

# 假肠膜明串珠菌 L64 中 *mazEF* 类 II 型毒素-抗毒素系统的识别和鉴定

李鹏\*, 刘兰, 章帅文, 王通, 黄筱萍

江西省科学院 微生物研究所, 江西 南昌

李鹏, 刘兰, 章帅文, 王通, 黄筱萍. 假肠膜明串珠菌 L64 中 *mazEF* 类 II 型毒素-抗毒素系统的识别和鉴定[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1070-1088.

LI Peng, LIU Lan, ZHANG Shuaiwen, WANG Tong, HUANG Xiaoping. Identification and characterization of *mazEF* family type II toxin-antitoxin systems of *Leuconostoc pseudomesenteroides* L64[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(3): 1070-1088.

**摘要:** 【目的】鉴定假肠膜明串珠菌 L64 基因组中编码的 *mazEF* 类 II 型毒素-抗毒素系统, 并初步探讨 *mazEF* 系统协助宿主应对环境酸压力的分子机制。【方法】在大肠杆菌中诱导表达 MazF 毒素, 或同时表达其对应的抗毒素蛋白, 以检测 MazF 是否抑制宿主的正常生长, 并验证对应的抗毒素是否能中和 MazF 的毒性。基于 *lacZ* 报告系统及电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 等体内外试验确定 *mazEF* 系统的自调控机制。通过生物信息学预测及体内外试验确定受 MazE 调控的下游基因。【结果】在假肠膜明串珠菌 L64 基因组编码的 3 对潜在 *mazEF* 毒素-抗毒素系统中, 仅有 *mazEF1-Leup* (OYT\_01690-OYT\_01685) 编码真正的毒素-抗毒素系统。抗毒素 MazE1-Leup (OYT\_01685) 通过与启动子中的回文序列 (TAACAaaatgTGTTA) 结合, 抑制 *mazEF1-Leup* 启动子的转录; 同时, MazE1-Leup 通过与 *dlt-acpS-alr* 操纵子启动子中的相同回文序列 (TAACAAtttgaaatattgTGTTA) 结合, 抑制 *dlt-acpS-alr* 的转录。【结论】OYT\_01690-OYT\_01685 编码一个真正的 *mazEF* 类毒素-抗毒素系统, 该系统不仅参与自身转录的调控, 还抑制 *dlt-acpS-alr* 操纵子的转录, 从而协助假肠膜明串珠菌 L64 应对环境中的酸压力。

**关键词:** 假肠膜明串珠菌; II 型毒素-抗毒素系统; *mazEF* 家族; 回文序列; 酸压力

资助项目: 江西省科学院重点研发计划(2022YSBG22011, 2021YSBG21014, 2022YSBG21007)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Jiangxi Academy of Sciences (2022YSBG22011, 2021YSBG21014, 2022YSBG21007).

\*Corresponding author. E-mail: pengli\_jx@126.com

Received: 2024-11-12; Accepted: 2024-12-11; Published online: 2025-01-22

## Identification and characterization of *mazEF* family type II toxin-antitoxin systems of *Leuconostoc pseudomesenteroides* L64

LI Peng\*, LIU Lan, ZHANG Shuaiwen, WANG Tong, HUANG Xiaoping

Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang, Jiangxi, China

**Abstract:** [Objective] To identify *mazEF* family type II toxin-antitoxin systems of *Leuconostoc pseudomesenteroides* L64 and to elucidate the molecular roles of the *mazEF* systems in the host exposed to environmental acid stress. [Methods] Putative MazF toxins were induced alone or co-expressed with their cognate antitoxins in *Escherichia coli*. The toxic effect of MazF on bacterial growth and the antitoxic effects of cognate antitoxins were examined. The *lacZ* reporter system and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were used to decipher the auto-regulation mechanism of the *mazEF* system *in vivo* and *in vitro*. The putative target genes regulated by MazE were predicted and validated through *in vivo* and *in vitro* experiments. [Results] Among the three putative *mazEF* systems in *L. pseudomesenteroides* L64, *mazEF1-Leup* (OYT\_01690-OYT\_01685) encoded a functional type II toxin-antitoxin system. MazE1-Leup (OYT\_01685) inhibited *mazEF1-Leup* transcription by binding to the palindromic sequence (TAACAaaatgTGTTA) in the promoter. In addition, MazE1-Leup inhibited transcription of the *dlt-acpS-alr* operon by binding to the similar palindromic sequence (TAACAtattgaaatgatgTGTTA) in the promoter of *dlt-acpS-alr*. [Conclusion] *mazEF1-Leup* (OYT\_01690-OYT\_01685) encodes a functional *mazEF* family type II toxin-antitoxin system. Beyond regulating its own operon, MazE1-Leup regulates the transcription of *dlt-acpS-alr* and finally assists *L. pseudomesenteroides* L64 in response to low acid stress.

**Keywords:** *Leuconostoc pseudomesenteroides*; type II toxin-antitoxin system; *mazEF* family; palindromic sequence; acid stress

毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin system, TA system)最初发现于低拷贝质粒中,其通过分裂后自杀机制确保质粒的稳定遗传<sup>[1-2]</sup>。然而,近年来的研究表明,TA系统还广泛分布于细菌和古菌的染色体中。根据抗毒素的性质(蛋白质或RNA)以及抗毒素中和毒素毒性的不同机制,TA系统被划分为8大类<sup>[3]</sup>。其中,II型TA系统不仅分布最为广泛,而且展现出更高的多样性<sup>[4-6]</sup>。典型的II型TA系统由2个共转录的基因组成,分别编码稳定的毒素和相对不稳定的抗毒素。在正常条件下,抗毒素与毒素紧密结合,形成TA复合物,从而有效中和毒素的毒性。当细胞

处于压力环境时,不稳定的抗毒素易受Lon蛋白酶或Clp蛋白酶的降解,导致毒素从TA复合物中释放并发挥其毒性作用。然而,近年来这一观点受到了挑战。Leroux等<sup>[7]</sup>的研究表明,虽然压力条件可以诱导TA系统的转录,但并不会直接激活毒素。游离的II型毒素蛋白主要通过干扰DNA复制、转录<sup>[8-9]</sup>、翻译<sup>[10-13]</sup>及其他重要生理生化过程<sup>[14-15]</sup>,进而影响细胞的正常功能。尽管关于II型TA系统的激活机制仍存在争议,但普遍认为TA系统在协助细菌应对外界压力挑战中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。

在II型TA系统中,抗毒素基因通常位于毒

素基因的上游,但也有少数 II 型 TA 系统呈现出相反的遗传结构,即毒素基因位于抗毒素基因的上游。Li 等<sup>[17]</sup>的研究表明,无论遗传结构如何,抗毒素的表达水平总是高于毒素。抗毒素具有明显的模块化结构,分别具备与毒素和 DNA 结合的功能;在正常条件下,过量的抗毒素通过其 HTH 结构域与 TA 系统启动子中的反向重复序列(inverted repeat, IR)结合,以此实现对 TA 系统转录的调控。同时,毒素与抗毒素的结合会进一步抑制 TA 系统的转录。除了参与 II 型 TA 系统的自调控外,越来越多的研究表明,抗毒素还作为转录因子在调控细菌其他关键的生理生化过程中发挥重要作用。例如, MqsA 通过抑制多效性转录因子 *rpoS* 和 *csgD* 的转录,参与细菌压力应答和生物膜形成的调控过程<sup>[18-19]</sup>;铜绿假单胞菌编码的 HigA 直接抑制毒素基因 *myfR* 的表达,并在压力条件下诱导其他毒力因子的转录<sup>[20-21]</sup>; HipB 与 *relA* 启动子结合,抑制其转录<sup>[22]</sup>; DinJ 则通过抑制 *cspE* 的转录,进而降低 RpoS 的蛋白水平<sup>[23]</sup>。

尽管 II 型 TA 系统在其他细菌中,尤其是条件致病菌中得到了广泛研究,但关于乳酸菌,特别是明串珠菌来源的 TA 系统研究仍相对匮乏<sup>[24-25]</sup>。明串珠菌作为一类重要的乳酸菌,在食品行业中有着广泛的应用和重要的价值。作为有机酸的重要生产者,乳酸菌在生长过程中积累的有机酸会迅速降低环境 pH 值,给乳酸菌自身的生长带来了巨大挑战<sup>[26-27]</sup>。为了应对这种酸压力,乳酸菌采用了多种机制来增强自身的酸耐受性<sup>[28-30]</sup>。例如, TCSR7 蛋白通过正调控 *dlt* 操纵子来增强乳酸乳球菌的酸耐受性<sup>[31]</sup>。然而,作为细菌中重要的压力应答元件,II 型 TA 系统是否参与乳酸菌的酸压力应答过程尚不清楚。鉴于此,本研究基于假肠膜明串珠菌 L64 的全基因组序列,识别和鉴定潜

在的 *mazEF* 类 TA 系统,通过研究其自调控机制,初步探讨抗毒素 MazE 在协助假肠膜明串珠菌应对外界酸压力过程中的作用及其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒及培养条件

本研究所用菌株和质粒的详细信息见表 1。大肠杆菌在 LB 培养基中 37 °C、180 r/min 培养 12 h,假肠膜明串珠菌 L64 在 MRS 培养基中 30 °C、120 r/min 培养 16 h。培养含 pBAD/myc-hisA 相关质粒或 His-LacZ 相关质粒的细菌时添加 100 µg/mL 的氨苄青霉素,培养含 pACYCDuet-1 相关质粒的细菌时添加 25 µg/mL 的氯霉素,培养含 pKT25 相关质粒的细菌时添加 50 µg/mL 的卡那霉素。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

高保真 DNA 聚合酶 I-5<sup>TM</sup> 2×High-Fidelity Master Mix,北京擎科生物科技股份有限公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNase I,赛默飞世尔科技公司;DNA 聚合酶 2×*Taq* Mix、逆转录试剂盒、质粒小提试剂盒、qPCR 试剂盒 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、无缝克隆试剂盒 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;RNA 提取试剂盒,杭州倍沃医学科技有限公司;抗生素,阿拉丁试剂(上海)有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷、Gel-Shift 结合缓冲液,上海碧云天生物技术股份有限公司。

水平电泳仪、垂直电泳仪、成像仪(荧光成像),上海天能科技有限公司;PCR 仪, Bio-Rad 公司;摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;

表1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strains/Plasmids	主要特征 Features	来源 Origin
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> L64	Wild type	Lab
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ( <i>ara</i> , <i>leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , ( <i>Str</i> <sup>r</sup> ) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	ThermoFisher Scientific
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdSB</i> ( <i>rB</i> <sup>-</sup> <i>mB</i> <sup>-</sup> ), (DE3)	Novagene
<i>Escherichia coli</i> BTH101	F <sup>-</sup> , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> ( <i>Str</i> <sup>r</sup> ), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i> , <i>relA1</i>	Euromedex
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	F <sup>-</sup> [ <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , <i>lacZ</i> , ΔM15, Tn10], <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>lac</i> , Δ( <i>mcrA</i> )183, Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173, <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i>	ThermoFisher Scientific
His-LacZ	pUC <i>ori</i> , <i>araC</i> , <i>bla</i> , promoter-less <i>lacZ</i>	Lab
pACYCDuet-1	P15A <i>ori</i> , <i>lacI</i> , <i>cat</i> , two MCSs	Novogene
pBAD/myc-hisA	pBR322 <i>ori</i> , <i>bla</i> , <i>araC</i> , pBAD	Life Tech.
pUT18C	pUC <i>ori</i> , T18, <i>bla</i>	Euromedex
pKT25	pUC <i>ori</i> , T25, <i>kan</i>	Euromedex
pBAD-F1	Expression of MazF1-Leup controlled by arabinose inducible promoter	This study
pBAD-F2	Expression of MazF2-Leup controlled by arabinose inducible promoter	This study
pBAD-F3	Expression of MazF3-Leup controlled by arabinose inducible promoter	This study
pUT18C-zipper	pUC <i>ori</i> , zipper-T18, <i>bla</i>	Euromedex
pKT25-zipper	pUC <i>ori</i> , zipper-T25, <i>kan</i>	Euromedex
pPef1-lacZ	Expression of report gene <i>lacZ</i> controlled by promoter of <i>mazEF1-Leup</i>	This study
pPef1-lacZ-Pcat-E1	Simultaneous expression of MazE1-Leup on the basis of pPef1-lacZ	This study
pPef1-lacZ-Pcat-EF1	Simultaneous expression of MazEF1-Leup on the basis of pPef1-lacZ	This study
pPef1-IRM-lacZ	Mutation of IR in promoter of <i>mazEF1-Leup</i>	This study
pPef1-IRM-lacZ-Pcat-E1	Simultaneous expression of MazE1-Leup on the basis of pPef1-IRM-lacZ	This study
pPdl1-lacZ	Expression of report gene <i>lacZ</i> controlled by promoter of <i>dlt</i> operon	This study
pPdl1-lacZ-Pcat-E1	Simultaneous expression of MazE1-Leup on the basis of pPdl1-lacZ	This study
pACYC-his-E1	Expression of MazE1-Leup with N-terminus His tag	This study
pACYC-his-E1-F1	Expression of MazE1-Leup with N-terminus His tag and label free MazF1-Leup	This study
pUT18C-mazE1	Fusion expression of MazE1 and T18	This study
pKT25-mazF1	Fusion expression of MazF1 and T25	This study

-表示相关因子缺失或相关蛋白功能丧失, Δ表示基因或DNA片段被敲除, <sup>r</sup>表示抗性。

- indicates loss of related factor or loss of function of related protein; Δ represents the knocked-out gene or DNA fragment; <sup>r</sup> indicates the resistance.

培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 酶联免疫分析仪, 杭州奥盛仪器有限公司; 台式高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 分光光度计, Eppendorf 公司; 荧光

定量 PCR 系统, ThermoFisher Scientific 公司。

### 1.1.3 引物

本研究所用引物见表 2, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表2 本研究所用引物

Table 2 Oligonucleotides used in this study

引物 Primers name	序列 Primer sequences (5'→3')
mazF1-f	GGGCTCGAGATGAGTGATGATATTCGCG
mazF1-r	CCCGGTACCTCATTCTAAATCAGATAAAAACGC
mazF2-f	GGGCTCGAGATGAGTTACAAGCCTAGGC
mazF2-r	CCCGGTACCTTAAACCCAACCTGGCTGG
mazF3-f	GGGCTCGAGATGAGTGAATTAGATCCCAG
mazF3-r	CCCGGTACCTTATCCTTTGAAAGGTATCTTTC
mazF1-R28A-f	TGGCTCCGGCATTGTAGTGAAATACG
mazF1-R28A-r	TACAAATGCCGGAGCCACCTTGGAGCCTACTTCTCGC
mazF1-T46A-f	AGCTAGTCAATATGATGATAAATCAGAATATTTAAG
mazF1-T46A-r	CATCATATTGACTAGCTATTTTGTATAAGTAATCCGCTGATTATC
mazF2-I50T-f	GCCAATAACTCACGGTGATTGGGAGTTTGC
mazF2-I50T-r	CACCGTGAGTTATTGGCGTCACAATGGCAA
mazF3-E18G&K20E-f	CCATATGGAGACGAAAGTGATTCAAAACTAGACCTGCTTTC
mazF3-E18G&K20E-r	CTTTCGTCTCCATATGGTATGTTTACCACGTAAACTTTCA
HisE1OE-f	ACCATCATACCACAGCCAGGATCCGATGAAAGCAATTCAAGTATCTGCTCG
HisE1OE-r	CTTAAGCATTATGCGGCCGCAAGCTTTCATTGCAAAAATTCCTCACGG
HisE1-F1-OE-f	GCCACGCGATCGCTGACGTCGGTACCATGAGTGATGATATTCGCGAGCA
HisE1-F1-OE-r	GCAGCGTTTCTTTACCAGACTCGAGTCATTCTAAATCAGATAAAAACGCCA
F1-KT25-f	GGCGGGCTGCAGGGTCGACTCTAGAGATGAGTGATGATATTCGCGAGCA
F1-KT25-r	TACGCTGGATAGGTACCCGGGGATCCTCATTCTAAATCAGATAAAAACGCCA
E1-UT18C-f	AACGCCACTGCAGGTCGACTCTAGAGATGAAAGCAATTCAAGTATCTGCTCG
E1-UT18C-r	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCATTGCAAAAATTCCTCACGG
EF1-prom-f	CCCGCGGCCGCGCTTCTCTAGATAGCAAGC
EF1-prom-r	CCCGGATCCGCTTTCATAATGTGCACCC
EF1-prom-IRM-f	ACATATACGCCATAAATGTGTTATAATTTAAGTAAAG
EF1-prom-IRM-r	ACACATTTATGGCGTATATGTTATCTATTGTTAGTAATTATG
EF1-probe-FAM-r	GCTTTCATAATGTGCACCC
cat-prom-f	CACTGGTGATAACCATTCCGCGATGATCGGCACGTAAGAGGTTC
cat-prom-r	TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAAT
EF1-cat-prom-f	CAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAAAGCAATTCAAGTATCTGCTC
EF1-cat-prom-r	TCGTCATCCGGAGGCTCGCGATCATTCTAAATCAGATAAAAACGCC
E1-cat-prom-r	TCGTCATCCGGAGGCTCGCGATCATTGCAAAAATTCCTCACGG
Pef1-3510D-f	TTAAGTAAAGTATATTAAGTGGGG
Pef1-3510D-r	ACTTAATATACTTTACTTAAGTTAGTAATTATGCTGAATTGG
16SqF	CAATGGGCGAAAGCCTGATG
16SqR	GCACGTATTTAGCCGTCCCT
E1qF	GCTCGTGTTGATCCAAGCAT
E1qR	GGCTGTTGATGGGTCTCTTGA

(待续)



(续表2)

引物 Primers name	序列 Primer sequences (5'→3')
F1qF	CAAGGTGAGACCGGCATTG
F1qR	GCCCGCATAAACCCAATCTT
dlt-acpS-f	ACCTTTCTTCGCCAAGGGTT
dlt-acpS-r	CCTGCCAATGGACTTTTTTCACC
acpS-alr-f	AGTCCATTGGCAGGATATTGAA
acpS-alr-r	GTTGCAACAGCAAAGTCCGT
Pdlt-f	GAGACCGGTCTGTTTTGCGGCCGCTCGCTCCAATATTGAAACACAAT
Pdlt-r	ACGGGATCTATCATTGGATCCCCGCTGAAAAAACTGTTTTATCAT
Pdlt-probe-f-fam	GTCGCTCCAATATTGAAACAC
Pdlt-probe-r	CCGCTGAAAAAACTGTTTTATC

下划线标记的核苷酸为限制性内切酶的识别位点。

The underlined nucleotides indicate the recognition sequences of restriction endonucleases.

## 1.2 重组质粒的构建

### 1.2.1 潜在毒素蛋白毒性验证质粒的构建

按照细菌基因组提取试剂盒说明书提取假肠膜明串珠菌 L64 的全基因组 DNA。以该基因组 DNA 为模板，利用特异性引物 mazF1-f/r、mazF2-f/r 及 mazF3-f/r (表 2)，分别扩增潜在毒素蛋白编码基因 *mazF1-Leup*、*mazF2-Leup* 及 *mazF3-Leup*。PCR 反应体系 (50 μL): 2×High-Fidelity Master Mix 25 μL，上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL，DNA 模板 0.5 μL，ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 30 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。本研究后续的 PCR 反应体系及程序与此次类似，但会根据不同引物及预期产物大小调整退火温度和延伸时间。PCR 产物经过胶回收后，使用 *Kpn* I 及 *Xho* I 进行酶切处理，与经过相同酶切处理的 pBAD/myc-hisA 连接，连接产物随即被转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，最终获得质粒 pBAD-F1、pBAD-F2 及 pBAD-F3。

### 1.2.2 毒素蛋白定点突变相关载体的构建

按照质粒抽提试剂盒说明书从大肠杆菌 TOP10/pBAD-F1 中提取重组质粒 pBAD-F1。以

提取的质粒 pBAD-F1 为模板，使用引物 mazF1-R28A-f/r (表 2) 进行反向 PCR 扩增，以获得线性化的载体。通过 *Dpn* I 酶处理，降解残留的环形质粒模板。在 T4 DNA 连接酶的作用下，线性化载体发生自连。将自连产物转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，从而获得含有突变毒素蛋白表达载体 pBAD-F1 (R28A)。采用同样的方法构建 pBAD-F1 (T46A)、pBAD-F2 (I50T) 及 pBAD-F3 (E18G&K20E) 等重组质粒。

### 1.2.3 细菌双杂交质粒的构建

以假肠膜明串珠菌 L64 的基因组 DNA 为模板，利用引物对 F1-KT25-f/r 及 E1-UT18C-f/r (表 2) 分别扩增基因 *mazF1-Leup* 及 *mazE1-Leup*。使用 *Xba* I 及 *Bam* H I 处理 pKT25 及 pUT18C，获得线性化的 pKT25 及 pUT18C。按照无缝克隆试剂盒说明书，获得重组质粒 pKT25-mazF1 及 pUT18C-mazE1。

### 1.2.4 抗毒素 MazE1-Leup 及毒素抗毒素复合物 MazEF1-Leup 表达质粒的构建

以假肠膜明串珠菌 L64 的基因组 DNA 为模板，使用引物 HisE1OE-f/r (表 2) 扩增抗毒素基因 *mazE1-Leup*。使用 *Bam* H I 及 *Hind* III 处理 pACYCDuet-1，获得线性化的 pACYCDuet-1。利

用无缝克隆试剂盒，获得 N 端融合 His 标签的 MazE1-Leup 表达质粒 pACYC-His-E1。再次以假肠膜明串珠菌 L64 的基因组 DNA 为模板，使用引物 HisE1-F1-OE-f/r (表 2) 扩增毒素基因 *mazF1-Leup*。之后，使用 *Kpn* I 及 *Xho* I 对 pACYC-His-E1 进行酶切处理，使其线性化。利用无缝克隆试剂盒将 *mazF1-Leup* 克隆至 pACYC-His-E1 的第 2 个多克隆位点，获得质粒 pACYC-His-E1-F1。

### 1.2.5 基于 LacZ 的相关报告质粒的构建

以假肠膜明串珠菌 L64 的基因组 DNA 为模板，使用引物 EF1-prom-f/r (表 2) 扩增 *mazEF1-Leup* 上游的非编码序列 Pef1。经过凝胶回收纯化后，用 *Not* I 及 *Bam*H I 处理 Pef1，与经过相同酶切处理的 His-LacZ 连接。将连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，最终获得重组质粒 pPef1-lacZ。采用相同的方法构建 pPdl-lacZ。以假肠膜明串珠菌 L64 的基因组 DNA 为模板，使用引物 EF1-cat-prom-f/r (表 2) 扩增 *mazEF1* 的编码区。同时，以 pACYCDuet-1 为模板，使用引物 cat-prom-f/r (表 2) 扩增氯霉素抗性基因的启动子 Pcat。通过 SOE-PCR 将 *mazEF1* 与 Pcat 进行融合。利用无缝克隆试剂盒将融合片段 Pcat-*mazEF1* 克隆至 pPef1-lacZ，获得质粒 pPef1-lacZ-Pcat-EF1。采用相同的方法构建重组质粒 pPef1-lacZ-Pcat-E1 和 pPdl-lacZ-Pcat-E1。此外，以 pPef1-lacZ 为模板，使用引物 Pef1-3510D-f/r (表 2)，通过反向 PCR 及 *Dpn* I 处理后，删除启动子 Pef1 中的 -35 和 -10 区，获得质粒 pPef1-3510D-LacZ。采用相同的方法构建 pPef1-IR1M-lacZ 和 pPef1-IR1M-lacZ-Pcat-E1。

### 1.3 检测毒素对宿主细胞的毒性及抗毒素对毒素的中和作用

将包含 pBAD/myc-hisA 或潜在毒素蛋白诱导表达质粒的大肠杆菌 TOP10 接种于含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$

氨苄青霉素的 LB 培养基，37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养过夜。随后，以 1% 的接种量转接至新鲜的 LB 培养基，37  $^{\circ}\text{C}$  培养至  $OD_{600}$  值达到 0.2–0.3。将培养物均分为 2 等份，分别加入 0.2% 葡萄糖及 0.2% 的 L-阿拉伯糖进行诱导，然后 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 1 h。之后，进行梯度稀释 ( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ )，每个梯度取 3  $\mu\text{L}$  点样至 LA 平板，37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱倒置培养 12 h 后，观察并记录生长情况。

将包含 pBAD-F1 及 pACYC-his-E1 的大肠杆菌 BL21(DE3) 接种至含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素的 LB 培养基，37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。同样地，以 1% 的接种量转接至新鲜的 LB 培养基，37  $^{\circ}\text{C}$  培养至  $OD_{600}$  值达到 0.2–0.3，将培养物均分成 4 份，分别加入 0.2% 葡萄糖、0.5 mmol/L 的 IPTG、0.2% L-阿拉伯糖及 0.5 mmol/L 的 IPTG 和 0.2% L-阿拉伯糖，37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养，每隔半小时取样测定  $OD_{600}$ ，连续测定 2 h。诱导 1 h 后，取样进行梯度稀释 ( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ )，每个梯度取 3  $\mu\text{L}$  点样至 LA 平板，37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱倒置培养 12 h 后，观察并记录生长情况。

### 1.4 抗毒素 MazE1-Leup 及毒素-抗毒素复合物 MazEF1-Leup 的表达与纯化

将表达质粒 pACYC-his-E1 及 pACYC-his-E1-F1 分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中，获得相应的表达菌株大肠杆菌 BL21(DE3)/pACYC-his-E1 及大肠杆菌 BL21(DE3)/pACYC-his-E1-F1。以 MazE1-Leup 的表达与纯化为例进行阐述：将大肠杆菌 BL21(DE3)/pACYC-his-E1 接种于含 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素的 LB 培养基中，于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养过夜。以 1% 的接种量转接至含 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素的新鲜 LB 培养基，37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  达到 0.5–0.6 之间，加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 MazE1-Leup 的表达。诱导结束后，

4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。用 buffer A (25 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、150 mmol/L NaCl)重悬菌体, 并通过超声破碎菌体, 将破碎后的菌体裂解液于 4 °C、12 000 r/min 离心 45 min, 保留上清液。基于重组蛋白 His<sub>6</sub>-MazE1-Leup 中的 His 标签, 利用 Ni-NTA 柱进行亲和层析纯化 MazE1-Leup。利用 buffer B (25 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、150 mmol/L NaCl、50 mmol/L 咪唑)洗涤杂蛋白, 然后用 buffer C (25 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、150 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑)洗脱, 获得目标蛋白 His<sub>6</sub>-MazE1-Leup。最终利用 buffer D (25 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、150 mmol/L NaCl、5% 甘油)通过超滤对目标蛋白进行脱盐及浓缩。通过 SDS-PAGE 检测目标蛋白 MazE1-Leup 的表达情况与纯度。基于 MazE1-Leup 与 MazF1-Leup 的直接相互作用, 利用 MazE1-Leup 携带的 His 标签来纯化 MazEF1-Leup 复合物。纯化过程与 MazE1-Leup 的纯化过程相同。最后, 利用 MALDI-TOF MS 对纯化产物进行鉴定。

### 1.5 细菌双杂交 (bacterial adenylate cyclase-based two-hybrid, BACTH)

将包含 pKT25-mazF1 及 pUT18C-mazE1 的大肠杆菌 BTH101 接种于含 50 µg/mL 卡那霉素及 100 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 30 °C 培养过夜。以 1% 的接种量转接至新鲜 LB 培养基, 继续培养至 OD<sub>600</sub> 值达到 0.1 左右, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 数小时后取样测定细胞内 β-半乳糖苷酶的活性。同时, 取 100 µL 培养物, 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 5 µL 新鲜 LB 培养基重悬菌体后点样至含有 X-gal 的 LA 平板, 30 °C 培养箱倒置培养过夜, 观察颜色变化。采用同样的方法处理阳性对照大肠杆菌 BTH101/pKT25-zipper/pUT18C-zipper 及阴性对照大肠杆菌

BTH101/pKT25/pUT18C。

### 1.6 凝胶迁移实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

参考 Li 等<sup>[32]</sup>的方法进行 EMSA 实验。以假肠膜明串珠菌 L64 的基因组 DNA 为模板, 使用引物 EF1-prom-f/EF1-probe-FAM-r (表 2), 扩增预测的 *mazEF1-Leup* 启动子作为探针, 该探针的 5' 末端携带 FAM 荧光标记。配制包含结合缓冲液、FAM 标记的 DNA 探针 (200 ng) 及不同量的 His<sub>6</sub>-MazE1-Leup 或 His<sub>6</sub>-MazEF1-Leup 的结合反应体系, 室温孵育 30 min 后, 在 8% 非变性 PAGE 胶中以 100 V 低温电泳 1 h。电泳结束后, 采用天能凝胶成像系统 (荧光成像模式) 观察蛋白与探针的结合情况。

### 1.7 总 RNA 的提取、RT-PCR 及 RT-qPCR

将假肠膜明串珠菌 L64 的 30 °C 过夜培养物接种至新鲜的 D-乳酸发酵培养基。对照组在发酵培养基中加入 55 g/L 的 CaCO<sub>3</sub>, 以中和产生的乳酸并稳定培养基的 pH; 实验组则不添加 CaCO<sub>3</sub>, 其他成分保持一致。经过 48 h 发酵后, 按照 RNA 抽提试剂盒的操作说明书抽提总 RNA, 并使用 DNase I 在 37 °C 处理 RNA, 去除残留的基因组 DNA。随后, 利用逆转录试剂盒合成 cDNA。设计特异性 RT-qPCR 引物 (表 2), 并按照 ChamQ Universal SYBR qPCR 试剂盒的操作说明配制反应体系, 以定量检测实验条件下目标基因 mRNA 水平的变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 假肠膜明串珠菌 L64 基因组编码 3 对潜在的 MazEF 类 II 型毒素-抗毒素系统

利用 TADB 3.0 在线工具 TAFinder 2.0<sup>[6]</sup>, 在假肠膜明串珠菌 L64 基因组中成功识别出 2 对



潜在的 *mazEF* 家族 TA 系统, 分别是 *OYT\_03030-OYT\_03025* 和 *OYT\_04285-OYT\_04280*。其中, *OYT\_03030* 和 *OYT\_04285* 分别编码 194 个和 122 个氨基酸残基的 MazF 毒素蛋白, 与大肠杆菌编码的 MazF 的序列一致性分别仅为 15.82% 和 10.49%。这 2 对系统中的上游基因 *OYT\_RS03025* 和 *OYT\_RS04280* 分别编码 PemK 和 MazE 抗毒素。此外, 通过 BLASTp 在假肠膜明串珠菌 L64 基因组中还发现了另一个潜在的 MazF 蛋白 *OYT\_01690*, 与大肠杆菌来源的 MazF 的序列一致性为 11.19%。值得注意的是, 上游基因 *OYT\_01685* 编码 RelB/DinJ 抗毒素, 并且与 *OYT\_01690* 存在 4 个核苷酸的重叠区域。综上所述, 假肠膜明串珠菌 L64 基因组编码 3 对潜在的 *mazEF* 类 II 型 TA 系统(表 3), 为便于后续描述, 将 *OYT\_01690-OYT\_01685*、*OYT\_03030-OYT\_03025* 及 *OYT\_04285-OYT\_04280* 分别命名为 *mazEF1-Leup*、*mazEF2-Leup* 及 *mazEF3-Leup*。

## 2.2 毒素蛋白 MazF1-Leup 对大肠杆菌具有强烈毒性

构建潜在毒素蛋白过表达质粒并分别导入大肠杆菌 TOP10 细胞中, 同时, 将空白质粒 pBAD/myc-hisA 导入大肠杆菌 TOP10 细胞中作为对照。在抑制条件(添加 0.2% 葡萄糖)和诱导条件(添加 0.2% L-阿拉伯糖)下分别生长 1 h 后, 通过稀释点板实验检测毒素的表达对宿主生长的影响。在抑制条件下, 毒素蛋白表达宿主与空白对照一样, 均正常生长; 在诱导条件下, 大肠杆菌 TOP10/pBAD-MazF1 的生长受到明显

抑制, 而大肠杆菌 TOP10/pBAD-MazF2 和 大肠杆菌 TOP10/pBAD-MazF3 与空白对照大肠杆菌 TOP10/pBAD 一样, 均正常生长(图 1A), 表明 MazF1-Leup 对大肠杆菌具有强烈毒性, 而 MazF2-Leup 和 MazF3-Leup 无毒性(图 1A)。通过多序列比对识别 MazF1-Leup 中保守活性位点(图 1B), 将 R28 和 T46 分别突变为 Ala 后, 结果显示突变后的 MazF1-Leup 毒性消失, 进一步证明 *mazF1-Leup* 编码的是 MazF 类毒素蛋白。

多序列比对结果显示, MazF2-Leup 和 MazF3-Leup 的潜在活性位点均发生突变, 具体来说, MazF2-Leup 的 Ile (50) 取代了 Thr, MazF3-Leup 的 Glu (18) 和 Lys (20) 分别取代了 Gly 和 Glu (图 1B)。为了验证这些活性位点的突变是否导致毒性的丧失, 将 MazF2-Leup 的 I50 突变为 T, 将 MazF3-Leup 的 E18 和 K20 分别突变为 G 和 E, 获得了突变蛋白 MazF2-Leup<sup>I50T</sup> 和 MazF3-Leup<sup>E18G&K20E</sup> 的表达基因, 将它们分别导入大肠杆菌 TOP10 细胞中。诱导表达突变体后, 宿主细胞依然正常生长, 表明突变后的 MazF2-Leup 和 MazF3-Leup 仍然无毒性(图 1C)。以上结果表明, MazF1-Leup 是 II 型 MazF 毒素蛋白, MazF2-Leup 和 MazF3-Leup 在当前实验条件下均无毒性。

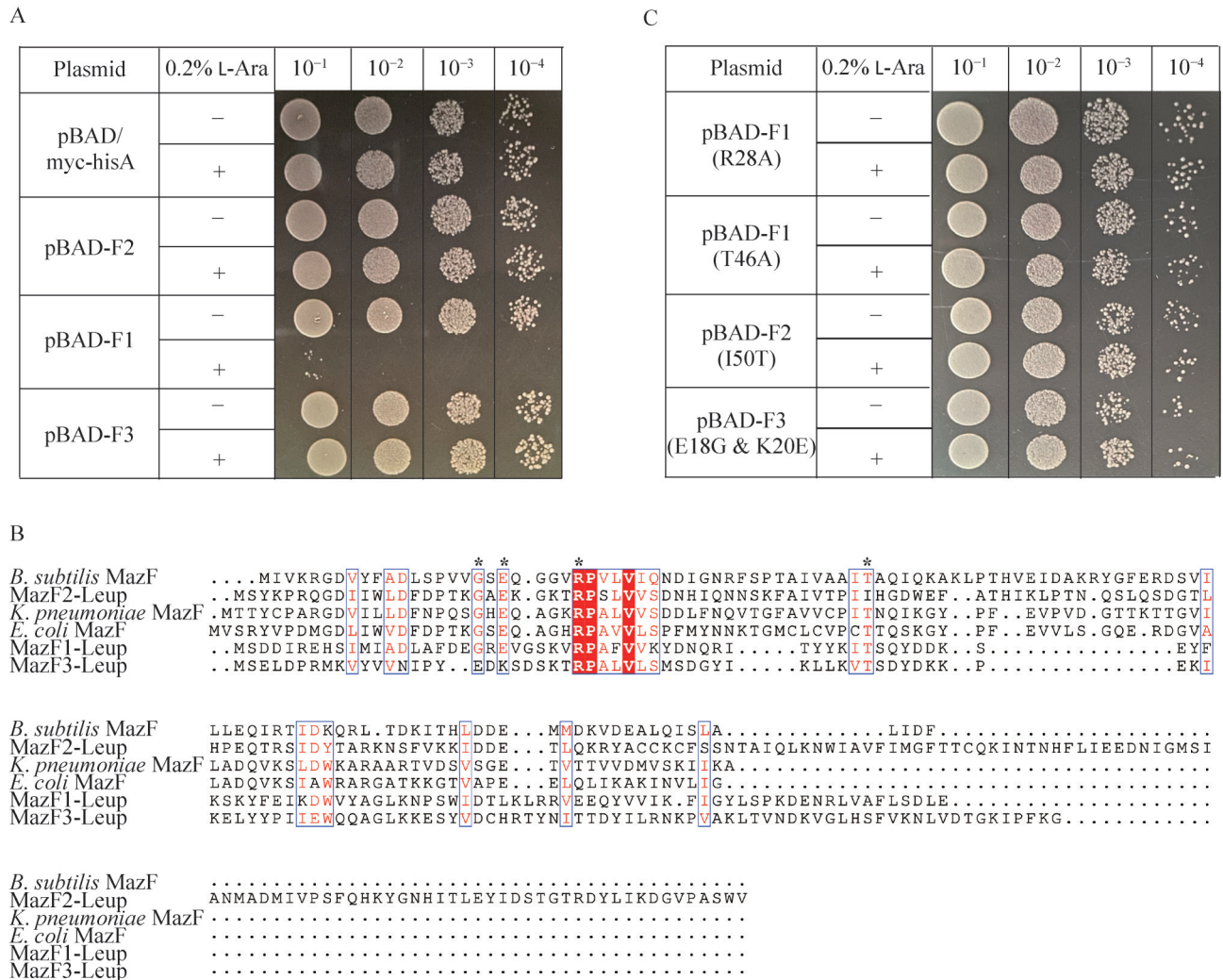
## 2.3 抗毒素 MazE1-Leup 可以中和 MazF1-Leup 的毒性

将 MazE1-Leup 过表达载体 pACYC-His-E1 与 MazF1-Leup 过表达载体 pBAD-F1 共同导入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中。作为对照,

表3 假肠膜明串珠菌L64基因组编码的3对潜在的*mazEF*类TA系统

Table 3 Three putative *mazEF* family TA systems encoded by *Leuconostoc pseudomesenteroides* L64 genome

编号 Number	毒素 Toxin	抗毒素 Antitoxin	毒素-抗毒素结构域 Toxin-antitoxin domain
<i>mazEF1-Leup</i>	OYT93_01690	OYT93_01685	MazF-RelB/DinJ
<i>mazEF2-Leup</i>	OYT93_03030	OYT93_03025	MazF-PemK
<i>mazEF3-Leup</i>	OYT93_04285	OYT93_04280	MazF-MazE



**图1** 假肠膜明串珠菌L64染色体编码的MazF毒素的毒性鉴定。A: 包含不同毒素的重组菌株*Escherichia coli* TOP10的梯度稀释滴板实验。+/-分别表示添加/未添加0.2% L-阿拉伯糖。B: 同源MazF毒素多序列比对。星号标记的是活性位点。C: 包含不同突变毒素的重组菌株*E. coli* TOP10的梯度稀释滴板实验。

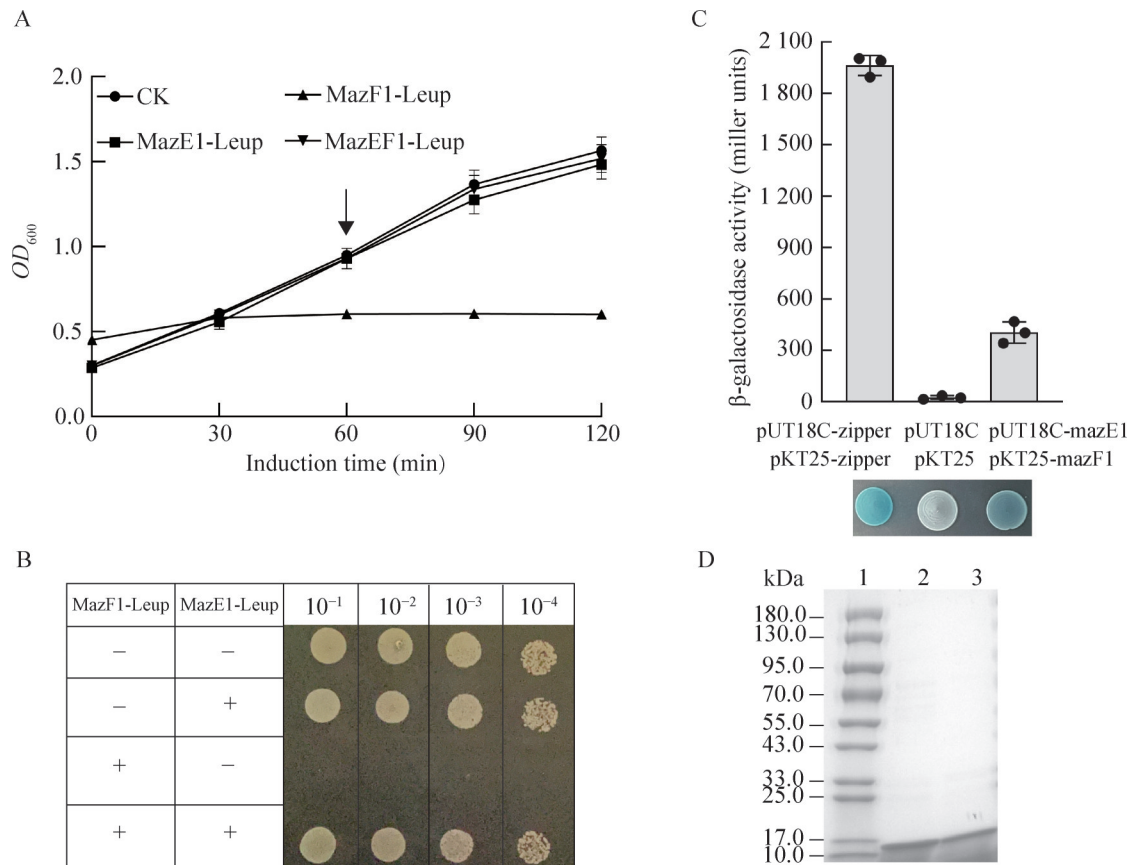
**Figure 1** Toxicity assessment of MazF toxins encoded by *Leuconstoc pseudomesenteroides* L64 chromosome. A: The 10-fold dilutions of *Escherichia coli* TOP10 harbouring pBAD/myc-hisA constructs, as indicated, spotted onto LA plates. +/- denotes the presence or absence of 0.2% L-arabinose. B: Multi-sequence alignments among MazF toxins. Amino acid residues marked with asterisks indicated the active sites. C: The 10-fold dilutions of *E. coli* TOP10 harbouring pBAD/myc-hisA constructs, as indicated, spotted onto LA plates.

将 pACYCDuet-1 及 pBAD/myc-hisA 也导入大肠杆菌 BL21(DE3)。在培养基中分别加入 IPTG、阿拉伯糖或 IPTG 和阿拉伯糖, 检测宿主生长曲线。加入 IPTG 诱导 MazE1-Leup 的表达后, 宿主细胞与空白对照一样正常生长(图 2A、2B);

加入阿拉伯糖诱导 MazF1-Leup 的表达后, 菌株的生长受到了明显抑制(图 2A、2B); 当同时加入 IPTG 和阿拉伯糖时, 宿主细胞又恢复正常生长(图 2A、2B), 表明 MazE1-Leup 能够有效中和 MazF1-Leup 的毒性。由于 II 型抗毒素通过与

毒素蛋白的直接相互作用来中和毒素毒性，为检测 MazE1-Leup 与 MazF1-Leup 之间的相互作用，基于细菌双杂交系统构建质粒 pUT18C-E1 和 pKT25-F1，并将它们共同导入大肠杆菌 BTH101 感受态细胞。与空白对照相比，IPTG 诱导后能够检测到明显的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性 (图 2C)，表明 MazE1-Leup 与 MazF1-Leup 之间存在直接相互作用。为进一步验证它们之间的相互作用，构建了 N 端融合 His 标签的 MazE1-

Leup 及不含任何标签的 MazF1-Leup 的表达质粒 pACYC-His-E1-F1。由于 His<sub>6</sub>-MazE1-Leup 与 MazF1-Leup 的分子量非常接近，在 SDS-PAGE 结果中只能观察到一条条带 (图 2D)。因此，利用 MALDI-TOF 质谱对泳道 3 的条带进行了检测，结果显示亲和层析纯化的 His-MazE1-Leup 同时分离到了 MazF1-Leup，进一步证明了 MazE1-Leup 与 MazF1-Leup 之间存在相互作用。



**图2 MazE1-Leup通过与MazF1-Leup直接相互作用中和MazF1-Leup毒性。** A: 重组菌株 *Escherichia coli* TOP10生长曲线; B: 重组菌株 *E. coli* TOP10梯度稀释滴板实验; C: MazE1-Leup与MazF1-Leup细菌双杂交实验; D: His<sub>6</sub>-MazE1-Leup及复合物His<sub>6</sub>-MazE1-F1的纯化。

**Figure 2** MazE1-Leup neutralized toxicity of MazF1-Leup through direct interaction. A: Growth curves of *Escherichia coli* TOP10 expressing MazE1-Leup, MazF1-Leup or MazEF1-Leup complex; B: The 10-fold dilutions of *E. coli* TOP10 harbouring pBAD/myc-hisA constructs, as indicated, spotted onto LA plates; C: Bacterial two hybrid experiment of MazE1-Leup and MazF1-Leup; D: Purification of His<sub>6</sub>-MazE1-Leup and His<sub>6</sub>-MazE1-F1 complex.



## 2.4 *mazE1-Leup* 与 *mazF1-Leup* 形成操纵子

II 型抗毒素与毒素基因形成操纵子结构, *mazE1-Leup* 与 *mazF1-Leup* 之间存在 4 个碱基的重叠(图 3A), 暗示它们可能发生共转录。因此, 通过 RT-PCR 验证 *mazEF1-Leup* 是否形成操纵子。分别设计特异性引物检测 *mazE1-Leup* 和 *mazF1-Leup* 的转录, 以 RNA 为模板进行 PCR 时未获得任何条带(图 3B), 表明 RNA 中无残留的基因组 DNA。以基因组 DNA 或 cDNA 为模板时均获得了预期的目的条带(图 3B), 表明 *mazE1-Leup* 和 *mazF1-Leup* 均能正常转录。使用跨越 *mazEF1-Leup* 的引物 E1qF/F1qR 进行扩增时, 以基因组 DNA 或 cDNA 为模板均获得了与预期大小相符的目的条带(图 3B)。对目的条带进行测序后, 发现序列与预期一致。以上结果表明 *mazE1-Leup* 与 *mazF1-Leup* 发生共转录, 形成操纵子结构。

## 2.5 *MazE1-Leup* 及 *MazEF1-Leup* 复合物均能抑制自身启动子的转录活性

利用在线工具 BPROM, 在 *mazEF1-Leup* 的上游非编码区识别到了一个潜在的启动子 Pef1 (图 4A), 将 Pef1 克隆至报告基因 *lacZ* 的上游, 构建了报告载体 pPef1-*lacZ* (图 4B)。β-半乳糖苷酶活性检测结果表明 Pef1 包含活性启动子, 而

当删除 Pef1 中的潜在-35 和-10 区(pPef1-3510D-*lacZ*)后(图 4B), Pef1 则丧失了转录活性(图 4C)。为了确定抗毒素 MazE1-Leup 是否能够抑制 Pef1 的转录, 构建了 pPef1-*lacZ*-Pcat-E1 载体(图 4B)。在表达 MazE1-Leup 后, 宿主的 β-半乳糖苷酶活性显著降低, 表明 MazE1-Leup 能够抑制 Pef1 的转录活性(图 4C)。此外, 还构建了 pPef1-*lacZ*-Pcat-EF1 载体(图 4B), 并发现当同时表达 MazE1-Leup 和 MazF1-Leup 时, β-半乳糖苷酶活性进一步降低, 表明 MazF1-Leup 能增强 MazE1-Leup 对 Pef1 转录的抑制效果(图 4C)。在体外实验中, EMSA 的结果也表明 MazE1-Leup 与 Pef1 之间存在特异性的相互作用(图 4D-4F)。

已知的 II 型抗毒素通过与启动子中的反向重复序列(inverted repeat, IR)结合来抑制启动子的转录, 在 Pef1 中识别到一个 IR (TAACAaaatgTGTTA), 位于-35 区和-10 区之间, 并且部分与-10 区重叠(图 4A), 推测该 IR 可能是 MazE1-Leup 与 Pef1 的结合位点。为验证这一猜想, 将该 IR 中的 TAACA 突变成 GCCAT (图 5A), 并构建了相关报告质粒 pPef1-IRM-*lacZ* 及 pPef1-IRM-*lacZ*-Pcat-E1, 结果表明当 Pef1 中的 IR 发生突变后, MazE1-Leup 则无法再抑制 Pef1 的转录(图 5B)。同时, EMSA 的结果也表明 MazE1-Leup 不能与突变后的 Pef1

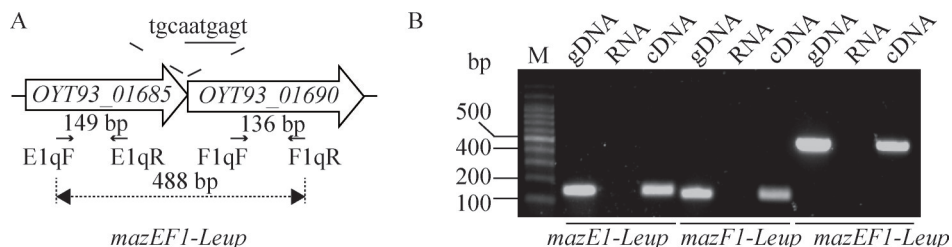
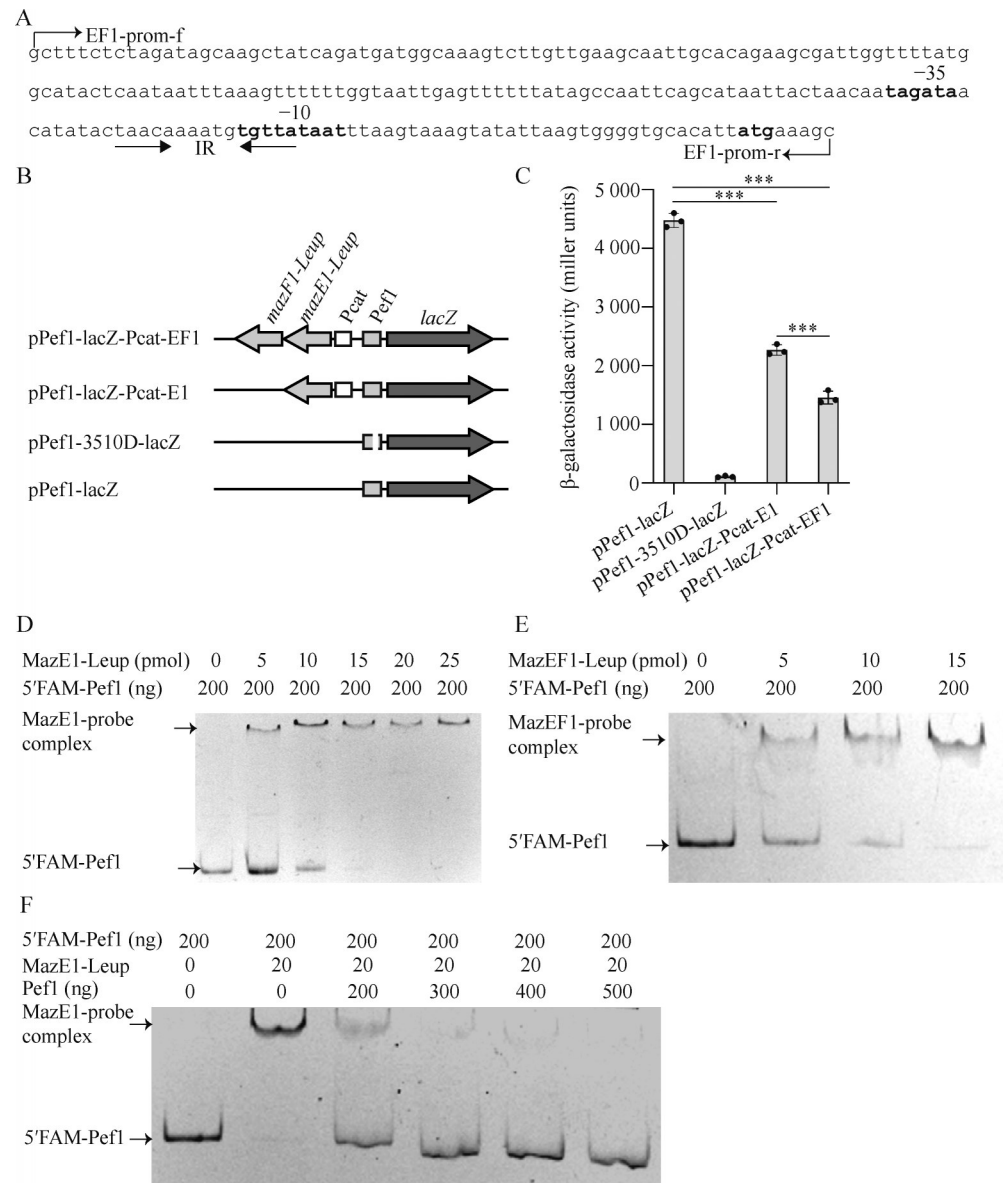


图3 *mazE1-Leup* 与 *mazF1-Leup* 形成操纵子。A: *mazEF1-Leup* 基因结构示意图; B: RT-PCR 检测 *mazEF1-Leup* 的遗传结构(gDNA表示基因组DNA)。

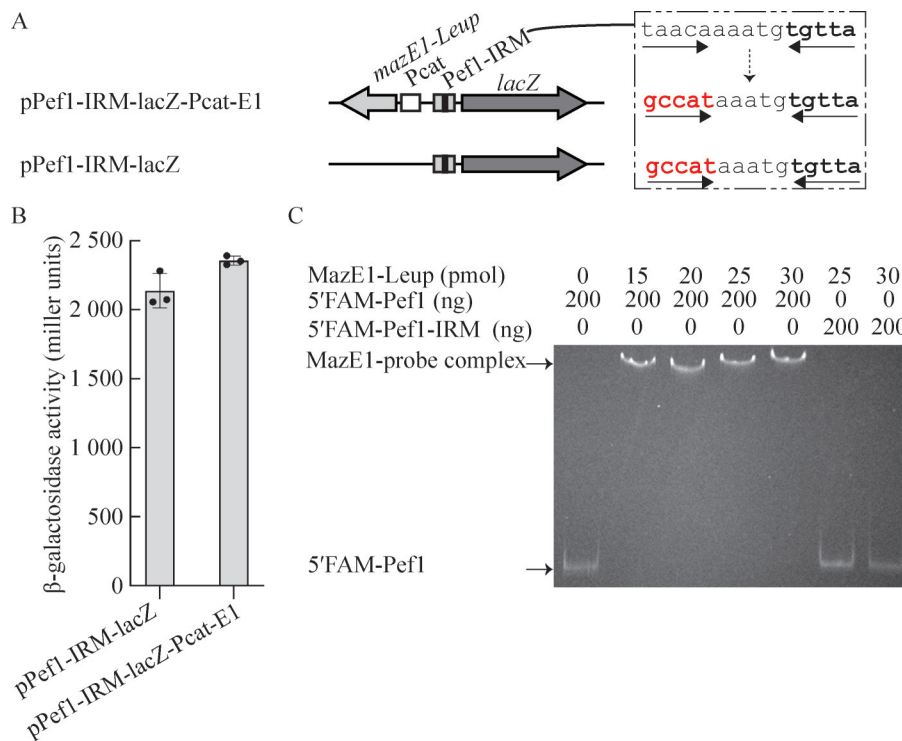
Figure 3 *mazE1-Leup* and *mazF1-Leup* consist of an operon. A: Schematic representation of *mazEF1-Leup* genetic structure. B: Genetic organization of *mazEF1-Leup* confirmed by RT-PCR (gDNA denotes genomic DNA). M: DNA marker.





**图4 MazE1-Leup通过与启动子结合抑制mazEF1-Leup系统的转录。** A: 在mazEF1-Leup上游识别到的潜在启动子; B: 报告质粒示意图; C: 基于lacZ的报告系统结果表明MazE1-Leup或MazEF1-Leup均能抑制mazEF1-Leup启动子的转录; D、E: EMSA检测MazE1-Leup (D)或MazEF1-Leup (E)与启动子Pef1之间的相互作用; F: 通过在EMSA反应体系中添加特异性竞争探针检测MazE1-Leup与Pef1之间是否存在特异性相互作用。

Figure 4 MazE1-Leup inhibited transcription of *mazEF1-Leup* by binding to promoter. A: A putative promoter was identified upstream of *mazEF1-Leup*; B: Schematic diagram of reporter plasmids; C: Transcription of *mazEF1-Leup* inhibited by MazE1-Leup or MazEF1-Leup was confirmed by *lacZ* based reporter system; D, E: Interaction between Pef1 and MazE1-Leup (D) or MazEF1-Leup (E) was revealed with EMSA; F: Specific interaction between Pef1 and MazE1-Leup was further confirmed by adding specific competitor within EMSA reaction system.



**图5** MazE1-Leup与*mazEF1-Leup*启动子中的IR序列(TAACAAaatgTGTTA)结合。A: Pef1中IR突变后的相关质粒示意图(用于检测IR突变后, MazE1-Leup是否还能抑制Pef1转录); B: MazE1-Leup不能抑制IR突变后的Pef1转录; C: MazE1-Leup不能与IR突变后的Pef1相互作用。

Figure 5 MazE1-Leup binds to the IR (TAACAaaatgTGTTA) of *mazEF1-Leup* promoter. A: Schematic diagram of plasmids constructed for detection of effect of IR mutation on the transcription of Pef1; B: MazE1-Leup can't inhibit transcription of Pef1 with IR mutation; C: MazE1-Leup can't bind to the Pef1 with IR mutation.

结合(图 5C), 进一步证实了 MazE1-Leup 是通过与 IR (TAACAaaatgTGTTA)序列结合来抑制 Pef1 的转录活性。

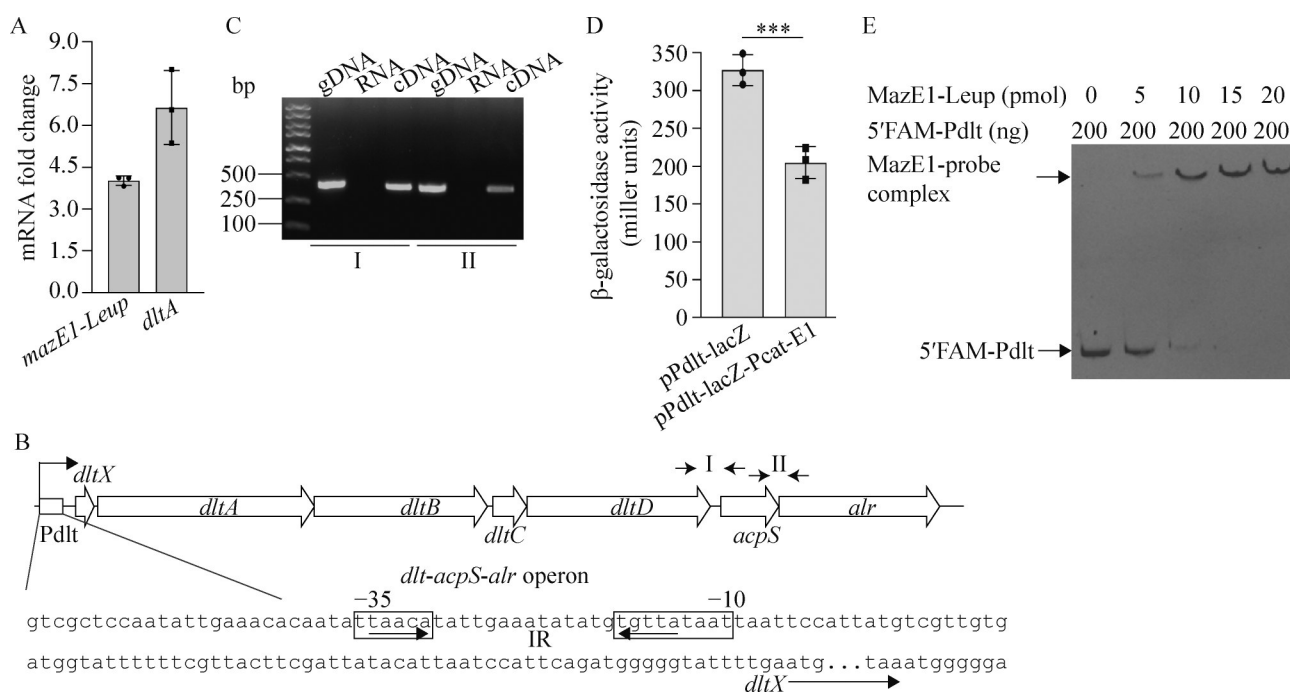
## 2.6 酸压力诱导 *mazEF1-Leup* 的转录

假肠膜明串珠菌 L64 发酵合成乳酸时, 随着乳酸的不断积累, 培养基中的 pH 值会发生显著变化。在发酵 48 h 后, 与对照组(即在培养基中加入 55 g/L 的  $\text{CaCO}_3$  以调节并保持 pH 稳定)相比, 实验组的 pH 从 6.2 降低至 4.5。为了探究培养基中 pH 值的变化是否能诱导 *mazEF1-Leup* 的转录, 利用 RT-qPCR 检测了发酵过程中 *mazEF1-Leup* 的 mRNA 水平变化。结果显示, 与对照组相比, *mazE1-Leup* 的 mRNA 水平升高

了约 4 倍(图 6A)。以上结果表明酸压力条件能诱导 *mazEF1-Leup* 的转录。

## 2.7 MazE1-Leup 抑制 *dlt-acpS-alr* 操纵子的转录

利用 MEME 中在线工具 FIMO<sup>[33]</sup>, 在假肠膜明串珠菌 L64 全基因组范围内查找包含与 IR (TAACAaaatgTGTTA)相同或相似的重复序列的启动子, 在 OYT93\_01215 的上游非编码区识别到了一个相似的 IR (TAACAtattgaaatgatgTGTTA) (图 6B)。BLASTp 比对结果显示, OYT93\_01215 编码 DltX, 其下游相邻基因分别编码 DltA、DltB、DltC、DltD、AcpS 及 Alr。其中, *dltX*、*dltA*、*dltB*、*dltC* 及 *dltD* 形成 *dlt* 操纵子,



**图6 MazE1-Leup抑制dlt-acpS-alr操纵子的转录。** A: 酸压力诱导*mazE1-Leup*及*dltA*的转录; B: *dlt*操纵子、*acpS*及*alr*基因示意图(方框标记的是*dlt*操纵子启动子的-35和-10区; IR表示*dlt*操纵子启动子发现的相似反向重复序列); C: *dlt*基因与*acpS*及*alr*形成操纵子(M: DNA marker); D: MazE1-Leup抑制*dlt*操纵子启动子的转录; E: MazE1-Leup与*dlt-acpS-alr*操纵子的启动子结合。

**Figure 6** MazE1-Leup inhibited the transcription of *dlt-acpS-alr* operon. A: Transcription of *mazE1-Leup* and *dltA* was induced under acid stress condition; B: Schematic representation of *dlt* operon, *acpS* and *alr* gene locus (Putative promoter of *dlt* operon was indicated by -35 and -10 box; Inverted arrows pair denotes the similar IR); C: *dlt* gene cluster, along with *acpS* and *alr* forms an operon as determined by RT-PCR (M: DNA marker); D: Transcription activity of Pdlt was inhibited by MazE1-Leup; E: MazE1-Leup binds to the promoter of the *dlt-acpS-alr* operon.

而 *acpS* 与 *alr* 基因存在 4 个核苷酸重叠, 暗示它们可能发生共转录, 而 *dltD* 与 *acpS* 基因之间只有 71 个核苷酸的间隔, 推测 *dlt* 与 *acpS-alr* 形成一个更大的操纵子, RT-PCR 结果证实了这一猜想 (图 6C)。RT-qPCR 结果显示, 与 *mazE1-Leup* 一样, 酸压力也显著诱导了 *dltA* 的转录, 其 mRNA 水平升高了大约 5 倍 (图 6A)。为了探究 MazE1-Leup 是否直接抑制 *dlt-acpS-alr* 操纵子的转录, 构建了报告质粒 pPdlt-lacZ 及 pPdlt-lacZ-E1。β-半乳糖苷酶活性检测结果表明, 同时表达 MazE1-Leup 后,

*dlt-acpS-alr* 启动子的转录活性显著降低 (图 6D), 表明 MazE1-Leup 直接抑制 *dlt-acpS-alr* 的转录。EMSA 结果进一步证实了 MazE1-Leup 能与 *dlt-acpS-alr* 的启动子结合 (图 6E)。

### 3 讨论与结论

本研究在假肠膜明串珠菌 L64 基因组中识别到了 3 对潜在的 *mazEF* 类 TA 系统, 分别是 OYT\_01690-01685、OYT\_03030-03025 及 OYT\_04285-04280。根据以下实验结果确定 *mazE1-Leup* (OYT\_01690-01685) 编码一个真正的 II 型

TA 系统。(1) 在 3 个潜在的毒素蛋白中, 仅 MazF1-Leup (OYT\_01690) 能够抑制大肠杆菌的正常生长, 而其保守活性位点的突变则导致其毒性丧失, *mazE1-Leup* (OYT\_01685) 编码的抗毒素蛋白, 通过与 MazF1-Leup 直接相互作用, 达到中和其毒性的目的; (2) *mazE1-Leup* 与 *mazF1-Leup* 发生共转录, 形成操纵子结构; (3) MazE1-Leup 及 MazEF1-Leup 复合物能够抑制自身启动子的转录; (4) MazE1-Leup 通过与启动子中的 IR 序列 (TAACAaaatgTGTTA) 结合抑制自身转录。

II 型 TA 系统作为全局调控元件正日益受到关注, 其主要原因之一在于 II 型毒素蛋白利用 RNA 酶活性在全局范围内选择性切割 mRNA, 从而调控全局性蛋白翻译。除毒素外, 越来越多的实验证据表明, 同时包含与毒素结合和 DNA 结合的模块化结构的抗毒素, 可能作为通用型转录调控因子参与细菌其他重要生理生化过程的调控。在本研究中, 在 *dlt* 操纵子的启动子中发现了与 IR (TAACAaaatgTGTTA) 相似的回文序列 TAACAatattgaaatattgTGTTA。同时, RF-qPCR 结果显示, 随着生长过程中乳酸等有机酸的积累导致环境 pH 下降, 会诱导 *mazEF1-Leup* 和 *dlt* 操纵子转录水平上升。因此, 推测 MazE1-Leup 可能通过调控 *dlt* 操纵子的转录增强宿主的耐酸性。研究发现, *dlt* 操纵子广泛分布于革兰氏阳性细菌, 参与细胞壁中脂磷壁酸 (lipo-teichoic acid, LTA) 的 D-丙氨酰化修饰, 与乳酸菌的酸耐受性相关<sup>[31,34]</sup>。细菌并不能直接合成 D-丙氨酸, 它需要由丙氨酸消旋酶 (alanine racemase, Alr) 催化 L-丙氨酸转化而来。本研究发现假肠膜明串珠菌 L64 的 *dlt* 操纵子与下游的 *acpS* 和 *alr* 基因共转录, 形成操纵子结构, 这种遗传结构在其他细菌中较为罕见。通过构建 *dlt-acpS-alr* 操纵子启动子活性检测的报告载体,

发现同时表达 MazE1-Leup 时, *dlt-acpS-alr* 操纵子的启动子转录活性显著降低, 即 MazE1-Leup 能够直接抑制 *dlt-acpS-alr* 操纵子的转录。同时, 体外的 EMSA 反应结果也显示 MazE1-Leup 与 *dlt-acpS-alr* 操纵子的启动子之间存在直接相互作用。基于上述实验结果, 推测 MazE1-Leup 参与假肠膜明串珠菌 L64 应答酸压力的分子机制如下(图 7): 当假肠膜明串珠菌 L64 处于正常生长条件时, 过量的抗毒素 MazE1-Leup 通过与 *dlt-acpS-alr* 操纵子的启动子中的回文序列 (TAACAatattgaaatattgTGTTA) 结合, 部分抑制其转录水平, 导致 Alr 蛋白水平较低, 细胞内 D-丙氨酸含量相对较低。同时, 参与 LTA 的 D-丙氨酰化修饰的 DltX、DltA、DltB、DltC、DltD 含量也较少, 使得细胞壁中 LTA 的 D-丙氨酰化修饰维持较低水平。随着生长进程中乳酸等有机酸的大量积累, 导致环境 pH 下降, ClpPX 或 Lon 蛋白酶被激活, 进而导致不稳定的 MazE1-Leup 被降解, 解除了对自身转录及 *dlt-acpS-alr* 转录的抑制, 使 D-丙氨酰化修饰相关蛋白的含量升高, 从而增强了细胞壁中 LTA 的 D-丙氨酰化修饰程度, 最终提高了假肠膜明串珠菌 L64 对酸的耐受性。

在 *dlt-acpS-alr* 操纵子的内部还识别到了一个与 IR (TAACAaaatgTGTTA) 相似的回文序列 TAACAacgatTGTTA (表 4), 正好位于 *alr* 基因的上游, 即 *acpS* 基因的编码区内部, 并且在该段 DNA 中预测到了一个潜在启动子。然而, 在当前实验条件下, 未能检测到该启动子的转录活性, 因此, 是否存在第 2 个启动子单独控制 *alr* 基因的转录还需进一步验证。除 *dlt-acpS-alr* 操纵子外, 在假肠膜明串珠菌 L64 基因组中还识别到了几个包含相似回文序列的基因(表 4)。其中, OYT93\_08975 编码一个融合蛋白, 同时包含 LysM 结构域、FRQ1 结构域及 CAP 结构



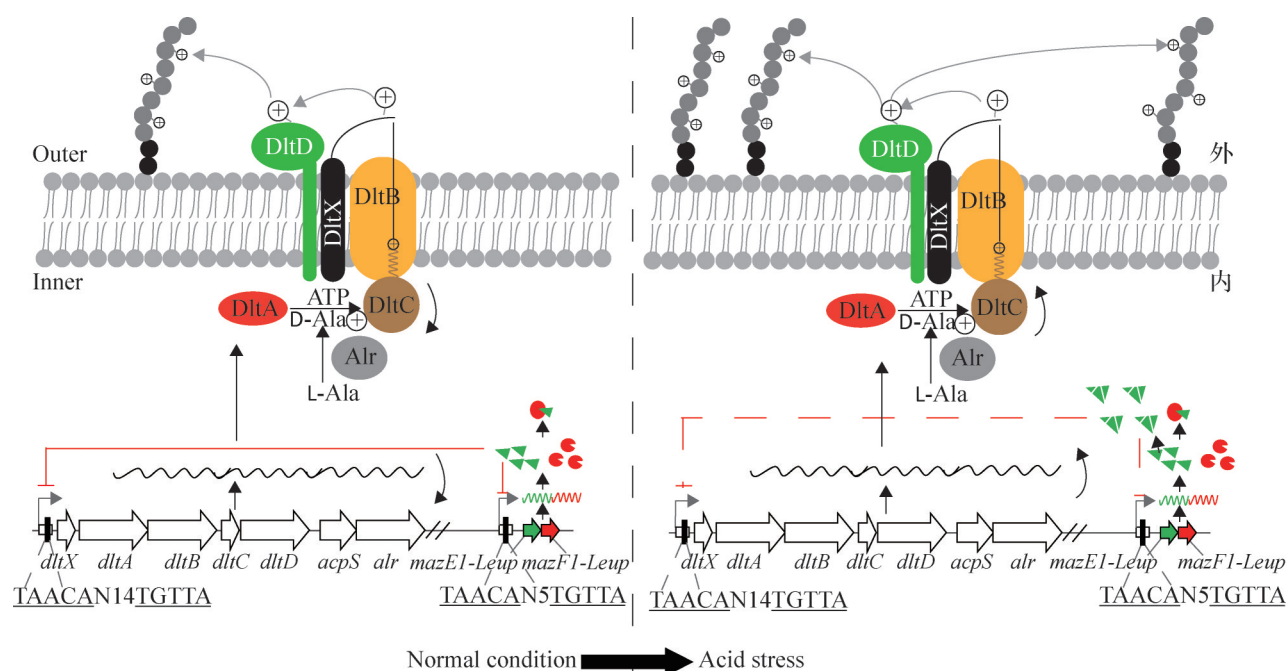


图7 抗毒素MazE1-Leup协助假肠膜明串珠菌L64应对酸压力的调控机制

Figure 7 Proposed regulatory mechanism of MazE1-Leup in assisting *L. pseudomesenteroides* L64 to cope with acid stress.

表4 包含与回文序列(TAACAAAatgTGTTA)相似回文序列的基因

Table 4 Genes containing palindromic sequences similar to palindromic sequence (TAACAAAatgTGTTA)

基因编号 Gene number	编码的蛋白功能 Protein function	回文序列 Palindromic sequence
OYT93_01685	Antitoxin MazE1-Leup	<u>TAACAAAatgTGTTA</u>
OYT93_01215	DltX	<u>TAACAatattgaaatatatgTGTTA</u>
OYT93_01245	Alanine racemase Alr	<u>TAACAacgatTGTTA</u>
OYT93_00860	NADH-dependent flavin oxidoreductase	<u>TAACAatatcgTGTTA</u>
OYT93_06375	phage tail tube assembly chaperone	<u>TAACAatcctaaTGTTA</u>
OYT93_07930	Hypothetical protein	<u>TAACAacTGTTA</u>
OYT93_08975	LysM and FRQ1 domains containing protein	<u>TAACAatTGTTA</u>

域。LysM 结构域广泛分布于细菌和真菌中，在细菌中，负责与细胞壁中的肽聚糖结合，参与肽聚糖的水解，其表达受到严格的时间和空间调控<sup>[35]</sup>；在真核生物中，FRQ1 结构域蛋白是一种  $\text{Ca}^{2+}$  信号传感器<sup>[36]</sup>；CAP 结构域的功能尚不清楚。MazE1-Leup 是否通过调控 OYT93\_08975 参与假肠膜明串珠菌 L64 与  $\text{Ca}^{2+}$  信号相关的生理生化代谢通路的调控还有待进

一步研究。

## 作者贡献声明

李鹏：研究构思和设计、开展实验、处理数据、撰写和修改论文；刘兰：开展实验、处理数据、修改论文；章帅文：开展实验；王通：协助实验操作；黄筱萍：设计实验、修改论文。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在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。

## 参考文献

- [1] OGURA T, HIRAGA S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983, 80(15): 4784-4788.
- [2] GERDES K, RASMUSSEN PB, MOLIN S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(10): 3116-3120.
- [3] JURĖNAS D, FRAIKIN N, GOORMAGHTIGH F, van MELDEREN L. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(6): 335-350.
- [4] LEPLAE R, GEERAERTS D, HALLEZ R, GUGLIELMINI J, DRĚZE P, van MELDEREN 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.
- [5] MAKAROVA KS, WOLF YI, KOONIN EV. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes[J]. Biology Direct, 2009, 4: 19.
- [6] GUAN JH, CHEN YK, GOH YX, WANG M, TAI C, DENG ZX, SONG JN, OU HY. TADB 3.0: an updated database of bacterial toxin-antitoxin loci and associated mobile genetic elements[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(D1): D784-D790.
- [7] 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.
- [8] DAO-THI MH, van MELDEREN L, de GENST E, AFIF H, BUTS L, WYNS L, LORIS R. Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB[J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 348(5): 1091-1102.
- [9] HARMS A, STANGER FV, SCHEU PD, de JONG IG, GOEPFERT A, GLATTER T, GERDES K, SCHIRMER T, DEHIO C. Adenylation of gyrase and topo IV by FicT toxins disrupts bacterial DNA topology[J]. Cell Reports, 2015, 12(9): 1497-1507.
- [10] JURĖNAS D, van MELDEREN L. The variety in the common theme of translation inhibition by type II toxin-antitoxin systems[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 262.
- [11] WINTHER K, TREE JJ, TOLLERVEY D, GERDES K. VapCs of *Mycobacterium tuberculosis* cleave RNAs essential for translation[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(20): 9860-9871.
- [12] PEDERSEN K, ZAVIALOV AV, PAVLOV MY, ELF J, GERDES K, EHRENBERG M. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site[J]. Cell, 2003, 112(1): 131-140.
- [13] JURĖNAS D, CHATTERJEE S, KONIJNENBERG A, SOBOTT F, DROOGMANS L, GARCIA-PINO A, van MELDEREN L. AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA<sup>fMet</sup>[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(6): 640-646.
- [14] KASPY I, ROTEM E, WEISS N, RONIN I, BALABAN NQ, GLASER G. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase[J]. Nature Communications, 2013, 4: 3001.
- [15] FREIRE DM, GUTIERREZ C, GARZA-GARCIA A, GRABOWSKA AD, SALA AJ, ARIYACHAOKUN K, PANIKOVA T, BECKHAM KSH, COLOM A, POGENBERG V, CIANCI M, TUUKKANEN A, BOUDEHEN YM, PEIXOTO A, BOTELLA L, SVERGUN DI, SCHNAPPINGER D, SCHNEIDER TR, GENEVAUX P, de CARVALHO LPS, et al. An NAD<sup>+</sup> phosphorylase toxin triggers *Mycobacterium tuberculosis* cell death[J]. Molecular Cell, 2019, 73(6): 1282-1291.e8.
- [16] FRAIKIN N, GOORMAGHTIGH F, van MELDEREN L. Type II toxin-antitoxin systems: evolution and revolutions[J]. Journal of Bacteriology, 2020, 202(7): e00763-19.
- [17] LI GW, BURKHARDT D, GROSS C, WEISSMAN JS. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources[J]. Cell, 2014, 157(3): 624-635.
- [18] SOO VWC, WOOD TK. Antitoxin MqsA represses curlI formation through the master biofilm regulator CsgD[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 3186.
- [19] WANG XX, KIM Y, HONG SH, MA Q, BROWN BL, PU MM, TARONE AM, BENEDIK MJ, PETI W, PAGE R, WOOD TK. Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response[J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(6): 359-366.
- [20] SONG YJ, ZHANG SP, LUO GH, SHEN YL, LI CC, ZHU YB, HUANG Q, MOU XY, TANG XY, LIU TG, WU SY, TONG AP, HE YX, BAO R. Type II antitoxin HigA is a key virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. ACS Infectious Diseases, 2021, 7(10): 2930-2940.
- [21] GUO YX, SUN CL, LI YM, TANG KH, NI SW, WANG XX. Antitoxin HigA inhibits virulence gene mvfR expression in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(8): 2707-2723.
- [22] LIN CY, AWANO N, MASUDA H, PARK JH, INOUE M. Transcriptional repressor HipB regulates the multiple promoters in *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2013, 23(6): 440-447.
- [23] HU Y, BENEDIK MJ, WOOD TK. Antitoxin DinJ influences the general stress response through transcript stabilizer CspE[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(3): 669-679.
- [24] BONINI AA, MAGGI S, MORI G, CARNUCCIO D, DELFINO D, CAVAZZINI D, FERRARI A, LEVANTE A, YAMAGUCHI Y, RIVETTI C, FOLLI C. Functional characterization and transcriptional repression by

- Lactocaseibacillus paracasei* DinJ-YafQ[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(21): 7113-7128.
- [25] FERRARI A, MAGGI S, MONTANINI B, LEVANTE A, LAZZI C, YAMAGUCHI Y, RIVETTI C, FOLLI C. Identification and first characterization of DinJ-YafQ toxin-antitoxin systems in *Lactobacillus* species of biotechnological interest[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 7645.
- [26] EVEN S, LINDLEY ND, LOUBIÈRE P, COCAIGN-BOUSQUET M. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(4): 1143-1152.
- [27] KOPONEN J, LAAKSO K, KOSKENNIEMI K, KANKAINEN M, SAVIJOKI K, NYMAN TA, de Vos WM, TYNKKYNEN S, KALKKINEN N, VARMANEN P. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(4): 1357-1374.
- [28] SU MS, SCHLICHT S, GÄNZLE MG. Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(Suppl 1): S8.
- [29] WU CD, ZHANG J, WANG M, DU GC, CHEN J. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(7): 1031-1039.
- [30] WEIDMANN S, MAITRE M, LAURENT J, COUCHENEY F, RIEU A, GUZZO J. Production of the small heat shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* in *Lactococcus lactis* improves its stress tolerance[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 247: 18-23.
- [31] WU H, ZHANG YL, LI L, LI YN, YUAN L, YUE E, QIAO JJ. Positive regulation of the DLT operon by TCSR7 enhances acid tolerance of *Lactococcus lactis* F44[J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(10): 7940-7950.
- [32] LI P, TAI C, DENG ZX, GAN JH, OGGIONI MR, OU HY. Identification and characterization of chromosomal relBE toxin-antitoxin locus in *Streptomyces cattleya* DSM 46488[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32047.
- [33] Grant CE, Bailey TL, Noble WS. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 2011, 27(7): 1017-1018.
- [34] BOYD DA, CVITKOVITCH DG, BLEIWEIS AS, KIRIUKHIN MY, DEBABOV DV, NEUHAUS FC, HAMILTON IR. Defects in d-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(21): 6055-6065.
- [35] SALAMAGA B, TURNER RD, ELSARMANE F, GALLEY NF, KULAKAUSKAS S, MESNAGE S. A moonlighting role for LysM peptidoglycan binding domains underpins *Enterococcus faecalis* daughter cell separation[J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 428.
- [36] AMES JB, HENDRICKS KB, STRAHL T, HUTTNER IG, HAMASAKI N, THORNER J. Structure and calcium-binding properties of Frq1, a novel calcium sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(40): 12149-12161.