

研究报告

变铅青链霉菌广谱胁迫蛋白对氧化压力响应的研究

熊康丽 浦天宁 梁晶丹 汪志军*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200030)

摘要: 【目的】广谱胁迫蛋白(USP)是一种古老的蛋白家族,在链霉菌属细菌中其功能研究尚未报道。以变铅青链霉菌 USP 蛋白为对象对其功能进行解析。【方法】使用序列比对的方法分析同源性及保守结构域。纯化 USP 蛋白,用圆二色谱分析蛋白与环腺苷酸(cAMP)的结合对 *usp* (SLI_7517)进行基因中断。检测野生型和 *usp* 基因缺失株对偶氮二甲酰胺造成的氧化压力的耐受能力。使用 qPCR 荧光定量分析技术,检测野生型菌株与 *usp* 缺失株在氧化环境中谷胱甘肽过氧化物酶及巯基过氧化物酶基因转录量的差异。【结果】同源序列分析表明链霉菌属来源的 USP 蛋白序列相互之间相似性较高,USP-like 结构域高度保守。USP 蛋白在体外结合 cAMP 引起 CD 谱的变化。*usp* 基因缺失株对偶氮二甲酰胺更耐受,同时菌株中谷胱甘肽过氧化物酶基因转录量上升。【结论】变铅青链霉菌中 USP 蛋白能够结合 cAMP。*usp* 参与菌体应对氧化环境的调控,对谷胱甘肽过氧化物酶基因的转录有阻遏作用。

关键词: 变铅青链霉菌, 广谱胁迫蛋白, 环腺苷酸, 谷胱甘肽过氧化物酶

Response of universal stress protein from *Streptomyces lividans* 1326 to oxidative stress

XIONG Kang-Li PU Tian-Ning LIANG Jing-Dan WANG Zhi-Jun*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: [Objective] Universal stress protein (USP) belongs to an ancient protein family. In *Streptomyces*, its physiological function has not been reported yet. This work focused on the protein particularly. [Methods] Sequence alignment was performed. The association between cAMP and USP was detected using circular dichroism spectroscopy. The *usp* gene (SLI_7517) was also disrupted.

Foundation item: The Tang Berkeley Scholarship; National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2015CB554203, 2012CB721004); National Natural Science Foundation of China (No. 31470830, 31121064); Natural Science Foundation of Shanghai (No. 14ZR1421500); National Program of Development of Transgenic New Species of China; Shanghai Pujiang Program (No. 14PJD019); International Cooperation and Exchange Program of Shanghai Jiao Tong University

*Corresponding author: Tel: 86-21-62932943; E-mail: wangzhijun@sjtu.edu.cn

Received: March 29, 2016; Accepted: June 03, 2016; Published online (www.cnki.net): June 21, 2016

基金项目: 伯克利唐氏奖学金; 国家重点基础研究发展规划(973 计划)(No. 2015CB554203, 2012CB721004); 国家自然科学基金项目(No. 31470830, 31121064); 上海自然科学基金项目(No. 14ZR1421500); 国家转基因生物新品种培育项目; 上海浦江人才计划项目(No. 14PJD019); 上海交通大学国际合作与交流项目

*通讯作者: Tel: 86-21-62932943; E-mail: wangzhijun@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-03-29; 接受日期: 2016-06-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-21

Susceptibility of wild-type and the *usp* disruption mutant strains to the thiol oxidant, diamide, was analyzed. qPCR was conducted to detect the expression differences of glutathione peroxidase and thiol peroxidase genes between the wild-type and *usp* disruption mutant strains. **[Results]** USP from different *Streptomyces* species shares 90% similarity, with the highly conserved USP-like domain. The alteration of USP CD spectra was observed when USP was mixed with cAMP. Tolerance to diamide increased after *usp* was knocked out. The transcription level of glutathione peroxidase gene was up-regulated in the *usp* disruption mutant. **[Conclusion]** USP protein from *Streptomyces lividans* 1326 can bind to cAMP. It might be involved in the regulation process, that suppresses the transcription of glutathione peroxidase when the bacteria exposed to oxidative environment.

Keywords: *Streptomyces lividans* 1326, Universal stress protein, cAMP, Glutathione peroxidase

广谱胁迫蛋白(Universal stress proteins, USPs)是一类进化上比较保守和古老的蛋白家族,广泛存在于细菌、古菌及真核生物中^[1-3]。对大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的6种同源USP蛋白功能研究发现,当细菌遭遇多种外界压力,如热休克、饥饿环境、氧化环境以及紫外暴露时^[4],会触发USP的表达,进而通过多种分子机制调节菌体在这些环境下的生存能力。大肠杆菌的USP蛋白分别应对不同压力环境,同时也与细菌的运动性、离子清除以及附着性有关^[5-6]。在结核分枝杆菌中,USP过表达后菌体表现出对于异烟肼(常用于治疗肺结核的药物)的敏感性^[7-8],且多种调控蛋白表达量升高^[8]。此外,USP对cAMP(环腺苷酸)这一信号分子表现出很高的亲和性。USP蛋白可以通过结合cAMP对其起到蓄积作用,进而调节细胞内cAMP浓度的平衡^[3,9]。因此,USP蛋白将信号传导与转录调控联系起来,其功能对于微生物的代谢可能

起到至关重要的作用^[10]。

链霉菌中USP蛋白生理功能的研究鲜有报道。链霉菌作为一种主要的抗生素产生菌^[11],是非常重要的微生物资源,其研究价值不言而喻。研究选取变铅青链霉菌1326(*Streptomyces lividans* 1326)中一种USP蛋白(GenBank登录号:EOY52220.1)作为研究对象,进行了USP蛋白同源性分析,经圆二色谱分析检测,USP与cAMP相互作用。对该蛋白的*usp*基因(SLI_7517)进行中断,使用偶氮二甲酰胺(Diamide, 硫醇氧化剂)处理菌株。比较*usp*缺失对细菌在氧化压力环境下存活率的影响,并定量分析清除氧化压力相关的谷胱甘肽过氧化物酶和硫醇过氧化物酶基因转录水平的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 详见表1。

表1 菌种和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strains or plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	Wild type	Our lab
XKL1	<i>usp</i> deletion, <i>aac(3)IV</i>	This work
<i>Escherichia coli</i> DH10B	<i>F⁻</i> , <i>recA</i> , <i>lacZ</i> , <i>Am15</i>	Our lab
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>F⁻</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>rBB⁻mB⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Our lab
<i>Escherichia coli</i> ET12567 (pUZ8002)	<i>cml</i> , <i>kan</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsds</i> , <i>Tra⁺</i> , pUZ8002	[12]
pET-28a	N-His, N-Thrombin, N-T7, C-His, <i>kan</i>	Our lab
pJTU1278	<i>oriT</i> , <i>repA</i> , <i>amp</i> , <i>lacZ</i>	[13]
pXKL	Derivated from pJTU1278, <i>aac(3)IV</i>	This work

1.1.2 主要试剂和仪器：限制性内切酶、反转录试剂盒、Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司；卡那霉素(50 g/L)、氯霉素(25 g/L)、安普霉素(50 g/L)、氨苄青霉素(100 g/L)、萘啶酮酸(25 g/L)以及 IPTG (1 mmol/L)购于福建省福抗药业股份有限公司；胶回收试剂盒购于美国 Omega Bio-Tek 公司；KOD 酶购于纽英伦生物技术(北京)有限公司；*rTaq* 酶购于宝生物工程(大连)有限公司；RNA 提取试剂盒购于北京赛百盛基因技术有限公司；天冬酰胺、半胱氨酸、甲硫氨酸以及谷氨酸购于上海生工生物股份有限公司；cAMP 及偶氮二甲酰胺购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司；Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购于北京天根生化科技有限公司。其余生化试剂和药品均为分析纯。3 kD 超滤管，美国默克密理博(Merck millipore)公司；J-810 型圆二色谱仪，日本分光株式会社(JASCO)；7500 实时定量 PCR 仪，美国应用生物系统公司；AH1500 超高压细胞破碎机，ATS 工业系统有限公司。

1.1.3 培养基：用于细菌常规培养的 LB 培养基(g/L)：胰蛋白胨 10.0，酵母提取物 5.0，NaCl 10.0，pH 7.2。用于链霉菌种子培养的 TSBY 培养基(g/L)：胰蛋白胨 30.0，蔗糖 340.0，酵母抽提物 5.0，pH 7.8^[13]。用于链霉菌预萌发的培养基(g/100 mL)：Difco 水解酪蛋白氨基酸 1.0，调 pH 至 8.0。用于配制 MMT 培养基的 MM 培养基(g/L)：L-天冬酰胺 0.5，K₂HPO₄·3H₂O 0.638，MgSO₄·7H₂O 0.2，FeSO₄·7H₂O 0.01，pH 7.2；配置好后，分装并加入琼脂 2 g/200 mL。用于链霉菌存活率测定的 MMT 固体培养基：MM 培养基 1 L，补加葡萄糖(50%) 4 mL，酪氨酸(0.7%) 10 mL，水解酪蛋白氨基酸(30%) 4 mL，CuCl₂·2H₂O (10 g/L) 0.2 mL，L-甲硫氨酸(149 g/L) 1 mL。链霉菌预萌发培养基(g/100 mL)：酵母抽提物 1.0，Difco 水解酪蛋白氨基酸 1.0。大肠杆菌培养基 1.1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。所有链霉菌培养基以及 MMT 培养基补加成分，0.95×10⁵ Pa 灭菌 30 min 后使用。

1.1.4 引物：研究所用引物均由上海杰李生物技术有限公司合成，见表 2。

表 2 PCR 引物及其序列	
Table 2 PCR primers and sequence	
引物 Primers	碱基序列 Base sequence (5'→3')
<i>usp-Nde</i> I-F*	GGGAATTC <u>CATATG</u> ATGACGCGCCCGATCACGGC
<i>usp-Xho</i> I-R*	CCGCTCGAGTCACCTGTGCGGGACCAACCG
<i>usp-L-arm-Bam</i> H I-F*	CGCGGATCCGCACCCGGATGTTGG
<i>usp-L-arm-Hind</i> III-R*	CCCAAGCTTGCGGGTCCCTCCCTG
<i>usp-R-arm-Hind</i> III-F*	AAAAAGCTTGCGGTGCTCCAGCAGC
<i>usp-R-arm-Kpn</i> I-R*	CGGGGTACCAACACCTGCCCCGACGCCGGGGT
16S rRNA-F	AGTAACACGTGGGCAACTGC
16S rRNA-R	CTCAGACCAGTGTGGCCGGT
qPCR-Thiol peroxidase-F	ATGAGCGAGCGACTCCAGCC
qPCR-Thiol peroxidase-R	CTGCTTCGTGCAGCCGGGGG
qPCR-Glutathione peroxidase-F	TCAACCGGCGAGGCGTTCCT
qPCR-Glutathione peroxidase-R	GACGCCGAGGGCCACAGCGG

注：标有下划线的碱基序列为限制酶切位点。
Note：Underline sequences are cleavage sites of restriction enzyme.

1.2 实验方法

1.2.1 变铅青链霉菌 1326 的培养: (1) 孢子培养: 接种孢子液到 SFM 平板, 在 30 °C 倒置培养 5 d 至完全产孢后用棉签刮下孢子, 保存至 20% 甘油冻存到 -30 °C。(2) 菌丝体液体培养: 将适量孢子接种到 TSBY 培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 至对数期得到菌丝体菌液。

1.2.2 变铅青链霉菌 1326 的 USP 蛋白异源表达及纯化: 在 *usp* 基因 N 端和 C 端设计引物 *usp-Nde* I-F 和 *usp-Xho* I-R 分别引入 *Nde* I 及 *Xho* I 酶切位点, 经 PCR 扩增得到带有酶切位点的目的基因。酶切回收后与同样酶切处理的载体 pET-28a 连接得到重组质粒, 使得 USP 蛋白 N 端带有 His 标签^[14]。测序验证(技术服务由上海杰李生物技术有限公司提供)正确后转化到大肠杆菌 BL21(DE3)进行蛋白表达。以 1:100 体积比接种到 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 培养至对数生长期以 1:1 000 体积比加入 20% IPTG 诱导表达, 16 °C 培养 16 h。5 000 r/min 离心 10 min 收集过表达菌株。以 Ni buffer A (50 mmol/L 咪唑、150 mmol/L NaCl、25 mmol/L Hepes 和 10% 甘油, pH 8.0)重悬菌体。用细胞破碎机在 800 MPa 压力下破碎 5 min。15 000 r/min 离心 30 min 收集上清液。上清加到经 Ni buffer A 平衡后的 Ni 柱中。用 Ni buffer A 冲洗未结合 Ni 柱的蛋白质, 然后用 Ni buffer B (500 mmol/L 咪唑、150 mmol/L NaCl、25 mmol/L Hepes 和 10% 甘油, pH 8.0)洗脱目标蛋白^[15]。将目标蛋白洗脱液再加载到 Heparin 柱上, 用 Heparin buffer A (150 mmol/L NaCl、25 mmol/L Hepes 和 1% 甘油, pH 8.0)冲洗未特异性结合填料的蛋白以及 Heparin buffer B (2 mol/L NaCl、25 mmol/L Hepes 和 1% 甘油, pH 8.0)洗脱目标蛋白。目标蛋白溶液在透析液(50 mmol/L Hepes 和 50 mmol/L NaCl, pH 8.0)透析 3 h 后用 3 kD 超滤管超滤浓缩至终浓度 1 g/L, 用蛋白浓度测定试剂盒进行浓度测定^[15]。

1.2.3 USP 蛋白与 cAMP 结合的圆二色谱检测: 将 200 μ L 的 USP 蛋白溶液(0.8 g/L)与 200 μ L 的

cAMP 溶液(50 μ mol/L)混匀, 在 4 °C 条件下反应 5 h。取 200 μ L 加入到石英检测皿中, 放入圆二色光谱仪。扫描 190–300 nm 紫外波长, 得到相应波长处对应的 CD 值, 可信范围为 ± 100 mdeg^[16-17]。将样品进行 10 倍梯度稀释直到出现稳定的 CD 信号图谱。

1.2.4 变铅青链霉菌 1326 中 *usp* 基因中断: 以变铅青链霉菌 1326 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到 *usp* 基因左右各 1.5 kb 长的同源臂^[13]。*usp* 左边 1.5 kb 为左臂, 引入酶切位点 *Bam*H I 及 *Hind* III, 引物为 *usp-L-arm-Bam*H I-F 和 *usp-L-arm-Hind* III-R; *usp* 右边 1.5 kb 为右臂, 引入 *Hind* III 及 *Kpn* I, 引物为 *usp-R-arm-Hind* III-F 和 *usp-R-arm-Kpn* I-R。PCR 并酶切回收, 与经 *Bam*H I 及 *Kpn* I 酶切处理回收的 pJTU1278 连接, 转化至大肠杆菌 DH10B 扩增质粒。将测序正确的质粒进行 *Hind* III 酶切处理并回收后与经 *Hind* III 酶切的安普霉素抗性片段 *aac*(3)*IV* 连接。再转化到大肠杆菌 DH10B 扩增带有同源臂以及抗性筛选标记的重组质粒 pXKL1。将质粒 pXKL1 转化到大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 中^[18]。转化后的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 与变铅青链霉菌 1326 新鲜孢子混匀涂板。30 °C 培养 12 h 后加入萘啶酮酸及安普霉素覆盖。30 °C 培养 3 d 后挑取单克隆。以单克隆菌落为模板, 在 *usp* 上下游 200 bp 处设计验证引物 *usp-del*F 和 *usp-del*R, 进行 PCR 筛选出发生双交换的单克隆, 命名为 XKL1。

1.2.5 偶氮二甲酰胺处理变铅青链霉菌 1326 及 XKL1 的存活率测定: 将变铅青链霉菌 1326 及 XKL1 新鲜孢子用 TES 缓冲液清洗, 使孢子数量达到 $(1.0-4.0) \times 10^7$ CFU/mL。将孢子吹吸混匀后, 放入 50 °C 水浴锅中热激 10 min。取 1 mL 热激后的孢子溶液, 加入 1 mL 链霉菌预萌发培养基, 2 μ L 5 mol/L CaCl_2 混合, 放入 37 °C、200 r/min 培养 2.5 h。预萌发后洗涤 3 次, 连续 10 倍稀释两次, 第 2 次 10 倍稀释使得最后体积为 900 μ L, 分别加入 100 μ L 不同浓度的偶氮二甲酰胺(15、30、

45 mmol/L) 溶液^[19-20], 混匀后放入 30 °C、200 r/min 培养 1 h。将处理后的孢子溶液连续 3 次 10 倍稀释, 涂布于 MMT 平板上。放置 30 °C 培养 3 d 后菌落计数, 以处理后的菌落总数除以空白对照组菌落总数, 即为该处理浓度下菌体存活率。

1.2.6 偶氮二甲酰胺处理变铅青链霉菌 1326 及 XKL1 后 qPCR 检测过氧化物酶基因表达量:将变铅青链霉菌 1326 及 XKL1 菌株培养至对数期, 进行偶氮二甲酰胺处理, 处理终浓度为 1.5 mmol/L 和 3 mmol/L^[19-20]。30 °C、200 r/min 培养 1 h 后 4 °C、15 000 r/min 离心 15 min 收集菌体。用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。以此 RNA 为模板, 用反转录试剂盒反转录合成 cDNA。反转录 20 μ L 体系: RNA 样品 11 μ L, 随机引物(10 μ mol/L) 1 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L, 5 \times RT buffer 4 μ L, Ribolock RI (RNA 酶抑制剂) 1 μ L, RevertAidH Mimus RT (RNA 反转录酶) 1 μ L。反转录反应条件: 25 °C 5 min (随机引物与模板结合), 42 °C 60 min (cDNA 合成), 72 °C 10 min (终止反应)。选择 16S rRNA 基因作为内参基因, 设计 PCR 产物长 150 bp 的引物 16S rRNA-F 和 16S rRNA-R。取谷胱甘肽过氧化物酶和巯基过氧化物酶基因 150 bp 序列, 设计各自荧光定量引物 qPCR-Glutathione peroxidase-F 和 qPCR-Glutathione peroxidase-R, 以及 qPCR-Thiol peroxidase-F 和 qPCR-Thiol peroxidase-R (表 2)。用 SYBR Green/ROX 荧光定量试剂盒, 以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR (ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 系统)。荧光定量 PCR 反应体系 (25 μ L): Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 \times) 12.5 μ L, 正向引物(1.25 μ mol/L)与反向引物(1.25 μ mol/L)混合物 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 去离子水 10.5 μ L。荧光定量 PCR 反应条件: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环^[21-22]。

2 结果与分析

2.1 变铅青链霉菌 USP 蛋白序列分析及功能预测在变铅青链霉菌 1326 中共有 14 个 USP 的同源

蛋白质, 相互之间相似性为 40%–45%。选择其中一种 USP 同源蛋白(EOY52220.1)进行分析, 该蛋白与其他链霉菌来源的 USP 蛋白相似性高达 90% 以上。因此认为该蛋白可能是链霉菌属中较为保守的 USP 蛋白。在变铅青链霉菌 1326 中, 该 *usp* 基因开放阅读框大小为 873 bp, 编码 291 个氨基酸, 预测蛋白质大小为 30.0 kD。

NCBI Protein BLAST 分析表明, 该 USP 蛋白含有 cd00293 结构域, 为广谱胁迫蛋白家族保守结构域。在不同种属间进行序列分析比对, 来源于变铅青链霉菌 1326 与来源于天蓝色链霉菌 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)] 以及紫色链霉菌 NRRL S-12 [*Streptomyces violaceoruber* NRRL S-12] 的 USP 蛋白序列相似性高达 90% 以上。而在结核分枝杆菌 [*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv] 中, 二者的相似性仅为 45%。以上 4 种来源的 USP 蛋白共同的 USP-like 结构域同源性较高, 这一结构域有结合 cAMP 的结合位点, 推测变铅青链霉菌 1326 的 USP 蛋白能够结合 cAMP (图 1)。

2.2 cAMP 与 USP 蛋白的相互作用研究

在大肠杆菌中异源表达纯化后的 USP 蛋白溶液, 加入 cAMP 溶液反应后, 用圆二色谱仪进行检测。在远紫外区, 蛋白质肽键的圆二色性可以用来分析蛋白质的二级结构。在未加入 cAMP 以及只加入 cAMP 的对照组中, CD 谱在 205 nm 处有一负值的 CD 谱带, 而加入 cAMP 后该谱带由负偏振转向正值 (图 2)。说明 cAMP 能够结合 USP 并导致 USP 蛋白质二级结构发生变化, 从而引起了 CD 值的偏振改变。推测变铅青链霉菌 1326 的这一 USP 蛋白同样存在环腺苷酸结合位点, 能够与 cAMP 在体外发生结合。

2.3 氧化压力对变铅青链霉菌 1326 野生型与 XKL1 菌株存活率的影响

将变铅青链霉菌 1326 *usp* 基因中断后, 比较野生型菌株和 *usp* 缺失菌株 XKL1 不同偶氮二甲酰胺处理浓度(0、1.5、3.0、4.5 mmol/L)下细菌的存活率 (图 3)。对于野生型来说, 细菌在 1.5 mmol/L 的偶氮二甲酰胺处理时并未受到较大影响, 存活率与

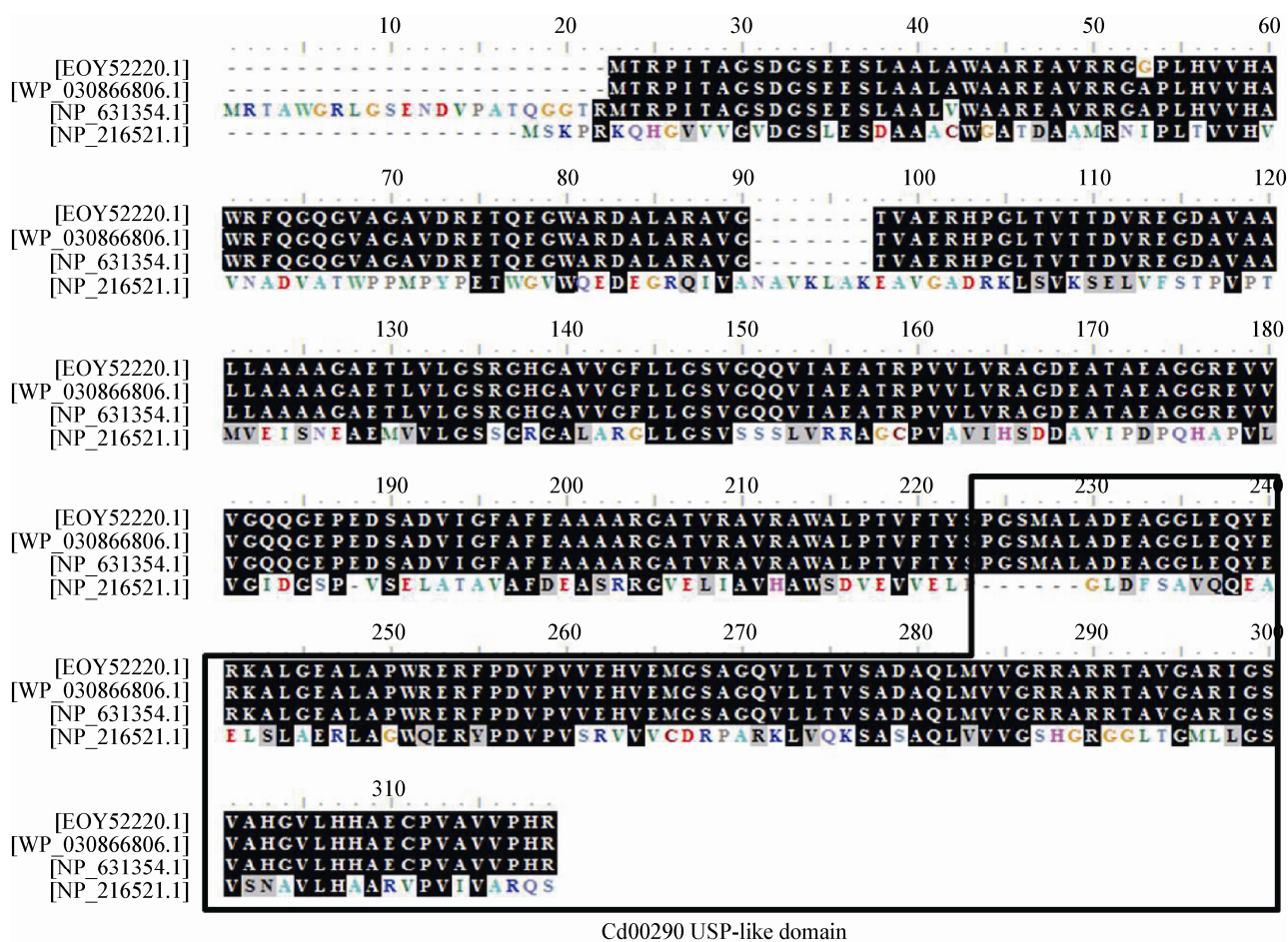


图1 USP 蛋白同源蛋白序列比对分析

Figure 1 Amino acid sequence alignment analysis for USPs from different species

注：EOY52220.1 来源于变铅青链霉菌 1326；WP_030866806.1 来源于紫色链霉菌 NRRL S-12；NP_631354.1 来源于天蓝色链霉菌 A3(2)；NP_216521.1 来源于结核分枝杆菌 H37Rv.

Note: EOY52220.1 from *S. lividans* 1326; WP_030866806.1 from *S. violaceoruber* NRRL S-12; NP_631354.1 from *S. coelicolor* A3(2); NP_216521.1 from *M. tuberculosis* H37Rv.

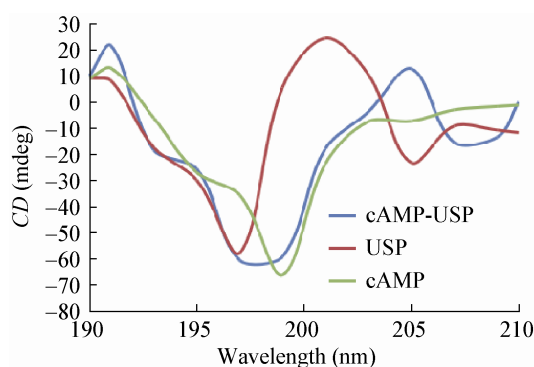


图2 圆二色谱分析 USP 与 cAMP 的结合

Figure 2 Analysis of binding between USP and cAMP by circular dichroism spectroscopy

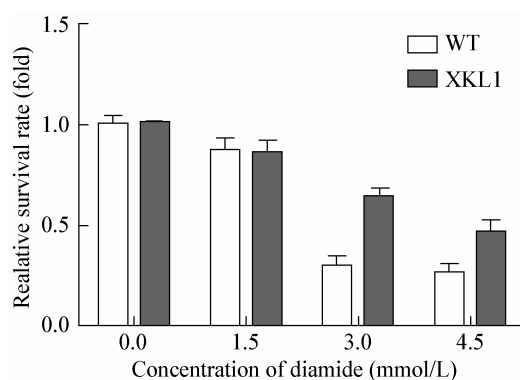


图3 WT 和 XKL1 的偶氮二甲酰胺的敏感性测试

Figure 3 Sensibility test of WT and XKL1 strains to diamide

对照组相比几乎不变。而当偶氮二甲酰胺浓度升高到 3 mmol/L 时, 细菌存活率迅速下降至对照组的 30%。而同样浓度下, XKL1 存活率维持在 70%。偶氮二甲酰胺浓度继续升高至 4.5 mmol/L, 野生型存活率维持在 30%, XKL1 降至 50%。在氧化剂处理浓度逐渐升高的过程中, 野生型存活率迅速降低而 XKL1 则更加耐受。说明野生型的菌株相较 XKL1 而言对于环境中偶氮二甲酰胺更加敏感。

2.4 氧化压力对变铅青链霉菌 1326 和 XKL1 中谷胱甘肽过氧化物酶以及硫基过氧化物酶基因表达的影响

根据偶氮二甲酰胺氧化巯基的氧化作用机制, 选取谷胱甘肽过氧化物酶及硫醇过氧化物

酶, 二者可以还被氧化的巯基。使用实时荧光定量 PCR 比较对数期的野生型和 XKL1 菌株细胞内上述两种过氧化物酶基因的转录量水平(图 4)。未进行氧化剂处理时硫醇过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶在野生型及 XKL1 中转录量差异在 1.3 倍以内($P=0.004<0.01$, $P=0.017<0.05$)。在 1.5 mmol/L 偶氮二甲酰胺浓度下, 上述两种酶转录量差异均在 1.5 倍以内($P=0.002<0.01$, $P=0.006<0.01$)。当 Damide 浓度升至 3 mmol/L 时, 缺失菌株 XKL1 中谷胱甘肽过氧化物酶转录量增加至野生型的 2.8 倍($P=0.0009<0.001$)。由于谷胱甘肽过氧化物酶对氧化剂有清除作用, 其转录量的提升增强了菌株抵抗氧化环境的能力。

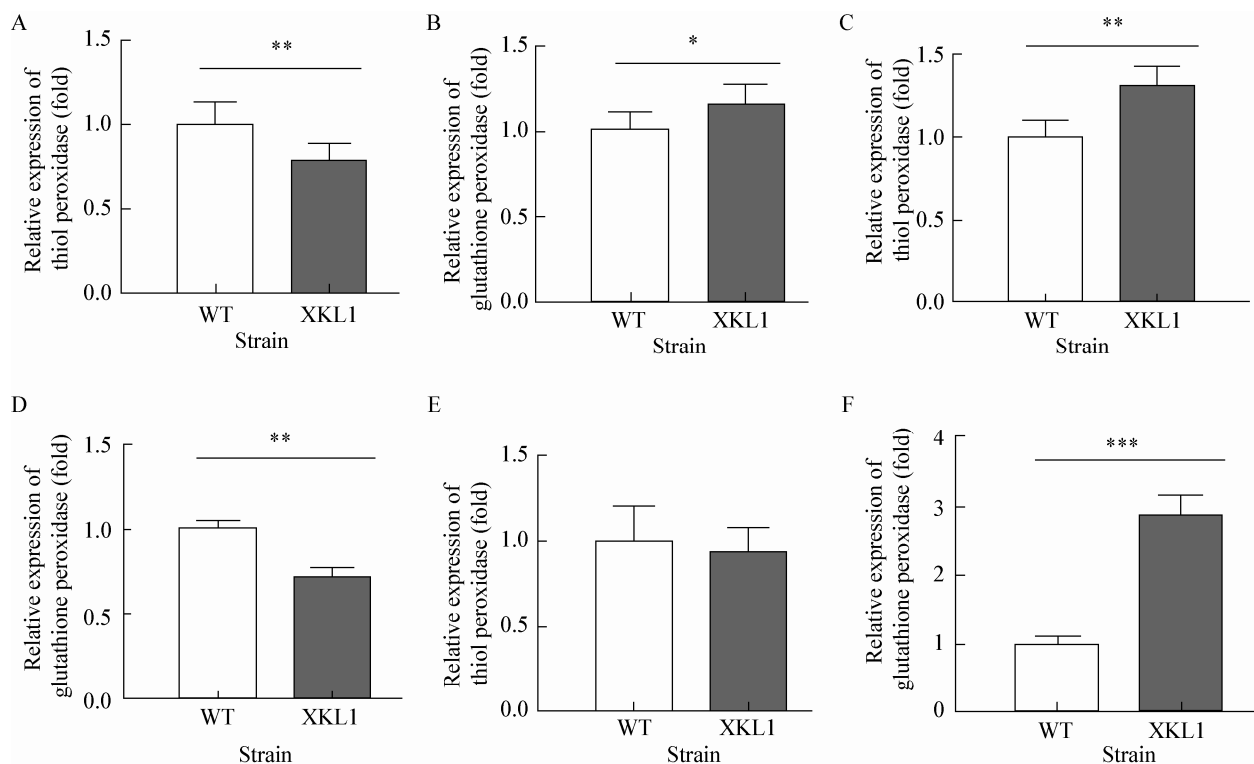


图 4 硫醇基过氧化物酶及谷胱甘肽过氧化物酶基因转录分析

Figure 4 RNA transcriptions of thiol peroxidase and glutathione peroxidase of WT and XKL1 strains

注: 野生型及 XKL1 中硫醇基过氧化物酶及谷胱甘肽过氧化物酶的转录量在偶氮二甲酰胺未处理(A、B)、1.5 (C、D) 以及 3.0 (E、F) mmol/L 处理后的变化. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

Note: Variation of RNA transcriptions of thiol peroxidase and glutathione peroxidase of WT and XKL1 strains treated by 0 (A, B), 1.5 (C, D) and 3.0 mmol/L (E, F) diamide. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

3 讨论

蛋白序列分析结果表明,不同宿主的 USP 蛋白结构域保守。推测细菌中 USP 蛋白有相似功能。cAMP 引起了变铅青链霉菌 1326 USP 蛋白圆二色谱的偏振改变,说明二者之间发生相互作用能够影响到 USP 蛋白的二级结构。推测 USP 蛋白存在与 cAMP 结合的保守氨基酸残基,cAMP 作为信号分子对细菌生长和繁殖调节起到重要作用,因此 USP 蛋白与 cAMP 的体内相互作用可能对这一过程产生影响。关于变铅青链霉菌的 USP 蛋白与 cAMP 结合的生物学意义需要进一步研究。

偶氮二甲酰胺浓度升高时,野生型细菌对于氧化压力的抵抗不及 XKL1,导致二者存活率产生差异。同时,XKL1 相比野生型,谷胱甘肽过氧化物酶基因转录量升高。因此,usp 对谷胱甘肽过氧化物酶基因的转录存在阻遏作用,这可能是 XKL1 相对野生型菌株更加耐受偶氮二甲酰胺的原因。这一结论不同于在结核分枝杆菌等细菌中发现的 USP 蛋白对氧化压力应答的正向调控。由于链霉菌与结核分枝杆菌生长环境不同,二者所面对的氧化压力不同,推测链霉菌中这种阻遏可能是细菌在应对氧化压力时防止细菌过度应激的一种缓冲。在 usp 基因缺失后,谷胱甘肽过氧化物酶基因调控不受限制,表达量可能超过清除氧化剂所需。过度表达对于细菌而言是一种浪费,在野生型细菌中,usp 基因的阻遏作用可减少这种浪费。因此,虽然 USP 家族存在共同的保守序列,变铅青链霉菌中 USP 调控细菌应对氧化压力的机制与其他宿主细菌存在差异。

参考文献

- [1] Elhosseiny NM, Amin MA, Yassin AS, et al. *Acinetobacter baumannii* universal stress protein A plays a pivotal role in stress response and is essential for pneumonia and sepsis pathogenesis[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2015, 305(1): 114-123
- [2] Nyström T, Neidhardt FC. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(21): 3187-3198
- [3] Banerjee A, Adolph RS, Gopalakrishnapai J, et al. A universal stress protein (USP) in mycobacteria binds cAMP[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(20): 12731-12743
- [4] Udawat P, Mishra A, Jha B. Heterologous expression of an uncharacterized universal stress protein gene (*SbUSP*) from the extreme halophyte, *Salicornia brachiata*, which confers salt and osmotic tolerance to *E. coli*[J]. Gene, 2014, 536(1): 163-170
- [5] Kvint K, Nachin L, Diez A. The bacterial universal stress protein: function and regulation[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(2): 140-145
- [6] Nachin L, Nannmark U, Nyström T. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(18): 6265-6272
- [7] Hu XL, Li XJ, Huang LG, et al. Quantitative proteomics reveals novel insights into isoniazid susceptibility in mycobacteria mediated by a universal stress protein[J]. Journal of Proteome Research, 2015, 14(3): 1445-1454
- [8] O'Toole R, Williams HD. Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Research in Microbiology, 2003, 154(6): 387-392
- [9] Kim DJ, Bitto E, Bingman CA, et al. Crystal structure of the protein At3g01520, a eukaryotic universal stress protein-like protein from *Arabidopsis thaliana* in complex with AMP[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2015, 83(7): 1368-1373
- [10] Antoni FA. Molecular diversity of cyclic AMP signalling[J]. Frontiers in Neuroendocrinology, 2000, 21(2): 103-132
- [11] de Lima Procópio RE, de Silva IR, Martins MK, et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*[J]. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2012, 16(5): 466-471
- [12] He YL, Wang ZJ, Bai LQ, et al. Two pHZ1358 derivative vectors for efficient gene knockout in *Streptomyces*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(4): 678-682
- [13] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetics: A Laboratory Manual[M]. Norwich, United Kingdom: John Innes Foundation, 2000: 231-232
- [14] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Journal of Molecular Biology, 1983, 166(4): 557-580
- [15] Lew MH, Lim RLH. Expression of a codon-optimised recombinant Ara h 2.02 peanut allergen in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(2): 661-671
- [16] Garbett NC, Ragazzon PA, Chaires JB. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions[J]. Nature Protocols, 2007, 2(12): 3166-3172
- [17] Ranjbar B, Gill P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses-a review[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2009, 74(2): 101-120
- [18] Lei X, Kong LX, Zhang C, et al. Function of transporter genes *fscTI* and *fscTII* in the biosynthetic cluster of candicidin/FR-008[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(12): 1458-1466 (in Chinese)
- [19] 雷旋, 孔令新, 张晨, 等. 杀念菌素/FR-008 生物合成途径中转运基因 *fscTI* 与 *fscTII* 的功能[J]. 微生物学报, 2012, 52(12): 1458-1466
- [20] Kosower NS, Kosower EM. Formation of disulfides with diamide[J]. Methods in Enzymology, 1987, 143: 264-270
- [21] Kosower NS, Kosower EM. Diamide: an oxidant probe for thiols[J]. Methods in Enzymology, 1995, 251: 123-133
- [22] Stahlberg A, Kubista M. The workflow of single-cell expression profiling using quantitative real-time PCR[J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2014, 14(3): 323-331
- [23] Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR[J]. Journal of Applied Genetics, 2013, 54(4): 391-406