨糖醇对菌株的冲击实验

将活化的野生型 DR 和突变株 $\Delta B0118$ 分别转接至 20 mL 新鲜 TGY 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养至生长对数初期(*OD*₆₀₀ 为 0.6–0.8), 分别吸取 1 mL DR 和 $\Delta B0118$ 菌液, 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 1 mL 1 mol/L 和 2 mol/L 的 D-山梨糖醇重悬后 30 °C、220 r/min 培养 4 h, 并设置对照。处理后的菌液用无菌水进行梯度稀释, 每

个稀释度各取 10 μ L 点接种于 TGY 固体培养基上。30 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d 后观察结果, 试验进行 3 次重复。

1.6 不同浓度 H_2O_2 处理对菌株的冲击实验

将野生型菌株 DR 和突变株 $\Delta B0118$ 培养至生长对数初期(OD_{600} 为 0.6–0.8), 各取 1 mL 菌液, 加入 27% H_2O_2 母液, 使其终浓度分别为 0、40、60、80、100 mmol/L。样品混匀置于 4 $^{\circ}$ C 避光处理 30 min, 立即用无菌水进行梯度稀释, 每个稀释度各取 10 μ L 菌液点接种到 TGY 固体培养基上。同时, 每个梯度取 100 μ L 菌液均匀涂布到 TGY 固体培养基上, 每个样品平行 3 次。30 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d 后观察表型变化, 并统计每个平板的菌落数, 计算存活率。根据公式计算存活率: 细菌存活率=(过氧化氢冲击后培养基上菌落数平均值/对照组菌落数平均值) \times 100%。

1.7 氧化胁迫下基因的表达分析

将活化的野生型 DR 和突变株 $\Delta B0118$ 分别转接至新鲜的 20 mL TGY 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养至生长对数初期(OD_{600} 为 0.6–0.8)。加入终浓度为 100 mmol/L 的 H_2O_2 20 min, 并设置对照组。离心收集菌体。提取细菌总 RNA 并消化反转成 cDNA。通过 qRT-PCR 对氧化胁迫条件下基因的表达差异情况进行分析。本实验采用相对定量方法, 以 *D. radiodurans* R1 野生型菌株作为对照, 以 16S rRNA 基因作为菌株内部参比基因, 利用 $\Delta\Delta C_T$ 法分析实时定量数据。每个试验样品做 3 次重复, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 DRB0118 的生物信息学分析

NCBI 数据库, *drB0118* 位于 *D. radiodurans* R1

基因组巨型质粒上, 序列全长为 1 014 bp。使用 KEGG 分析 DRB0118 的结构域(图 1), 该蛋白 62–236 位氨基酸组成铁蛋白(Ferritin)保守结构域, 并且在其 N-端含有 Fe-S 结构域和 TAT 结构域。利用 ProtParam 软件分析表明, *D. radiodurans* R1 菌的 *drB0118* 基因编码 337 个氨基酸, 分子量为 34.9 kD, 理论等电点为 5.0, 脂溶性系数为 91.63, 不稳定系数为 26.0, 是一类稳定性的蛋白。

从 NCBI 中获得与 DRB0118 同属的干燥相关蛋白序列沙漠奇异球菌(*D. deserti*)干燥相关蛋白(Desiccation-related protein, 登录号为 YP_002785369.1)、中度嗜热菌(*D. geothermalis*)双精氨酸转位途径信号蛋白(Twin-arginine translocation pathway signal, 登录号为 YP_603569.1)、其他菌株中嗜热菌(*Thermus thermophiles*)干燥相关蛋白 pcc13-62 前体(Desiccation-related protein pcc13-62 precursor, 登录号为 YP_006153.1)以及复苏植物(*Craterostigma plantagineum*)干燥相关蛋白(Desiccation-related protein, 登录号为 AAA63616.1)。利用 MEGA 5.0 软件进行系统进化分析(图 2), 结果显示, *D. radiodurans* R1 中的 DRB0118 与同属 *D. geothermalis* 中双精氨酸转位途径信号蛋白(YP_603569.1)亲缘关系较近, 相似性为 75%; 与同属 *D. deserti* 中干燥相关蛋白(YP_002785369.1)相似性为 71%; 与其它属的 *Thermus thermophiles* 干燥相关蛋白 pcc13-62 前体(YP_006153.1)相似性为 49%; 与文献报道的复苏植物属 *Craterostigma plantagineum* 干燥相关蛋白(AAA63616.1)相似性仅为 32%。

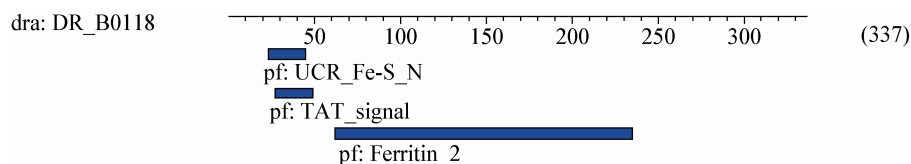


图 1 DRB0118 的功能结构域预测
Figure 1 The analysis of DRB0118 motif

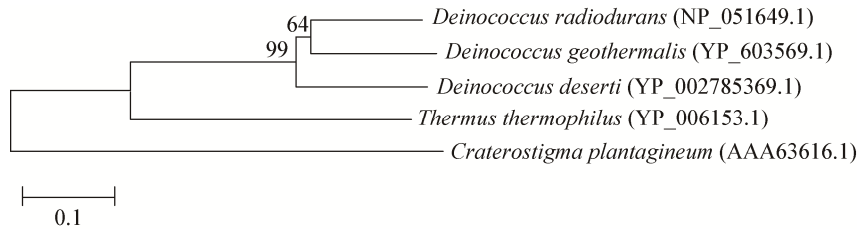


图2 耐辐射异常球菌 DRB0118 同源物的系统发育分析及序列比对

Figure 2 Phylogenetic relationships of DRB0118 homologs and sequence alignment from *D. radiodurans* R1

注: 括号内为菌株在 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示构建系统进化树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 标尺为进化距离。

Note: The numbers in parentheses represent the accession number of those strains in the GenBank. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications). Scale for evolutionary distance.

2.2 突变株 $\Delta B0118$ 的构建

采用融合 PCR 方法获得 *drB0118* 基因缺失突变株 $\Delta B0118$ 。通过 PCR、酶切、测序验证后, 将融合片段线性转化 DR 野生型菌株, 通过 20 mg/L 卡那霉素抗性筛选获得 *drB0118* 突变株 $\Delta B0118$ 。通过 PCR 方法验证 $\Delta B0118$ 。以突变株基因组为模板, YZKF/R、YZB0118F/R 和 QB0118F/R 三对引物进行 PCR 反应, 分别对 K_m 抗性盒、*drB0118* 基因和融合全长片段进行验证; K_m 抗性盒用 pKatAPH3 质粒作阳性对照, *drB0118* 基因和融合全长片段用野生型 DR 基因组作阳性对照。 K_m 抗性盒鉴定结果(图 3 第 1 和第 2 泳道)表明 K_m 抗性盒已成功替换 *drB0118* 基因插入到 DR 基因组中; *drB0118* 基因鉴定结果(图 3 第 4 和第 5 泳道)发现, 以 $\Delta B0118$ 基因组为模板未能扩增出目的条带, 而 DR 野生型中扩增出 882 bp 条带; 融合全长片段验证结果中(图 3 第 7 和第 8 泳道), 以 $\Delta B0118$ 基因组为模板扩增出条带大小为 2 179 bp, 由于 K_m 基因和 *drB0118* 基因大小一致, 因此将 DR 基因组扩增出的条带进行回收测序, 扩增得到了目的片段, 说明 K_m 抗性盒已经成功替换掉 *drB0118* 基因。以上验证结果表明已成功敲除 *drB0118* 基因, 获得突变株 $\Delta B0118$ 。

2.3 *drB0118* 基因缺失减弱了 DR 菌株对高盐、高渗胁迫抗性

高盐和高渗均会造成细胞渗透失水, 细胞壁破裂, 最终导致细胞死亡。本研究对指数生长初期的

野生型菌株 DR 和突变株 $\Delta B0118$ 进行不同浓度盐 (NaCl) 冲击和山梨糖醇(D-sorbitol)冲击实验。结果显示(图 4), 正常培养条件下(未加 NaCl 和山梨糖醇), DR 与 $\Delta B0118$ 生存能力保持一致, 而用 4 mol/L

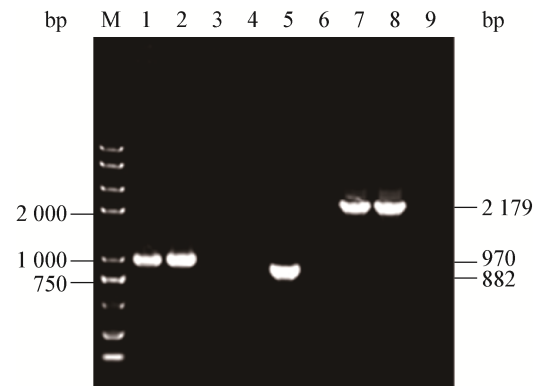


图3 突变株中 K_m 基因和 *drB0118* 基因验证

Figure 3 Verification of K_m gene and *drB0118* gene in mutant

注: M: Trans2K PlusII marker; 1: YZKF/R 引物验证 $\Delta B0118$ 中 K_m 基因; 2: K_m 基因阳性对照; 3: K_m 基因阴性对照; 4: YZ-B0118F/R 引物验证 $\Delta B0118$ 中 *drB0118* 基因; 5: *drB0118* 基因阳性对照; 6: *drB0118* 基因阴性对照; 7: QB0118F/R 引物验证融合全长片段; 8: 融合全长片段阳性对照; 9: 融合全长片段阴性对照。

Note: M: Trans2K PlusII marker; 1: The PCR products amplified from $\Delta B0118$ by the primers YZK-F/R; 2: The PCR products amplified from pKatAPH3 by the primers YZKF/R; 3: Negative control for K_m gene; 4: The PCR products amplified from $\Delta B0118$ by the primers YZB0118F/R; 5: Positive control for *drB0118* gene; 6: Negative control for *drB0118* gene; 7: The fusion fragments from $\Delta B0118$ by the primers QB0018F/R; 8: Positive control for fusion fragments; 9: Negative control for fusion fragments.

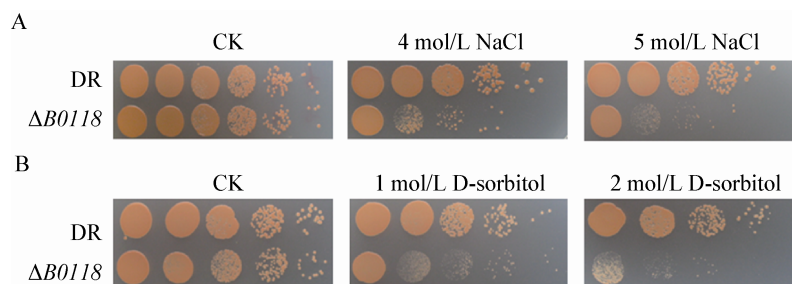


图 4 不同浓度 NaCl (A) 和山梨糖醇(B) 处理对突变株 $\Delta B0118$ 和野生型 DR 生长的影响

Figure 4 Effects of the different concentration NaCl (A) and D-sorbitol (B) on the growth of the mutant $\Delta B0118$ and *D. radiodurans* R1

NaCl 处理 4 h 后, $\Delta B0118$ 对盐的敏感性高于野生型 DR 菌株, 5 mol/L NaCl 处理 4 h 后, 突变株 $\Delta B0118$ 对盐冲击更加敏感。用 1 mol/L 或 2 mol/L 山梨醇处理 4 h 后, 菌株的生长情况与 NaCl 冲击结果类似。上述结果表明 DRB0118 蛋白在 DR 菌株抵抗盐和渗透胁迫过程中发挥重要作用。

2.4 *drB0118* 基因缺失导致细胞抗氧化能力减弱

为研究 DRB0118 蛋白对菌体抗氧化能力的影响, 本实验对野生型 DR 和突变株 $\Delta B0118$ 进行了不同浓度 H_2O_2 冲击和存活率测定。结果显示, 正常培养条件下(未加 H_2O_2), DR 和 $\Delta B0118$ 生长保持一致; 用 60 mmol/L H_2O_2 处理菌株 30 min 后, 突变株 $\Delta B0118$ 耐受能力较野生型 DR 下降 3 个数量级, 当 H_2O_2 浓度达到 80 mmol/L 时, 突变株 $\Delta B0118$ 几乎全部死亡(图 5A)。图 5B 结果表明, 40 mmol/L H_2O_2 冲击下, 两者的存活率都在 75% 以上; 60 mmol/L H_2O_2 条件下, 突变株 $\Delta B0118$ 在 30 min 内存存率明显下降, 存活率不到 30%, 而野生型 DR 菌株仍达到 87%; 当 H_2O_2 浓度增加至 80 mmol/L 时, 突变株 $\Delta B0118$ 的生存率急剧下降不足 10%, 增加至 100 mmol/L 时, 突变株 $\Delta B0118$ 不能正常生长, 而野生型菌株 DR 大约依然保留 70% 的存活率。由此可见, 随着 H_2O_2 浓度的逐渐增加, *drB0118* 的缺失导致细胞对氧化胁迫更加敏感。研究结果表明, *drB0118* 基因的缺失降低了 DR 菌株抗氧化损伤的能力, 对 *D. radiodurans* R1 的抗氧化机制起着重要作用。

2.5 氧化胁迫对 *drB0118* 基因表达水平的影响

过氧化氢冲击和存活率试验显示(图 5), *drB0118* 基因的缺失降低了菌株抗氧化损伤的能力, 表明 *drB0118* 基因对 DR 菌的抗氧化机制可能起着重要的作用。为研究 *drB0118* 基因在氧化胁迫中的作用, 本研究分析了转录水平上野生型和突变株 $\Delta B0118$ 中参与氧化胁迫抗性相关基因在正常条件和 100 mmol/L 过氧化氢冲击(30 min)下的相对表达量。结果显示, 在正常培养条件下, 氧化抗性基因包括编码过氧化氢酶 KatE、关键调控因子 OxyR、过氧化物酶 Pod 和超氧化物歧化酶 SodC 的基因表达量与野生型相比无显著性差异(图 6A)。过氧化氢处理后, *drB0118* 基因缺失并没有引起 *sodC* 和 *katE* 基因表达量的较大幅度的变化, 但导致了过氧化物酶 *pod* 基因和转录因子 *oxyR* 基因发生了约 4 倍和 10 倍的下调(图 6B)。

3 讨论

绝大多数生物体在含有自由基的环境中均会受到活性氧(ROS)的破坏。ROS 是有毒物质, 破坏细胞组分, 导致脂质过氧化、蛋白氧化和 DNA 损伤。耐辐射异常球菌具有超强的抗氧化保护机制, 该菌细胞内存在多种抗氧化酶, 其中过氧化氢酶(KatE)、超氧化物歧化酶(SodC)和过氧化物酶(Pod)等均可防止 ROS 的产生^[17]。耐辐射异常球菌中 *drB0118* 基因编码的蛋白与复苏植物属(*Craterostigma plantagineum*)干燥抗性相关蛋白高

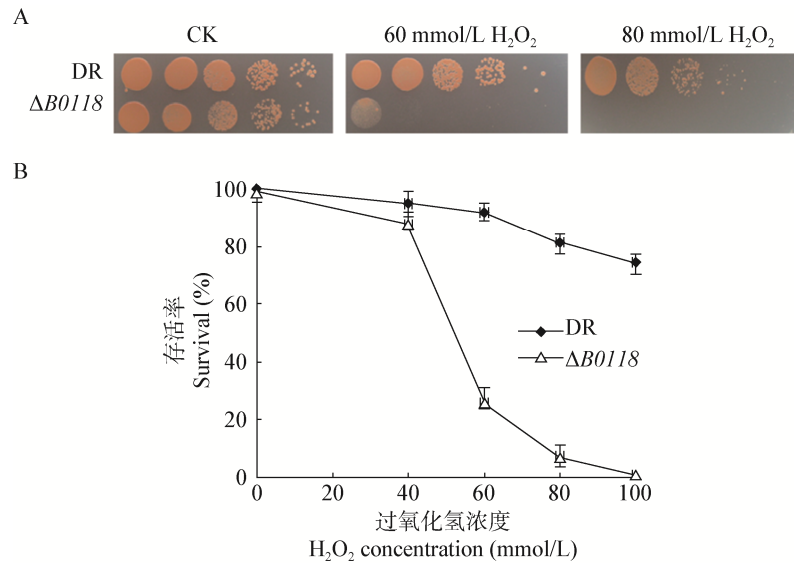


图5 不同浓度 H₂O₂ 冲击对突变株 ΔB0118 和野生型 DR 的生长影响(A)及生存率比较(B)
Figure 5 Growth and survival curves for *D. radiodurans* R1 and mutant ΔB0118 following exposure to H₂O₂

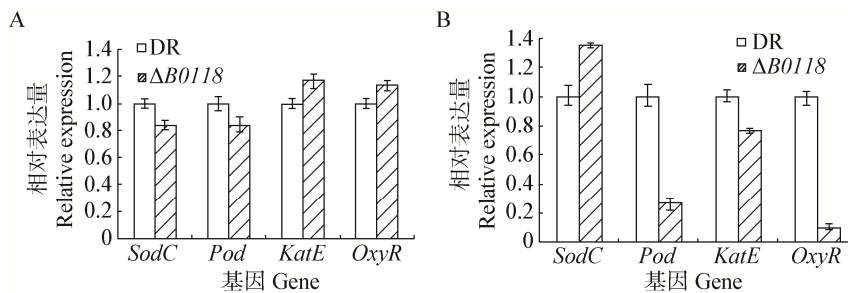


图6 耐辐射异常球菌 DR 与突变株 ΔB0118 在正常条件下(A)和 H₂O₂ 冲击下(B)氧化胁迫相关基因的表达情况
Figure 6 The relative expression of oxidative resistance genes in *D. radiodurans* R1 compared mutant strains under normal condition (A) and H₂O₂ stress (B)

度同源。已有研究表明, 复苏植物可以耐受极端干旱环境, 甚至在失去自身水分 95% 时仍可长时间存活^[18-20]。本研究结果显示 *drB0118* 基因的缺失导致细胞对 NaCl、D-sorbitol 和 H₂O₂ 胁迫敏感。转录分析也发现 *drB0118* 基因的缺失引起过氧化物酶基因 *pod* 和转录因子基因 *oxyR* 表达发生了约 4 倍和 10 倍的下调, 表明 DRB0118 蛋白直接或间接参与 *D. radiodurans* R1 高盐、高渗和氧化胁迫反应。

OxyR 调节子是最早发现的细菌抗氧化防御系统之一, 参与了细菌抗氧化作用、致病性及铁代谢等多种生理代谢作用^[21-22]。已报道大肠杆菌 OxyR 调节子参与铁代谢的 *dps* 基因编码的 Dps 蛋白能以

Fe(OH)₃ 的形式储存 Fe²⁺, 从而降低了胞内游离 Fe²⁺ 浓度, 间接降低了 H₂O₂ 产生的危害^[23]。生物信息学分析发现, DRB0118 属于铁蛋白 2 超家族 (Ferritin_2 superfamily)。铁蛋白 (Ferritin) 广泛存在于动物、植物和微生物体内, 在细胞内大量储存既可以被生物体利用, 又能抵抗极端环境^[24-26]。所有的铁蛋白在有氧条件下均与溶液中的二价铁离子反应, 铁离子螯合在内部的空心结构中, 抑制铁氧化反应, 保护细胞不受铁过量引起的氧化损害; 并且亚铁氧化中心能利用 Fenton 反应的反应物阻止 ROS 的产生, 所以铁蛋白具有抗氧化功能^[27-29]。

本研究初步证实 *Deinococcus radiodurans* R1

中 DRB0118 蛋白在高盐、高渗和氧化胁迫反应中发挥重要作用, 该编码基因的功能尚需进一步通过构建 $\Delta B0118$ 的功能回补菌株进行验证。同时, DRB0118 蛋白预测为铁结合蛋白, 可能通过结合游离亚铁离子来维持细胞内铁离子的动态平衡, 消除 Fe^{2+} 和 H_2O_2 发生反应而对细胞产生损伤。因此, 仍需对 DRB0118 蛋白在参与了铁离子转运过程、维持铁离子稳态和氧化保护上进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Battista JR, Earl AM, Park MJ. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation[J]. Trends in Microbiology, 1999, 7(9): 362-365
- [2] Bauermeister A, Hahn C, Rettberg P, et al. Roles of DNA repair and membrane integrity in heat resistance of *Deinococcus radiodurans*[J]. Archives of Microbiology, 2012, 194(11): 959-966
- [3] Brim H, McFarlan SC, Fredrickson JK, et al. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(1): 85-90
- [4] Hua Y, Narumi I, Gao G, et al. Ppr1: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 306(2): 354-360
- [5] Potts M. Desiccation tolerance: a simple process[J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(11): 553-559
- [6] Hansen JM, Go YM, Jones DP. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2006, 46: 215-234
- [7] Mattimore V, Battista JR. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(3): 633-637
- [8] Slade D, Radman M. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011, 75(1): 133-191
- [9] Bauermeister A, Moeller R, Reitz G, et al. Effect of relative humidity on *Deinococcus radiodurans*' resistance to prolonged desiccation, heat, ionizing, germicidal, and environmentally relevant UV radiation[J]. Microbial Ecology, 2011, 61(3): 715-722
- [10] Wang P, Schellhorn HE. Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1995, 41(2): 170-176
- [11] Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, et al. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(1): 44-79
- [12] Sgherri CLM, Loggini B, Boichichio A, et al. Antioxidant system in *Boea hygrosopica*: changes in response to desiccation and rehydration[J]. Phytochemistry, 1994, 37(2): 377-381
- [13] Battista JR, Park MJ, McLemore AE. Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation[J]. Cryobiology, 2001, 43(2): 133-139
- [14] Fredrickson JK, Li SM, Gaidamakova EK, et al. Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance?[J]. The ISME Journal, 2008, 2(4): 393-403
- [15] Bertani G. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1951, 62(3): 293
- [16] Joshi B, Schmid R, Altendorf K, et al. Protein recycling is a major component of post-irradiation recovery in *Deinococcus radiodurans* strain R1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 320(4): 1112-1117
- [17] Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2012, 190(4): 1157-1195
- [18] Bartels D. Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*[J]. Integrative and Comparative Biology, 2005, 45(5): 696-701
- [19] Gaff DF. Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa[J]. Science, 1971, 174(4013): 1033-1034
- [20] Rodriguez MCS, Edsgård D, Hussain SS, et al. Transcriptomes of the desiccation-tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*[J]. The Plant Journal, 2010, 63(2): 212-228
- [21] Henderson IR, Owen P. The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and OxyR[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(7): 2132-2141
- [22] Anjem A, Varghese S, Imlay JA. Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2009, 72(4): 844-858
- [23] Chen H, Xu G, Zhao Y, et al. A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in *Deinococcus radiodurans*[J]. PLoS One, 2008, 3(2): e1602
- [24] Strozycycki PM, Szymanski M, Szczurek A, et al. A new family of ferritin genes from *Lupinus luteus*-comparative analysis of plant ferritins, their gene structure, and evolution[J]. Molecular Biology and Evolution, 2010, 27(1): 91-101
- [25] Lobreaux S, Briat JF. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development[J]. Biochemical Journal, 1991, 274: 601-606
- [26] Liu BJ, Zhang WB. Structure, function and expression regulation of ferritin[J]. Feed Industry, 2009, 30(4): 42-47 (in Chinese)
刘宝娟, 张文兵. 铁蛋白的结构、功能及表达调控[J]. 饲料工业, 2009, 30(4): 42-47
- [27] Theil EC. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms[J]. Annual Review of Biochemistry, 1987, 56(1): 289-315
- [28] Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. Cellular Signalling, 2012, 24(5): 981-990
- [29] Ravet K, Touraine B, Boucherez J, et al. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2009, 57(3): 400-412