



研究报告

假结核耶尔森氏菌中 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统的功能鉴定

杨昶杏¹ 孟凡能^{*2} 张文越² 杨培钰¹ 王丹丹¹ 刘兴宇³ 王瑶^{*1} 沈锡辉¹

1 旱区作物逆境生物学国家重点实验室 陕西省农业与环境微生物重点实验室 西北农林科技大学生命科学学院 陕西 杨凌 712100

2 庆阳陇沱海绵城市建设管理运营有限责任公司 甘肃 庆阳 745000

3 北京有色金属研究总院 北京 100088

摘要:【背景】毒素-抗毒素系统在微生物体内广泛存在,在微生物对抗外界不良环境方面发挥重要作用。【目的】以模式细菌假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*, *Yptb*)为材料,探究其编码的 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统的作用机制和生物学功能。【方法】通过生物信息学方法预测 *Yptb* 中编码的 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统,通过毒性分析、基因表达分析及蛋白相互作用对其进行鉴定;通过抗生素胁迫、氧胁迫、生物被膜形成等实验研究 Phd-Doc 在体内发挥的生物学功能。【结果】生物信息学分析鉴定出一对 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统,发现二者共转录且相互作用;毒素蛋白 Doc 能够引起大肠杆菌形态发生变化并抑制其生长,抗毒素蛋白 Phd 能中和 Doc 的毒性;Phd-Doc 毒素-抗毒素系统具有自调控抑制效应;*phd-doc* 的缺失对 *Yptb* 自身的生长无影响,而且毒素蛋白 Doc 在野生型 *Yptb* 内过表达并未显示毒性;*phd-doc* 在转录水平上响应了抗生素胁迫和氧胁迫,其中,对氯霉素胁迫最为敏感,但并不影响 *Yptb* 的生长;同时,Phd-Doc 能够影响 *Yptb* 的生物被膜形成能力。【结论】*Yptb* 中 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统的功能鉴定对于更好地了解在多变的外部环境下微生物的定殖和响应机制具有重要意义。

关键词: 毒素-抗毒素系统, Phd-Doc, 自体调控, 环境胁迫, 生物被膜

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901200); National Natural Science Foundation of China (31725003, 31970114, 31671292); Qingyang Longfeng Sponge City Construction Management Operation Company of Comprehensive Treatment of Xiaokongtong Gully Project (QYLF-JSY-2020029)

***Corresponding authors:** E-mail: MENG Fanneng: mengfanneng@163.com; WANG Yao: wangyao@nwsuaf.edu.cn

Received: 02-01-2021; **Accepted:** 23-03-2021; **Published online:** 31-05-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901200); 国家自然科学基金(31725003, 31970114, 31671292); 庆阳陇沱海绵城市建设管理运营公司小崆峒沟道项目综合治理项目(QYLF-JSY-2020029)

***通信作者:** E-mail: 孟凡能: mengfanneng@163.com; 王瑶: wangyao@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2021-01-02; **接受日期:** 2021-03-23; **网络首发日期:** 2021-05-31

Functional characterization of Phd-Doc toxin-antitoxin system in *Yersinia pseudotuberculosis*

YANG Changxing¹ MENG Fanneng^{*2} ZHANG Wenyue² YANG Peiyu¹
WANG Dandan¹ LIU Xingyu³ WANG Yao^{*1} SHEN Xihui¹

¹ State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Shaanxi Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

² Qingyang Longfeng Sponge City Construction Management Operation Company, Qingyang, Gansu 745000, China

³ General Research Institute for Nonferrous Metals, Beijing 100088, China

Abstract: [Background] The toxin-antitoxin system is widespread in microorganisms and plays an important role in their defense against adverse environments. [Objective] We used *Yersinia pseudotuberculosis* (*Yptb*) as the material to investigate the mechanism and biological functions of the Phd-Doc toxin-antitoxin system. [Methods] The Phd-Doc toxin-antitoxin system encoded in *Yptb* was identified by bioinformatics, and subsequently confirmed by toxicity experiment, gene expression analysis and protein interaction assay. To study the biological function of Phd-Doc toxin-antitoxin system in *Yptb*, the differences between the wild type strains and mutant strains were compared through antibiotic stressing, oxygen stressing and biofilm formation experiments. [Results] Bioinformatics analysis showed that a pair of Phd-Doc toxin-antitoxin system is present in *Yptb*, and subsequent experiments confirmed that these proteins are co-transcribed and display high affinity. The cell morphology was changed and cell growth was inhibited when the Doc toxin protein expressed in *Escherichia coli*, and these changes were rescued by the antitoxin protein Phd. The transcription level of *phd-doc* was significantly up-regulated under stress conditions, especially under the chloramphenicol stress. Deletion of *phd-doc* significantly affected the biofilm forming ability of *Yptb* but did not influence the cell growth. [Conclusion] The functional identification of the Phd-Doc toxin antitoxin system in *Yptb* is of great significance for a better understanding of the colonization and response mechanism of microorganisms under the changing external environment.

Keywords: toxin-antitoxin system, Phd-Doc, autoregulation, environmental stress, biofilm

毒素-抗毒素(Toxin-Antitoxin, TA)系统普遍存在于细菌和古菌的染色体和质粒上,该系统由2个共表达的基因组成,分别编码稳定的毒素和不稳定的抗毒素。毒素表达后通常能抑制细菌生长,但抗毒素能够中和毒素的毒性,进而对细菌起到保护作用,从而促进细菌的环境适应能力,以利于在恶劣环境中定殖。研究表明,许多染色体TA系统在极端胁迫条件下被激活。例如:在营养缺乏条件下大肠杆菌 *relEB* 模块可以被诱导激活^[1];大肠杆菌 *mazEF* 系统在应对不同种类的抗生素、高温、DNA破坏剂和氧化应激时会被过量表达^[2-3]。这些研究结果均表明,在外界环境压力下,染色体上的TA模块能够发生应激反应,以促进细菌适应多变的外界环境。目前,根据抗毒素的性质(RNA或蛋白质)和作用方式,将毒素和抗毒素系统分为八大类型^[3-4],在

这八大类型TA系统中,II型TA系统的研究最为广泛和深入。

Phd-Doc TA系统属于II型TA系统,Phd-Doc家族最初在P1噬菌体中被发现,随后在大肠杆菌基因组中也发现Phd-Doc毒素-抗毒素系统的存在。Phd-Doc模块中,毒素蛋白能使宿主细胞硬化死亡(Death on Curing),因此命名为Doc;抗毒素蛋白通过与毒素蛋白相互作用形成复合体,可防止宿主死亡(Prevent Host Death),因此命名为Phd^[5]。Phd-Doc家族是毒素-抗毒素模块中最小的家族之一,研究发现大肠杆菌中的Doc毒素蛋白与核糖体30S亚基相互作用,作为一种激酶对翻译延伸因子EF-Tu进行磷酸化,抑制翻译,在细菌应对外界压力、提高环境适应性方面具有重要作用^[6]。此外,Doc蛋白与Fic蛋白(Filamentation Induced by

cAMP)在结构上非常相似,而且在二级结构 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 之间的环中共享一个高度保守的 HXFX(D/E) (A/G)N(K/G)R 结构域^[7-9],因此,在进化上推测 Doc 蛋白家族由 Fic 蛋白家族进化而来。研究表明,许多病原细菌通过分泌 Fic 蛋白进入宿主细胞内,在细菌致病过程中发挥重要作用^[10-12],而 TA 系统毒素总是在合成它们的细胞内起作用^[13],因此,Doc 毒素的主要功能可能在于细菌的自身防御。

目前,Phd-Doc 毒素抗毒素家族在弧菌^[14]、鼠疫耶尔森氏菌^[15]、结核分枝杆菌^[16]、P1 噬菌体、大肠杆菌^[17]和一些革兰氏阳性细菌^[18]中都有相关报道。通过生物信息学分析发现,模式细菌假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*, *Yptb*)中也有一对 II 型 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统,本研究

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')
<i>doc</i> -F- <i>Bam</i> H I	CGGGATCCATGGCAGATATTGTTGAAGGG
<i>doc</i> -R- <i>Sal</i> I	ACGCGTCGACTTCTATCTTTACCTGTGTTGCAGTC
<i>phd</i> -F- <i>Bam</i> H I	CGGGATCCATGAGCCATGCACTGAAAAATG
<i>phd</i> -R- <i>Sal</i> I	ACGCGTCGACCACCTTAGAAAGTTCTTCCATTGC
<i>phd</i> -F1	ATGAGCCATGCACTGAAAAATG
<i>phd</i> -R1	CACCTTAGAAAGTTCTTCCATTGC
<i>doc</i> -F2	ATGGCAGATATTGTTGAAGGG
<i>doc</i> -R2	TTCTATCTTTACCTGTGTTGCAGTC
<i>doc</i> ^{H75A} -R1	AGCTGTTTCGTTTGTTAGCATTTGCAAAGGCGGCATTCTGGAT
<i>doc</i> ^{H75A} -F2	ATCCAGAATGCCGCCTTTGCAAATGCTAACAAACGAACAGCT
<i>phd</i> - <i>doc</i> -F- <i>Sal</i> I	ACGCGTCGACATGAGCCATGCACTGAAAAATG
<i>doc</i> -F- <i>Sal</i> I	ACGCGTCGACATGGCAGATATTGTTGAAGGGGATAC
<i>doc</i> -R- <i>Bam</i> H I	CGGGATCCTTATTCTATCTTTACCTGTGTTGCAGTC
<i>doc</i> -up-F1- <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGGCTGGCTGGAAGGTGATTTACG
<i>doc</i> -up-R1	GTTGCAGTCACTACTAGAGAATAATGTATCCCTTCAACAATATC
<i>doc</i> -down-F2	GATATTGTTGAAGGGATACATTATTCTCTAGTAGTGACTGCAAC
<i>doc</i> -down-R2- <i>Bgl</i> II	GAAGATCTATTGGGTAGCATCACCCCCG
<i>phd</i> - <i>doc</i> -up-F1- <i>Bgl</i> II	GAAGATCTGGTGTGTTGGTTTGAATGATGTGATG
<i>phd</i> - <i>doc</i> -up-R1	TTATTCTATCTTTACCTGTGTGCATGGCTCATTACGTTAC
<i>phd</i> - <i>doc</i> -down-F2	GTAACGTAATGAGCCATGCACACAGGTAAAGATAGAATAA
<i>phd</i> - <i>doc</i> -down-R2- <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGAGGCGATTCAACGCTGTGGTAT
EMSA-F	CCTACTTCAGGCAAAACACATGA
EMSA-R	TACGTTACCCTCTGAATTATAGATAGAA
16S-F	CTAGCGATTCCGACTTCAT
16S-R	CCCTTATCCTTTGTGTC
Q- <i>doc</i> -F	ATGGCAGATATTGTTGAAGG
Q- <i>doc</i> -R	TATTTTACTACGCTGGGTCT
Q- <i>phd</i> -F	ATGAGCCATGCACTGAAA
Q- <i>phd</i> -R	TTTTCATAGCGAGAAAAGCC

注:划线部分为酶识别位点

Note: Restriction enzyme sites are underscored

对其相关功能进行鉴定,以期丰富对微生物适应多变的外界环境的定殖机制和防御机制的认知,帮助进一步了解微生物在西北恶劣环境中(如甘肃庆阳小崆峒地区)有效定殖的机制,展现在生态环境保护 and 人类健康领域的重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及引物

大肠杆菌使用LB培养基,37℃培养;假结核耶尔森氏菌 *Yptb* 使用YLB培养基,26℃或30℃培养。

克隆表达菌株基于 pET21a 质粒构建^[19];回补菌株基于 pKT100 质粒构建^[20];启动子酶活测定相关菌株基于 pST412 和 pKT100 质粒构建^[21];过表达菌株基于 pME6032 质粒构建^[22];基于同源重组原理^[23],对 *Yptb* 中 *ypk_2388*、*ypk_2389-2388* 基因进行敲除。相关引物信息见表1,菌株和质粒见表2。

表 2 本研究所用菌株和质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Source
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		
YPIII	Wild-type <i>Y. pseudotuberculosis</i> pIB1, Nal ^r	This lab
<i>Yptb-Δdoc</i>	<i>doc</i> deleted in <i>Yptb</i> YPIII	This study
<i>Yptb-ΔphdΔdoc</i>	<i>phd</i> and <i>doc</i> deleted in <i>Yptb</i> YPIII	This study
<i>Δdoc</i>	Mutant of knockout <i>doc</i> containing plasmid pKT100	This study
<i>ΔphdΔdoc</i>	Mutant of knockout <i>phd</i> and <i>doc</i> containing plasmid pKT100	This study
<i>Δdoc(doc)</i>	<i>Δdoc</i> complemented with plasmid pME6032- <i>doc</i>	This study
<i>ΔphdΔdoc(phd-doc)</i>	<i>ΔphdΔdoc</i> complemented with plasmid pME6032- <i>phd-doc</i>	This study
<i>Δdoc(promoter)</i>	Mutant of knockout <i>doc</i> containing plasmid pKT100 and pST412- <i>P_{phd-doc}::lacZ</i>	This study
<i>ΔphdΔdoc(promoter)</i>	Mutant of knockout <i>phd</i> and <i>doc</i> containing plasmid pKT100 and pST412- <i>P_{phd-doc}::lacZ</i>	This study
<i>CΔdoc(vector)</i>	Mutant of knockout <i>doc</i> containing plasmid pKT100- <i>doc</i> and pST412::lacZ	This study
<i>CΔphdΔdoc(vector)</i>	Mutant of knockout <i>phd</i> and <i>doc</i> containing plasmid pKT100- <i>phd-doc</i> and pST412::lacZ	This study
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	[F' <i>traD36proABlacIqZAM15</i>]supEthi-1Δ(<i>lac-proAB</i>)Δ(<i>mcrB-hsdSM</i>)5(rK-mK-)	This lab
BL21(DE3)	Host for expression vector pET21a	This lab
S17-1	λ-pir lysogen of S17-1, <i>thi pro hsdR hsdM⁺ recA</i> RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7	This lab
pET21a	Expression vector with C-terminal hexahistidine affinity tag, Amp ^r	Novagen
pET21a- <i>doc</i>	pET21a derivative for expression of <i>doc</i>	This study
pET21a- <i>doc</i> ^{H75A}	pET21a derivative for expression of <i>doc</i> ^{H75A}	This study
pET21a- <i>phd</i>	pET21a derivative for expression of <i>phd</i>	This study
pET21a- <i>phd-doc</i>	pET21a derivative for co-expression of <i>phd-doc</i>	This study
pKT25	p15A origin of replication ending CyaA1-224; Km ^r	This lab
pUT18	ColE1 origin of replication encoding CyaA225-399; Amp ^r	This lab
pKT25m	Modified pKT25	This lab
pUT18Cm	Modified pUT18	This lab
pKT25- <i>zip</i>	Leucine zipper of GCN1(BTH positive control); Km ^r	[24]
pUT18- <i>zip</i>	Leucine zipper of GCN1(BTH positive control); Amp ^r	[24]
pKT25m- <i>doc</i>	<i>doc</i> in pKT25m	This study
pUT18Cm- <i>phd</i>	<i>phd</i> in pUT18Cm	This study
pDM4	Suicide vector, <i>mobRK2</i> , <i>oriR6K</i> , <i>pir</i> , <i>sacB</i> , Cm ^r	This lab
pDM4- <i>Δdoc</i>	Construct for in-frame deletion of <i>doc</i> , Cm ^r	This study
pDM4- <i>ΔphdΔdoc</i>	Construct for in-frame deletion of <i>phd-doc</i> , Cm ^r	This study
pKT100	Cloning vector, p15A replication, Km ^r	[20]
pKT100- <i>doc</i>	<i>doc</i> under the control of kanamycin resistance gene promoter in plasmid pKT100	This study
pKT100- <i>phd-doc</i>	<i>phd-doc</i> under the control of kanamycin resistance gene promoter in plasmid pKT100	This study
pME6032	Shuttle vector between <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> and <i>E. coli</i> , Tc ^r	[22]
pME6032- <i>doc</i>	<i>doc</i> cloned into pME6032 for complementation	This study
pST412::lacZ	Modified pDM4 contains free <i>lacZ</i> gene behind MCS, Cm ^r	[21]

注: Cm^r: 氯霉素抗性; Tc^r: 四环素抗性; Km^r: 卡那霉素抗性; Amp^r: 氨苄青霉素抗性; Nal^r: 萘啶酮酸抗性

Note: Cm^r: Chloramphenicol resistance; Tc^r: Tetracycline resistance; Km^r: Kanamycin resistance; Amp^r: Ampicillin resistance; Nal^r: Nalidixic acid resistance

1.2 主要试剂和仪器及培养基

1.2.1 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小量提取试剂盒、RNA Prep Pure 细菌总 RNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; Fast King cDNA 第一链合成试剂盒、Easy Script One-Step gDNA Removal 试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; Trelief™ Prestained Protein Ladder, 北京擎科新业生物技术有限公司; PrimeSTAR Max DNA Polymerase、DNA 连接试剂盒、Apox HF DNA 聚合酶, 湖南艾科瑞生物工程技术有限公司; 限制性内切酶, TaKaRa 公司; 卡那霉素(Kanamycin)、氨苄青霉素(Ampicillin)、链霉素(Streptomycin)、氯霉素(Chloramphenicol)、四环素(Tetracycline)、萘啶酮酸(Nalidixic Acid)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、麦康凯琼脂粉, 北京索莱宝科技有限公司。凝胶成像仪、全自动化学发光仪, 上海天能科技有限公司; 全波长酶标仪, BioTek 公司; 荧光定量 PCR 仪, Roche 公司。

1.2.2 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, 用于培养大肠杆菌。

YLB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, 用于培养假结核耶尔森氏菌 *Yptb*。

M9 无机盐培养基: Na₂HPO₄ 6.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, KH₂PO₄ 3.0 g/L, NH₄Cl 1.0 g/L, CaCl₂ 0.1 mmol/L, MgSO₄ 2.0 mmol/L, 葡萄糖 20.0 mmol/L, 用于大肠杆菌培养和假结核耶尔森氏菌 *Yptb* 营养缺乏条件培养。

麦康凯琼脂培养基: 51.5 g/L 麦康凯琼脂粉, 用于培养大肠杆菌 BTH101 及互作菌株筛选。

1.3 生物信息学分析

基于 P1 噬菌体中 Doc 的氨基酸序列, 在 *Yptb* 基因组中进行 BLASTp 搜索, 分析出得分较高的蛋白由基因 *ypk_2388* 编码, 多序列比对在软件 ClustalX 中完成; *ypk_2388* 编码的蛋白质三维结构

模拟在网站 I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)完成, 模拟结果与多序列比对结果用 ESPrnt 3.0 进行绘制; 氨基酸保守结构域在网站 <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> 中进行比对并绘制。

1.4 生长曲线测定

挑取待测菌株(大肠杆菌或假结核耶尔森氏菌 *Yptb*)单菌落于 YLB 培养基, 37 °C、220 r/min 培养至稳定期(*OD*₆₀₀ 约为 1.2), 1%接种量分别转接至 YLB 培养基中, 26 °C、200 r/min 培养, 每隔 2 h 取样测定 *OD*₆₀₀ 吸光值, 连续测定 12 h 或者 24 h。每组 3 个平行, 统计数据绘制生长曲线。胁迫测定生长时, 胁迫剂浓度分别为链霉素 2.0 μg/mL、氯霉素 2.0 μg/mL、氨苄青霉素 10.0 μg/mL、双氧水 H₂O₂ 15.0 mmol/L。

1.5 滴板实验

从新鲜平板中挑取单菌落于 LB 培养基, 37 °C、220 r/min 中培养至稳定期(*OD*₆₀₀ 约为 1.2), 进行 2⁻¹、2⁻²、2⁻³、2⁻⁴、2⁻⁵ 梯度稀释, 分别吸取各梯度菌液 2.5 μL 分别滴至含 0.1 mmol/L IPTG 和无诱导剂的 LB 平板上, 30 °C 静置培养过夜, 观察菌落生长情况。

1.6 转录水平检测

将 *Yptb* 按照 1.4 中描述方法转接培养至稳定期(*OD*₆₀₀ 约为 1.2)后, 分别添加胁迫剂链霉素 20.0 μg/mL、氯霉素 20.0 μg/mL、氨苄青霉素 100.0 μg/mL、双氧水 H₂O₂ 15.0 mmol/L。30 °C、220 r/min 胁迫 1 h, 以未加胁迫剂样品作为对照组, 结束后取样提取 RNA, 将各样品中 RNA 浓度调节一致后进行反转录; 然后进行实时定量 PCR 检测, 分析数据并绘制结果图。

1.7 细菌双杂交实验

用基于腺苷酸环化酶的细菌双杂交验证 Phd 和 Doc 的相互作用^[24]。构建 pKT25m-*phd* 及 pUT18Cm-*doc* 克隆, 共转化至内源性基因 *cyaA* 缺失的大肠杆菌 BTH101 感受态细胞作为实验组; 以共转空质粒 pKT25m 和 pUT18Cm 的 BTH101 为阴性对照; 由于组成腺苷酸环化酶结构域的 2 个亚基

T25 和 T18 在大肠杆菌 BTH101 中同时存在时二者通过相互作用可以重构有活性的腺苷酸环化酶, 使得菌体在麦康凯培养基上显红色, 因此本实验使用分别含 T25 和 T18 的质粒 pKT25-*zip* 和 pUT18-*zip* 共转至 BTH101 菌株作为阳性对照, 涂布于含氨苄青霉素、卡那霉素和 IPTG 的麦康凯培养基, 30 °C 静置培养 48 h。挑取实验组中传代多次始终变红的单菌落进行 β -半乳糖苷酶酶活测定, 测定方法参照 Battesti 等方法^[24-25]。

1.8 形态学观察

挑取含表达质粒 pET21a、pET21a-*doc*、pET21a-*doc*^{H75A}、pET21a-*phd*、pET21a-*phd-doc* 的大肠杆菌 BL21(DE3)单菌落于 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至稳定期(OD_{600} 约为 1.2), 以 1%接种量分别转接至含终浓度 0.1 mmol/L IPTG 和不含 IPTG 的 LB 液体培养基中, 每组设置 3 个平行, 26 °C、200 r/min 进行诱导表达, 14 h 后取样制片, 于倒置显微镜 10 倍目镜、63 倍油镜下进行观察。

1.9 共转录检测

提取假结核耶尔森氏菌 RNA 反转录为 cDNA, 分别以 cDNA 和 *Yptb* 基因组为模板进行 PCR 扩增, 引物见表 1, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.10 生物被膜实验

参考 Wang 等^[21]方法进行生物被膜测量。分别将野生型菌株、突变体菌株及回补菌株培养至稳定期(OD_{600} 约为 1.2), 分别按 1%接种量转接至 5 mL M9 培养基中, 26 °C、150 r/min 培养 30 h; 结束后将试管中菌液倒掉, 用去离子水将试管底部轻洗 2 遍, 晾干后加入 6 mL 结晶紫染液染色 30–60 min, 将结晶紫染液倒出, 用去离子水将试管中的结晶紫染液洗干净, 晾干, 试管壁上洗不掉的一层紫色即为生物被膜; 晾干后加入 5 mL 冰乙酸, 待试管内生物被膜充分溶解后涡旋振荡混匀取样测量 OD_{595} 吸光值。

1.11 蛋白纯化

将 Phd 表达菌株大肠杆菌 BL21(DE3)的新鲜菌液按 1%转接至含相应抗生素的培养基中, 培养至菌体

开始进入对数期(OD_{600} 约 0.4)时添加 0.3 mmol/L IPTG, 然后 18 °C、150 r/min 培养过夜。之后纯化过程参照林金水等^[26]蛋白纯化方法, 将纯化的蛋白进行 18% SDS-PAGE 和 Western Blot 检测。

1.12 凝胶阻滞迁移(Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)实验

参考 Wang 等^[21]方法进行 EMSA 实验。将预测的 *ypk_2389–2388* 启动子核酸探针由 PCR 扩增并回收; 不同浓度的蛋白、核酸探针(30–50 ng)和反应缓冲液在 20 μ L 结合反应体系中完成, 室温孵育 30 min 后加入核酸指示剂, 点样于无 SDS 的 6%蛋白胶中进行电泳。电泳完毕后, 核酸染液染色 30 min, 于化学发光成像仪观察蛋白与核酸探针结合情况。

1.13 数据统计分析

本实验设 3–5 个生物学平行并独立重复 2–3 次, 结果用 GraphPad Prism V8.0.1 软件对结果进行统计分析, 结果以平均值 \pm 标准偏差表示, 显著性分析采用 Student's *t*-test, $P < 0.05$ 代表结果差异显著。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

Phd-Doc 毒素-抗毒素系统最早在 P1 噬菌体中被发现, 随后在大肠杆菌基因组中也被发现, 而且大肠杆菌的毒素 Doc 与噬菌体 P1 具有极高的相似性(图 1A)。为了研究 *Yptb* 中是否存在 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统, 以最初发现该 TA 系统的宿主菌 P1 噬菌体的 Doc (AAQ14075.1)氨基酸序列作为查询序列, 通过 BLASTp 在 *Yptb* 基因组中检索到一个假定候选蛋白 YPK_2388。将该假定候选蛋白分别与 P1 噬菌体 Doc (AAQ14075.1)、P7 噬菌体 Doc (YP_009914583.1)和大肠杆菌 Doc (CAP07826.1)进行多序列比对, 结果显示假结核耶尔森氏菌 Doc 与上述 3 种蛋白的氨基酸序列具有较高相似性, 相似度分别为 67.72%, 67.72%和 67.41%(图 1A), 并且具有 Doc 的典型保守结构域 HXFX(D/E)GNR^[7](图 1B), 该结构域中的组氨酸是 Doc 发挥生物学功能所必需的^[19]。此外, 通过对候选蛋白进行三维

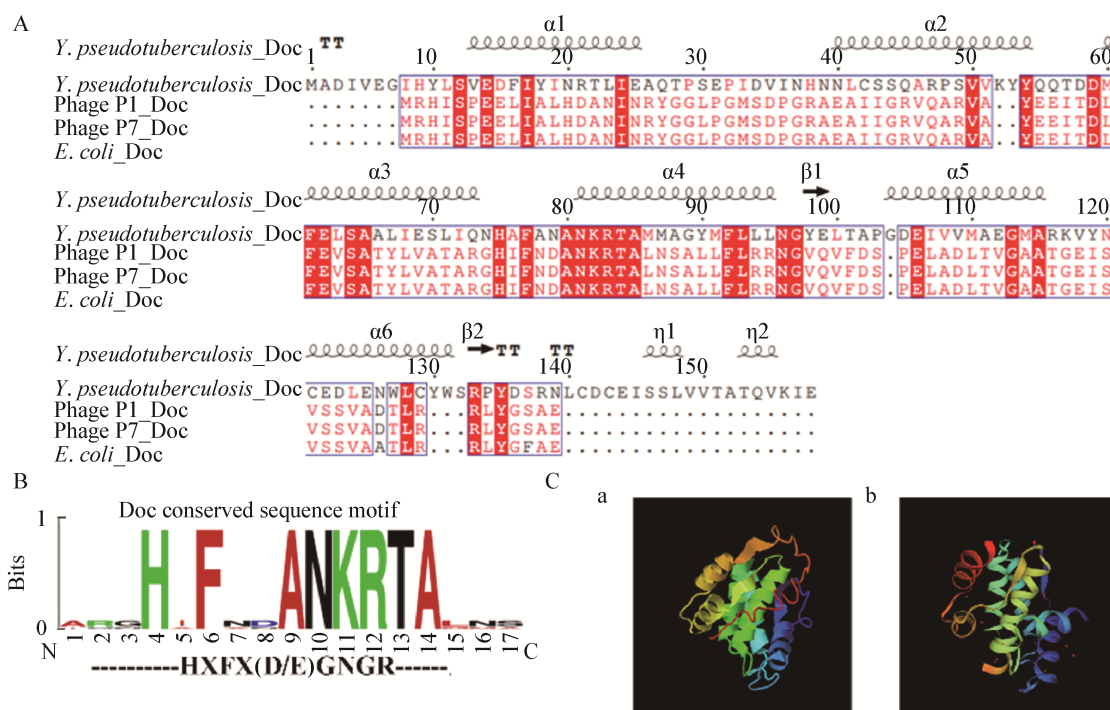


图 1 假结核耶尔森氏菌毒素 Doc 的生物信息学分析

Figure 1 Bioinformatics analysis of the *Yptb* Doc toxin

注: A: Doc 与相关同源蛋白的多序列比对; B: Doc 保守结构域图标; C: Doc 三维结构模拟 a 和已报道的 Doc^{H66Y}-Phd C 末端复合体三维结构 b 示意图

Note: A: Multiple sequence alignment analysis with related homologs; B: Consensus logo of Doc conserved motif; C: Tertiary structure prediction of candidate protein a and reported tertiary structure of Doc^{H66Y} in complex with the C-terminal domain of Phd b

结构模拟(图 1Ca), 与大肠杆菌中 Doc^{H66Y}-Phd C 末端复合体(PDB_3DD7^[9])的三维结构(图 1Cb)相比, 它们均由 6 个 α 螺旋和 2 个 β 折叠组成, 具有高度的相似性。以上生物信息学分析结果表明 *ypk_2388* 编码的蛋白具有典型的 Doc 蛋白特征, 因此将 *ypk_2388* 编码的蛋白质命名为 Doc。

2.2 候选蛋白活性鉴定

为鉴定 *Yptb* 中该疑似 Doc 蛋白的生物学功能, 将其在大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达, 检测其是否对宿主具有毒性。如图 2A 滴板实验结果所示, 在大肠杆菌中诱导表达 Doc 蛋白对菌体有明显的毒性抑制作用, 而表达 HXFX(D/E)GNR 保守结构域中的组氨酸残基点突变蛋白 Doc^{H75A} 对大肠杆菌的毒性并不明显。该结果进一步被 Doc 诱导表达后引起的大肠杆菌细胞形态

变化所证实。如图 2B 所示, 诱导表达 Doc 后引起部分大肠杆菌形态变长, 而诱导表达点突变蛋白后菌体形态无明显改变。其中大肠杆菌形态变长可能是由于 Doc 蛋白的表达引起菌体分裂异常, Doc 蛋白具有 Fic 蛋白的保守结构域^[9], 该结构域的典型特点是能够引起细胞分裂异常、菌体变长并表现出毒性^[10]。此外, 部分大肠杆菌形态变长可能是由于在同一时间里菌液内每个菌体中 Doc 蛋白的表达量存在差异。当菌体内 Doc 蛋白表达量达到一定程度后对细胞分裂产生影响, 细胞形态变长; 当菌体内 Doc 蛋白不能有效表达或者是表达量不足以对细胞分裂造成影响时, 细胞形态无变化。综上所述, *ypk_2388* 编码的蛋白质为 Doc 毒素蛋白, 其保守结构域中的组氨酸是其发挥毒性的关键氨基酸残基。

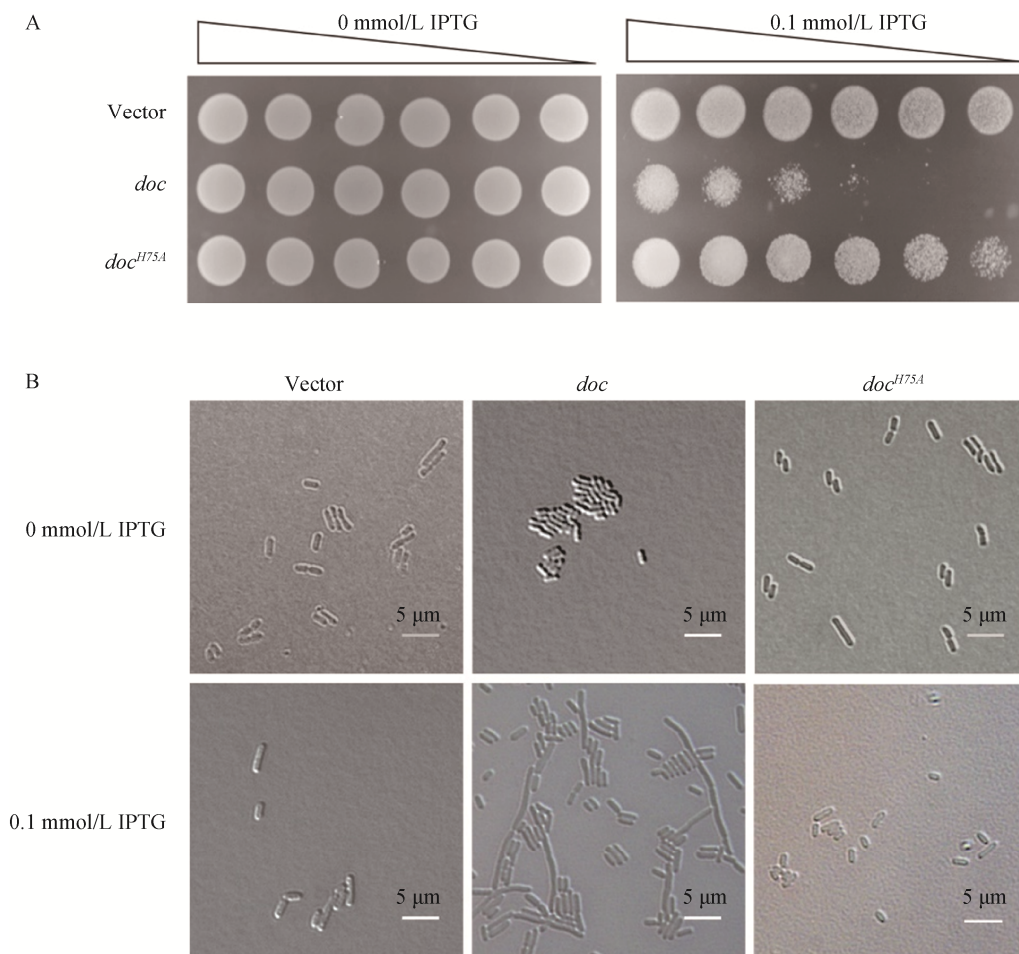


图2 候选毒素蛋白 Doc 毒性检测

Figure 2 Toxicity test of candidate toxin protein Doc

注: A: 重组菌株大肠杆菌 BL21(DE3)梯度稀释滴板试验; B: 图 A 中菌株的形态观察(10×63)

Note: A: The 2-fold dilutions of *Escherichia coli* BL21(DE3) containing pET21a constructs, as indicated, spotted onto LB agar plates; B: Morphology observation of strains in A (10×63)

2.3 抗毒素蛋白 Phd 的鉴定

在传统的毒素-抗毒素系统中, 毒素和抗毒素蛋白一般位于同一个基因簇中的同一个操纵子上, 它们的编码区间隔很短, 甚至有部分重叠且共转录^[27-28]。如图 3A 所示, 通过分析 *doc* 基因所在基因簇位置, 发现与 *doc* 基因紧邻的是一个假定蛋白基因 *ypk*₂₃₈₉, 2 个基因的阅读框之间间隔 10 bp, 这极有可能属于双顺反子操纵子, 其中 *ypk*₂₃₈₉ 启动子区域的-35 和-10 区经 BPROM 分析预测。此外, 对 *ypk*₂₃₈₉ 的氨基酸序列与 P1 噬菌体 Phd (AAQ14182.1)、P7 噬菌体 Phd (AAQ107576.1) 和大肠杆菌 Phd (CAA66834.1) 进行多序列比对, 结果显示

假定蛋白 YPK₂₃₈₉ 与上述 3 种蛋白的氨基酸序列具有较高相似性, 相似度均为 63.70%, 而且它们的二级结构均具有 2 个 α 螺旋(图 3B)。为探究该假定蛋白与毒素蛋白 Doc 之间的关系, 先从转录水平出发提取野生型菌株 RNA, 通过 RT-PCR 反应得到 cDNA, 并设计引物 *phd*-F1、*phd*-R1、*doc*-F2、*doc*-R2 (表 1) (图 3A), 分别以 *Yptb* 野生型基因组和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。如图 3C 所示, 以 cDNA 为模板的 PCR 产物和基因组为模板的 PCR 产物条带大小一致, 无 PCR 产物的为阴性对照。结果表明, 毒素蛋白 Doc 与假定蛋白在转录水平上属于共转录, 由此推测该假定蛋白可能是毒素蛋白 Doc 的抗毒素蛋白 Phd。

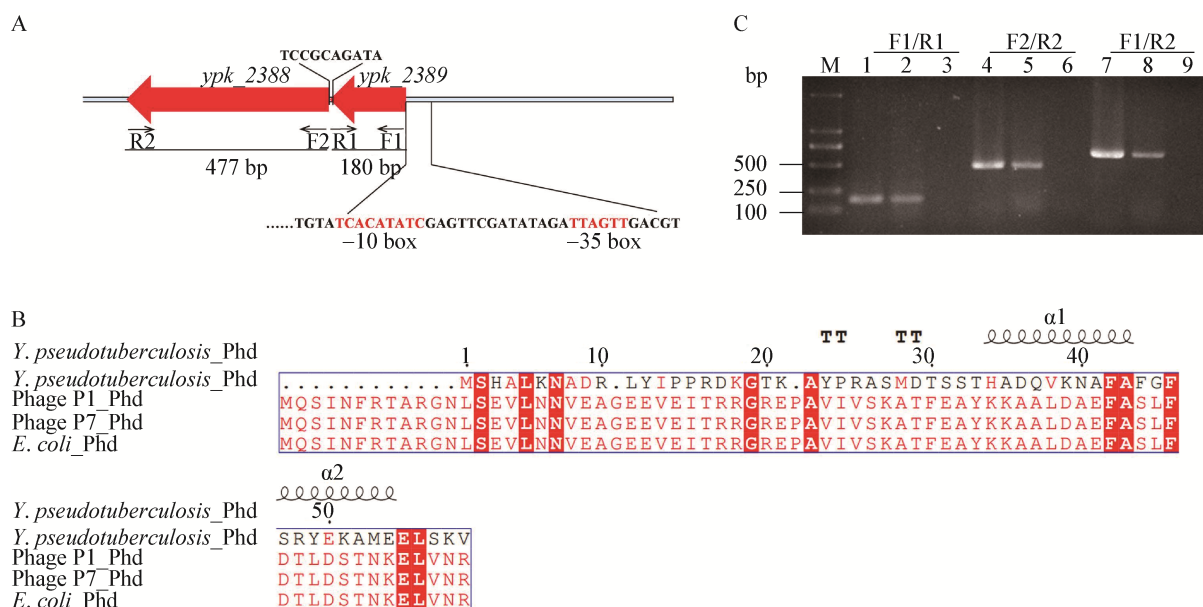


图3 抗毒素蛋白 Phd 鉴定

Figure 3 Identification of antitoxin protein Phd

注：A：Phd-Doc 基因座示意图；B：Phd 与相关同源蛋白的多序列比；C：TA 系统 Phd-Doc 共转录检测，1、4、7 以 *Yptb* 作为模板；2、5、8 以 *Yptb* cDNA 作为模板；3、6、9 以 ddH₂O 作为模板进行的 PCR 检测结果

Note: A: Phd-Doc locus diagram. B: Multiple sequence alignment analysis with related homologs. C: TA system Phd-Doc co-transcription test, 1, 4, 7: PCR product with *Yptb* as template; 2, 5, 8: PCR product with *Yptb* cDNA as template; 3, 6, 9: PCR product with ddH₂O as template

2.4 Doc 与 Phd 的相互作用鉴定

为了进一步确定 *ypk_2389* 编码的假定蛋白是毒素蛋白 Doc 的抗毒素蛋白 Phd，通过细菌双杂交实验检测了 2 个蛋白之间的相互作用。如图 4A 所示，在麦康凯培养基平板上实验组与阳性对照组菌落均呈红色；如图 4B 所示，实验组 β-半乳糖苷酶酶活远高于阴性对照组且与阳性对照组相近，表明 Doc 和 *ypk_2389* 编码的假定 Phd 蛋白之间存在较强的相互作用；从滴板实验结果发现，在大肠杆菌中单独诱导表达 Doc 时对菌体生长具有明显毒性，共表达 Phd-Doc 时 Doc 的毒性被抑制，而单独表达 Phd 时对细菌无毒性(图 4C)。此外，如图 4D 所示，诱导表达 Doc 时部分大肠杆菌菌体形态较正常地变长，而共表达 Phd-Doc 或单独表达 Phd 时，大肠杆菌的形态与对照组相比均无明显差异。以上结果进一步证实 *ypk_2389* 编码 Doc 的抗毒素蛋白 Phd，二者共同形成一个 Phd-Doc 毒

素-抗毒素系统。

2.5 TA 系统 Phd-Doc 的自体调控效应

典型的 II 型毒素-抗毒素系统中，抗毒素一般具有 2 个结合结构域，一个为 DNA 结合结构域，另一个为蛋白质结合结构域；抗毒素一般能够通过 DNA 结合结构域和自身启动子结合来调节其自身和毒素蛋白的转录，这种效应称为自调控效应^[29]。为探讨 *Yptb* 中毒素-抗毒素系统 Phd-Doc 的调控方式，分别通过体外和体内 2 个方面进行研究。首先，如图 5A 所示，随着 Phd 蛋白浓度增加，其与启动子结合能力不断增强，但与启动子探针大小相当的对照核酸片段无结合；此外，对照蛋白 BSA (6 μg)与启动子探针也无结合，表明 Phd 抗毒素蛋白能和自身启动子特异结合。接着构建了启动子融合报告质粒 pST412-*P_{phd-doc}::lacZ*，通过测定 β-半乳糖苷酶酶活来体现启动子活性^[30]。如图 5B 所示，在野生型菌株体内，启动子酶活处于较低

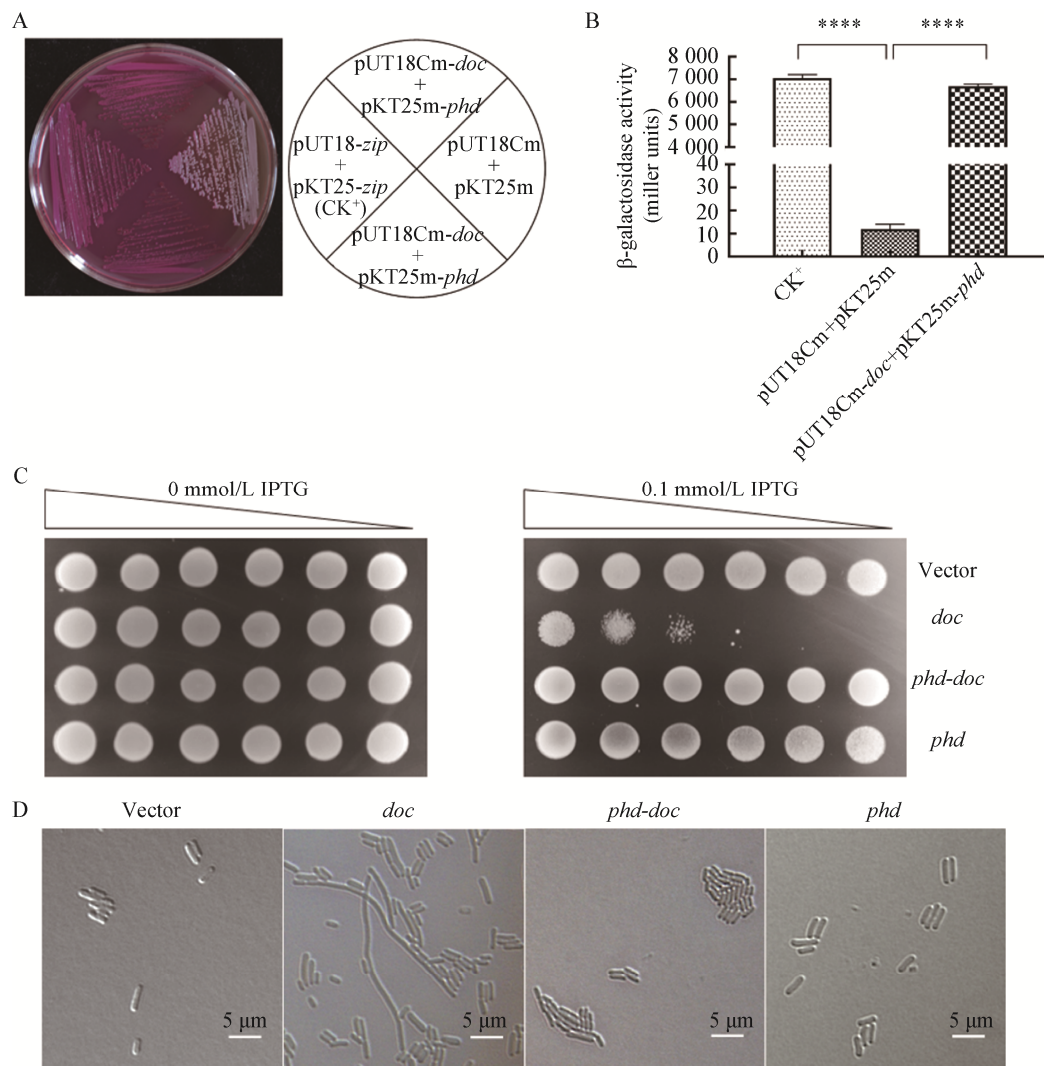


图4 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统的鉴定

Figure 4 Identification of toxin-antitoxin system Phd-Doc

注: A: Phd-Doc 细菌双杂交实验; B: β 半乳糖苷酶酶活检测; C: 重组菌株大肠杆菌 BL21(DE3)梯度稀释滴板实验; D: 图 C 中菌株在 0.1 mmol/L IPTG 诱导 14 h 后的形态观察(10 \times 63); 提供的所有数据是至少 2 个独立生物学重复的平均值, ****: $P < 0.0001$ (Student's t test)

Note: A: Bacterial two-hybrid experiment of Phd and Doc; B: The β -galactosidase activity assay of strains in A; C: The 2-fold dilutions of *Escherichia coli* BL21(DE3) containing pET21a constructs, as indicated, spotted onto LB agar plates; D: Morphology observation of strains in C induced about 14 h with 0.1 mmol/L IPTG (10 \times 63); All data presented are the average of at least two independent biological replicates, ****: $P < 0.0001$ (Student's t test)

的水平, 在 Δdoc 单突变体菌株体内启动子水平较野生型有了较大程度的提高, 而在 $\Delta phd\Delta doc$ 双突变体菌株体内酶活水平最高, 但在对应的互补菌株 $C\Delta doc$ 和 $C\Delta phd\Delta doc$ 中, 启动子活性又恢复到野生型水平。这与 Hayes 等^[31]的报道一致, 抗毒素能够与自身启动子结合负调控启动子的转

录水平, 而毒素的存在则能增强抗毒素的负调控作用。综上所述, Phd 抗毒素蛋白可以通过与自身启动子结合, 从而抑制自身和毒素蛋白的转录活性, 说明毒素-抗毒素系统 Phd-Doc 具有自调控效应, 同时也表明 *Yptb* 中的 Phd-Doc 是一对有活性的毒素-抗毒素系统。

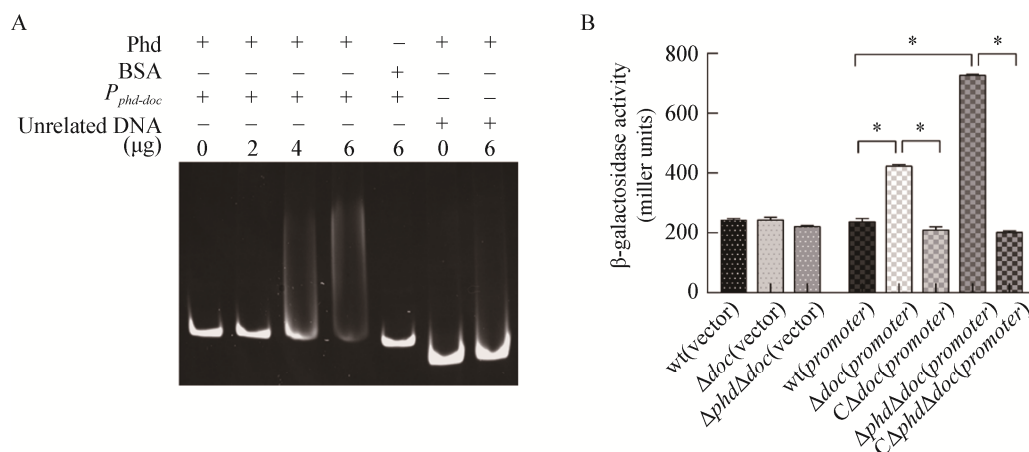


图5 TA系统 Phd-Doc 自体调控

Figure 5 Autoregulation of TA system Phd-Doc

注: A: EMSA 检测; B: Phd-Doc 启动子酶活试验, 提供的所有数据是至少 3 个独立生物学重复的平均值, *: $P < 0.05$ (Student's t test)
 Note: A: EMSA test. B: The β -galactosidase activity assay of the Phd-Doc operon promoter; All data presented are the average of at least three independent biological replicates; *: $P < 0.05$ (Student's t test)

2.6 Phd-Doc 系统的功能研究

为探讨 *phd-doc* 和 *doc* 基因缺失对 *Yptb* 生长的影响, 研究测定了相关菌株的生长曲线。如图 6A 所示, 在正常培养条件下, 野生型菌株及 2 个突变体菌株(Δdoc 、 $\Delta phd\Delta doc$)的生长情况无差异, 表明毒素-抗毒素系统 Phd-Doc 并不影响菌体的正常生长。那么, 该毒素-抗毒素系统在自身菌体内发挥什么功能呢? 上述研究结果中, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达 Doc 时对菌体生长具有较大影响, 因此, 为探究在 *Yptb* 中过表达 Doc 对菌体生长是否具有同样的效果, 本研究在菌体内诱导表

达 Doc 并测定生长曲线。如图 6B 所示, 在野生型菌株内过表达 Doc, 其生长情况与对照组生长情况并无差异。同时, 在 $\Delta phd\Delta doc$ 突变体内过表达 Doc 时, 菌体的生长较对照组也无明显差异。Leplae 等研究表明, TA 系统之间并不是一一对应的关系, 即一个毒素可能存在不同的抗毒素来中和其毒性, 或者一个抗毒素可以中和不同的毒素; 此外, 微生物体内不同 TA 系统之间也可能存在交叉联系^[32]。总之, 在原始宿主 *Yptb* 中过表达 Doc 无明显毒性, 这可能是因为在宿主体内存在其他抗毒素来中和 Doc 的毒性。

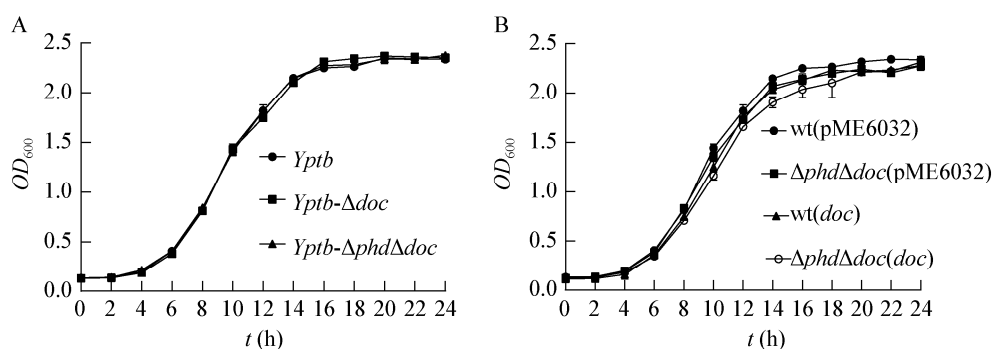


图6 TA系统 Phd-Doc 缺失和过表达菌株的生长曲线

Figure 6 Growth curves of TA system Phd-Doc deleted and overexpressed strains

注: A: *Yptb* 及 Phd-Doc 缺失突变体在 YLB 培养基中的生长曲线; B: *Yptb* 中过表达 Doc 的生长曲线

Note: A: Growth curve of TA system Phd-Doc deleted *Yptb* in YLB medium; B: Growth curve of Doc overexpressed *Yptb*

研究表明,许多染色体 TA 系统在极端胁迫条件下被激活^[1-3]。本研究进一步探讨了 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统在抗生素耐受性、氧胁迫耐受性方面是否发挥功能。如图 7 所示,在链霉素、氨苄青霉素、氯霉素、双氧水胁迫条件下,野生型菌株和 Δdoc 、 $\Delta phd\Delta doc$ 菌株生长情况无明显差异。

如图 8 所示,通过对压力胁迫后抗毒素 Phd 转录水平的检测,在以上各种抗生素胁迫和双氧水胁迫后抗毒素转录水平较野生型均有不同程度的上升,其中,在氯霉素胁迫后抗毒素水平较野生型上升 20 倍以上。类似地,近期有研究表明,外界应激条件下可以刺激体内毒素-抗毒素系统的转录^[2]。综上所述,*Yptb* Phd-Doc 毒素-抗毒素系统在响应抗生素胁迫和氧胁迫压力条件下对菌体生长并未发挥

功能,但转录水平具有不同程度的提高。在氯霉素胁迫条件下转录水平极大提高,表明 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统对氯霉素胁迫尤为敏感。

2.7 Phd-Doc 系统对 *Yptb* 生物被膜形成能力的影响

近年来,越来越多新的 TA 系统被报道,并且多数 TA 系统与细菌生物被膜形成相关^[18]。为探讨毒素-抗毒素系统 Phd-Doc 对 *Yptb* 生物被膜形成能力的影响,本研究通过在营养缺乏型培养基 M9 中对野生型菌株、突变体菌株和回补菌株进行培养,检测以上菌株生物被膜形成的能力。如图 9A 所示,在 M9 培养基中培养 30 h 后, $\Delta phd\Delta doc$ 双突变体的生物被膜形成能力较野生型菌株生物被膜形成能力显著降低,而互补菌株的生物被膜形成能力有一定

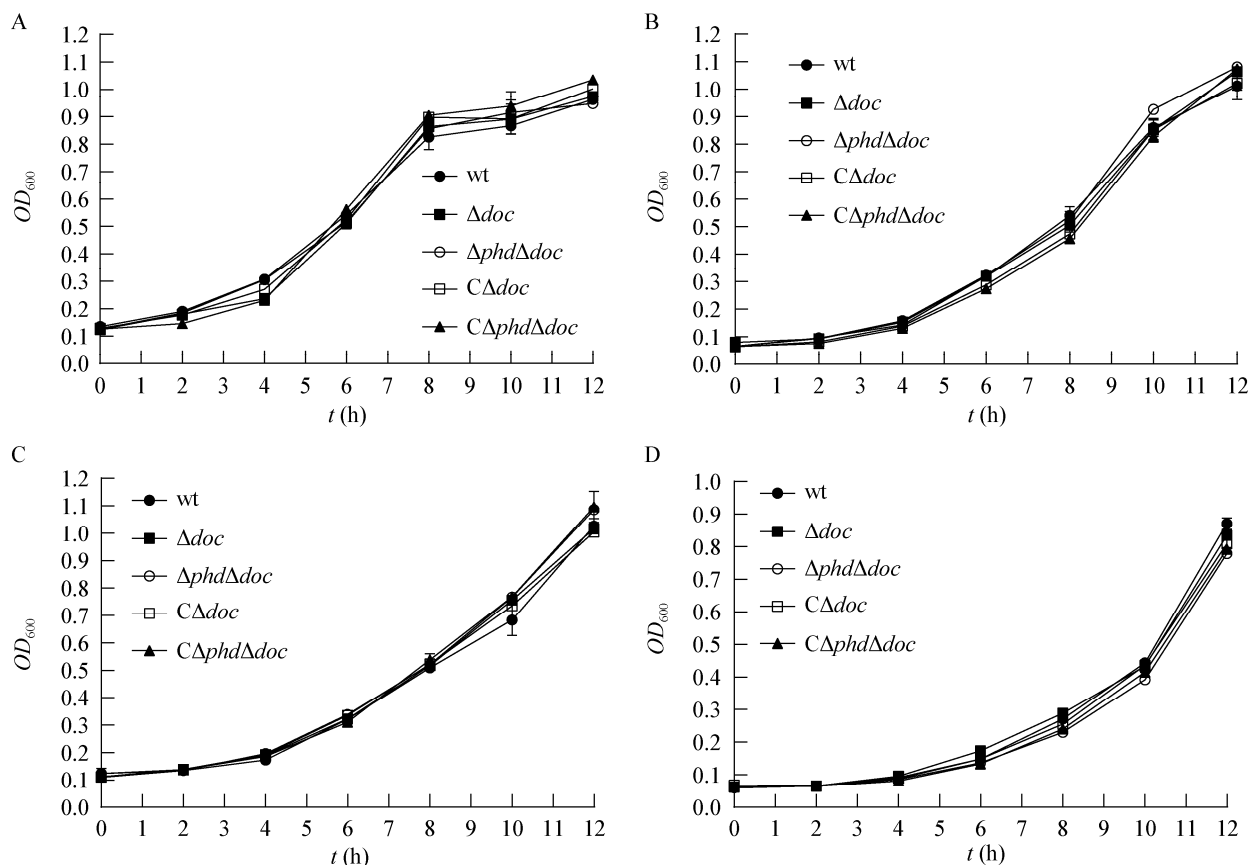


图 7 各菌株在不同胁迫条件下的生长曲线

Figure 7 Growth curve of strains under different stress conditions

注: A: 链霉素 2.0 $\mu\text{g/mL}$; B: 氨苄青霉素 10.0 $\mu\text{g/mL}$; C: 氯霉素 2.0 $\mu\text{g/mL}$; D: 双氧水 15.0 mmol/L

Note: A: Streptomycin 2.0 $\mu\text{g/mL}$; B: Ampicillinum 10.0 $\mu\text{g/mL}$; C: Chloramphenicol 2.0 $\mu\text{g/mL}$; D: H_2O_2 15.0 mmol/L

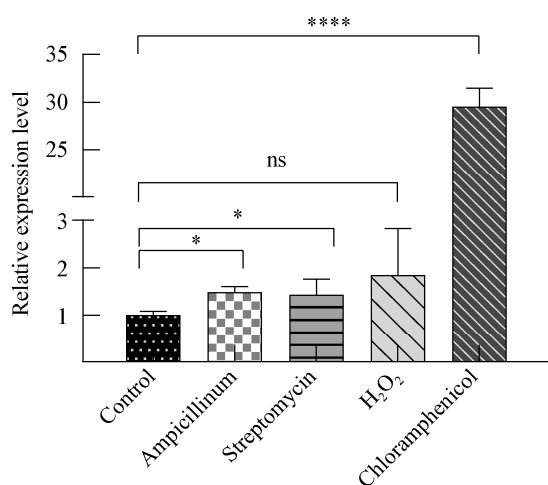


图8 压力胁迫下TA系统Phd-Doc的转录水平

Figure 8 Transcription level of TA system Phd-Doc under different stresses

注：提供的所有数据是至少3个独立生物学重复的平均值，*：

$P < 0.05$ ；****： $P < 0.0001$ (Student's t test)；ns：无显著性差异

Note: All data presented are the average of at least three independent biological replicates, *: $P < 0.05$ ；****: $P < 0.0001$ (Student's t test); ns: Not significant

程度的恢复。为探讨 $\Delta phd\Delta doc$ 双突变体的生物被膜形成能力的降低是否由生长差异引起，对野生型菌株和突变菌株在营养缺乏型培养基 M9 中进行生长测定。如图 9B 所示，野生型菌株和 $\Delta phd\Delta doc$ 双突变体生长并无明显差异，因此， $\Delta phd\Delta doc$ 双突变

体的生物被膜形成能力的降低不是由两者生长差异引起。综上所述，毒素-抗毒素系统 Phd-Doc 能影响 *Yptb* 的生物被膜形成能力。

3 讨论与结论

TA 系统广泛存在于细菌和古菌中，而且一个细菌基因组中可以同时存在几十对上到上百对 TA 系统，但是目前对大多数 TA 系统的生物学功能和作用机制尚不清楚。已有研究表明，细菌基因组上的 TA 系统与细菌致病性、生物被膜形成、环境适应能力及持留细菌形成相关^[18,33-34]，因此 TA 系统在近年来受到越来越多的关注。本研究通过生物信息学分析寻找 *Yptb* 中 P1 噬菌体 Doc 的同源蛋白，并通过毒性实验、共转录实验和细菌双杂交等鉴定了 *Yptb* 基因组中存在的一对 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统，并对其生物学功能进行了初步探索。

前人研究结果表明，因为自调控效应的存在，正常生长条件下菌体内毒素抗毒素含量处于较低的水平，而当细菌受到外界胁迫压力时，体内的 Lon 或 ClpXP 等蛋白酶被激活，不稳定的抗毒素被蛋白酶特异降解，毒素得以释放^[35-37]。近期也有研究表明，在压力应激下，虽然抗毒素降解率在增加，但

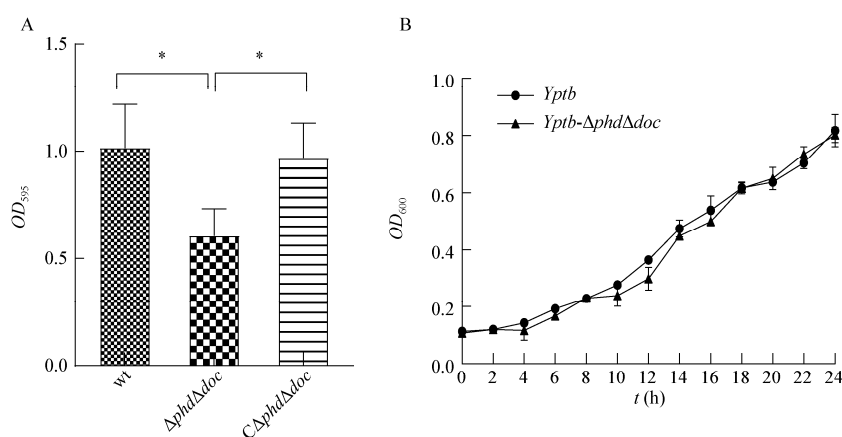


图9 TA系统Phd-Doc对*Yptb*生物被膜形成能力的影响

Figure 9 Effect of TA system Phd-Doc on the ability of *Yptb* biofilm formation

注：A：生物膜测定结果；B：*Yptb* 及 $\Delta phd\Delta doc$ 菌株在 M9 培养基中的生长曲线；提供的所有数据是至少3个独立生物学重复的平均，*： $P < 0.05$ (Student's t test)

Note: A: Biofilm test result; B: Growth curve of *Yptb* and $\Delta phd\Delta doc$ strains in M9 medium; All data presented are the average of at least three independent biological replicates, *: $P < 0.05$ (Student's t test)

细菌体内的抗毒素,特别是和毒素结合的抗毒素一直没有被降解完全,LeRoux 等通过生长测定和 mRNA 切割实验证明,胁迫条件下细菌体内毒素并没有得到释放,即毒素没有被激活^[2]。

本研究探讨了不同抗生素胁迫条件下和氧胁迫条件下 *Yptb* 野生型菌株和相应突变体的生长情况,以及胁迫后抗毒素转录水平的变化。结果显示,抗生素胁迫和氧胁迫压力下,野生型菌株和突变体菌株生长无差异,但 Phd-Doc 的转录水平有不同程度的上升(1.5–2.0 倍),这可能是由于自体调控效应的存在,即在外界压力条件下,不稳定的抗毒素被蛋白酶降解,自体调控抑制效应减弱或解除,从而导致毒素-抗毒素系统转录水平的升高。类似地,近期报道中,在抗生素胁迫、酸胁迫等外界应激下大肠杆菌 MG1655 中的 10 对 II 型 TA 系统(*mazEF* 等)转录水平均有不同程度的上升^[2,37]。不同的是,本研究发现经氯霉素胁迫后 Phd-Doc 的转录水平显著提高(25–30 倍),明显高于其他胁迫后的转录水平,这意味着 Phd-Doc 应激氯霉素胁迫尤为敏感,但经氯霉素胁迫后野生型菌株和相应的突变体菌株生长情况并无差异,这可能是因为胁迫的条件(浓度、时间等)不足以激活毒素蛋白。此外,胁迫后 Phd-Doc TA 系统的过表达也可能影响宿主体内其他的生物学效应,但并不通过生长来体现。

本研究通过在营养缺乏型培养基 M9 中进行低转速培养 30 h 后,发现 Phd-Doc 的双缺突变体菌株较野生型菌株生物被膜形成能力减弱,表明 Phd-Doc 可以影响 *yptb* 生物被膜的形成能力。通常情况下,生物被膜形成能力与菌株抵抗外界不良环境能力相关^[18],然而本研究中,在抗生素胁迫和氧胁迫下野生型菌株和突变菌株 Δdoc 、 $\Delta phd\Delta doc$ 的生长情况并无明显差异,这可能是由于生物被膜的形成需要一定的时间和条件,而在生长测量条件下胁迫剂的浓度、时间和摇床转速等不利于生物被膜的形成。

本研究还发现 Phd-Doc 的缺失对菌体自身正常生长并无影响,在野生型菌株及 Phd-Doc 缺失突变体菌株中诱导表达毒素 Doc,两者生长情况并无显著差异。类似地,有研究表明在鼠疫杆菌中过表达自身体内的毒素蛋白 HigB4 和 Doc 并未通过生长检

测到毒素的活性,然而在该研究中未能获得 Phd-Doc 的双缺失突变体^[15],因此本研究进一步证实了在自身宿主体内诱导表达 Doc,但 Doc 毒素活性未能表现。这可能是因为在宿主体内不仅只存在 Phd 一种特异的抗毒素,可能还存在其他的抗毒素蛋白来中和其毒性,也可能在宿主体内的不同 TA 系统之间存在交叉影响^[19]。

综上所述,本研究通过 BLASTp 搜索、多序列比对等生物信息学方法分析,在 *Yptb* 基因组中发现了一对有活性的 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统,它们同在一个基因座上且共转录,具有自调控效应;Doc 在大肠杆菌中异源表达能够发挥活性,引起大肠杆菌形态发生变化并抑制大肠杆菌的生长,但在原始宿主 *Yptb* 中诱导表达 Doc 未能检测到其对大肠杆菌类似的毒性;抗生素胁迫和氧胁迫条件下 Phd-Doc 转录水平有不同程度的升高,而且对氯霉素胁迫尤为敏感;此外,在营养缺乏环境下能够影响 *Yptb* 生物被膜的形成能力。然而,关于 Phd-Doc 毒素-抗毒素系统在其产生菌胞内的具体作用机制、对氯霉素胁迫信号尤为敏感的原因及毒素 Doc 被激活的条件均有待更深入的研究。

REFERENCES

- [1] Christensen SK, Maenhaut-Michel G, Mine N, Gottesman S, Gerdes K, Van Melderen L. Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(6): 1705-1717
- [2] LeRoux M, Culviner PH, Liu YJ, Littlehale ML, Laub MT. Stress can induce transcription of toxin-antitoxin systems without activating toxin[J]. Molecular Cell, 2020, 79(2): 280-292.e8
- [3] Song S, Wood TK. A primary physiological role of toxin/antitoxin systems is phage inhibition[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1895
- [4] Song S, Wood TK. Toxin/antitoxin system paradigms: toxins bound to antitoxins are not likely activated by preferential antitoxin degradation[J]. Advanced Biosystems, 2020, 4(3): e1900290
- [5] Lehnher H, Yarmolinsky MB. Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(8): 3274-3277
- [6] Castro-Roa D, Garcia-Pino A, De Gieter S, Van Nuland NAJ, Loris R, Zenkin N. The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu[J]. Nature Chemical Biology, 2013, 9(12): 811-817
- [7] Kinch LN, Yarbrough ML, Orth K, Grishin NV. Fido, a novel AMPylation domain common to Fic, Doc, and avrB[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5818

- [8] Goeders N, Van Melderden L. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems[J]. *Toxins*, 2014, 6(1): 304-324
- [9] Garcia-Pino A, Sterckx Y, Magnuson RD, Loris R. Type II toxin-antitoxin Loci: the phd/doc family[J]//In Gerdes K. (ed). *Prokaryotic Toxin-Antitoxins*[M]. Newcastle upon Tyne, UK: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 157-176
- [10] Lu CH, Nakayasu ES, Zhang LQ, Luo ZQ. Identification of Fic-1 as an enzyme that inhibits bacterial DNA replication by AMPylating GyrB, promoting filament formation[J]. *Science Signaling*, 2016, 9(412): ra11
- [11] Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN, Grishin NV, Ball HL, Orth K. AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling[J]. *Science*, 2009, 323(5911): 269-272
- [12] Mukherjee S, Liu XY, Arasaki K, McDonough J, Galán JE, Roy CR. Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase[J]. *Nature*, 2011, 477(7362): 103-106
- [13] Liu MH, Zhang YL, Inouye M, Woychik NA. Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(15): 5885-5890
- [14] Guérout AM, Iqbal N, Mine N, Ducos-Galand M, Van Melderden L, Mazel D. Characterization of the phd-doc and ccd toxin-antitoxin cassettes from *Vibrio* superintegrons[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(10): 2270-2283
- [15] Goulard C, Langrand S, Carniel E, Chauvaux S. The *Yersinia pestis* chromosome encodes active addiction toxins[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(14): 3669-3677
- [16] Frampton R, Aggio RB, Villas-Bôas SG, Arcus VL, Cook GM. Toxin-antitoxin systems of *Mycobacterium smegmatis* are essential for cell survival[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(8): 5340-5356
- [17] Lehnher H, Maguin E, Jafri S, Yarmolinsky MB. Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: Doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1993, 233(3): 414-428
- [18] Chan WT, Domenech M, Moreno-Córdoba I, Navarro-Martínez V, Nieto C, Moscoso M, García E, Espinosa M. The *Streptococcus pneumoniae* yefM-yoeB and relBE toxin-antitoxin operons participate in oxidative stress and biofilm formation[J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(9): 378
- [19] Arbing MA, Handelman SK, Kuzin AP, Verdon G, Wang C, Su M, Rothenbacher FP, Abashidze M, Liu MH, Hurley JM, et al. Crystal structures of Phd-Doc, HigA, and YeeU establish multiple evolutionary links between microbial growth-regulating toxin-antitoxin systems[J]. *Structure*, 2010, 18(8): 996-1010
- [20] Hu YB, Lu P, Wang Y, Ding LS, Atkinson S, Chen SY. OmpR positively regulates urease expression to enhance acid survival of *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Microbiology(Reading)*, 2009, 155(Pt 8): 2522-2531
- [21] Wang Z, Wang TT, Cui R, Zhang ZX, Chen KQ, Li MY, Hua YY, Gu HW, Xu L, Wang Y, et al. HpaR, the repressor of aromatic compound metabolism, positively regulates the expression of T6SS₄ to resist oxidative stress in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 705
- [22] Wang TT, Si M, Song YH, Zhu WH, Gao F, Wang Y, Zhang L, Zhang WP, Wei GH, Luo ZQ, et al. Type VI secretion system transports Zn²⁺ to combat multiple stresses and host immunity[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(7): e1005020
- [23] Zhang WP, Xu SJ, Li J, Shen XH, Wang Y, Yuan ZM. Modulation of a thermoregulated type VI secretion system by AHL-dependent quorum sensing in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2011, 193(5): 351-363
- [24] Battesti A, Bouveret E. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*[J]. *Methods*, 2012, 58(4): 325-334
- [25] Hofnung M. A short course in bacterial genetics and a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria[J]. *Biochimie*, 1993, 75(6): 501
- [26] Lin JS, Niu YT, Wang ST, Wang GF, Tian Y, Zhang H, Zhu XF, Si QP, Cheng JL, Ai YN, et al. Characterization of zinc ion uptake mediated by *cntRLMN* operon in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(4): 789-804 (in Chinese)
林金水, 牛艳婷, 王帅涛, 王贵锋, 田野, 张恒, 朱旭飞, 司青坡, 成娟丽, 艾亚楠, 等. 铜绿假单胞菌 *cntRLMN* 操纵子介导锌离子摄取的功能鉴定[J]. *微生物学报*, 2020, 60(4): 789-804
- [27] Tandon H, Sharma A, Wadhwa S, Varadarajan R, Singh R, Srinivasan N, Sandhya S. Bioinformatic and mutational studies of related toxin-antitoxin pairs in *Mycobacterium tuberculosis* predict and identify key functional residues[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(23): 9048-9063
- [28] Kędzierska B, Hayes F. Emerging roles of toxin-antitoxin modules in bacterial pathogenesis[J]. *Molecules*, 2016, 21(6): 790
- [29] Sun CL, Guo YX, Tang KH, Wen ZL, Li BY, Zeng ZS, Wang XX. MqsR/mqsA toxin/antitoxin system regulates persistence and biofilm formation in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 840
- [30] Salmon MA, Melderden LV, Bernard P, Couturier M. The antidote and autoregulatory functions of the F plasmid CcdA protein: a genetic and biochemical survey[J]. *Molecular and General Genetics*, 1994, 244(5): 530-538
- [31] Hayes F, Kędzierska B. Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs[J]. *Toxins (Basel)*, 2014, 6(1): 337-358
- [32] Leplae R, Geeraerts D, Hallez R, Guglielmini J, Drèze P, Van Melderden L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(13): 5513-5525
- [33] Slayden RA, Dawson CC, Cummings JE. Toxin-antitoxin systems and regulatory mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Pathogens and Disease*, 2018, 76(4): fty039
- [34] Sala A, Calderon V, Bordes P, Genevaux P. TAC from *Mycobacterium tuberculosis*: a paradigm for stress-responsive toxin-antitoxin systems controlled by SecB-like chaperones[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2013, 18(2): 129-135
- [35] Muthuramalingam M, White JC, Bourne CR. Toxin-antitoxin modules are pliable switches activated by multiple protease pathways[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8(7): 214
- [36] Ronneau S, Helaine S. Clarifying the link between toxin-antitoxin modules and bacterial persistence[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(18): 3462-3471
- [37] Fraikin N, Goormaghtigh F, Van Melderden L. Type II toxin-antitoxin systems: evolution and revolutions[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(7): e00763-19