

研究报告

假结核耶尔森氏菌硫氧还蛋白系统相关基因参与抗氧化胁迫的机制

严伯涵¹, 何照¹, 范俊凤^{1,2}, 陶文曦¹, 张子衿¹, 万芬^{*1,2}¹ 杭州医学院 检验医学院生物工程学院 浙江省人民医院(附属人民医院), 浙江 杭州 310053² 杭州医学院 浙江省生物标志物与体外诊断转化重点实验室, 浙江 杭州 310053

严伯涵, 何照, 范俊凤, 陶文曦, 张子衿, 万芬. 假结核耶尔森氏菌硫氧还蛋白系统相关基因参与抗氧化胁迫的机制[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2331-2343.

YAN Bohan, HE Zhao, FAN Junfeng, TAO Wenxi, ZHANG Zijin, WAN Fen. Role of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2331-2343.

摘要:【背景】硫氧还蛋白系统是细菌重要的氧化还原状态维持系统。假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*) YPIII是肠道常见的机会致病菌, 在YPIII中进行过氧化氢胁迫下的转录组测序, 结果发现硫氧还蛋白系统的相关基因有所上调, 可能参与细菌氧化胁迫的应答。【目的】研究假结核耶尔森氏菌中硫氧还蛋白系统应答氧化胁迫的方式。【方法】利用同源重组方法构建硫氧还蛋白系统缺失突变株($\Delta trxA$ 、 $\Delta trxC$ 和 $\Delta trxR$), 研究假结核耶尔森氏菌在过氧化氢胁迫下的生长, 测定过氧化氢对细菌的最低抑菌浓度、过氧化氢清除能力, 以及过氧化氢处理下的存活率等。同时, 通过*lacZ*报告基因系统对硫氧还蛋白系统的表达调控进行探究。【结果】构建硫氧还蛋白系统缺失突变株, 发现缺失后显著影响了假结核耶尔森氏菌的抗氧化胁迫能力, 因此TrxA是硫氧还蛋白系统中应答氧化胁迫的主要蛋白; 在 $\Delta trxA$ 中过氧化氢酶的表达上调, 但不足以保护细菌及时修复受损的生物大分子; 启动子活性测定及实时荧光定量PCR(real time quantitative PCR, RT-qPCR)实验结果表明和的表达可能受到细菌氧化胁迫转录调控因子OxyR的影响。【结论】硫氧还蛋白系统作为细菌内部还原环境的维持系统, 在OxyR的调控下参与氧化胁迫应答, 并发挥了重要的作用。

关键词: 假结核耶尔森氏菌; 硫氧还蛋白; OxyR; 转录调控

资助项目: 国家自然科学基金(31900021); 杭州医学院基本科研业务费(KYYB202004)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31900021) and the Fundamental Research Funds for the Hangzhou Medical College (KYYB202004).

*Corresponding author. E-mail: fenw0818@163.com

Received: 2024-08-16; Accepted: 2024-10-19; Published online: 2024-11-22

Role of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Yersinia pseudotuberculosis*

YAN Bohan¹, HE Zhao¹, FAN Junfeng^{1,2}, TAO Wenxi¹, ZHANG Zijin¹, WAN Fen^{*1,2}

¹ School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Zhejiang Provincial People's Hospital (Affiliated People's Hospital), Hangzhou 310053, Zhejiang, China

² Key Laboratory of Biomarkers and *in vitro* Diagnosis Translation of Zhejiang Province, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

Abstract: [Background] The thioredoxin system is critical for maintaining the redox state in bacteria. *Yersinia pseudotuberculosis* YPIII is a common opportunistic pathogen in the gut. The result of transcriptome sequencing under hydrogen peroxide stress in YPIII showed that thioredoxin system related genes are up-regulated, indicating the participation in oxidative stress response. **[Objective]** To study the mechanism of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Yersinia pseudotuberculosis*. **[Methods]** Mutants $\Delta trxA$, $\Delta trxC$, and $\Delta trxR$ were constructed by homologous recombination. The mutants were then characterized in terms of the growth curve with or without H_2O_2 , minimal inhibition concentration of H_2O_2 , ability to degrade H_2O_2 , and survival rates under the treatment with H_2O_2 . Furthermore, we employed the *lacZ* reporter system to explore the regulation of the expression of the thioredoxin system. **[Results]** Mutants $\Delta trxA$, $\Delta trxC$, and $\Delta trxR$ were successfully constructed. Only $\Delta trxA$ showed significant sensitivity to H_2O_2 , implying that TrxA might be the primary protein in combating with oxidative stress. Although the expression levels of catalases were up-regulated in $\Delta trxA$, it was still not enough to allow the bacteria to repair the damaging biomacromolecules. In addition, we found that expression levels of *trxC* and *trxR* were under positive control of the oxidative stress regulator OxyR. **[Conclusion]** The thioredoxin system, as a maintenance system for the intracellular reducing state in *Y. pseudotuberculosis*, participates in the response to oxidative stress under the regulation of OxyR.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*; thioredoxins; OxyR; transcriptional regulation

硫氧还蛋白(thioredoxins, Trx)是一类具有高度保守活性位点(Cys-Gly-Pro-Cys)的小分子蛋白,这些小分子蛋白通常都含有由4个 α 螺旋和5个 β 折叠组成的硫氧还蛋白模体结构^[1]。硫氧还蛋白的氧化还原电位较低,所以能够有效地还原细菌内的二硫键。被氧化的硫氧还蛋白由硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)利用NADPH的电子进行还原。在细菌中Trx和TrxR共同组成了维持胞质还原环境的硫氧还蛋白系统(thioredoxin system, Trxs)^[2]。在广泛研究的模式细菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)中存在2种Trx的编码基因,即*trxA*和*trxC*,

分别编码Trx1和Trx2蛋白,TrxR则由*trxB*编码^[3]。除Trxs系统以外,大部分细菌还存在谷氧还蛋白系统(glutaredoxin system)等氧化还原系统发挥抗氧化作用^[1]。但在一些致病菌,如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等细菌中不存在谷氧还蛋白系统,因此Trxs系统是这些细菌唯一的氧化还原维持系统^[4-6]。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一类由氧分子不完全还原产生的化学性质活泼的含氧分子或离子的总称。常见的ROS有过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子(O_2^-)和羟基自由基($\cdot OH$)

等。ROS 能和几乎所有的生物大分子发生反应，造成这些分子失活，从而影响细胞体内重要的生命进程。ROS 的产生途径多样，如有氧呼吸链的部分电子逸出会引起氧的不完全还原而产生 ROS^[7-8]。对病原菌而言，宿主固有免疫系统的淋巴细胞会产生大量 ROS 以杀灭入侵的病原体。因此如何应对 ROS 引起的氧化胁迫是细菌不得不面对的难题。

假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*) YPIII 为伽玛变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)肠杆菌目(*Enterobacterales*)耶尔森氏菌科(*Yersiniaceae*)耶尔森氏菌属(*Yersinia*)的革兰氏阴性杆菌。作为一种兼性厌氧的人兽共患致病菌，假结核耶尔森氏菌的生长温度较为宽泛，

0–45 °C 均可生长^[9]。因此，冰箱储存食物是其重要的感染来源。动物和人类通过食用被污染的食物或水引发消化道感染，如回肠炎、肠系膜腺炎和腹泻^[9]等。前期研究对 YPIII 在 H₂O₂ 胁迫下的转录组学进行了分析，结果表明 Trx 系统的基因转录水平明显上调，这提示 Trx 系统在抗 H₂O₂ 胁迫中很可能具有重要作用^[10]。基于此，本研究旨在初步探究 YPIII 中 Trx 系统在氧化应激中发挥的作用，为 YPIII 感染的治疗及预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

本研究采用的菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Description	Source or reference
Stain		
<i>Escherichia coli</i>		
WM3064	Δ dapA, donor strain for conjugation	W. Metcalf, UIUC
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		
YPIII	Wild type	Lab stock
YPK-RS20585	Δ oxyR derived from YPIII	[10]
YPK-RS20330	Δ trxA derived from YPIII	This study
YPK-RS16760	Δ trxC derived from YPIII	This study
YPK-RS13445	Δ trxR derived from YPIII	This study
YPK-RS14285	Δ katE derived from YPIII	[10]
YPK-RS17025	Δ katG derived from YPIII	[10]
YPK-RS16370	Δ ahpC derived from YPIII	[10]
Plasmid		
pHGM01	Ap ^r Gm ^r Cm ^r , suicide vector	[11]
pHGI01	Promoterless vector for complementation	[12]
pHGEI01	Km ^r , integrative lacZ reporter vector	[13]
pHGEI01-trxA	pHGEI01 containing the trxA promoter	This study
pHGEI01-trxC	pHGEI01 containing the trxC promoter	This study
pHGEI01-trxR	pHGEI01 containing the trxR promoter	This study
pHGEI01-katE	pHGEI01 containing the katE promoter	[10]
pHGEI01-katG	pHGEI01 containing the katG promoter	[10]
pHGEI01-ahpC	pHGEI01 containing the ahpC promoter	[10]
pHGE-P _{tac}	Km ^r , IPTG-inducible vector	[14]
pHGE-P _{tac} -trxA	Vector for inducible expression of trxA	This study
pHGE-P _{tac} -trxC	Vector for inducible expression of trxC	This study
pHGE-P _{tac} -trxR	Vector for inducible expression of trxR	This study
pHGE-P _{tac} -oxyR	Vector for inducible expression of oxyR	[10]

假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 参考菌株 YPIII、*trxA*、*trxC* 和 *trxR* 基因的缺失株和回补株, 以及大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3), 本实验室保存。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 酵母提取物 5.0, 琼脂粉 15.0, pH 7.4。无 NaCl 的 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0。不含 NaCl、含 10% 蔗糖的 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 蔗糖 100.0, 琼脂粉 15.0, pH 7.4。

1.3 主要试剂和仪器

FOX I 试剂: 100 mmol/L 山梨醇, 125 mmol/L 二甲基酚橙; FOX II 试剂: 25 mmol/L 硫酸亚铁铵, 2.5 mol/L 硫酸; 使用前将 FOX I 和 FOX II 试剂按照 100:1 的比例混合配成 FOX 试剂。琼脂、酵母粉和蛋白胨, 赛默飞世尔科技有限公司; PBS 缓冲液、NaCl 和蔗糖, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG)、异丙基 β -D-1-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 庆大霉素、卡那霉素和 2,6-二氨基庚二酸(2,6-diaminoheptanedioic acid, DAP), 杭州六余医疗器械有限公司; 基因组 DNA 快速提取试剂盒、通用型 DNA 纯化回收试剂盒、质粒小量制备试剂盒、TRIzol、RNeasy Mini Kit 和实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒, 杭州都泰生物科技有限公司。

多功能酶标仪, 南京珞蔚生物科技有限公司; 细胞超声波破碎仪, 上海谱振生物科技有限公司; 凝胶成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; 生物安全柜, 上海力康生物医疗科技控股有限公司; PCR 仪, 迪图(上海)生物科技有限公司; ABI7300 96-well RT-qPCR system, 赛默飞世尔科技有限公司; 全温度振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司。

1.4 引物的设计与合成

本研究所使用的基因序列来自 NCBI 数据库, 引物序列由浙江尚亚生物技术有限公司合成(表 2)。

1.5 基因缺失突变株 Δ *trxA*、 Δ *trxC* 和 Δ *trxR* 的构建及回补

将菌株 YPIII 接种在 LB 培养基中 26 °C、250 r/min 振荡培养^[10]。必要时, 培养基中添加以下化学试剂: 庆大霉素 15 μ g/mL, 卡那霉素 50 μ g/mL, DAP 0.3 mmol/L, 过氧化氢酶 2 000 U/mL。IPTG 浓度为 0.1 mol/L, 按实验所需添加。基因缺失突变株 Δ *trxA*、 Δ *trxC* 和 Δ *trxR* 采用 *attB* 位点特异性重组原理构建。具体步骤如下: 设计两对带有 *attB* 序列的特殊引物(5O/5I 和 3O/3I, 序列见表 2), 以基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增目的基因两侧序列^[10]。基因组 DNA 按照基因组 DNA 快速提取试剂盒说明书提取。反应体系(50 μ L): 基因组 DNA 模板 1 μ L, 浓度为 10 μ mol/L 的上下游引物(如 RS20330-5O/5I、RS20330-3O/3I)各 1 μ L, *FastPfu* DNA 聚合酶 0.5 μ L, dNTPs 2 μ L, ddH₂O 34.5 μ L, 5 $\times$ buffer 10 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。两侧序列通过 PCR 连接在一起形成融合片段并克隆至质粒 pHGM01, 构建为重组质粒, 将重组质粒转化至受体菌 *E. coli* WM3064 中, 涂布于含 50 μ g/mL 庆大霉素和 0.3 mmol/L DAP 的 LB 平板并对其进行抗性筛选, 然后通过菌落 PCR 挑选阳性克隆。反应体系(20 μ L): 基因组 DNA 模板 1 μ L, 浓度为 10 μ mol/L 的上下游引物(如 RS20330-5O/3O)各 1 μ L, *EasyTaq* DNA 聚合酶 0.2 μ L, dNTPs 1.6 μ L, ddH₂O 13.2 μ L, 10 $\times$ buffer 2 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。将阳性菌落和 YPIII 以 2:1 比例混合后于 DAP 平板上 26 °C 培养过夜, 第 2 天用 LB 液体培养基将平板上的菌苔冲洗下来, 4 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 用 200 μ L LB

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
Mutagenesis	
RS20330-5O	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGATACGAGAGAGTGGCAG
RS20330-5I	ACACAAGTCGCGGAGGTCAT CTGGCTTTCAGCACATCAGT
RS20330-3O	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATACACCGTCACCGAA
RS20330-3I	ATGACCTCCGCGACTTGTGTCTAAGGGGCAACTCAAAGCG
RS20330-LF	GAGCAACATCACCCGTCAAT
RS20330-LR	CACGGGCGGTAAATCTTCA
RS20330-SF	TGATTAGTCTGGCGACCCTC
RS20330-SR	AATGGGACATTCAACCACCG
RS16760-5O	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGCCTTACAAGCATTCTCA
RS16760-5I	TCTAGGTATTTACAGAGCGG TCGTCGCCATACAAGCTGTA
RS16760-3O	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAAGTTGACGCAGAGGGTC
RS16760-3I	CCGCTCTGTAAATACCTAGACTAAATGGCGCTGTACCCAA
RS16760-LF	TAGCCTGAGTTTGCTGTTGC
RS16760-LR	TTTTCTTCGTGGCTTGCTGT
RS16760-SF	GGCGGAAGATTACCTGATG
RS16760-SR	ATTACTGGGCTTGAGTGGCT
RS13445-5O	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGACCCGCAGCCTGTTTTATG
RS13445-5I	ACAATCGTGAAGAGTAGGCT GCCGTGCTCATGAATACCTCT
RS13445-3O	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGCACACGCATACCACAAAT
RS13445-3I	AGCCTACTCTTCACGATTGTGTATGGCAGCACTGGATGCA
RS13445-LF	CCCGTTCCAGACATGGTGT
RS13445-LR	ATGGCCCCAACTGTTCTAGC
RS13445-SF	CGTGCCAGAATTAGCCACAC
RS13445-SR	CGTTTGCTTGCAGCCTACTG
Complementation	
TrxA-F	AGAATTCATGAGCGATAAAATTATTCACCT
TrxA-R	AGGATCCTTACAGATTTGCATCCAAGAAC
TrxC-F	AGAATTCATGAATACGGTATGTACAGCTTGTATG
TrxC-R	AGGATCCGTAACTGTTTGGATCTCTTGATAATTG
TrxR-F	AGAATTCATGAGCACGGCTAAACATAGCA
TrxR-R	AGGATCCTTATTTATCGTTTGCCAACCCGT
LacZ reporters	
ptrxA-F	AGAATTCATTAATCCGCCGTGGAAAT
ptrxA-R	AGGATCCGTAATCATGGTCATGTTCTACTCCAAAGGATTGTGTCTAC
ptrxC-F	AGAATTCATGAATACGGTATGTACAGCTTG
ptrxC-R	AGGATCCTTAAGTGTGTTGGATCTCTTGATAATTG
ptrxR-F	AGAATTCATGAGCACGGCTAAACATAGC
ptrxR-R	AGGATCCTTATTTATCGTTTGCCAACCCG
RT-qPCR	
trxA-qF	GCCAGTGGCTTGGTCTTAGT
trxA-qR	CGTATTTTGGTGCTGTGCCC
trxC-qF	CCACCGCTGAAACACTGGAT
trxC-qR	CGATCATTTTGCCGTTGCGA
trxR-qF	TTACCGGGATGGAAAAGGGC
trxR-qR	ACGGTTTTGCAGATCAACGC
16S rRNA-qF	CTAACACATGCAAGTCGAGCG
16S rRNA-qR	CTGGACCGTGTCTCAGTTCC

液体培养基重悬后,涂布于含 50 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 LB 平板上筛选整合到基因组上的接合子,并通过 PCR 验证。反应体系(20 μL): 基因组 DNA 模板 1 μL , 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物(如 RS20330-LF/SR, RS20330-SF/LR)各 1 μL , *EasyTaq* DNA 聚合酶 0.2 μL , dNTPs 1.6 μL , ddH₂O 13.2 μL , 10 $\times$ buffer 2 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。在无 NaCl 的 LB 培养基中培养验证正确的接合子,诱导其发生二次重组,并涂布于不含 NaCl、含 10%蔗糖的 LB 平板上培养,挑选对庆大霉素敏感、蔗糖耐受的阳性克隆进行 PCR 验证。反应体系(20 μL): 基因组 DNA 模板 1 μL , 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物(如 RS20330-LF/LR)各 1 μL , *EasyTaq* DNA 聚合酶 0.2 μL , dNTPs 1.6 μL , ddH₂O 13.2 μL , 10 $\times$ buffer 2 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。对突变区域进行测序后验证所得框内缺失突变株。

突变株回补实验为扩增突变基因的片段,并将其克隆至带有 *P_{tac}* 启动子的可受 IPTG 诱导表达的 pHGE-*P_{tac}* 载体上,测序验证正确后,将回补载体转化至 *E. coli* WM3064 菌株中,通过接合转移至相应的 YPIII 突变株中。

1.6 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的测定

将菌株 YPIII、 ΔtrxA 、 ΔtrxC 和 ΔtrxR 接种于液体 LB 培养基, 26 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养过夜后按 1%接种量转接至新鲜的液体 LB 培养基中,培养至对数中期(OD_{600} 约为 0.6)后按照 1%接种量转接于含有不同 H₂O₂ (0、2、4、8 mmol/L)的 24 孔板中, 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察拍照。

1.7 抑菌圈的测定

将菌株 YPIII、 ΔtrxA 、 ΔtrxC 和 ΔtrxR 接种于液体 LB 培养基, 26 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养过夜后按 1%接种量转接至新鲜的液体 LB 培养基

中,培养至对数中期(OD_{600} 约为 0.6)后取 200 μL 菌液均匀涂布到 LB 平板上, 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h 后,将含有 10 μL 1 mol/L H₂O₂ 的圆纸片(直径 6 mm)置于平板中央。26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察测量纸片周围形成的抑菌圈直径。以抑菌圈外沿为界进行测量,至少测量 3 次不同方向的直径大小后取平均值。

1.8 H₂O₂ 清除能力的测定

H₂O₂ 清除能力的测定采用 Ferrous Oxidation-Xylenol Orange (FOX)法。即采用一定浓度的 H₂O₂ 处理不同细菌(OD_{600} 约为 0.6)一段时间后测定培养基中剩余 H₂O₂ 来评价不同菌株对 H₂O₂ 的清除能力。具体操作为将各菌株接种于液体 LB 培养基,培养过夜后按 1%接种量转接至新鲜的液体 LB 培养基中,培养至对数中期(OD_{600} 约为 0.6)时加入 H₂O₂ 至终浓度为 0.5 mmol/L,于 5 min 后过滤除菌取样。取样完成后于 96 孔板上加入 180 μL FOX 试剂和 20 μL 样品,每组 3 个平行,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,酶标仪测定 OD_{560} , H₂O₂ 的含量与吸光度成正比,与同样处理的标准曲线进行比较后可计算得出 H₂O₂ 的含量。

1.9 目的基因表达量的测定

采用 β -半乳糖苷酶活性用于确定目的基因的表达水平。构建 *lacZ* 报告基因的启动子检测系统。将目的基因的启动子序列与报告基因 β -半乳糖苷酶相连,得到重组质粒如 pHGEI01-*katE* 等转入相应背景菌株中。通过检测这些菌株中半乳糖苷酶的活性间接比较目的基因的表达水平。具体操作为: PCR^[10]扩增目的基因编码区上游约 300 bp 碱基的 DNA 序列克隆至报告质粒 pHGEI01 中,并转化到 *E. coli* WM3064 菌株中。测序正确后与菌株 YPIII 进行接合,将质粒转移至菌株 YPIII 中。将培养过夜的菌液按 1%接种量转接至新鲜的 LB 培养基中培养至对数中期(OD_{600} 约为 0.6)。取 1 mL 菌液 4 000 r/min 离心 2 min,弃上清后,加 500 μL PBS 重悬,于细胞超声波破碎仪破碎(功率 25%,工作 3 s,间

歇 4 s, 工作时长 10 min)至菌液澄清状态, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min 去除细胞碎片。取上清液 100 μ L 加入 96 孔板, 再加入 100 μ L 4 mg/mL ONPG 混匀。酶标仪设置 37 °C 每隔 30 s 读取 OD_{420} (0.2–0.8)。 β -半乳糖苷酶活性计算公式: $\text{Miller units} = 1\,000 \times OD_{420} / (T \times V \times OD_{600})$ 。式中: T 为反应时间(min); V 为菌液体积(mL)。

RT-qPCR 实验用于测定目的基因的转录水平^[10]。离心收集对数中期的菌体, 依照 TRIzol 试剂盒和 RNeasy Mini Kit 说明书提取细菌总 RNA。获得总 RNA 后按照 RT-qPCR 试剂盒说明书进行反应。RT-qPCR 反应体系(25 μ L): cDNA 模板 1 μ L, 引物(如 *trxA*-qF/qR) (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2 $\times$ qPCR Mix 12.5 μ L, 焦碳酸二乙酯水 9.5 μ L。RT-qPCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。使用 ABI7300 96-well RT-qPCR system 进行实时荧光定量 PCR。每次实验中每个基因的表达设置 3 次重复。采用丰度保持相对恒定的 16S rRNA 基因作为内参基因, 目的基因的循环阈值(C_t)取平均值并利用 16S rRNA 基因的 C_t 值进行标准化。每个基因的相对丰度(relative abundance, RA)用如下公式计算: $RA = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.10 H₂O₂ 处理下细菌存活率的测定

将菌株 YPIII、 Δ *trxA*、 Δ *trxC* 和 Δ *trxR* 接种于液体 LB 培养基, 26 °C、250 r/min 培养过夜后按 1% 接种量转接至新鲜的液体 LB 培养基中。培养至对数中期(OD_{600} 约为 0.6), 加入 0.2 mmol/L 的 H₂O₂ 处理 5 min, 取菌液 200 μ L 进行梯度稀释后涂板, 26 °C 培养 24 h 后计算平板上菌落的数量。

2 结果与分析

2.1 *trxA*、*trxC* 和 *trxR* 缺失突变株的构建及其抗氧化胁迫能力的分析

根据 *E. coli* 硫氧还蛋白系统 TrxA、TrxC 和 TrxR 的蛋白序列在 YPIII 基因组中利用 NCBI 的 BLAST 功能进行比对寻找其同源蛋白, 发现

YPK_RS20330、YPK_RS16760 和 YPK_RS13445 与 TrxA、TrxC 和 TrxR 的序列相似度分别为 87.04%、77.70% 和 85.05% (图 1)。根据比对结果表明 YPK_RS20330、YPK_RS16760 和 YPK_RS13445 的结构域序列与 TrxA、TrxC 和 TrxR 的相应序列具有很高的相似度, 均含有典型的 CXXC 模体基序, 为可靠的同源蛋白。因此利用基于 *attB* 位点的同源重组原理, 对这 3 个基因进行了框内基因敲除, 构建了相应基因缺失突变株, 分别命名为 Δ *trxA*、 Δ *trxC* 和 Δ *trxR*。所有突变株均进行 PCR 验证, 获得正确条带后测序, 测序结果表明相应序列已被敲除。

为探究菌株 YPIII 中 TrxA、TrxC 和 TrxR 对抗氧化胁迫能力的影响, 本研究测定了不同浓度 H₂O₂ 处理下细菌生长的影响。结果表明, 在未经 H₂O₂ 处理下, 相较于菌株 YPIII, Δ *trxA* 的生长速度变慢(图 2A), Δ *trxC* 和 Δ *trxR* 则不受明显影响(图 2B)。加入 2 mmol/L H₂O₂ 后, Δ *trxA* 的生长迟缓更加明显。这说明 TrxA 的缺失会影响菌株 YPIII 对 H₂O₂ 胁迫的应答。进一步对 H₂O₂ 的 MIC 测定结果表明, Δ *trxA* 对 H₂O₂ 的 MIC 为 2 mmol/L, Δ *trxC*、 Δ *trxR* 和菌株 YPIII 均为 4 mmol/L (图 3A)。抑菌圈结果显示 Δ *trxA* 对 H₂O₂ 的抑菌圈直径为 1.6 cm, 大于菌株 YPIII 的 1.2 cm (图 3B)。

此外, 测定了 H₂O₂ 胁迫下 Δ *trxA*、 Δ *trxC* 和 Δ *trxR* 的存活率。如图 4 所示, 0.2 mmol/L H₂O₂ 处理 5 min 后, 菌株 YPIII 存活率为 57.65%, Δ *trxA* 仅为 7.97%, Δ *trxC* 和 Δ *trxR* 分别为 15.11% 和 33.12% (图 4A)。为了进一步验证该结果, 分别测定了 Δ *trxA*、 Δ *trxC* 和 Δ *trxR* 对 H₂O₂ 的清除能力。如图 4B 所示, 在加入 0.2 mmol/L H₂O₂ 后, Δ *trxA* 中剩余 50.71% 的 H₂O₂ 未被清除, 而菌株 YPIII 中 H₂O₂ 剩余量为 19.87%。该结果表明 Δ *trxA* 无法及时清除外界的 H₂O₂, 这可能是 Δ *trxA* 对 H₂O₂ 敏感的原因。值得说明的是, 同时构建了 Δ *trxA*、 Δ *trxC* 和 Δ *trxR* 的回补菌株 Δ *trxA*/ptrxA、 Δ *trxC*/ptrxC 和 Δ *trxR*/ptrxR, 这些

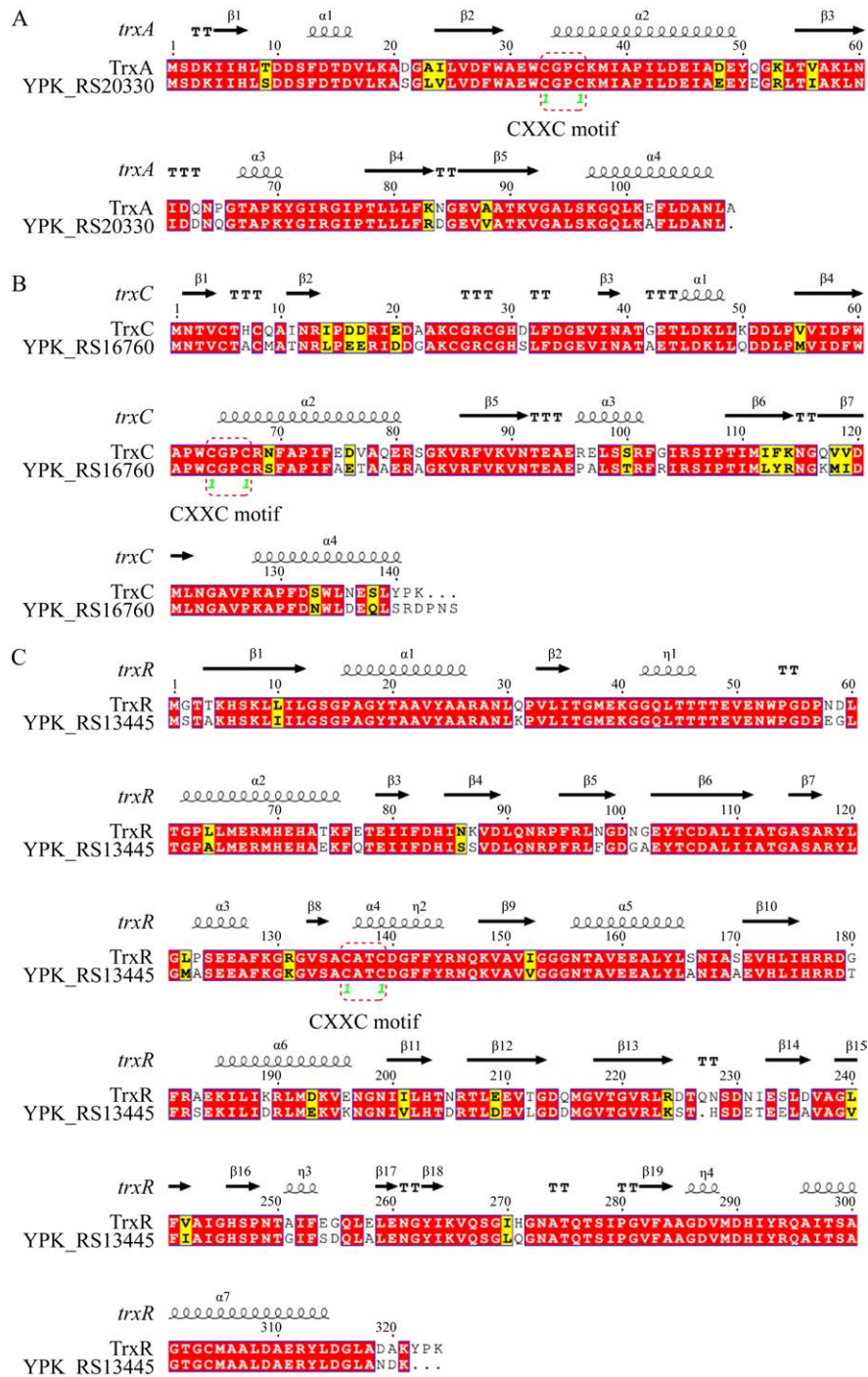


图 1 大肠杆菌中 TrxA、TrxC 和 TrxR 与菌株 YPIII 中同源序列的比对 YPK_RS20330 (A)、YPK_RS16760 (B) 和 YPK_RS13445 (C) 与 *E. coli* 的 TrxA、TrxC 和 TrxR 的序列相似度分别为 87.04%、77.70% 和 85.05%。CXXC 模体已标出。

Figure 1 Alignment of TrxA, TrxC, and TrxR in *Escherichia coli* with homologous sequences in strain YPIII. YPK_RS20330 (A), YPK_RS16760 (B) and YPK_RS13445 (C) shared 87.04%, 77.7% and 85.05% of their sequences with TrxA, TrxC and TrxR of *E. coli*, respectively. CXXC motif are marked.

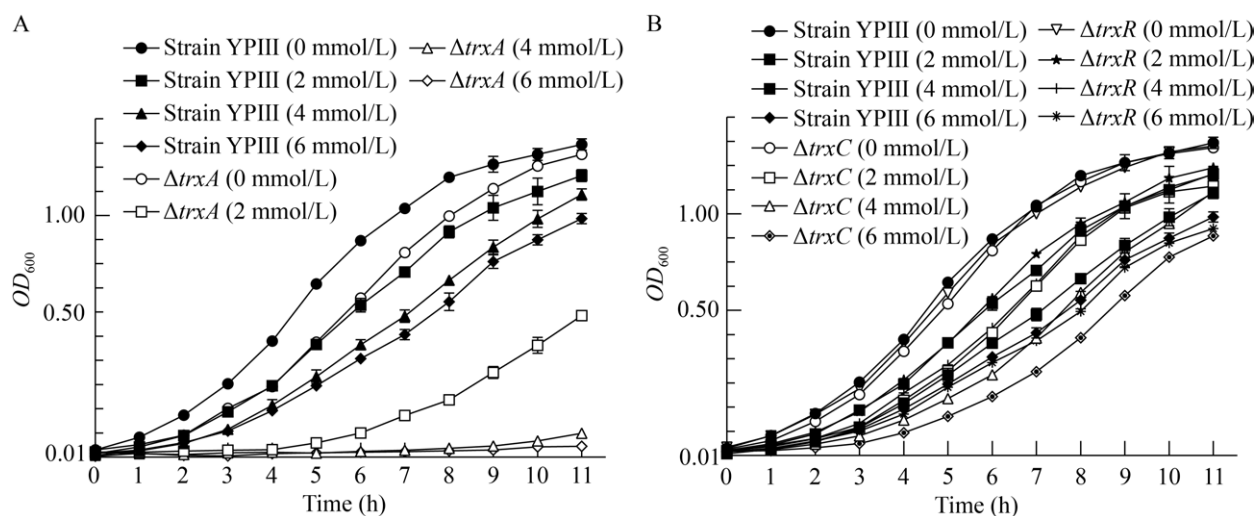


图 2 $\Delta trxA$ 、 $\Delta trxC$ 和 $\Delta trxR$ 在不同浓度 H_2O_2 条件中的生长曲线 A: 菌株 YPIII 和 $\Delta trxA$ 的生长曲线; B: 菌株 YPIII、 $\Delta trxC$ 和 $\Delta trxR$ 的生长曲线。括号内为 H_2O_2 的浓度。

Figure 2 The growth curves of $\Delta trxA$ 、 $\Delta trxC$ and $\Delta trxR$ in the treatment of H_2O_2 . A: Growth curves of strain YPIII and $\Delta trxA$; B: Growth curves of strain YPIII, $\Delta trxC$ and $\Delta trxR$. The concentration of H_2O_2 in parentheses.

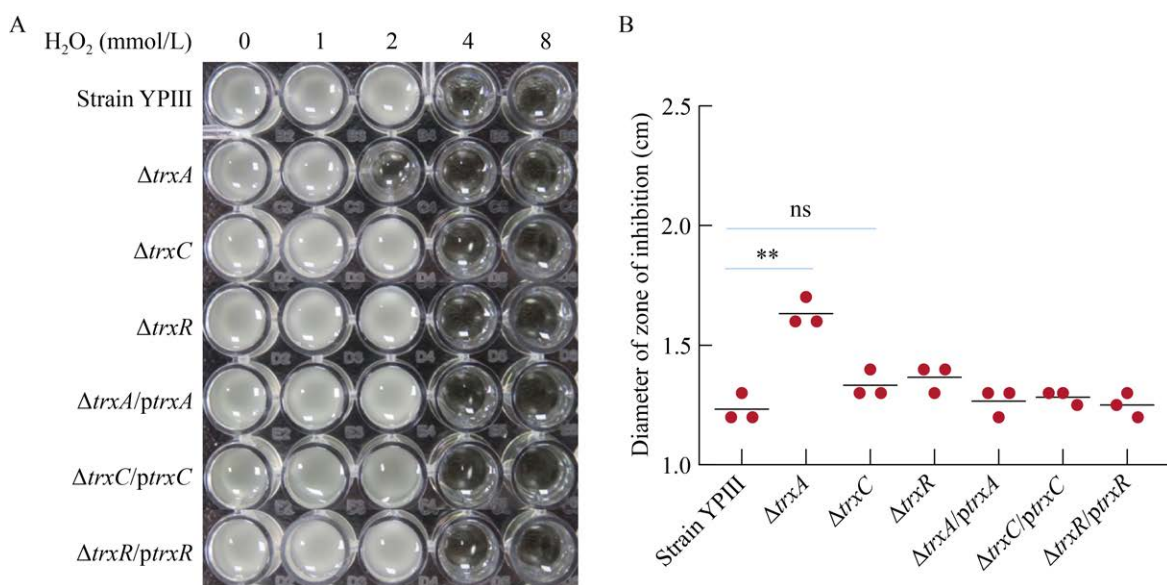


图 3 突变株和回补株对 H_2O_2 的最低抑菌浓度值(A)与抑菌圈(B)

Figure 3 The minimum inhibitory concentration (A) and inhibition zone (B) of mutant and complementation strains against H_2O_2 . **: $P < 0.01$; ns: Not significant.

回补菌株均可以有效地恢复这些表型(图3,图4)。鉴于 $\Delta trxA$ 对 H_2O_2 降解能力降低, 在 $\Delta trxA$ 中过表达菌株 YPIII 中主要的过氧化氢酶 KatE^[10], 并

测定了 H_2O_2 胁迫下的细菌存活率(图 4A), 结果表明 $\Delta trxA$ 的存活率明显上升。以上这些结果表明 $trxA$ 的缺失增加了菌株 YPIII 对 H_2O_2 敏感性。

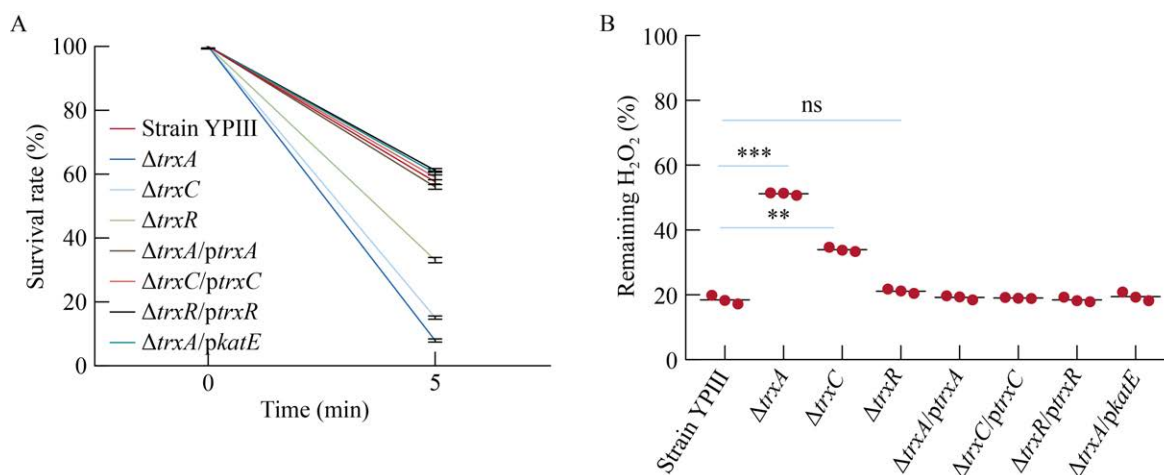


图 4 突变株和回补株的存活率(A)和 H_2O_2 清除能力(B)

Figure 4 Survival rate (A) and H_2O_2 scavenging ability (B) of mutant and complementation strains. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: Not significant.

2.2 $\Delta trxA$ 中过氧化氢酶 KatE 的启动子活性升高

前期研究结果表明菌株 YPIII 的过氧化氢清除系统由过氧化氢酶 KatE、KatG 和过氧化物酶 AhpC 组成, 其中 KatE 是主要的过氧化氢酶^[10]。为了探究 $\Delta trxA$ 对 H_2O_2 的敏感是否是过氧化氢酶的表达下调引起, 构建了基于 *lacZ* 报告基因的启动子检测系统。将 *katE*、*katG* 和 *ahpC* 的启动子序列与报告基因 β -半乳糖苷酶相连, 得到重组质粒 pHGEI01-*katE*、pHGEI01-*katG* 和 pHGEI01-*ahpC* 后转入 $\Delta trxA$ 。通过检测半乳糖苷酶的活性间接比较 *katE*、*katG* 和 *ahpC* 在 $\Delta trxA$ 的表达水平。如图 5A 所示, 未经 H_2O_2 处理时, $\Delta trxA$ 中 *katE* 的表达较菌株 YPIII 中有所上调。经 0.2 mmol/L H_2O_2 处理后, KatE 的表达水平明显上调, 上调水平约为菌株 YPIII 的 1.5 倍, 而 *katG* 和 *ahpC* 的表达不受 *trxA* 缺失的影响。RT-qPCR 的实验结果与启动子活性测定的结果一致(图 5B)。这些结果共同说明 *trxA* 基因的缺失引起过氧化氢酶 KatE 表达升高。

2.3 OxyR 影响硫氧还蛋白系统的表达

在菌株 YPIII 中, 氧化胁迫转录调控蛋白 OxyR 是应答 H_2O_2 胁迫的重要转录因子, 调控过氧化氢酶等众多蛋白的表达。在已有研究的

部分细菌中, OxyR 同样也调控着 Trx 系统的表达^[1]。为了探究菌株 YPIII 的 Trx 系统是否也受到 OxyR 的调控, 分别测定了在 H_2O_2 处理下, *trxA*、*trxC* 和 *trxR* 在菌株 YPIII 和 $\Delta oxyR$ 中的转录水平和表达水平。结果表明, 在 0.2 mmol/L H_2O_2 的诱导下, 菌株 YPIII 中 *trxA*、*trxC* 和 *trxR* 的表达水平均升高(图 6A、6B)。但在 $\Delta oxyR$ 中, 即使在 H_2O_2 的诱导下, *trxC* 和 *trxR* 的启动子水平也与未经 H_2O_2 的诱导下的菌株 YPIII 相似, 提示在 $\Delta oxyR$ 中 *trxC* 和 *trxR* 的表达不再受 H_2O_2 的诱导。相应的, 同时测定了在 $\Delta trxA$ 、 $\Delta trxC$ 和 $\Delta trxR$ 中 OxyR 的表达变化, 结果表明这些基因的缺失不影响 OxyR 的表达(图 6C、6D)。这些结果说明 *oxyR* 的缺失不影响 *trxA* 的表达, 但影响 *trxC* 和 *trxR* 对 H_2O_2 的响应。

3 讨论

细菌硫氧还蛋白对于维持胞内稳定还原环境的维持具有重要作用。作为核糖核酸还原酶和甲硫氨酸亚砷还原酶的质子供体, 硫氧还蛋白参与 DNA 合成和修复过程。除了还原胞内蛋白以外, 硫氧还蛋白还可以直接还原 H_2O_2 等 ROS^[15]。因此, 硫氧还蛋白在细菌氧化应激过程中也发挥着不可或缺的作用。对于致病菌而

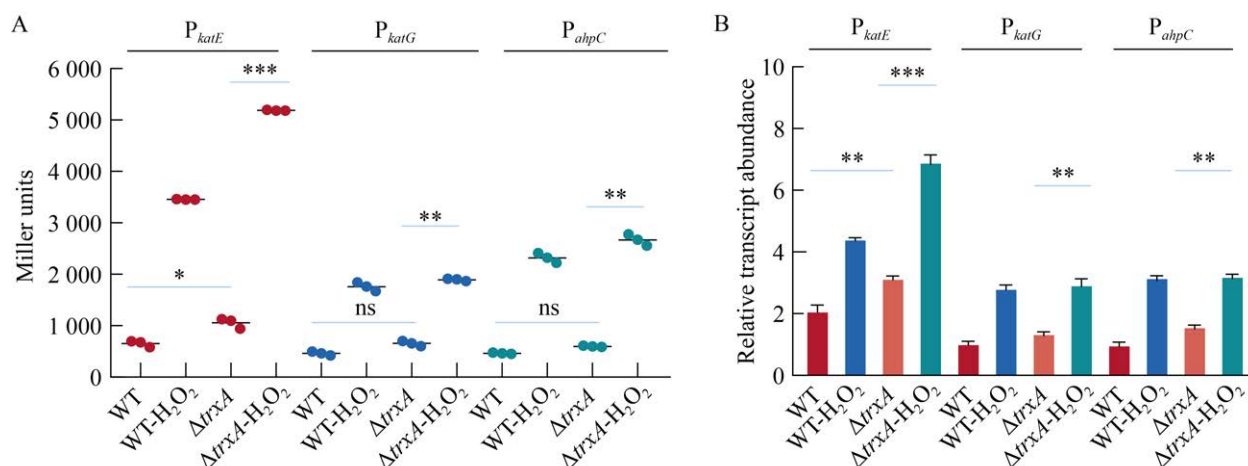


图 5 $\Delta trxA$ 中过氧化氢酶 KatE 的表达上调 A: $\Delta trxA$ 中 *katE*、*katG* 和 *ahpC* 的启动子活性; B: $\Delta trxA$ 中 *katE*、*katG* 和 *ahpC* 的转录水平。WT: 菌株 YPIII。

Figure 5 Expression levels of KatE were up-regulated in $\Delta trxA$. A: Promoter activities of *katE*, *katG* and *ahpC* in $\Delta trxA$; B: Analysis of transcripts of *katE*, *katG* and *ahpC* in $\Delta trxA$. WT: Strain YPIII. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: Not significant.

言, 完善的氧化胁迫应答系统能够有效地帮助其在宿主定殖, 抵抗宿主固有免疫的攻击。例如鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) TrxA 能够减少分泌型 IgA 产生, 促进其在宿主胃肠道黏膜表面的定殖^[16]; 幽门螺旋杆菌 TrxA 和 TrxC 缺失后严重影响细菌在胃部的定殖能力^[17]; 图莱里弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*) TrxA1 促进其在巨噬细胞内的存活和参与毒力的表达^[18]; 单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*) TrxA 通过维持鞭毛形成关键蛋白 MogR 的还原态决定细菌的运动性, 进而严重影响细菌致病性^[19]; 猪链球菌(*Streptococcus suis*)的硫氧还蛋白还原酶参与维持细菌的侵袭能力及介导细菌黏附等^[20]。

肠道独特的微氧环境使得肠道细菌对于氧化应激的调控更加精细。菌株 YPIII 作为肠道致病菌, 需要依赖强大的氧化还原体系应答外界的氧化压力。本研究利用同源重组构建框内缺失突变株的方法在菌株 YPIII 中构建了硫氧还蛋白系统 *trxA*、*trxC* 和 *trxR* 缺失突变株, 探究了硫氧还蛋白系统的抗氧化胁迫功能。发现在菌株 YPIII 中, *trxA* 的缺失会引起细菌对 H₂O₂

敏感, 即在 H₂O₂ 胁迫下细菌存活率显著下降, H₂O₂ 清除能力减弱。因此, TrxA 蛋白是参与抗氧化胁迫的主要功能蛋白。 $\Delta trxA$ 的 H₂O₂ 清除能力下降有可能是 $\Delta trxA$ 对 H₂O₂ 敏感的原因。然而, $\Delta trxA$ 中过氧化氢酶 KatE、KatG 和 AhpC 的表达却有一定程度的升高。而这似乎是矛盾的结果。推测 *trxA* 的缺失使得细菌无法稳定维持胞内的氧化还原环境, 容易受到外界 H₂O₂ 的攻击而死亡。过氧化氢酶的升高有可能是细菌氧化应激的结果, 并不能及时保护细菌以便有效地修复受损蛋白。硫氧还蛋白系统是细菌中重要的蛋白氧化还原平衡维持系统, 不仅影响氧化胁迫应答, 还影响着其他生命活动中重要的蛋白质的氧化还原, 如基因复制、细胞分裂、有氧呼吸等过程。在 *E. coli* 等细菌中, Trx 系统受到氧化胁迫转录调控蛋白 OxyR 的调控^[21-22]。本研究的结果也表明, 在菌株 YPIII 中 OxyR 有可能正调控 Trx 系统的表达。OxyR 蛋白依赖一对十分保守的 Cys 感受 H₂O₂ 的浓度变化, 使得 OxyR 发生氧化态和还原态的构象变化从而发挥转录调控功能。氧化态的 OxyR 依赖于硫氧还蛋白和谷氧还蛋白系统还原。在这 2 种还原系

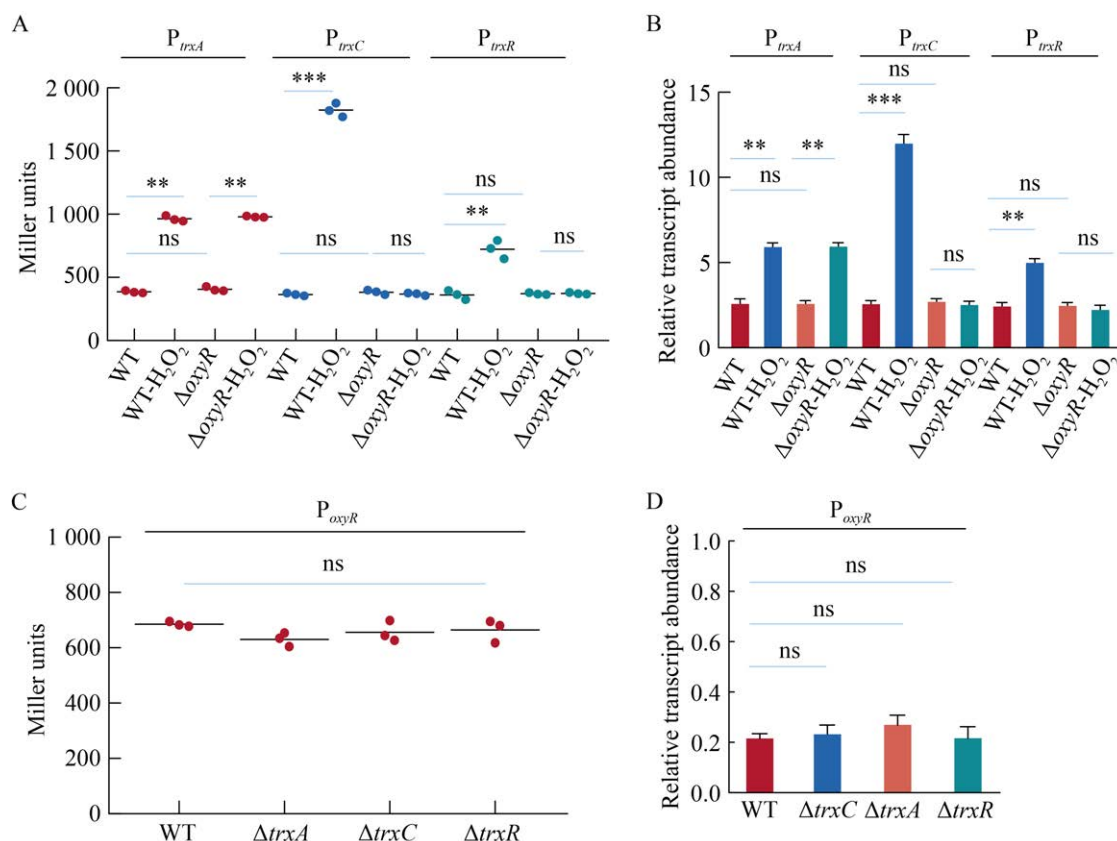


图 6 OxyR 的缺失影响 *trxC* 和 *trxR* 的表达 A: $\Delta oxyR$ 中 *trxA*、*trxC* 和 *trxR* 的启动子活性; B: $\Delta oxyR$ 中 *trxA*、*trxC* 和 *trxR* 的转录水平; C: $\Delta trxA$ 、 $\Delta trxC$ 和 $\Delta trxR$ 中 *oxyR* 的启动子活性; D: $\Delta trxA$ 、 $\Delta trxC$ 和 $\Delta trxR$ 中 *oxyR* 的转录水平。

Figure 6 The loss of OxyR affects the expression of *trxC* and *trxR*. A: Promoter activities of *trxA*, *trxC*, and *trxR* in $\Delta oxyR$; B: Analysis of transcripts of *trxA*, *trxC*, and *trxR* in $\Delta oxyR$; C: Promoter activities of *oxyR* in $\Delta trxA$, $\Delta trxC$, and $\Delta trxR$; D: Analysis of transcripts of *oxyR* in $\Delta trxA$, $\Delta trxC$, and $\Delta trxR$. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: Not significant.

统受到影响的 *E. coli* 突变株如 $\Delta trxA \Delta gorA$ 或 $\Delta trxA \Delta gshA$ 中, 氧化态 OxyR 无法被还原, 使得 OxyR 被锁定在氧化态, 氧化态的 OxyR 持续激活下游基因的表达, 引起细菌对氧化胁迫的反应发生改变^[23]。荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)中也有类似的发现^[21]。因此, 推测菌株 YPIII 中氧化态的 OxyR 有可能依赖 TrxA 进行还原, 缺失 *trxA* 会引起 OxyR 的部分激活, 使得激活的 OxyR 正调控过氧化氢酶 KatE 的表达。但是具体的调控机制有待进一步研究。

4 结论

本研究发现菌株 YPIII 的硫氧还系统的 TrxA 是主要参与氧化胁迫应答的蛋白, 该系统有可能受到 OxyR 的正调控。该研究结果为深入理解细菌如何依赖硫氧还蛋白系统适应外界氧化环境奠定了基础, 对假结核耶尔森氏菌的防治具有重要意义。

作者贡献声明

严伯涵和何照完成实验的探究; 严伯涵完

成数据分析和初稿撰写；范俊凤完成初稿的修改；陶文曦和张子衿参与完成部分实验；万芬负责实验思路和方法的设计，初稿的审阅与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] ZELLER T, KLUG G. Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes[J]. *Die Naturwissenschaften*, 2006, 93(6): 259-266.
- [2] LU J, HOLMGREN A. The thioredoxin antioxidant system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66: 75-87.
- [3] RITZ D, PATEL H, DOAN B, ZHENG M, ASLUND F, STORZ G, BECKWITH J. Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(4): 2505-2512.
- [4] WANG G, ALAMURI P, MAIER RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(4): 847-860.
- [5] UZIEL O, BOROVIK I, SCHREIBER R, COHEN G, AHARONOWITZ Y. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(2): 326-334.
- [6] 关馨, 宁静, 张静, 丁士刚. 幽门螺杆菌硫氧还蛋白的研究进展[J]. *胃肠病学*, 2022, 27(5): 311-315.
- GUAN X, NING J, ZHANG J, DING SG. Progress in research on *Helicobacter pylori* thioredoxin[J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*, 2022, 27(5): 311-315 (in Chinese).
- [7] KHADEMIAN M, IMLAY JA. How microbes evolved to tolerate oxygen[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(5): 428-440.
- [8] LU Z, IMLAY JA. When anaerobes encounter oxygen: mechanisms of oxygen toxicity, tolerance and defence[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(12): 774-785.
- [9] SEABAUGH JA, ANDERSON DM. Pathogenicity and virulence of *Yersinia*[J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2316439.
- [10] WAN F, FENG X, YIN JH, GAO HC. Distinct H₂O₂-scavenging system in *Yersinia pseudotuberculosis*: KatG and AhpC act together to scavenge endogenous hydrogen peroxide[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 626874.
- [11] JIN M, JIANG YM, SUN LL, YIN JH, FU HH, WU GF, GAO HC. Unique organizational and functional features of the cytochrome c maturation system in *Shewanella oneidensis*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75610.
- [12] WU L, WANG JX, TANG P, CHEN HJ, GAO HC. Genetic and molecular characterization of flagellar assembly in *Shewanella oneidensis*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21479.
- [13] FU HH, JIN M, JU LL, MAO YT, GAO HC. Evidence for function overlapping of CymA and the cytochrome bc₁ complex in the *Shewanella oneidensis* nitrate and nitrite respiration[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(10): 3181-3195.
- [14] LUO QX, DONG YY, CHEN HJ, GAO HC. Mislocalization of Rieske protein PetA predominantly accounts for the aerobic growth defect of Tat mutants in *Shewanella oneidensis*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62064.
- [15] PANNALA VR, DASH RK. Mechanistic characterization of the thioredoxin system in the removal of hydrogen peroxide[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2015, 78: 42-55.
- [16] KETTER PM, YU JJ, NEAL GUENTZEL M, MAY HC, GUPTA R, EPPINGER M, KLOSE KE, SESHU J, CHAMBERS JP, CAP AP, ARULANANDAM BP. *Acinetobacter baumannii* gastrointestinal colonization is facilitated by secretory IgA which is reductively dissociated by bacterial thioredoxin A[J]. *mBio*, 2018, 9(4): e01298-18.
- [17] KUHN LG, WANG G, MAIER RJ. Comparative roles of the two *Helicobacter pylori* thioredoxins in preventing macromolecule damage[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(7): 2935-2943.
- [18] MA Z, HIGGS M, ALQAHTANI M, BAKSHI CS, MALIK M. Thioredoxin A1 controls the oxidative stress response of *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS)[J]. *Journal of Bacteriology*, 2022, 204(5): e0008222.
- [19] CHENG CY, DONG ZM, HAN X, WANG H, JIANG L, SUN J, YANG YC, MA TT, SHAO CY, WANG XD, CHEN ZW, FANG WH, FREITAG NE, HUANG HR, SONG HH. Thioredoxin A is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 287.
- [20] 占东波, 刘海发, 龙如意, 王占丰, 朱乐欣, 廖兵荣, 蒋小武. 猪链球菌2型硫氧还蛋白还原酶介导细菌应激与致病作用[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(1): 241-249.
- ZHAN DB, LIU HF, LONG RY, WANG ZF, ZHU LX, LIAO BR, JIANG XW. Thioredoxin reductase contributes to stress response and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(1): 241-249 (in Chinese).
- [21] ZELLER T, LI KY, KLUG G. Expression of the trxC gene of *Rhodobacter capsulatus*: response to cellular redox status is mediated by the transcriptional regulator OxyR[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(21): 7689-7695.
- [22] HISHINUMA S, OHTSU I, FUJIMURA M, FUKUMORI F. OxyR is involved in the expression of thioredoxin reductase TrxB in *Pseudomonas putida*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 289(2): 138-145.
- [23] ASLUND F, ZHENG M, BECKWITH J, STORZ G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(11): 6161-6165.