

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(11):1352-1359; 4 November 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

选择性 σ 因子 SigF 影响耻垢分枝杆菌的抗氧化能力

吴寒宇^{1,2#}, 胡新玲^{2#}, 肖璟², 张京阳³, 陶均², 黄红兰¹, 米凯霞^{2*}

¹ 吉林大学白求恩医学院, 长春 130021

² 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 中国科学院微生物研究所, 北京 100190

³ 北京理工大学生命学院, 北京 100081

摘要: 【目的】 σ 因子是细菌 RNA 聚合酶全酶的重要组成部分, 包括必须 σ 因子和选择性 σ 因子。SigF 作为重要的选择性 σ 因子影响结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的致病性和毒力等重要功能。与之对应的在非致病性、快速生长的分枝杆菌耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*) 中, *sigF* 的调控可能与其适应一定的生理环境相关。【方法】通过基因敲除、遗传互补和抗药性分析, 系统的研究了耻垢分枝杆菌 SigF 的应答调控。【结果】*sigF* 敲除菌株与野生菌相比, 对过氧化氢特别敏感, 并且这种敏感性能够通过反式互补野生型的基因得到回复; 由于细菌体内的抗氧化能力与耐药性有较高的相关性, 进一步分析 *sigF* 敲除菌株的抗药性和抗氧化相关基因的表达情况, 显示 SigF 影响细菌清除过氧化氢的能力, 但是并不影响包括异烟肼等药物的敏感性以及与异烟肼敏感性相关基因的表达。【结论】SigF 调控的活性氧胁迫应答途径与异烟肼活化的氧化胁迫应答途径不同。另外, 实验显示 SigF 参与了耻垢分枝杆菌的色素的合成, 提示 SigF 参与的是光氧化胁迫应答途径, 与药物引起的氧化胁迫应答途径是不同的通路。

关键词: SigF, 耻垢分枝杆菌, 过氧化氢

中图分类号: **文献标识码:** **文章编号:** 0001-6209 (2012) 11-1352-08

结核分枝杆菌作为重要的病原菌, 可以感应外界的环境并迅速做出反应, 改变其代谢途径, 适应外界的环境。在这个过程中, 转录水平的调控起着重要的作用。 σ 因子作为 RNA 聚合酶全酶的组成成分参与启动子的识别以及与核心酶互作起始基因转录。在分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 中所有 σ 因子都属于 $\sigma 70$ 家族, 可细分为两类: 必须和选择性 σ 因子^[1-3]。前者包括 SigA 和 SigB, 是细菌维持正常

基因转录必须的组分, 后者包括 SigF 以及 ECF (extracytoplasmic function) σ 因子, 主要参与胁迫相关基因的转录调控^[1, 3]。结核分枝杆菌全基因组测序分析显示, 结核分枝杆菌 (*M. tb*) 基因组共编码 13 个 σ 因子, 其中 11 个为选择性 σ 因子^[2-5]。

有研究表明结核分枝杆菌 SigF^[6] 在静止生长期起调控作用, 其缺失的结核分枝杆菌在动物模型小鼠和豚鼠上的表现为致病力下降^[7-9] 以及在细菌

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070118); 中国科学院微生物研究所基础前沿项目 (KSCX2-EW-J-6); 中国科学院知识创新工程人才引进资助项目 (0954051001)

* 通信作者。Tel: +86-10-57408892; E-mail: mik@im.ac.cn

作者简介: #共同第一作者。吴寒宇 (1985 -), 女, 吉林省吉林市人, 硕士研究生, 主要从事病原细菌学研究, E-mail: whyhanyu@gmail.com; 胡新玲 (1977 -), 女, 北京市人, 助理研究员, 主要从事病原微生物学研究, E-mail: xlingh@gmail.com

收稿日期: 2012-05-07; 修回日期: 2012-08-18

成分中与致病相关硫酯的减少^[8]。另外,在过度表达 SigF 的菌株中,病原菌与宿主互作中起重要作用的细胞壁相关蛋白的表达显示明显变化^[10]。

结核分枝杆菌的 SigF 在结核菌的毒性方面有重要的作用, SigF 之前被认为是在结核菌属中慢速生长、致病菌中特有的选择性 σ 因子,并不存在于非致病性、快速生长的分枝杆菌属中^[6]。但是,生物信息学分析发现耻垢分枝杆菌中有与结核分枝杆菌 SigF 高度同源的蛋白(同源: 83% MSMEG_1804)。另外, SigF 与产孢芽孢杆菌胁迫和产孢相关的 σ 因子(SigB)序列上相似性较高,显示 SigF 可能参与耻垢分枝杆菌的胁迫应答。结核分枝杆菌等致病菌中 *sigF* 在后期表达,但耻垢分枝杆菌其在整个细菌的生长阶段都有表达,其表达量改变是由于不同的胁迫条件导致的^[11]。因此,与其在致病结核菌中与致病功能相关不同,在快生长非致病分枝杆菌中, SigF 可能对生理变化起着重要的作用。

本实验通过基因敲除、遗传互补和抗性筛选等试验,显示 SigF 在耻垢分枝杆菌的抗过氧化氢胁迫中起着重要作用。由于细菌耐药与抗氧化胁迫有相关性,我们进一步做了 *sigF* 敲除菌株的抗药谱,实验显示 *sigF* 敲除菌的抗药谱与野生菌的抗药谱没有统计学上的差异;另外,还发现 SigF 在细胞色素的合成中起着重要的调控作用。表明 SigF 调控的活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除途径与光氧化胁迫反应相关,独立于异烟肼等抗生素诱导的活性氧清除途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基:耻垢分枝杆菌 mc² 155, 质粒 p0004S, phA159 和 pMV361 由 W. R. Jacobs 教授提供。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存,作为基因克隆宿主细胞。LB 培养基用于大肠杆菌培养。耻垢分枝杆菌培养用培养基为 Middlebrook 7H9 (液体)和 7H10 (固体)(Becton Dickinson)。培养耻垢分枝杆菌潮霉素和卡那霉素用量分别是 50 和 25 mg/L。大肠杆菌培养用潮霉素、卡那霉素和氨苄青霉素用量分别是 150、50 和 100 mg/L。

1.1.2 主要试剂和仪器:BCL 生物超净工作台(北

京亚泰克隆), DK-8D 型电热恒温水浴槽(上海一恒科技有限公司), 恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司), MicroCL17R 离心机(Thermo Electron Corporation), PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司), ECM399 电转仪(BTX), HE-120 多功能水平电泳槽(上海天能科技有限公司), EPS-300 电泳仪(上海天能科技有限公司), 凝胶图像分析系统(DNR Bio-imaging System 公司), HZQ-X160 全温振荡培养箱(江苏太仓市实验设备厂), Millipore 针孔式过滤器(0.22 μm)(Millipore), 一次性使用注射器(上海治宇医疗器械有限公司), Nanodrop ND-100 spectrophotometer(NanoDrop Technologies)。7H9、7H10 培养基、Top Agar(Becton Dickinson), 牛血清白蛋白(BSA)、潮霉素(GenView 公司), 异烟肼、乙胺丁醇、利福平(AMRESCO), 链霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、Van91I、AlwNI、*MfeI*、*PacI*(Fermentas), Tween-80(Sigma), T4 DNA 连接酶、RNase-free DNase I(New England BioLabs), *Hind* III、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(TaKaRa Biotechnology), TransTaq HiFi DNA 酶(含 dNTPS)(TransGen), 过氧化氢、葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司), Trizol、Superscript first strand synthesis system(Invitrogen)。

1.2 基因敲除与互补菌株构建

1.2.1 敲除载体构建和噬菌体扩增:通过 PCR 扩增 *sigF* 的左右臂, 左臂引物是 MSMEG_1804LF: TTTTTTTTCAGAACTGAAGACGACCCGTGAGGGTA 和 MEMEG_1804LR: TTTTTTTTCAGTTCCTGATGTC GAGAACGTCTGCCGT; 右臂引物为 MSMEG_1804RF: TTTTTTTTCAGAGACTGTGCTGGCCAAGTCGCT 和 MSMEG_1804RR: TTTTTTTTCAGCTTCTGTGGGAAC ACCGATGGAACCT(下划线表示 *AlwNI* 的酶切位点)(图 1A)。限制性内切酶 *AlwNI* 酶切扩增产物 1804 L(左臂)和 1804 R(右臂), 回收酶切片段。*Van91I* 酶切载体 p0004S, 回收 3.6 kb 和 1.6 kb 大小的片段。酶切片段 1804 L、1804 R、3.6_{p0004} 和 1.6_{p0004} 连接并转化入 DH5 α , 挑选单菌落提质粒测序, 验证 1804 L 和 1804 R 臂正确连入 p0004S 进而获得载体 p0004-1804。*PacI* 酶切 p0004-1804 和 phA159, 回收并连接相应片段经体外包装获得 phasmid phA159-1804。将 phA159-1804 电击转化耻垢分枝杆菌, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养获得噬菌斑, 扩增 phage, 提高滴度到 10¹⁰/mL。

1.2.2 基因敲除:取培养至对数期 (OD_{600} 在 0.6 - 0.8) 的 mc^2155 , 用 MP Buffer 洗 2 次后用 7H9 培养基重悬, 然后与高滴度 phage 等体积混匀, 置于 37°C 共培养 3h, 最后将共培养液均匀涂布在含潮霉素的 7H10 平板上, 37°C 培养。挑选单菌落, 提基因组, PCR 验证基因是否被敲除。

1.2.3 互补载体构建:PCR 扩增目的基因, 引物为 pMV361-1804F: CCGGGCAATTGCGGTGACGTCCG AATACGCAGA 和 pMV361-1804R: CCGGGAAGCT TCTACTGCAGCTGGTCGCG。MfeI 和 Hind III 酶切回收扩增产物和载体 pMV361^[12]。连接酶切片段, 并转化入 DH5 α 。挑选单菌落测序, 测序正确的质粒电击转入 *sigF* 突变株。挑选单菌落提取基因组, PCR 验证正确后保菌。

1.3 过氧化氢胁迫实验

从 -80°C 冰箱冻存管中复苏种子液, 存放于 4°C。按 1:100 接种量接种, 培养至 $OD_{600} = 0.8 - 1.0$, 将上述菌液再按 1:100 接种量接种于新鲜的培养基, 培养至 $OD_{600} 0.3$ 左右。取出 2 mL 菌液于 50 mL 离心管中, 加过氧化氢胁迫。取对照组和处理组做梯度稀释, 每个梯度取 3 μ L 点平板。37°C 培养 3 天后拍照。

1.4 菌落形态和颜色观察

上述种子液, 按 1:100 接种量接种, 培养至 $OD_{600} = 0.8 - 1.0$ 。直接用牙签划线 LB 平板, 37°C 培养 4 天后拍照。

1.5 药物最小抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测定

上述种子液, 按 1:100 接种量接种, 培养至 $OD_{600} = 0.15$ 。稀释 100 倍后取 40 μ L 加入 96 孔细胞培养板, 加入不同浓度的抗生素: 异烟肼 (Isoniazid, INH)、乙胺丁醇 (ethambutol, EMB)、利福平 (Rifamycin, RIF)、链霉素 (Streptomycin, STR)、氨苄青霉素 (Ampicillin, AMP) 和卡那霉素 (Kanamycin, KAN), 终体积为 80 μ L。37°C 共培养 3 天后观察细菌生长状况, 对菌生长有抑制的抗生素浓度定为 MIC。实验结果重复 3 次以上。

1.6 RNA 提取和 qPCR

上述种子液, 按 1:100 接种量接种, 培养至 $OD_{600} = 0.3$ 。离心收集菌体, 重悬于 Trizol (Invitrogen) 并按说明书提取 RNA。RNA 中的基因组 DNA 用 RNase-free DNase I (New England

BioLabs) 除去, RNA 的浓度用 Nanodrop ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) 定量。cDNA 合成按 Superscript first strand synthesis system (Invitrogen) 所提供的方法进行。*rpoD* rRNA 基因做内参进行 PCR 反应。SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Takara Biotechlogy) 用于 qPCR 反应。引物如下: *katG*: TGCCCCGCGGAGTTCAAGCTG 和 GTTGACGTC GAGCACCCGCA; *katA*: CGCAGGCAGAACCTCGGC AA 和 GGCCATCACCACGCGTTCGT; *mcat*: CCG CTTCCAGAACGTCGCGT 和 TGCCTTCTCACCACCG AGC; *rpoD*: GCGTGTACGACGGCGATCA 和 TGCA TGTCGACCCGCGACCAC。

2 结果

2.1 耻垢分枝杆菌 *sigF* 突变体构建

利用分枝杆菌的噬菌体的特异转导法 (Mycobacteriophages in specialized transduction) 获得候选基因的敲除菌株。通过 PCR 扩增并回收得到 *sigF* 的左臂和右臂 (图 1-B)。Van91I 酶切载体 p0004S, 回收 3.6 kb 和 1.6kb 大小的片段与 AlwNI 酶切回收的 *sigF* 左臂和右臂连接获得了载体 p0004-1804 (图 1-C)。PacI 酶切 p0004-1804 和 phA159 后经连接和体外包装获得了 phasmid 载体 phA159-1804。将 phA159-1804 电击转化耻垢分枝杆菌, 30°C 培养得到大量的噬菌斑 (图 1-D), 通过扩增获得了滴度大于 10^{10} /mL 的噬菌体。将 0.5mL 噬菌体感染 0.5mL 耻垢分枝杆菌, 37°C 培养获得了大约 500 个潮霉素抗性克隆。随机挑选 4 个克隆培养并提取基因组 DNA, PCR 验证获得了 2 个 *sigF* 缺失的突变体。

2.2 *sigF* 突变导致耻垢分枝杆菌对过氧化氢敏感

由于 SigF 与产孢芽孢杆菌的胁迫和产孢相关的 σ 因子 (SigB) 序列上相似性较高, 推测 SigF 可能与胁迫应答相关。首先比较野生型和 *sigF* 突变体 ($\Delta sigF$) 过氧化氢耐受力的差别。7 和 15-mmol/L 过氧化氢处理 1 h 后按 10 倍梯度稀释、点板培养的结果 (图 2-A) 表明 *sigF* 突变导致耻垢分枝杆菌过氧化氢耐受力减弱。通过反式互补将 *sigF* 导入 *sigF* 突变体获得互补菌株 (C- $\Delta sigF$)。通过比较野生型、突变体和互补菌株在 5 mmol/L 过氧化氢处理 3h 后的生长状况 (图 2-B) 发现互补菌株表现出比

野生型菌株更高的过氧化氢耐受力。这些结果表明 *sigF* 调控分枝杆菌的过氧化氢响应能力。

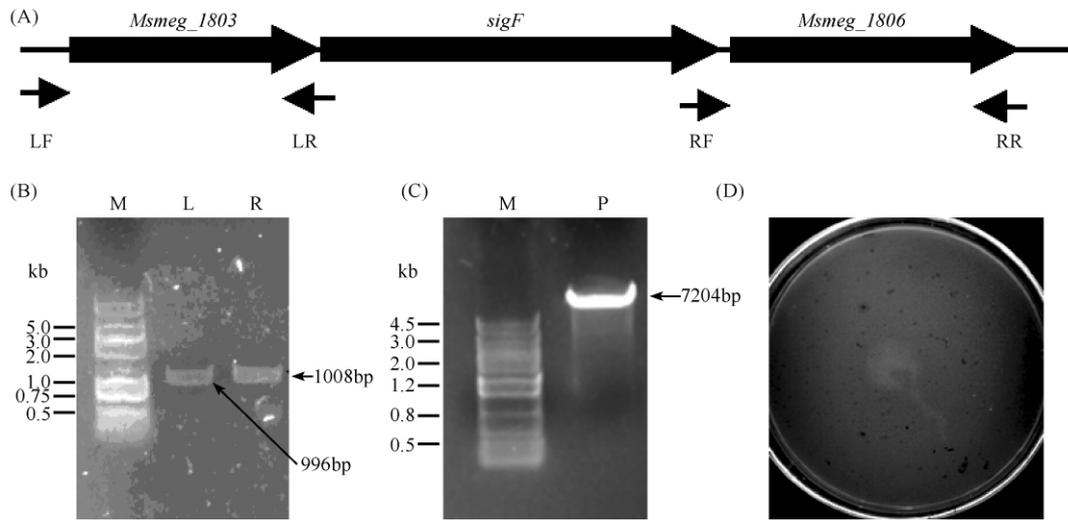


图 1 *sigF* 敲除载体构建和噬菌体繁殖

Fig. 1 Plasmids construction and phage amplification for *sigF* knockout. (A) Genomic arrangement of the *sigF* gene loci. Genes are shown as large arrows in their native orientation. Small arrows represent the primers used to construct the knockout *sigF* ($\Delta sigF$) strain. (B) PCR amplified upstream (L) and downstream (R) fragments of *sigF*; (C) The plasmid p0004-1804 (P); (D) Amplified phage containing the phasmid phA159-1804. M: DL2000 DNA ladder.

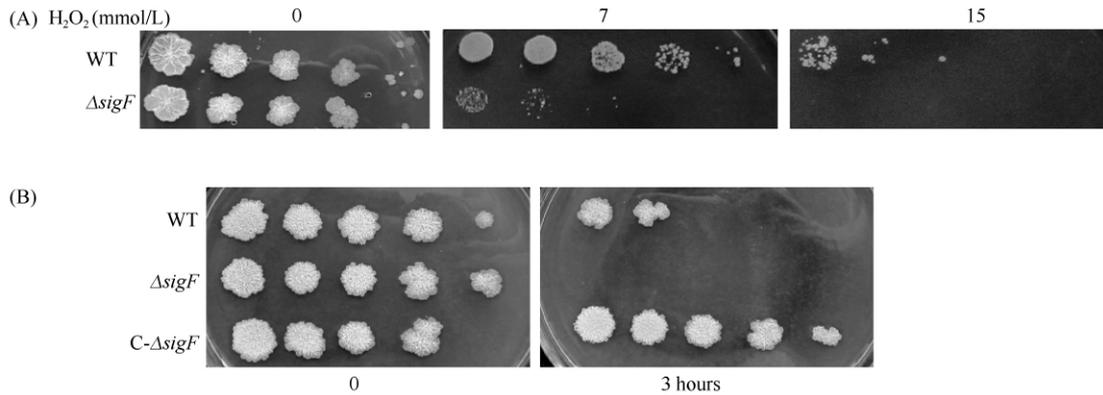


图 2 *sigF* 突变导致耻垢分枝杆菌对过氧化氢敏感

Fig. 2 SigF was involved into H_2O_2 resistance. A: The strains of *M. smegmatis* mc²155 wild-type (WT) and knock-out *sigF* mutant ($\Delta sigF$) were grown to an OD of 0.3 then treated with 0, 7 and 15 mmol/L H_2O_2 , respectively. The diluted culture of 1 hour post-treatment of *M. smegmatis* culture was spotted (3 μ L) onto solid 7H10 media with 10% ADS. The panel represented 10-fold dilution series from, 10^0 to 10^{-4} fold. (B) Complementary analysis of $\Delta sigF$ H_2O_2 resistance. H_2O_2 sensitivity was determined as described in (A) except the H_2O_2 concentration was 5 mmol/L.

2.3 SigF 参与的过氧化氢胁迫反应与异烟肼 (INH) 等药物引起的过氧化物胁迫反应无关

目前, 抗药机制从传统的一对一的药物对靶基因的对应关系, 发展到药物胁迫的全网络适应改变概念, 其中药物诱导细菌产生的活性氧在抗药、耐药机制中起着重要的作用^[13]。由于上面的实验显示, SigF 参与了过氧化氢的胁迫途径, 我们进一步检测

了 *sigF* 敲除菌株对药物抗性的改变。

其中, 异烟肼是目前治疗结核病最常用的一线药物, 其作为前体药物进入分枝杆菌细胞后, 在过氧化物/过氧化氢酶作用下形成活性药物进而抑制分枝菌酸的合成^[14-17]。过氧化物/过氧化氢酶 KatG 突变导致细菌对异烟肼不再敏感, 同时该突变也导致细菌对过氧化氢超敏^[14]。由于 *sigF* 突变导致耻

垢分枝杆菌过氧化氢耐受力减弱,推测 *SigF* 有可能影响异烟肼的抑菌能力。通过测定野生型、突变体和互补菌株的异烟肼最小抑菌浓度发现 *sigF* 突变并不影响耻垢分枝杆菌异烟肼的敏感性(表 1)。同时 *katG* 基因的转录水平在突变体和野生型中没有

明显的变化(图 3)。这些说明耻垢分枝杆菌至少含有一种与异烟肼敏感性无关的过氧化氢清除机制。另外,我们还检测了另外 5 种药物的抗性(表 1),我们的结果显示 *sigF* 突变对所检测的药物没有任何影响。

表 1 *SigF* 敲除菌株与野生菌的药敏实验

Table 1 The Minimum inhibitory concentrations (MIC) (mg/L) of isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol, ampicillin and kanamycin in *sigF* mutant ($\Delta sigF$) strain and wild strain

strain	isoniazid	rifampicin	streptomycin	ethambutol	ampicillin	kanamycin
wild strain	6.25	0.39	0.05	1.0	39	1.95
$\Delta sigF$	6.25	0.78	0.05	1.0	20	1.95

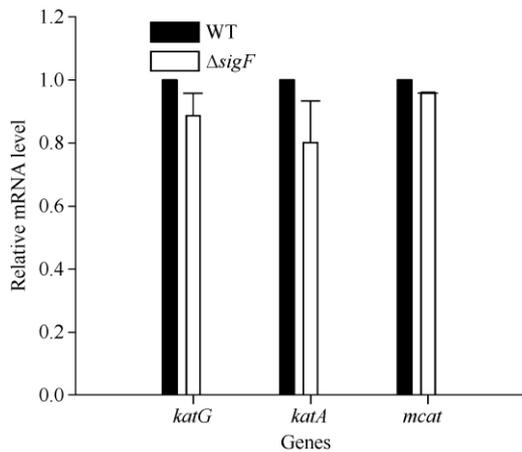


图 3 *SigF* 与异烟肼活化相关基因的表达

Fig. 3 The strain of *sigF* mutant ($\Delta sigF$) was no defect in Isoniazid (INH) resistance. *SigF* did not regulate the expressions of *katG*, *katA* and *mcat*.

2.4 *sigF* 突变改变细胞色素合成

与氧化胁迫不同的是,光氧化胁迫最近才开始研究^[18]。细胞色素在保护细胞免受外界环境如光伤害方面起到非常重要的作用。在固体培养基上, *sigF* 突变体呈白色而野生型为桔黄色(图 4),这说明 *SigF* 正调控细胞色素合成。互补菌株颜色在突变体和野生型之间(图 4),这说明互补菌株部分恢复了 *sigF* 突变导致的色素变化。

3 讨论

结核分枝杆菌是典型的内生菌,其为了存活,在长期的进化中,发展了一套感应外界环境,迅速调整自身的新陈代谢的机制。分枝杆菌选择性 σ 因子在细菌响应外界环境变化中起到非常重要的作用,

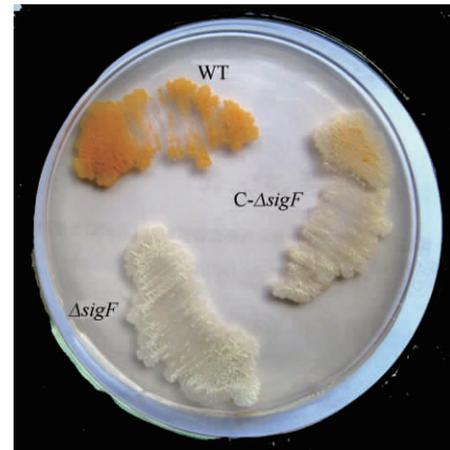


图 4 *SigF* 在细菌色素形成中起重要的作用

Fig. 4 *SigF* played important role in bacterial pigment formation. The strains of *M. smegmatis* mc² 155 wild-type (WT), *sigF* mutant ($\Delta sigF$) and the complementary (C- $\Delta sigF$) strains were cultured on LB agar and photographed after 4 days incubation at 37°C.

并且影响细菌与宿主的相互作用^[5, 7-10]。我们的研究发现耻垢分枝杆菌选择性 σ 因子 *SigF* 参与细菌的抗氧化反应,对细菌体内活性氧的清除起着相当重要的作用,其缺失导致细菌对过氧化氢的敏感(图 2)。目前的抗药机理的研究认为,活性氧的清除与抗药性有较高的相关性。*sigF* 对于药物的影响报道并不多, Singh 等的研究发现利福平等药物处理后其在转录水平没有改变^[11];由于研究比较清楚的活性氧清除蛋白是过氧化物/过氧化氢酶 *KatG*,为此我们比较了野生型和 *sigF* 突变体的 *katG* 的表达水平,结果显示 *SigF* 并不调控 *katG* 的转录(图 3)。由于 *KatG* 是已知的参与异烟肼抑菌作用的关键蛋白^[15],因此我们也比较了野生型和 *sigF* 突变体的异

烟肼耐受力;结果表明 SigF 不影响细菌异烟肼敏感性,这与其不调控 *katG* 转录是一致的。此外, SigF 也不调控活性氧清除相关基因 *katA* 和 *mcat* 的转录(图 3)。另外,我们还检测了其它 5 种药物的抗药谱, *sigF* 的突变菌株与野生菌株没有统计学意义上的差别;因此,我们推测耻垢分枝杆菌中存在多条过氧化氢清除途径。SigF 参与的过氧化氢清除途径与药物胁迫引起的活性氧清除途径除调控胁迫响应外还可能调控其它的过程。我们的实验发现,其调控细菌色素的形成(图 4)。有研究表明耻垢分枝杆菌 ATCC 607 菌株 SigF 通过影响异胡萝卜(isorenieratene)合成基因簇基因的表达来调控类胡萝卜素(carotenoid)合成^[19],但 Gebbard 在 2008 年的报道中指出 *mc²155* 中并没有发现相似的现象^[20]。但我们的结果说明 SigF 确实影响 *mc²155* 的色素形成。这种差别可能是由于不同菌株形成色素的时期或速度不同造成的,在延长培养到 4 天后,色素才会被观察到,预示胡萝卜素在细菌的后期生长中,起着重要的作用。色素作为重要的保护物质对细菌的生命活动非常重要^[21-23]。色素缺失可能导致细菌对光氧敏感,导致其死亡概率增加^[22-23]。因此推测, SigF 可能保护细菌免受光氧损伤。

本试验中,我们通过遗传、药敏实验等方法,证明 SigF 在耻垢分枝杆菌的抗过氧化氢胁迫中起着重要的作用,并且这种氧化胁迫与异烟肼等药物诱导的氧化胁迫途径不同。由于 SigF 在细胞色素的合成中起着重要的调控作用, SigF 在光氧化胁迫反应中起着重要的作用。因此,进一步深入研究 SigF 在光氧化胁迫中的作用,比较 SigF 在致病菌与非致病菌的不同应答反应,将为深入理解氧化胁迫在不同环境中的作用机制提供理论基础。

致谢 感谢 Albert Einstein College of Medicine 的 William R. Jacobs, Jr 教授提供 *mc²155* 菌株, p0004S 和 pH159 质粒。

参考文献

[1] Gruber TM, Gross CA. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 441-466.

- [2] Gomez JE, Chen JM, Bishai WR. Sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease*, 1997, 78 (3-4): 175-183.
- [3] Rodrigue S, Provvedi R, Jacques PE, Gaudreau L, Manganelli R. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30 (6): 926-941.
- [4] Manganelli R, Provvedi R, Rodrigue S, Beaucher J, Gaudreau L, Smith I. Sigma factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (4): 895-902.
- [5] Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, Singh Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS Journal*, 2010, 277 (3): 605-626.
- [6] DeMaio J, Zhang Y, Ko C, Young DB, Bishai WR. A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1996, 93 (7): 2790-2794.
- [7] Chen P, Ruiz RE, Li Q, Silver RF, Bishai WR. Construction and characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the alternate sigma factor gene, *sigF*. *Infection and Immunity*, 2000, 68 (10): 5575-5580.
- [8] Geiman DE, Kaushal D, Ko C, Tyagi S, Manabe YC, Schroeder BG, Fleischmann RD, Morrison NE, Converse PJ, Chen P, Bishai WR. Attenuation of late-stage disease in mice infected by the *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the SigF alternate sigma factor and identification of SigF-dependent genes by microarray analysis. *Infection and Immunity*, 2004, 72 (3): 1733-1745.
- [9] Karls RK, Guarner J, McMurray DN, Birkness KA, Quinn FD. Examination of *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor mutants using low-dose aerosol infection of guinea pigs suggests a role for SigC in pathogenesis. *Microbiology*, 2006, 152 (Pt 6): 1591-1600.
- [10] Williams EP, Lee JH, Bishai WR, Colantuoni C, Karakousis PC. *Mycobacterium tuberculosis* SigF regulates genes encoding cell wall-associated proteins and directly regulates the transcriptional regulatory gene *phoY1*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (11): 4234-4242.

- [11] Singh AK, Singh BN. Conservation of sigma F in mycobacteria and its expression in *Mycobacterium smegmatis*. *Current Microbiology*, 2008, 56 (6) : 574-580.
- [12] Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, 1991, 351 (6326) : 456-460.
- [13] Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular Cell*, 2010, 37 (3) : 311-320.
- [14] Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Science*, 2010, 19 (3) : 458-474.
- [15] Kang TJ, You JC, Chae GT. Identification of catalase-like activity from *Mycobacterium leprae* and the relationship between catalase and isonicotinic acid hydrazide (INH). *Journal of Medical Microbiology*, 2001, 50 (8) : 675-681.
- [16] Eylan E, Brachfeld R. Properties of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to isoniazid hydrazin (INH). *Bulletin of the Research Council of Israel. Section E: Experimental medicine*, 1959, 8E: 40-41.
- [17] Lanyi M, Roka J, Eidus L. Experimental and clinical data on the INH-resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Therapia Hungarica*, 1953, 2: 26-27.
- [18] Ziegelhoffer EC, Donohue TJ. Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature Review of Microbiology*, 2009, 7 (12) : 856-863.
- [19] Provvedi R, Kocincova D, Dona V, Euphrasie D, Daffe M, Etienne G, Manganelli R, Reytrat JM. SigF controls carotenoid pigment production and affects transformation efficiency and hydrogen peroxide sensitivity in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (23) : 7859-7863.
- [20] Gebhard S, Humpel A, McLellan AD, Cook GM. The alternative sigma factor SigF of *Mycobacterium smegmatis* is required for survival of heat shock, acidic pH and oxidative stress. *Microbiology*, 2008, 154 (Pt 9) : 2786-2795.
- [21] Rao NA, Saraswathy S, Smith RE. Tuberculous uveitis: distribution of *Mycobacterium tuberculosis* in the retinal pigment epithelium. *Archives of Ophthalmology*, 2006, 124 (12) : 1777-1779.
- [22] Ichiyama S, Shimokata K, Tsukamura M. Relationship between Mycobacterial species and their carotenoid pigments. *Microbiology and Immunology*, 1988, 32 (5) : 473-479.
- [23] David HL. Carotenoid pigments of *Mycobacterium kansasii*. *Applied Microbiology*, 1974, 28 (4) : 696-699.

Sigma factor F regulates *Mycobacterium smegmatis* hydrogen peroxide resistance

Hanyu Wu^{1,2#}, Xinling Hu^{2#}, Jing Xiao², Jingyang Zhang³, Jun Tao², Honglan Huang¹, Kaixia Mi^{2*}

¹ Norman Bethune Medical College, Jilin University, Changchun 130021, China

² CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

³ School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing, 100081, China

Abstract: [Objective] A sigma factor is an important component of RNA polymerase complex and is essential for initiation of RNA synthesis. The sigma factors fall into 2 categories: primary sigma factor is essential for bacterial growth and the alternative sigma factor is activated under different environmental conditions. Sigma F (SigF) is one of the sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*, affecting its virulence and pathogenesis. In contrast, the ortholog of the non-virulent, fast growing strain *Mycobacterium smegmatis* has been suggested without similar physiology roles. Here, we studied the functions of *M. smegmatis* SigF. [Methods] *sigF* knockout *Mycobacterium smegmatis* strain was constructed by specialized transduction. The wild type, knockout and complementary strains were challenged by oxidative stress and antibiotics. [Results] The knockout *sigF* strain was susceptible oxidative stress, compared to wild type. Furthermore, there was no defect in resistance to antibiotics including isoniazid between the knockout *sigF* strain and wild type strain. In addition, SigF is required for carotenoid pigment production in *M. smegmatis*. [Conclusion] Our data suggested that SigF is important to detoxify the reactive oxygen species, probably through photo-oxidative stress response pathway, which is independent on the pathway that is required for the isoniazid activation.

Keywords: Sigma factor F, *Mycobacterium smegmatis*, hydrogen peroxide

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070118), by the Application Foundation and Advanced Technology Program of the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-J-6) and by the Knowledge Innovation Program of The Chinese Academy of Sciences (0954051001)

#These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel: +86-40-57408892; Fax: +86-40-62566511; E-mail: mik@im.ac.cn

Received: 7 May 2012 / Revised: 18 August 2012