

Construction and Functional Analysis of *osmC* Gene Disruptant and *ohr* Gene Disruptant in *Deinococcus radiodurans* R1*

Guangyan Cui^{1,2}, Xianyi Xian^{1,2}, Yingying Liu², Qilin Dai¹, Ming Chen², Jin Wang^{2#}

¹Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang

²Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing

Email: 18749405362@126.com, #wangjin@caas.cn

Received: Nov. 28th, 2013; revised: Dec. 12th, 2013; accepted: Dec. 18th, 2013

Copyright © 2013 Guangyan Cui et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2013 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Guangyan Cui et al. All Copyright © 2013 are guarded by law and by Hans as a guardian.

Abstract: The osmotic stress induced protein (OsmC) and organic hydroperoxide resistance protein (Ohr) were two antioxidant enzymes which play an important role in bacteria defending organic or inorganic peroxidation. The *osmC* gene (*DR_1538*) and *ohr* gene (*DR_1857*) of *Deinococcus radiodurans* (*D. radiodurans* R1) encoded the two antioxidant enzymes in the OsmC superfamily. Fusion PCR of three sections *in vitro* and linear transformation method were used to firstly construct the spectinomycin-resistant mutant stain ($\Delta osmC$) and the kanamycin-resistant mutant strain (Δohr). The $\Delta osmC$, Δohr mutants strain and wild-type strain were treated with CHP (cumene hydroperoxide), H₂O₂ and NaCl stress treatments. The result showed that $\Delta osmC$ mutant is extremely sensitive to H₂O₂ compared with the wild type, while Δohr mutant is more sensitive to CHP and the two mutant strains had no changes after NaCl stress. QRT-PCR results displayed that the *osmC* gene of the wild-type strain were up-regulated in both H₂O₂ and NaCl stress treatments, and the *osmC* gene in H₂O₂ stress levels was significantly upregulated. The *ohr* genes in wild-type strain after CHP and NaCl stress treatments upregulated approximately 2-folds. From above, it was presumed that there may be different at the preference of two peroxidases in OsmC superfamily selecting substrates and the mode of those interacting with their substrate; OsmC proteins may mainly use inorganic peroxide as its substrate and Ohr protein may be primarily based on the organic peroxide as its substrate.

Keywords: *D. radiodurans* R1; *osmC* and *ohr* Gene; Mutant Stains; Antioxidant

耐辐射异常球菌 *osmC* 与 *ohr* 基因突变株的构建及功能研究*

崔广艳^{1,2}, 鲜先毅^{1,2}, 刘盈盈², 代其林¹, 陈明², 王劲^{2#}

¹西南科技大学生命科学与工程学院, 绵阳

²中国农业科学院生物技术研究所, 北京

Email: 18749405362@126.com, #wangjin@caas.cn

收稿日期: 2013年11月28日; 修回日期: 2013年12月12日; 录用日期: 2013年12月18日

摘要: 渗透胁迫诱导蛋白 OsmC 与有机氢过氧化物抗性蛋白 Ohr 都属于 OsmC 超家族抗氧化酶, 在细菌抵御有机或无机过氧化反应的过程中起重要作用。耐辐射异常球菌(*D. radiodurans* R1)中 *osmC* 基因(*DR_1538*)与 *ohr* 基因(*DR_1857*)分别编码了 OsmC 超家族中的这两种抗氧化酶。运用体外三段融合 PCR 方法和线性转化方法, 首次构建了壮观霉素抗性完全缺失突变株 $\Delta osmC$ 和卡那霉素抗性完全缺失突变株 Δohr 。对 $\Delta osmC$ 、 Δohr

*基金项目: 973 项目(2013CB733903), 863 项目(2012AA063503), 国家转基因专项(2014ZX0801201B), 农业部公益性行业科研专项(201103007)和西南科技大学博士研究基金(11zx7104)。

#通讯作者。

突变株和野生型菌株分别都进行 CHP(异丙苯基过氧化氢)、H₂O₂ 和 NaCl 胁迫处理, 结果显示, 与野生型相比, $\Delta osmC$ 突变株对 H₂O₂ 异常敏感, 而 Δohr 突变株对 CHP 更敏感, 两个突变株对 NaCl 胁迫都没有大的变化。QRT-PCR 结果显示在 H₂O₂ 和 NaCl 胁迫下野生型菌株中 *osmC* 基因都上调, 其中 H₂O₂ 胁迫下基因上调水平显著; 在 CHP 和 NaCl 胁迫下野生型菌株中 *ohr* 基因基因上调大约 2 倍左右。根据结果推测同属于 OsmC 超家族的两个过氧化物酶选择底物的偏好性与作用方式可能并不一样, OsmC 蛋白可能主要是以无机过氧化物作为底物, 而 Ohr 蛋白可能主要是以有机过氧化物为底物。

关键词: 耐辐射异常球菌; *osmC* 与 *ohr* 基因; 突变株; 抗氧化

1. 引言

耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans* R1, *D. radiodurans*)是一种红色非致病性, 能在极端环境下生长的革兰氏阳性细菌, 因其极强的抗电离和紫外线辐射, 抗干燥和活性氧化物而被众所周知^[1-3]。独特的抗性机制使得耐辐射异常球菌成为完成基因组测序的第一批生物体之一^[4]。在氧化胁迫条件下, 耐辐射异常球菌自身的强抗氧化机制可以保护细胞免受氧化损伤^[5]。

一般来说, 过氧化物是剧毒, 会损害细胞内的大分子物质。因此, 过氧化物的消除对细菌的存活和增殖来说非常重要^[6]。其中过氧化物还原酶被认为在细菌抵御有机或无机过氧化反应的过程中起重要作用。AhpC, Tpx, Ohr 和 OsmC 是研究最多的 4 种过氧化物还原酶。过氧化物还原酶中的有机过氧化物抗性蛋白(Ohr), 渗透胁迫诱导蛋白(OsmC), 以及许多其他未知的蛋白质都属于 OsmC 超家族。每种酶的底物选择, 调节行为, 生理学作用的不同主要取决于不同的物种^[7]。Gutierrez 等人最初是在大肠杆菌中把 OsmC 作为一个应对高渗环境所诱导的基因^[8], 因此研究耐辐射异常球菌中的 OsmC 与 Ohr 两种过氧化物酶的功能很有意义。

耐辐射异常球菌(*D. radiodurans* R1)中 *osmC* 基因 (*DR_1538*)与 *ohr* 基因(*DR_1857*)分别编码了 OsmC 与 Ohr 两种过氧化物酶。推测 OsmC 与 Ohr 可能在过氧化条件或高渗条件下起作用, 但目前对耐辐射异常球菌中这两种抗氧化酶的具体功能是否一致, 这还不清楚。因此, 本研究利用体外三段融合 PCR 方法和体内重组技术构建了 *osmC* 基因的完全缺失突变株 $\Delta osmC$ 与 *ohr* 基因的完全缺失突变株 Δohr 。通过对野生型菌株和 $\Delta osmC$ 、 Δohr 突变株进行不同的胁迫 (CHP、H₂O₂ 和 NaCl)处理以及分析两个基因在不同胁迫下的表达量, 初步探索了 *D. radiodurans* R1(DR)中两种抗氧化酶的生物功能, 为后续进行深入的体外酶活实验奠定了基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌株、质粒

本实验所用菌株和质粒如表 1 所示, 大肠杆菌于 LB 培养基(1% Typtone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0, 121℃ 高压灭菌) 37℃ 培养, 耐辐射异常球菌于 TGY 培养基(1% Typtone, 0.5% Yeast extract, 0.1% glucose, 112℃ 高压灭菌)30℃ 培养。

Table 1. Strains and plasmids of this research
表 1. 实验所用菌株和质粒

Strains and plasmids	characteristics	Source
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	CGMCC 1.633	Store in this lab
$\Delta osmC$,	<i>osmC</i> gene deleted-mutant	This study
Δohr	<i>ohr</i> gene deleted-mutant	This study
<i>E. coli</i> trans10	Competent strain	TransGen Biotech
pKatAPH3	Km ^r	Store in this lab
pKatAAD2	Spe ^r	Store in this lab
pGEM-T Easy	Amp ^r	TaKaRa

2.1.2. 主要试剂

PrimeStar HS DNA Polymerase、ExTaq 酶、dNTPs 购自 TaKaRa 公司；DNA marker、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、普通 DNA 纯化试剂盒、质粒小量提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收 DNA 试剂盒均购自北京天根生化公司；限制性内切酶购自 NEB 公司；RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司；实时定量荧光 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 购自 TaKaRa 公司；化学试剂均为分析纯。

2.2. 突变株 $\Delta osmC$ 、 Δohr 的构建

利用 Primer Premier 5.0 和 DNAMAN 软件设计 PCR 引物。分别以耐辐射异常球菌基因组中的 *osmC* (*DR_1538*) 基因、*ohr* 基因 (*DR_1857*) 以及各自基因上下游序列 (向上向下各延伸 800 bp) 为模板设计待融合的上下游片段的 PCR 引物, 再分别设计以 pKatAAD2、

pKatAPH3 载体序列为模板的抗性盒片段 PCR 引物, 引物序列如表 2 所示。

以突变株 $\Delta osmC$ 的构建为例, 用引物 1538-U-F/R、1538-D-F/R 分别扩增 *DR_1538* 基因的上下游同源臂 (524 bp 和 498 bp), 引物 1538-S-F/R 扩增壮观霉素抗性盒基因的反向互补序列 (942 bp)。以切胶回收的三个待融合的片段为模板, 各片段之间的互补序列为引物, 进行两步法融合 PCR 反应^[9]。PCR 反应第一步反应程序为 95°C 3 min; 95°C 15 s, 60°C 20 s, 72°C 6 min, 11 cycles; 72°C 10 min, 第二步 PCR 反应程序为 95°C 10 min; 95°C 30 s, 54°C 20 s, 72°C 1 min, 35 cycles; 72°C 10 min。融合片段长度为 1888 bp。PCR 扩增所用的聚合酶均为 PrimeStar HS DNA Polymerase。

回收的融合片段需加 A (72°C 10 min) 再与 pGEM-T Easy 载体 16°C 连接过夜。利用热激法将获得重组载

Table 2. Primers for fragments amplification
表 2. 目的片段扩增所用的引物

引物	引物序列(5'-3')
1538-U-F	GGGCGAGTGCCTTGGTGA
1538-U-R	CCAAGGTAGTCGGCAAATAAGTGTGCTCGCTGCGGGGC
1538-S-F	GCCCCGACGAGCAGACACTTATTTGCCGACTACCTTGG
1538-S-R	TCAGCCTTCGAGAATCGCTTCGAGCTCGCATGGAGACC
1538-D-F	GGTCTCCATGCGAGCTCGAAGCGATTCTCGAAGGCTGA
1538-D-R	GGCACATGCTTGACCCTGACC
1857-U-F	CGCTCCACACCCAGAATCAC
1857-U-R	GTTTTTCTAATCAGGATCCTCTAGGCGGTTGCTTCGGCGGTAT
1857-K-F	ATACCGCCGAAGCAACCGCCTAGAGGATCCTGATTAGAAAAAC
1857-K-R	GTGATGGTGGAGTCGGCGACGGTATCGATAAGCTTGATAT
1857-D-F	ATATCAAGCTTATCGATAACGTCGCCGACTCCACCATCAC
1857-D-R	CGCATTCTTCTGGGCACCTAC
1538-I-YZ-F	AGCGCAGTACTCGTTCAAGA
1538-I-YZ-R	GTCGAGCGCCTTGATCTCAT
1538-O-YZ-F	TGCCGTGGTAGATGTTTTTCGTC
1538-O-YZ-R	TGGGGACAAAGCAGGCAC
1857-I-YZ-F	AGTGACGACCGCCTCAACCT
1857-I-YZ-R	CCAGCGCACCTGAAAGC
1857-O-YZ-F	CAGTGACGACCGCCTCAACCT
1857-O-YZ-R	CCAGCGCACCTGAAAGC

体转入 *trans10* 感受态中, 利用蓝白斑和氨苄抗性筛选单克隆。单克隆经测序验证正确后, 提取质粒, 用限制性内切酶 *NcoI/PstI* 双酶切, 得到的酶切片段通过同源重组方法转进 DR 中, 用高浓度的壮观霉素 Spc (20 mg/mL) 筛选完全缺失突变株。挑取的单克隆子的基因组经 1538-I-YZ-F/R 引物来验证 DR_1538 内部缺失的基因(165 bp)是否存在突变株中。经 1538-O-YZ-F/R 引物来验证融合片段同源重组部位的正确性。

突变株 Δohr 的构建与突变株 $\Delta osmC$ 的构建方法类似, 其中卡纳霉素抗性盒反向插入取代了 *ohr* 基因, *ohr* 基因上下游同源臂与抗性盒的融合片段大小为 2104 bp。突变株用 20 $\mu\text{g/mL}$ Km 筛选, 筛选的单克隆子基因组用 1857-I-YZ-F/R 与 1857-O-YZ-F/R 引物分别验证突变株中 DR_1857 基因缺失和重组的情况。

2.3. CHP(异丙苯基过氧化氢)处理

从培养平板上分别挑取野生型菌株 DR 和 $\Delta osmC$ 、 Δohr 突变株的单克隆子转接于 50 mL TGY 液体培养基(含抗生素)中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6, 每个菌株的 50 mL TGY 液体菌液分装成 5 个 10 mL 的菌体, 分别加入不同体积的 CHP, 使终浓度为 0 mM、1 mM、2 mM、3 mM 和 5 mM, 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床温育 0.5 h, 取处理后的 100 μL 菌液用 PBS(磷酸钾缓冲液)倍比稀释, 每个稀释度各取 8 μL 点在 TGY 固体培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d, 观察菌落生长情况。

2.4. H₂O₂ 处理

从培养基平板上分别挑取野生型菌株 DR 和 $\Delta osmC$ 、 Δohr 突变株的单克隆转接于 20 mL TGY 液体培养基(含抗生素)中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6, 分别取 1 mL 菌体, 离心收集, 分别加 1 mL PBS(磷酸钾缓冲液)重悬, 加入不同体积的 H₂O₂, 使终浓度为 0 mM、20 mM、40 mM、60 mM、80 mM, 黑暗环境室温静置 0.5 h, 取处理后的 100 μL 菌液用 PBS(磷酸钾缓冲液)倍比稀释, 每个稀释度各取 8 μL 点在 TGY 固体培养基平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d, 观察菌落生长情况^[10]。

2.5. NaCl 处理

从培养基平板上分别挑取野生型菌株 DR 和

$\Delta osmC$ 、 Δohr 突变株的单克隆转接于 20 mL TGY 液体培养基(含抗生素)中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6, 分别取 1 mL 菌体, 离心收集菌体, 菌体分别用 1 mL 2 M 和 3 M NaCl 重悬, 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床温育 4 h, 处理后的菌液用 PBS(磷酸钾缓冲液)倍比稀释, 每个稀释度各取 8 μL 点在 TGY 固体培养基平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d, 观察菌落生长情况。

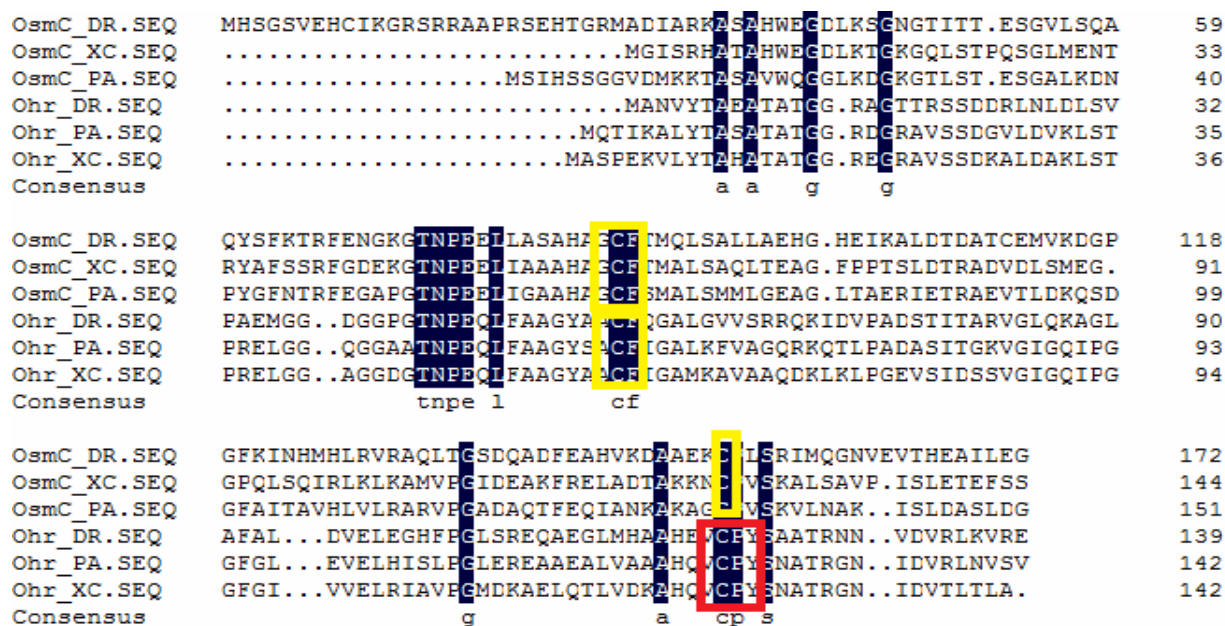
2.6. 不同胁迫下 *osmC* 基因、*ohr* 基因的表达分析

从培养基平板上挑取野生型菌株 DR, 转接于 4 瓶 20 mL TGY 液体培养基中, 分别用上述的胁迫处理方法进行 2 mM CHP、80 mM H₂O₂ 和 2 M NaCl 处理, 以未处理的野生型菌株做对照。大量收集菌体, 提取 RNA, 以反转录得到的 cDNA 为模板, 通过 QRT-PCR 分析 *osmC* 基因在 H₂O₂ 和 NaCl 胁迫处理下的表达情况与 *ohr* 基因在 CHP 和 NaCl 胁迫处理下的诱导表达情况。

3. 结果与分析

3.1. *osmC* 基因、*ohr* 基因序列结构域特征与突变株的构建

不同细菌中 OsmC 与 Ohr 蛋白的同源性分析表示, 它们是两组相关的蛋白^[11]。OsmC 与 Ohr 亚家族成员存在于革兰氏阳性和革兰氏阴性菌中, 并且与其他的原核或真核蛋白质没有显著的序列同源性^[12]。从 NCBI 基因库获得 *Deinococcus radiodurans* R1(耐辐射异常球菌)、*Pseudomonas aeruginosa*(铜绿假单胞菌)、*Xanthomonas campestris*(油菜黄单胞菌)中 *osmC* 与 *ohr* 基因的序列, 通过 DNAMAN 软件将基因序列翻译成氨基酸进行同源序列比对(图 1)。OsmC 与 Ohr 亚家族蛋白各自的同源性在 40%~60%之间, 两个亚家族之间只有约 20%的同源性。鉴于半胱氨酸残基 Cys 已被证明是 AhpC 过氧化物酶代谢有机过氧化氢的活性位点^[13], OsmC 与 Ohr 亚家族共有的比较保守的羧基末端的两个不变的半胱氨酸残基对于清除过氧化氢发挥关键性作用。OsmC 与 Ohr 亚家族之间不同之处在于第二个半胱氨酸残基相邻的氨基酸序列, Ohr 亚家族中第二个半胱氨酸(Cys125)相邻的氨基酸序列包含了一个 VCPY 基序, 而 OsmC 亚家族中并不含有(图



注：黄色框表示保守的半胱氨酸，红色框表示 VCPY 基序；DR: *Deinococcus radiodurans* R1; PA: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; XC: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913。

Figure 1. Amino acid sequence alignments of OsmC and Ohr
图 1. OsmC 与 Ohr 蛋白的氨基酸序列比对

1)。VCPY 基序使半胱氨酸处于异常亲核性的环境中，导致半胱氨酸对活性氧高度敏感^[13]。OsmC 与 Ohr 亚家族之间结构的差异可能导致两个亚家族的功能不一样。

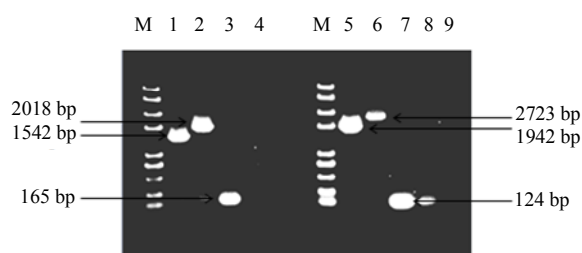
通过 PCR 方法验证 $\Delta osmC$ 突变株的构建是否成功，以突变株的基因组为模板，野生型 DR 基因组做为阳性对照，用 1538-I-YZ-F/R、1538-O-YZ-F/R 两对引物分别验证 *osmC* 基因与融合片段的大小。PCR 扩增结果显示阳性对照中 1538-I-YZ-F/R 引物扩增出 165 bp 大小的片段，突变株中不存在该片段，表明 $\Delta osmC$ 已完全缺失 *osmC*；1538-O-YZ-F/R 引物在阳性对照中扩增出 1542 bp，在突变株中扩增的片段为 2018 bp，表明壮观霉素抗性盒已成功替换 DR_1538 基因。

同理用 1857-I-YZ-F/R 与 1857-O-YZ-F/R 引物验证 Δohr 突变株，阳性对照为野生型 DR 基因组。结果显示，阳性对照中 1857-I-YZ-F/R 扩增片段大小为 124 bp，突变株中未扩增出目的条带，表明 Δohr 中不包含 *ohr* 基因。以野生型 DR 基因组为模板，1857-O-YZ-F/R 扩增出包含 DR_1857 基因上下游序列的对照片段 (1942 bp)，以突变株基因组为模板，扩增的条带大小为 2723 bp，表明卡那霉素抗性盒成功替换 DR_1857

基因，获得 Δohr 突变株。

3.2. DR 与 $\Delta osmC$ 、 Δohr 突变株在不同胁迫处理下的反应

耐辐射异常球菌 OsmC 和 Ohr 分属于两个亚家族，它们起着截然不同的或者交叉的功能值得我们去研究。本实验首先就 DR 与 $\Delta osmC$ 、 Δohr 突变株三株菌对有机过氧化物 CHP 的耐受性进行了研究：未处理的三株菌长势一样，1 mM CHP 处理 1 h 后，三株菌的长势减弱，但三株菌之间长势近似一样，2 mM CHP 处理 1 h 后， $\Delta osmC$ 突变株与 DR 长势近似一样，而 Δohr 突变株对 2 mM CHP 的敏感性比 DR 明显的提高(图 2)。结果表明 Ohr 在消除有机过氧化物的过程中起着重要作用。运用不同浓度的 H_2O_2 处理三株菌时发现，与 DR 相比， $\Delta osmC$ 突变株在 40 mM H_2O_2 处理时表现出对 H_2O_2 更敏感，随着 H_2O_2 浓度的加大，敏感性增强，80 mM H_2O_2 处理三株菌的结果如图 2 所示，而 Δohr 突变株对 H_2O_2 处理表现出与 DR 一样的长势，结果表明 OsmC 在清除无机过氧化物的过程中起着显著的作用。不同浓度的 NaCl 溶液对三株菌处理不同时间的结果并不明显，三株菌的长势与未处理比明显下降(图 3)，但三株菌之间无大的差异，推测



M: *Trans2K* Marker; 1,3,5,7,8: 1538-O-YZ-F/R、1538-I-YZ-F/R、1857-O-YZ-F/R、1857-I-YZ-F/R 引物的阳性对照; 2, 4: 1538-O-YZ-F/R、1538-I-YZ-F/R 引物扩增 $\Delta osmC$ 突变株; 6, 9: 1857-O-YZ-F/R、1857-I-YZ-F/R 引物验证 Δohr 突变株。

Figure 2. PCR assay of the mutant strains of $\Delta osmC$ and Δohr
图 2. $\Delta osmC$ 和 Δohr 突变株的 PCR 验证

OsmC 和 Ohr 在高渗条件(NaCl)下可能不起作用。

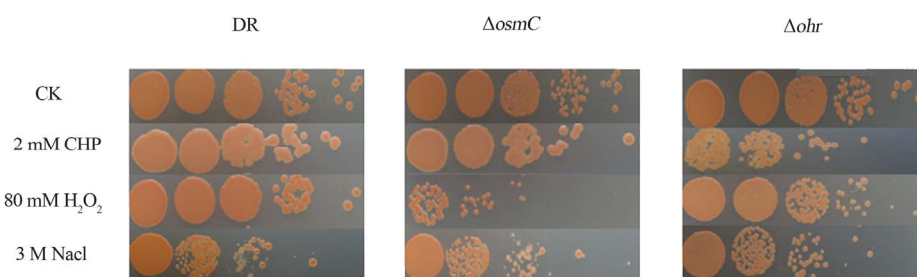
3.3. 不同胁迫处理对 *osmC* 与 *ohr* 基因转录水平的影响

我们使用实时定量 PCR 技术去探索 DR 野生型菌株中 *osmC* 与 *ohr* 基因在渗透胁迫(NaCl)和氧化胁迫(H_2O_2 或 CHP)下在转录水平的表达量。图 4(a)中的结果显示 *osmC* 基因在无机氧化胁迫(80 mMH_2O_2)下相对表达量上升了约 8.9 倍, 表明 *osmC* 基因受到 H_2O_2 的显著诱导, 而它在渗透胁迫(2 M NaCl)下相对表达

量上升了约 2 倍, 推测 *osmC* 基因可能受到渗透胁迫诱导。*ohr* 基因的相对表达量在有机氧化胁迫 CHP 和 NaCl 条件下都上升了 2 倍左右, 推测 *ohr* 基因可能受到两者的诱导。

4. 讨论

通常情况下, 氧分子是稳定的, 但是氧分子还原时会产生有毒的活性氧(ROS)^[14]。所有的 ROS 会氧化胞内的大分子, 包括 DNA 和脂质。ROS 解毒酶构成了细菌氧化胁迫抵御系统中的主要成分。参与 ROS 清除中最主要的一种酶是过氧化氢酶。很多细菌有两种类型的过氧化氢酶, 分别为单官能团的过氧化氢酶和双官能团的过氧化氢酶/过氧化物酶。这两种酶对维持细菌应对 H_2O_2 的能力非常重要。OsmC 和 Ohr 是过氧化物还原酶中研究的比较多的两种亚家族蛋白, 但每种酶在不同的物种中的存在形式、底物选择、所受调控方式并不一样。一些细菌中只存在 OsmC 或 Ohr 中的一种, 例如 *M. pneumoniae*(肺炎支原体), *Vcholerae*(霍乱弧菌)与 *X. fastidiosa*(苛养木杆菌)中只有 Ohr 同源物, 而 *E. coli* 中只有 OsmC 同源物。有一些菌中 OsmC 和 Ohr 都不存在, 例如 *H.pylori*(幽门螺



注: 菌落图是取自每个处理的稀释梯度(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5})点状涂板培养而成。

Figure 3. Effects of various stress (2 mM CHP, 80 mM H_2O_2 , 3 M NaCl) on growth of $\Delta osmC$, Δohr and DR strains
图 3. 不同胁迫处理(2 mM CHP, 80 mM H_2O_2 , 3 M NaCl)对 DR 和 $\Delta osmC$ 、 Δohr 菌株的影响

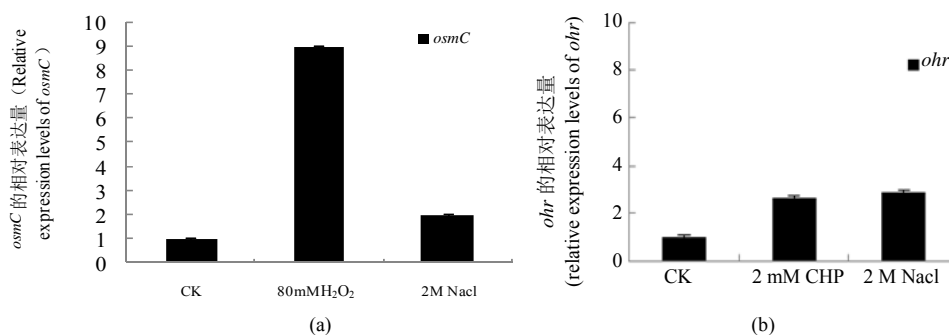


Figure 4. (a) Relative expression levels of *osmC* in different stress; (b) Relative expression levels of *ohr* in different stresses
图 4. (a) 不同胁迫条件下 *osmC* 基因的相对表达水平; (b) 不同胁迫条件下 *ohr* 基因的相对表达水平

杆菌), *M. tuberculosis*(结核分支杆菌), *N. meningitidis*(脑膜炎双球菌)等细菌^[15]。耐辐射异常球菌中存在 *OsmC* 与 *Ohr* 两种酶,但它们的具体作用功能并不清楚。

本研究成功构建了耐辐射异常球菌中 *osmC* 与 *ohr* 基因的缺失突变株,其中突变株 $\Delta osmC$ 对 H_2O_2 胁迫处理比对有机过氧化物 CHP 胁迫处理更敏感,而 Δohr 突变株对有机过氧化物 CHP 处理更敏感,表明 DR 中的 *OsmC* 与 *Ohr* 在底物选择偏好性上并不一样。DR 中 *OsmC* 过氧化物酶更偏好选择无机过氧化物,而 *Ohr* 更偏好选择有机过氧化物。

与耐辐射异常球菌不同的是 *E. coli* 中的 *OsmC* 与嗜热细菌中的 *Ohr* 功能类似,都能利用 H_2O_2 与有机过氧化物作为底物,但 *OsmC* 更偏爱有机过氧化物^[16, 17]。而 Atichartpongkul 等人提出假单胞绿脓杆菌 *osmC* 基因的突变体对渗透胁迫的敏感性增加,包括高盐和乙醇,表明假单胞绿脓杆菌中 *Ohr* 和 *OsmC* 具有有截然不同的功能^[15]。以 *E. coli* 中的 *OsmC* 与嗜热细菌中的 *Ohr* 的晶体结构作对比,*OsmC* 与 *Ohr* 结构的不同主要在活性位点上,Lesniak 等人就推测活性位点的不同导致了这两种酶在体内选择底物的喜好不同^[16-18]。而这个推测需要下一步对耐辐射异常球菌中的 *OsmC* 与 *Ohr* 两种蛋白进行体外酶活测定与 X-衍射获得的晶体结构进行验证。本研究结果不但丰富了细菌中 *OsmC* 与 *Ohr* 蛋白的作用机制,也为耐辐射异常球菌中这两种酶的工业化生产意义奠定理论依据。

参考文献 (References)

- [1] White, O., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., et al. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*, **286**, 1571-1577.
- [2] Mattimore, V. and Battista, J.R. (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing

- radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology*, **178**, 633-637.
- [3] Battista, J. (1997) Against all odds: The survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annual Reviews in Microbiology*, **1**, 203-224.
- [4] Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W. C., et al. (2000) "DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*," *Nature*, **406**, 477-483.
- [5] Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., et al. (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biology*, **5**, 769-779.
- [6] Lesniak, J., Barton, W.A. and Nikolov, D.B. (2002) Structural and functional characterization of the *Pseudomonas hydroperoxide* resistance protein *Ohr*. *The EMBO Journal*, **21**, 6649-6659.
- [7] Dubbs, J.M. and Mongkolsuk, S. (2007) Peroxiredoxin systems. Springer, Berlin, 143-193.
- [8] Gutierrez, C., Barondess, J., Manoil, C., et al. (1987) Analysis of osmotically regulated genes in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, **195**, 289-297.
- [9] 李敏, 杨谦 (2007) 一种高效构建同源重组 DNA 片段的方法——融合 PCR. *中国生物工程杂志*, **27**, 53-58.
- [10] 常胜合, 舒海燕, 陆辉明 (2008) 耐辐射球菌基因 DRB0099 缺失突变株的构建及逆境分析. *微生物学报*, **48**, 57-62.
- [11] Mongkolsuk, S. and Helmann, J.D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Molecular Microbiology*, **45**, 9-15.
- [12] Lim, Y.S., Cha, M.K., Kim, H.K., et al. (1994) The thiol-specific antioxidant protein from human brain: gene cloning and analysis of conserved cysteine regions. *Gene*, **140**, 279-284.
- [13] Chae, H.Z., Robison, K., Poole, L.B., et al. (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 7017-7021.
- [14] Halliwell, B. and Gutteridge, J. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, **219**, 1-13.
- [15] Atichartpongkul, S., Loprasert, S., Vattanaviboon, P., et al. (2001) Bacterial *Ohr* and *OsmC* paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression. *Microbiology*, **147**, 1775-1782.
- [16] Lesniak, J., Barton, W.A. and Nikolov, D.B. (2003) Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein *OsmC*. *Protein Science*, **12**, 2838-2843.
- [17] Rehse, P.H., Ohshima, N., Nodake, Y., et al. (2004) Crystallographic structure and biochemical analysis of the *Thermus thermophilus* osmotically inducible protein C. *Journal of Molecular Biology*, **338**, 959-968.
- [18] Shin, D.H., Choi, I.G., Busso, D., et al. (2004) Structure of *OsmC* from *Escherichia coli*: A salt-shock-induced protein. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **60**, 903-911.