

布氏柠檬酸杆菌 JPG1 的 SoxR 对好氧/厌氧-甲萘醌胁迫生理响应的调控

徐巧, 高磊, 陈升磊, 张旖旎, 王小雨*

东北师范大学 环境学院, 吉林 长春 130117

徐巧, 高磊, 陈升磊, 张旖旎, 王小雨. 布氏柠檬酸杆菌 JPG1 的 SoxR 对好氧/厌氧-甲萘醌胁迫生理响应的调控[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1621-1630.

XU Qiao, GAO Lei, CHEN Shenglei, ZHANG Yini, WANG Xiaoyu. Regulatory role of SoxR in *Citrobacter braakii* JPG1 in physiological response to aerobic/anaerobic-menadione stress[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1621-1630.

摘要: SoxR 是细菌应答氧化胁迫的转录调控因子之一, 在细菌逆境非生物胁迫防御中发挥着至关重要的作用。目前对细菌应答氧化胁迫的认知主要来自包括大肠杆菌在内的少数模式菌, 为了研究非模式细菌应答氧化胁迫的方式, 本研究以肠杆菌科中常见的布氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter braakii*)为模型, 基于全基因组背景分析 SoxR 进化关系, 构建 *soxR* 基因缺失菌株($\Delta soxR$), 并以氧化还原循环化合物甲萘醌为诱导剂, 通过细胞存活能力测定, 探究转录因子 SoxR 在应答好氧/厌氧-甲萘醌胁迫中的作用。好氧条件下, 低浓度甲萘醌(0.1 mmol/L)胁迫 24 h 后, 野生型细胞数量比 0 h 增加了 4.2 倍, $\Delta soxR$ 仅增加了 1.3 倍; 高浓度甲萘醌(0.3 mmol/L)胁迫的野生型和 $\Delta soxR$ 细胞数量分别为 0 h 时的 29% 和 0.2%。厌氧条件下, 甲萘醌不影响野生型和 $\Delta soxR$ 细胞的生长, 与对照组(0 mmol/L)相比无显著差异($P > 0.05$)。结果表明, *C. braakii* JPG1 的 SoxR 仅在有氧条件下响应氧化还原循环化合物甲萘醌的胁迫并增强了菌株的抗氧化能力, 对厌氧-甲萘醌无响应。本研究为探究细菌在不同氧条件下转录调控因子 SoxR 对甲萘醌胁迫响应的调控作用提供了理论基础。

关键词: 细菌; 转录调控因子; 氧化还原循环化合物; 氧化应激

Regulatory role of SoxR in *Citrobacter braakii* JPG1 in physiological response to aerobic/anaerobic-menadione stress

XU Qiao, GAO Lei, CHEN Shenglei, ZHANG Yini, WANG Xiaoyu*

School of Environment, Northeast Normal University, Changchun 130117, Jilin, China

Abstract: SoxR, one of bacterial transcriptional regulators, plays a crucial role in bacterial

资助项目: 国家自然科学基金(52070037)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (52070037).

*Corresponding author. E-mail: xywang@nenu.edu.cn

Received: 2024-07-12; Accepted: 2024-11-29; Published online: 2024-12-02

responses to oxidative stress induced by unfavorable environmental conditions. So far, the understanding of bacterial responses to oxidative stress mainly stems from a handful model bacteria such as *Escherichia coli* and the studies on non-model bacterial responses to oxidative stress are limited. In this study, *Citrobacter braakii* JPG1, a commonly occurring strain of enterobacteria, was used as a model for the first time to explore the role of SoxR in the responses to aerobic/anaerobic-menadione stress. First, we analyzed the phylogenetic relationship of SoxR based on the whole genome and constructed the *soxR*-deleted strain ($\Delta soxR$). Then, the cell counts of the wild type (WT) and $\Delta soxR$ were compared under aerobic/anaerobic-menadione stress. The results showed that the cell count of WT exposed to the aerobic-low concentration menadione (0.1 mmol/L) stress for 24 h increased by 4.2 times compared with that at the time point of 0 h, while that of $\Delta soxR$ only increased by 1.3 times. The vast majority of WT and $\Delta soxR$ cells died after exposure to the aerobic-high concentration menadione (0.3 mmol/L) stress for 24 h, with the cell counts only 29% and 0.2% of those at the time point of 0 h, respectively. Interestingly, the cell counts of WT showed no significant difference between the anaerobic-menadione stress and the control ($P>0.05$), and the same was true for $\Delta soxR$. All these results indicated that SoxR of *C. braakii* JPG1 only has a regulatory effect on the redox cycling compound menadione under aerobic conditions and enhance the antioxidant capacity. Under anaerobic conditions, menadione failed to activate SoxR. The findings from this study provide new insights into understanding both the physiological responses to menadione stress and the regulatory role of SoxR under different oxygen conditions.

Keywords: bacteria; transcriptional regulator; redox-cycling compounds; oxidative stress

细胞内氧化还原稳态对生物大分子功能的正常发挥至关重要,是维持正常生命活动的先决条件。作为单细胞微生物,细菌更易于遭受外部各种不利环境(如氧化还原循环化合物的威胁并影响细胞存活^[1]。氧化还原循环化合物(redox-cycling compounds, RCCs)是一类在生理条件下易被还原和再氧化的低分子量化合物^[2-3]。RCCs包括细菌、真菌和植物产生的天然抗生素和酚嗪物质,也包括人工合成的百草枯、甲萘醌等。由于RCCs在细胞内发生的单电子循环过程伴有超氧阴离子的生成,因此研究RCCs的毒性效应以及细胞应答是生物学领域中的一个重要方向^[3]。细菌主要通过适应性反应调节各种代谢活动以抵御逆境造成的损伤^[4-5]。转录调控因子是细菌调控相关基因应答逆境胁迫的

序列结合使细菌对逆境迅速做出响应^[6]。在过去的40多年里,细菌转录调控因子应答氧化胁迫一直是氧化应激研究领域的热点,对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的研究加深了研究人员对氧化应激问题的理解^[7-8]。但目前对细菌氧化应激相关转录调控因子的认知仍然十分有限,除*E. coli*等少数模式细菌外,绝大多数细菌转录调控因子如何进行表达调控尚不明晰^[6]。

SoxR是MerR家族的一种转录调控因子,广泛分布于变形菌门(α 、 β 、 γ 、 δ)和放线菌门,存在于超过65个属的微生物基因组中,在调控细菌应对氧化胁迫中发挥重要作用^[9-11]。SoxR为二聚体转录调控因子,每个亚基含有1个[2Fe-2S]簇,此[2Fe-2S]活性中心可感知生物体内的过氧化物,并激活后续相关抗氧化基因的转录^[12-14]。目前,对*E. coli*的SoxR调控机制

的研究最为透彻。此前,普遍认为 *E. coli* 在受到 RRCs 胁迫时,由化合物产生超氧阴离子间接氧化[2Fe-2S]活性中心激活 SoxR^[14-15]。然而,2011年 Gu 等^[16]证明了吩嗪硫酸甲酯等药物可在厌氧环境中激活 *E. coli* 的 SoxR,提出了 SoxR 可被 RRCs 直接激活的新观点,修正了长期以来研究人员对 SoxR 的认知。但是, *E. coli* 之外的其他细菌暴露于不同氧条件(好氧、厌氧)的 RRCs 时, SoxR 是否采用类似的调控机制尚不明晰。

C. braakii JPG1 为本实验室前期分离的一株可在好氧/厌氧条件下生长并对重金属 Cu²⁺ 具有耐受和去除能力的兼性厌氧菌^[17]。目前关于 *C. braakii* 的 SoxR 的研究较少,其是否与 *E. coli* 的 SoxR 具有相似的功能还有待进一步探究。本研究以肠细菌中常见的 *C. braakii* JPG1 为研究对象,基于全基因组测序结果阐述 SoxR 调控基因的基本特征及其系统发育进化关系;通过同源重组技术构建 *soxR* 基因缺失菌株 ($\Delta soxR$),比较野生型(wild type, WT)与 $\Delta soxR$ 分别于好氧/厌氧条件暴露在氧化还原循环化合物甲萘醌时的细胞存活数量,揭示 *C. braakii* JPG1 的 SoxR 应对好氧/厌氧-甲萘醌胁迫的差异,以期为全面理解除 *E. coli* 等模型系统之外的其他兼性厌氧菌的 SoxR 在不同氧条件下对甲萘醌胁迫的响应提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

C. braakii JPG1 是课题组前期分离并于本实验室保存,目前已经完成了全基因组测序(GenBank 登录号:CP063074-CP063075)。*E. coli* S17 pir 感受态细胞、pRE112 质粒、DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、2×Superpfu PCR mix、

5×Seamless Cloning mix、2×Taq PCR mix、DL2000 DNA marker 购自宝赛生物科技(杭州)有限公司,氯霉素购自 Sigma 公司, LB 培养基、琼脂购自海博生物技术(青岛)有限公司。

LB 液体培养基:蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L。LB 固体培养基中含 2% 的琼脂。LB 固体培养基中根据需求加入 34 μg/mL 氯霉素。

好氧培养条件:置于摇床中 120 r/min、30 °C 培养;厌氧培养条件:在厌氧瓶中通入氮气 20 min, 排出培养基中的氧气,并将连接的铝箔气袋中充满氮气,以保证密闭培养过程中持续提供氮气,将培养瓶置于厌氧培养箱中(广州瑞丰公司) 30 °C 静置培养。

1.2 *C. braakii* JPG1 的 SoxR 调控基因的基因组背景

利用 Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/>) 数据库通过同源性比对的方法对 *C. braakii* JPG1 的全基因组序列进行功能注释,并对照文献中细菌 SoxR 所调控的氧化应激基因^[11,16],查找 *C. braakii* JPG1 基因组中受 SoxR 调控的氧化应激基因。

1.3 *C. braakii* JPG1 的 SoxR 系统发育树构建

利用 ClustalX 1.83 软件比对了 *C. braakii* JPG1 与其他 12 株菌的 SoxR 氨基酸序列,采用 MEGA 6.0 软件运用最大似然法(maximum likelihood, M-L)构建系统发育树,数据自展重复抽样次数设定为 1 000 次。

1.4 *soxR* 基因缺失菌株的构建

1.4.1 引物

采用 Oligo 7 软件设计引物,用于 *soxR* 基因缺失菌株的构建(表 1)。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。选取 *soxR* 上下游 300–500 bp

表 1 构建 $\Delta soxR$ 所涉及的引物

Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>soxR</i> -Up- <i>Sma</i> I-F	TCCCCCGGGCGCCGCCATACTGACG CAGAG
<i>soxR</i> -Up-R	TCCATCAGATATTTACAAAATCGCTT TACCTCAAGTTAA
<i>soxR</i> -Down-F	GAGGTAAAGCGATTTTGTGAAATATC TGATGGATTGAC
<i>soxR</i> -Down- <i>Kpn</i> I-R	GGGGTACCACGCGCAATAAATAATCA GTC
pRE112- <i>ter</i> -F	ATGGAAAAGAAATTACCCCGAA
pRE112- <i>ter</i> -R	TCAATCATCTTCCAGCAGACGC
<i>soxR</i> -JD-F	AGCGGGCAATAATCTTACAGG
<i>soxR</i> -JD-R	CGGAACCTCACCTAATGTGCTC

设计 *soxR*-Up/*soxR*-Down 引物对, 并分别在引物 *soxR*-Up-F 和 *soxR*-Down-R 的 5'端加上 *Sma* I 和 *Kpn* I 酶切位点。选取质粒 pRE112 上下游片段两侧以及 *soxR* 内部片段分别设计特异性引物对 pRE112-*ter*/*soxR*-JD 作为鉴定引物, 验证突变体是否构建成功。

1.4.2 $\Delta soxR$ 的构建与验证

挑取单菌落接种于 LB 液体中培养至对数期, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 并以其为模板, 分别以 *soxR*-Up-*Sma* I-F/*soxR*-Up-R 和 *soxR*-Down-F/*soxR*-Down-*Kpn* I-R 为引物进行 PCR 扩增得到 *soxR* 的上、下游同源臂片段。将上述 PCR 产物回收、纯化并以此为模板, 以 *soxR*-Up-*Sma* I-F/*soxR*-Down-*Kpn* I-R 为引物进行融合 PCR 扩增。将融合产物纯化后与 *Sma* I、*Kpn* I 酶切的 pRE112 质粒经 T4 DNA 连接酶连接并将重组质粒命名为 pRE112-*soxR*, 将其转化至 *E. coli* S17 pir 感受态细胞并涂布至含氯霉素的平板上进行筛选, 用引物 pRE112-*ter*-F/pRE112-*ter*-R 进行 PCR 验证。将含有 pRE112-*soxR* 的 *E. coli* S17 pir 感受态细胞与 *C. braakii* JPG1 培养至对数生长期, 按照 1:1 的比例进行结合转移, 涂布至含氯霉素的平板上,

筛选出不含 pRE112 质粒的基因缺失菌。用特异性引物 *soxR*-JD-F/*soxR*-JD-R 对基因缺失菌株进行 DNA 扩增, 验证是否成功敲除 *soxR* 基因。

1.5 生长曲线测定

将 WT/ $\Delta soxR$ 分别接种于 100 mL 灭菌的 LB 培养基中, 置于 30 °C、120 r/min 摇床中过夜培养活化。将活化的 WT/ $\Delta soxR$ 菌株按 1% 的接种量分别接种至新鲜灭菌的 LB 培养基中, 分别进行好氧和厌氧培养, 在不同时间取样测 OD_{600} 值。实验设置 3 个平行, 所有数据采用平均值±标准差(mean±SD)表示。

1.6 不同浓度甲萘醌胁迫的存活实验

通过测定吸光度 OD_{600} 和稀释平板活菌计数测定 WT/ $\Delta soxR$ 分别在好氧和厌氧-甲萘醌胁迫下的细胞存活能力。将过夜活化的 WT/ $\Delta soxR$ 菌株以体积比 1% 的接种量分别接种至新鲜灭菌的 LB 培养基中, 分别于好氧/厌氧条件下培养至 $OD_{600}=0.8$ 后加入甲萘醌溶液, 使其最终浓度分别为 0 mmol/L (对照组)、0.1 mmol/L (低浓度) 和 0.3 mmol/L (高浓度)。甲萘醌加入的初始时间记为 0 h。测定不同时间段的吸光度 OD_{600} 并绘制生长曲线, 取培养 0 h 和 24 h 的 WT/ $\Delta soxR$ 进行平板计数, 测定活菌数量(CFU/mL)。

本研究中菌株类型、氧气培养条件、甲萘醌胁迫浓度和培养时间都包括 2 种情况, 在这种多维度条件影响下, 为了使各条件下菌株的存活生长数量具有可比性, 对所有菌株的存活数量进行归一化处理, 将细菌的存活数量转为相对细胞数量(normalized cell counts)。具体的归一化方法参考文献[18], 相对细胞数量= N_t/N_{t_0} (t : 时间; t_0 : 0 h)。实验设置 3 个平行, 所有数据采用平均值±标准差(mean±SD)表示。

1.7 数据统计分析

数据采用 SPSS 23.0 进行统计分析, 结果

分为差异不显著 ($P>0.05$, ns)、显著差异 ($P<0.05$, *)和极显著差异 ($P<0.001$, ***).

2 结果与分析

2.1 *C. braakii* JPG1 的转录调控因子 SoxR 调控的基因组与结构特征

从 *C. braakii* JPG1 的全基因组中找到属于 SoxR 转录调节因子的直系同源氧化应激基因, 其基因成员、基因相对位置、编码蛋白功能等相关信息如图 1 所示。从组成上看, 与 *E. coli* 相同, *C. braakii* JPG1 基因组中同时包含 SoxR 和 SoxS 这 2 个转录调控因子, 且含有大量受其调控的氧化应激基因, 包括黄素氧还蛋白 2 (*fldB*)、核酸内切酶 IV (*nfo*)、富马酸盐水合酶

II 类(*fumC*)、6-磷酸葡萄糖 1-脱氢酶(*zwf*)、黄素氧还蛋白 1 (*fldA*)、铁摄取调节蛋白(*fur*)、多药外排泵亚基(*acrAB*)、黄素氧还蛋白/铁氧还蛋白-NADP 还原酶(*fpr*)和锰超氧化物歧化酶(*sodA*)。从分布上看, *soxR* 与 *soxS* 在染色体中相邻, 有利于相互协作和调控, 其他大多数氧化应激基因呈不连续分布且不与 *soxRS* 聚集在一起。

2.2 *C. braakii* JPG1 的 SoxR 系统发育进化树

为了解 SoxR 转录调控因子在 *C. braakii* JPG1 的功能, 利用氨基酸序列比对方法对 SoxR 的系统发育关系进行了研究(图 2)。结果表明包含 *C. braakii* JPG1 在内的 13 株菌的 SoxR 蛋白

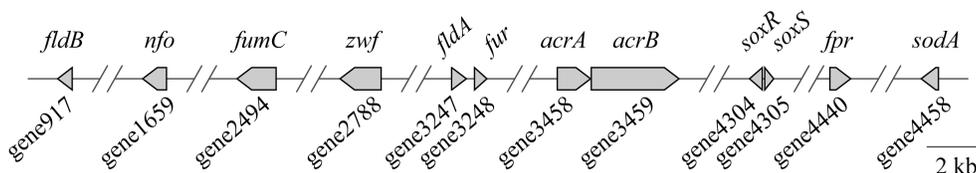


图 1 *Citrobacter braakii* JPG1 中受 SoxR 调控的氧化应激基因的基因组信息

Figure 1 Genomic context of genes involved in oxidative stress response regulated by SoxR in *Citrobacter braakii* JPG1. The functions of proteins encoded by SoxR-regulated genes: FldB, Flavodoxin 2; Nfo, Probable endonuclease 4; FumC, Fumarate hydratase class II; Zwf, Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase; FldA, Flavodoxin 1; Fur, Ferric uptake regulation protein; AcrA, Multidrug efflux pump subunit; AcrB, Multidrug efflux pump subunit; SoxR, Redox-sensitive transcriptional activator; SoxS, Regulatory protein; Fpr, Flavodoxin/ferredoxin-NADP reductase; SodA, Superoxide dismutase [Mn].

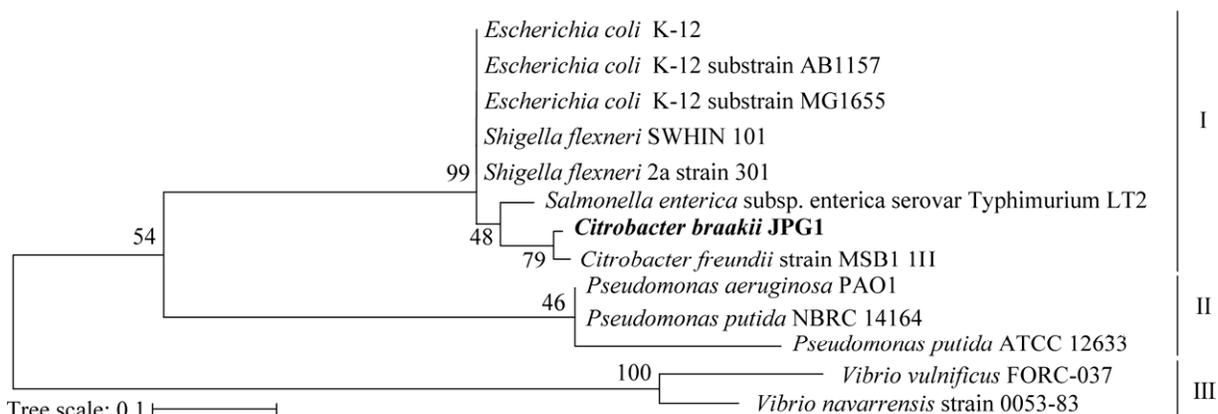


图 2 *Citrobacter braakii* JPG1 的 SoxR 系统发育树

Figure 2 The Phylogenetic tree of SoxR in *Citrobacter braakii* JPG1.

被分为 3 个主进化支。*C. braakii* JPG1 的 SoxR 与来自肠杆菌科的大肠杆菌(*E. coli*)、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)及弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)构成一个单独的进化支(I)。*C. braakii* JPG1 与同属的 *C. freundii* MSB1 1H 组成同一分支, SoxR 的氨基酸序列一致性高达 98.03%。除此之外, *C. braakii* JPG1 与其他分支的 *E. coli* K-12、*S. flexneri*、*S. enteritidis* 的 SoxR 氨基酸序列一致性分别为 93.42%、93.42%和 92.76%。*C. braakii* JPG1 的 SoxR 与肠杆菌科的其他菌株的 SoxR 具有较高的相似性, 推测在功能上可能也具有一定相似性。

2.3 *C. braakii* JPG1 的 *soxR* 基因缺失菌株的构建与鉴定

2.3.1 同源重组质粒 pRE112-*soxR* 的构建与验证

为了构建含同源重组质粒 pRE112-*soxR*, 首先使用引物对 *soxR*-Up 和 *soxR*-Down 扩增了 *C. braakii* JPG1 的 *soxR* 基因上下游同源臂, 结

果如图 3A 所示, 扩增分别得到上游 444 bp (泳道 2)、下游 372 bp (泳道 1)的基因片段。进一步使用引物 *soxR*-Up-Sma I-F/*soxR*-Down-Kpn I-R 成功将其融合为 800 bp 左右的同源片段(图 3B)。将构建成功的同源片段与 pRE112 载体进行酶切连接, 得到同源重组质粒 pRE112-*soxR*, 将其转化至 *E. coli* S17 pir 感受态细胞并通过引物对 pRE112-*ter*-F/R 进行 PCR 验证, 结果如图 3C 所示, 泳道 1 扩增的片段为 583 bp, 不含 *soxR* 基因片段; 泳道 2 扩增的片段为 1 042 bp, 表明同源重组质粒 pRE112-*soxR* 构建成功。

2.3.2 *soxR* 缺失菌株的验证

将 pRE112-*soxR* 的 *E. coli* S17 pir 感受态细胞与 *C. braakii* JPG1 共培养并进一步在含氯霉素的培养基中筛选获得基因缺失菌株。利用特异性引物对 *soxR*-JD 进行验证, 结果如图 3D 所示。泳道 2 为未敲除基因的正常菌株 JPG1, 检测到大小为 450 bp 左右的目标条带; 泳道 1 为构建的突变菌株, 未检测到目的条带, 表明 *soxR* 缺失菌株构建成功, 将其命名为 $\Delta soxR$ 。

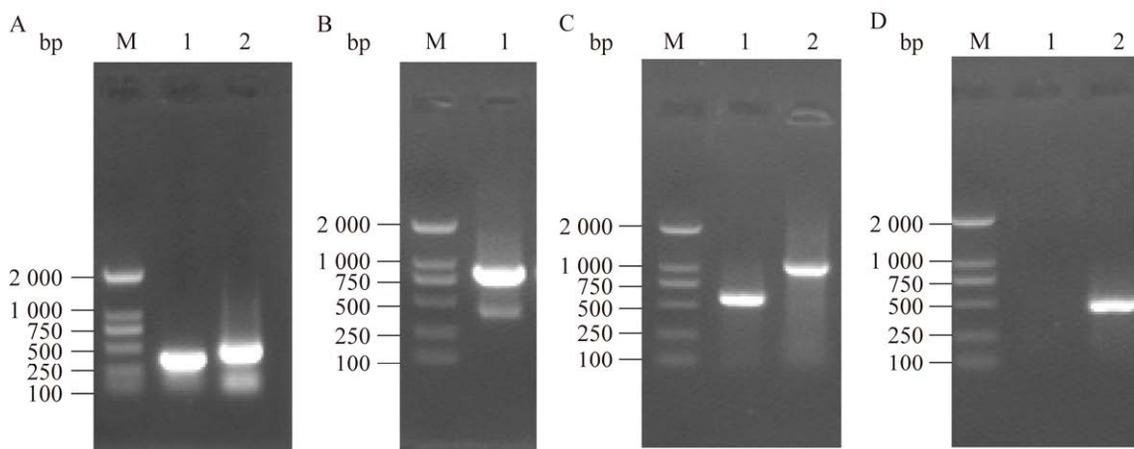


图 3 PCR 验证 *C. braakii* JPG1 的 $\Delta soxR$ 构建 A: *soxR* 基因上下游片段; B: 融合的 *soxR* 上下游片段; C: 重组质粒 pRE112-*soxR* 验证; D: *soxR* 突变体验证。M: DNA marker。

Figure 3 PCR identification results of $\Delta soxR$ construction of *C. braakii* JPG1. A: Upstream and downstream fragments of *soxR* gene; B: *soxR* up-down fragments; C: Verification of the recombinant plasmids pRE112-*soxR*; D: Verification of *soxR* gene deletion. M: DNA marker.

2.4 *soxR* 缺失对生长的影响

为考察 *soxR* 基因缺失对其生长的影响, 比较了 WT 和 $\Delta soxR$ 在好氧、厌氧条件下的生长曲线(图 4)。无论是好氧还是厌氧条件下, $\Delta soxR$ 与 WT 的生长几乎保持一致, 无显著差异 ($P>0.05$)。该结果表明 *soxR* 基因的缺失不影响 *C. braakii* *JPG1* 的生长, 所构建的 $\Delta soxR$ 可用于后续实验。

2.5 好氧/厌氧-甲萘醌胁迫下菌株的存活特征

2.5.1 好氧/厌氧-甲萘醌胁迫下菌株的生长曲线

如图 5 所示, 甲萘醌仅在好氧条件下对 WT

和 $\Delta soxR$ 的生长有影响, 在厌氧条件下对生长无明显影响。好氧-甲萘醌胁迫以浓度依赖式抑制 WT 和 $\Delta soxR$ 的生长, 且对 $\Delta soxR$ 的抑制作用更强(图 5A); 在低浓度胁迫条件下, 前 24 h 菌株被不同程度抑制, 随着培养时间增加生长逐渐恢复; 高浓度甲萘醌对细胞的毒性作用更强, WT 和 $\Delta soxR$ 细胞增长缓慢甚至下降, 培养 24 h 后的 OD_{600} 分别为对照组的 67.6% 和 54.6%。与好氧条件下不同的是, 厌氧-甲萘醌胁迫下 WT 和 $\Delta soxR$ 的生长曲线几乎保持一致(图 5B)。

2.5.2 好氧/厌氧-甲萘醌胁迫下菌株的存活能力

在研究甲萘醌在好氧和厌氧条件下对 WT

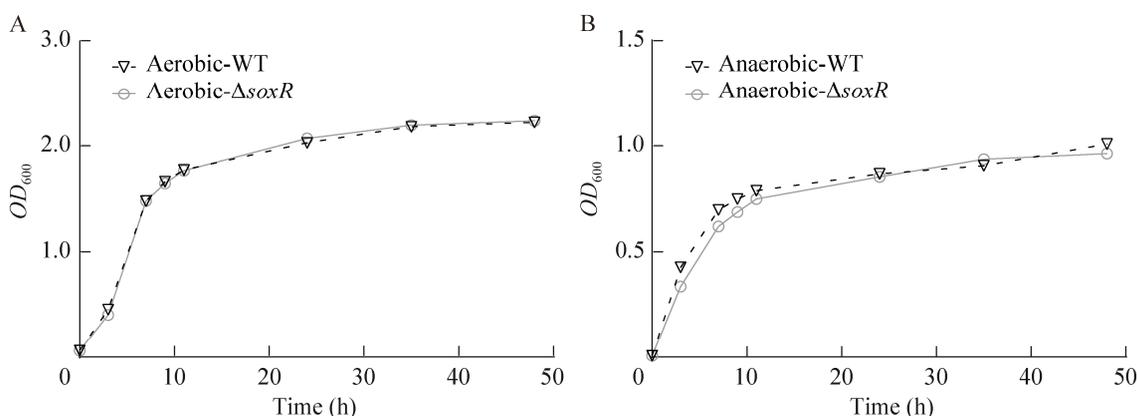


图 4 WT 与 $\Delta soxR$ 在好氧(A)、厌氧(B)条件下的生长曲线

Figure 4 Growth curves of WT and $\Delta soxR$ under aerobic (A) and anaerobic (B) conditions.

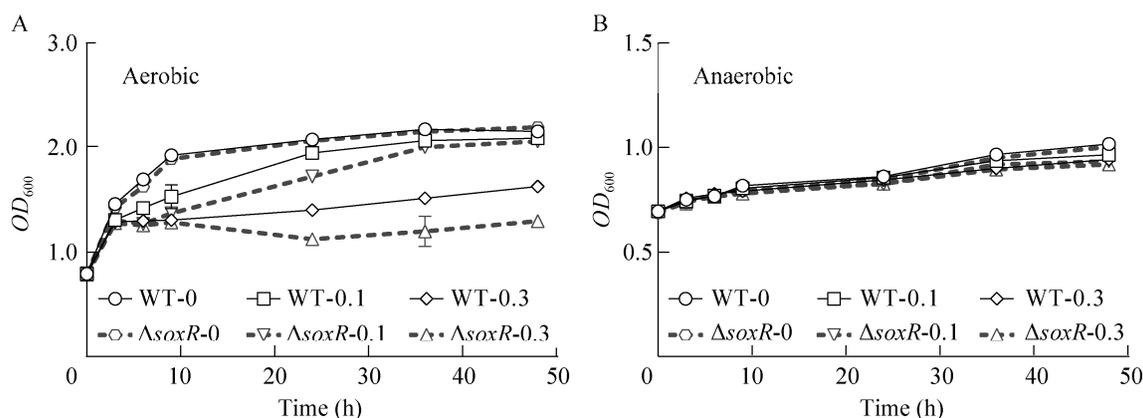


图 5 WT 与 $\Delta soxR$ 在好氧(A)、厌氧(B)-甲萘醌胁迫下的生长曲线

Figure 5 Growth curves of the WT and $\Delta soxR$ under stress of aerobic-menadione (A) and anaerobic-menadione (B).

和 $\Delta soxR$ 生长影响的基础上, 进一步通过活菌计数观察其对细胞存活的影响。如图 6A 和 6B 所示, 好氧-甲萘醌胁迫 24 h, WT 和 $\Delta soxR$ 的相对细胞数量均显著低于对照组 ($P < 0.001$), 且对 $\Delta soxR$ 细胞的毒性作用远大于 WT (表 2): 低浓度甲萘醌胁迫 24 h, $\Delta soxR$ 的相对细胞数量为 132.9%, 显著低于 WT (422.7%), 表明 SoxR 应对好氧-低浓度甲萘醌胁迫时发挥调控作用, 增强了细胞抗氧化的能力; 高浓度甲萘醌胁迫 24 h, WT/ $\Delta soxR$ 的细胞数量分别仅是 0 h 的 29.1% 和 0.2%, 表明大量细胞被杀死, 尽管 WT 与 $\Delta soxR$ 的细胞数量有差异(表 2), 但 SoxR 调控能力有限, 可能已无法满足正常的细胞代谢。如图 6C 和 6D 所示, 无论低浓度还是高浓度的厌氧-甲萘醌胁迫, WT/ $\Delta soxR$ 的细胞均保持正

常生长, 24 h 时的相对细胞数量与对照组相比均无显著差异 ($P > 0.05$); 同时, 厌氧-甲萘醌胁迫的 WT 与 $\Delta soxR$ 之间的相对细胞数量也均无显著差异(表 2), 表明厌氧-甲萘醌胁迫, $soxR$ 基因缺失与否均不影响 *C. braakii* JPG1 的存活。

3 讨论与结论

E. coli 作为研究最透彻的模式生物, 在生物学基本概念的发展进程中发挥了重要的作用。然而, 过度聚焦于 *E. coli* 研究导致对其他细菌物种的探索不足, 这不仅简化了微生物学的认知框架, 也阻碍了对微生物世界复杂性的全面解析^[19]。例如, 转录因子 SoxR 在 *E. coli* 中的调控是间接模式, SoxR 感知到氧化应激信号, 先诱导 *soxS* 转录, 由 SoxS 激活下游多个

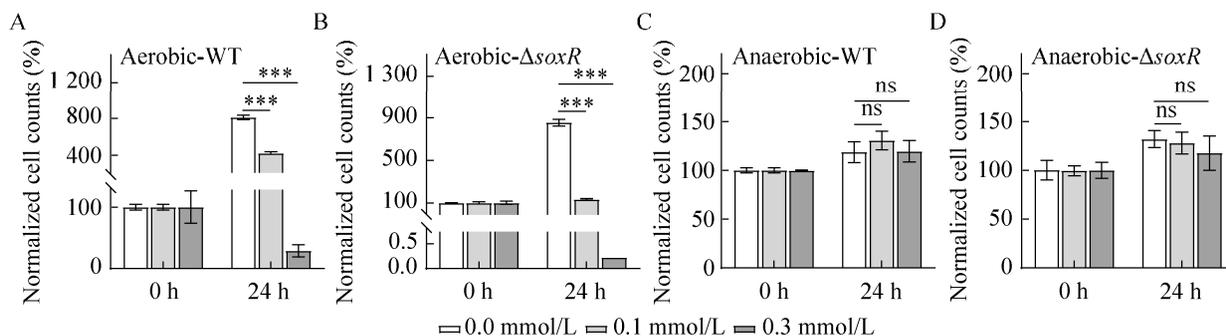


图 6 WT 与 $\Delta soxR$ 在好氧(A 和 B)/厌氧(C 和 D)-甲萘醌胁迫下的活菌数量

Figure 6 The number of viable bacterial cells of the WT and $\Delta soxR$ under stress of aerobic-menadione (A and B) and anaerobic-menadione (C and D). ns: $P > 0.05$; ***: $P < 0.001$.

表 2 好氧和厌氧-甲萘醌胁迫 24 h 后 WT 与 $\Delta soxR$ 归一化细胞数量显著性分析

Table 2 Significance analysis of normalized cell counts of WT and $\Delta soxR$ cultured under stress of aerobic-menadione and anaerobic-menadione for 24 h

Menadione concentration (mmol/L)	WT vs. $\Delta soxR$	
	Aerobic	Anaerobic
0.0	$P > 0.05$	$P > 0.05$
0.1	$P < 0.001$	$P > 0.05$
0.3	$P < 0.05$	$P > 0.05$

目标基因的表达, 这种调控模式适用于大多数肠细菌^[20]。但对于非肠细菌, 如铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 仅需 SoxR 即可实现对下游相关基因表达调控^[20]。2011 年, Gu 等^[16]利用 *E. coli* K-12 的衍生菌株 AB1157 探究 SoxRS 对氧化还原药物的响应, 发现 *E. coli* 的转录因子 SoxR 是由 RRCs (吩嗪硫酸甲酯、百草枯) 直接激活而非先前认为的由超氧化物间接激活。但是, 在 *E. coli* 中获得的实验

结论是否具有普适性还有待进一步研究。

本研究通过比较 *C. braakii* JPG1 的 WT 和 $\Delta soxR$ 在好氧/厌氧-甲萘醌胁迫下的存活能力,从细胞生理响应层面探究非模式肠细菌转录因子 SoxR 应对不同氧化条件下 RRCs 胁迫的调控作用。研究结果表明,甲萘醌只有在好氧条件下才能激活 *C. braakii* JPG1 的 SoxR 发挥调控作用,厌氧条件 SoxR 对甲萘醌无响应(图 5 和图 6),这与之前在 *E. coli* 中的结果并不一致^[16]。*C. braakii* JPG1 与 *E. coli* 在好氧/厌氧-RRCs 胁迫下生理响应不同,可能与转录因子 SoxR 和 RRCs 有关。

研究发现,尽管 SoxR 的 DNA 结合特性保守,但不同细菌的 SoxR 对一系列化合物的氧化行为响应并不完全相同^[20-21]。Chander 等^[22]确定了 *E. coli* 的 SoxR 为应对百草枯胁迫所必需的残基,其中一些残基与天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 和 *P. aeruginosa* 的 SoxR 有所不同^[21]。*P. aeruginosa* 与 *E. coli* 的 SoxR 虽然具有 77% 的序列相似性,但二者对超氧化物的敏感程度不同^[23]。本研究通过初步分析 SoxR 的系统发育关系,发现 *C. braakii* JPG1 与 *E. coli* 虽然同属于肠杆菌科,但二者的 SoxR 氨基酸序列存在一定的差异,这可能导致其对 RRCs 的响应不同(图 2)。本研究仅比较了 *C. braakii* 与 *E. coli* 转录调控因子 SoxR 的亲缘关系,二者对 RRCs 胁迫的响应差异是否源于蛋白结构的差异还需要更深入的分子生物学证据支持。

Imlay^[7]在论述不同的外源氧化还原物对模式菌株 *E. coli* 的生理效应时认为,特定氧化物化学性质不同会产生不同的生理效应,由此细胞也会相应地采用不同的防御策略来保护自身。RRCs 的不同可能导致 *C. braakii* JPG1 与 *E. coli* 对厌氧-RRCs 生理响应不同。迄今,RRCs

(如百草枯、甲萘醌和吩嗪)对细菌的胁迫研究大多在好氧条件下进行,厌氧条件下的氧化胁迫响应鲜少研究,对其在厌氧条件的毒性作用也知之甚少^[24]。研究表明,吩嗪硫酸甲酯 ($E^+ + 80$ mV) 仅需 0.3–50 $\mu\text{mol/L}$ 即可最大限度地激活 *S. coelicolor* 的 SoxR,与之相比,甲萘醌 ($E^+ - 260$ mV) 需要 200–300 $\mu\text{mol/L}$ ^[20-21]。在 Gu 等^[16]研究中,吩嗪硫酸甲酯、百草枯和甲萘醌在厌氧条件下诱导 *E. coli* 表达 SoxS 的能力依次降低。据此,可以推测厌氧条件下吩嗪硫酸甲酯的毒性/氧化性强于甲萘醌,更易攻击 SoxR。此外,研究表明细胞内氧化还原平衡的干扰是 SoxR 感应 RRCs 诱导的重要因素^[12,25]。甲萘醌在厌氧条件下可能并未引发 *C. braakii* JPG1 细胞的氧化还原失衡。由此推测在好氧条件下 *C. braakii* JPG1 的 SoxR 可能通过直接感应甲萘醌或间接感应甲萘醌产生的超氧化物而激活 *soxS* 转录,并进一步激活编码锰超氧化物歧化酶(*sodA*)、多药外排蛋白(*acrAB*)和氧化损伤修复蛋白(*nfo*, *fpr*)等基因,细胞响应多个防御机制以增强对甲萘醌的解毒作用^[11];厌氧条件下甲萘醌可能对 SoxR 无氧化毒性而未引起氧化应激响应,或者可能需要远高于好氧条件下的胁迫浓度才能激活 SoxR。因此,后续还需要进一步结合转录组学等分析方法加以验证,以明晰 SoxR 响应不同氧条件下甲萘醌胁迫的调控机制。

本研究结果表明,由经典模式细菌 *E. coli* 获得的氧化胁迫作用结果外推到其他种细菌时应慎重,因为细菌种类、氧气条件及 RRCs 的不同均可能导致转录调控作用不同。这也提示细菌 SoxR 转录调控机制可能较为复杂。本研究为了解 *E. coli* 之外的其他细菌转录调控因子 SoxR 响应 RRCs 提供了参考。

REFERENCES

- [1] MÉNDEZ V, RODRÍGUEZ-CASTRO L, DURÁN RE, PADRÓN G, SEEGER M. The OxyR and SoxR transcriptional regulators are involved in a broad oxidative stress response in *Paraburkholderia xenovorans* LB400[J]. Biological Research, 2022, 55(1): 7.
- [2] KAPPUS H, SIES H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation[J]. Experientia, 1981, 37(12): 1233-1241.
- [3] DIETRICH LEP, KILEY PJ. A shared mechanism of SoxR activation by redox-cycling compounds[J]. Molecular Microbiology, 2011, 79(5): 1119-1122.
- [4] 黄璐璐, 谷宇锋, 吴翠蓉, 黄俊红, 程古月. 细菌的应激反应和生理代谢与耐药性及其控制策略[J]. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2287-2297.
- HUANG LL, GU YF, WU CR, HUANG JH, CHENG GY. Bacterial stress response, physiological metabolism and antimicrobial tolerance and the control strategies[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(11): 2287-2297 (in Chinese).
- [5] SAZYKIN IS, SAZYKINA MA. The role of oxidative stress in genome destabilization and adaptive evolution of bacteria[J]. Gene, 2023, 857: 147170.
- [6] 王雪莹, 孙泽敏, 冯永君. 细菌转录因子与基因表达调控[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(6): 697-703.
- WANG XY, SUN ZM, FENG YJ. Bacterial transcription factors in gene expression regulation[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2021, 37(6): 697-703 (in Chinese).
- [7] IMLAY JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(7): 443-454.
- [8] IMLAY JA. Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species[J]. Annual Review of Microbiology, 2015, 69: 93-108.
- [9] DIETRICH LEP, TEAL TK, PRICE-WHELAN A, NEWMAN DK. Redox-active antibiotics control gene expression and community behavior in divergent bacteria[J]. Science, 2008, 321(5893): 1203-1206.
- [10] KAUR S, BENOVT LT. Methylene blue induces the *soxRS* regulon of *Escherichia coli*[J]. Chemico-Biological Interactions, 2020, 329: 109222.
- [11] POMPOSIELLO PJ, DEMPLE B. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors[J]. Trends in Biotechnology, 2001, 19(3): 109-114.
- [12] SPIELMANN A, BAUMGART M, BOTT M. NADPH-related processes studied with a SoxR-based biosensor in *Escherichia coli*[J]. MicrobiologyOpen, 2019, 8(7): e00785.
- [13] HIDALGO E, BOLLINGER JM, BRADLEY TM, WALSH CT, DEMPLE B. Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(36): 20908-20914.
- [14] KOBAYASHI K. Sensing mechanisms in the redox-regulated, [2Fe-2S] cluster-containing, bacterial transcriptional factor SoxR[J]. Accounts of Chemical Research, 2017, 50(7): 1672-1678.
- [15] GAUDU P, WEISS B. SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(19): 10094-10098.
- [16] GU M, IMLAY JA. The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide[J]. Molecular Microbiology, 2011, 79(5): 1136-1150.
- [17] WANG XY, HUANG N, SHAO J, HU MZ, ZHAO Y, HUO MX. Coupling heavy metal resistance and oxygen flexibility for bioremoval of copper ions by newly isolated *Citrobacter freundii* JFG1[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 226: 194-200.
- [18] ZHANG B, YU PF, WANG ZJ, ALVAREZ PJJ. Hormetic promotion of biofilm growth by polyvalent bacteriophages at low concentrations[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(19): 12358-12365.
- [19] MEGAN KTD. *E. coli* is one of the most widely studied organisms: that may be a problem for both science and medicine[EB/OL]. [2023-07-05]. <https://phys.org/news/2023-07-coli-widely-organismsand-problem-science.html>.
- [20] SINGH AK, SHIN JH, LEE KL, IMLAY JA, ROE JH. Comparative study of SoxR activation by redox-active compounds[J]. Molecular Microbiology, 2013, 90(5): 983-996.
- [21] SHEPLOCK R, RECINOS DA, MACKOW N, DIETRICH LEP, CHANDER M. Species-specific residues calibrate SoxR sensitivity to redox-active molecules[J]. Molecular Microbiology, 2013, 87(2): 368-381.
- [22] CHANDER M, RADUCHA-GRACE L, DEMPLE B. Transcription-defective *soxR* mutants of *Escherichia coli*: isolation and *in vivo* characterization[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(8): 2441-2450.
- [23] FUJIKAWA M, KOBAYASHI K, KOZAWA T. Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(42): 35702-35708.
- [24] IMLAY J, FRIDOVICH I. Exogenous quinones directly inhibit the respiratory NADH dehydrogenase in *Escherichia coli*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1992, 296(1): 337-346.
- [25] LIOCHEV SI, FRIDOVICH I. Is superoxide able to induce SoxRS?[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2011, 50(12): 1813.