



耐辐射奇球菌铁结合蛋白 DRA0258 的抗氧化功能

杨粟, 刘梦葭, 王梁燕, 华跃进*

农业部核农学重点实验室, 浙江大学原子核农业科学研究所, 浙江 杭州 310029

摘要:【目的】通过对极端环境耐受的耐辐射奇球菌 *Deinococcus radiodurans* R1 全基因组进行序列比对分析, 获得具有铁储备蛋白 Ferritin 类似功能基序的未知功能蛋白 DRA0258, 采用分子生物学技术对该蛋白的功能和性质进行了验证和分析。【方法】首先对 DRA0258 进行克隆表达和纯化, 并经络合物显色法测定蛋白上铁结合含量; 通过三段连接敲除法构建 *dra0258* 突变株, 检测突变株在双氧水胁迫下的生存率、总抗氧化活性及过氧化氢酶活性; 利用实时定量 PCR 检测突变株内抗氧化酶类及铁转运相关性调控蛋白的基因转录水平。【结果】经体内外蛋白铁含量检测证实 DRA0258 具有一定的铁结合能力; 双氧水生存率实验表明 *dra0258* 的缺失导致细胞的抗氧化能力显著下降; 过氧化氢酶活性、总抗氧化活性检测及抗氧化酶类的基因转录水平检测证实 *dra0258* 基因的缺失导致细胞内一些抗氧化基因转录水平下调, 细胞的抗氧化应激系统受到损伤, 并影响了一些铁调控网络蛋白的基因转录水平。【结论】本研究证实 DRA0258 是一种铁结合蛋白, 该编码基因的缺失影响胞内铁转运系统并使细胞抗氧化能力下调。

关键词: 耐辐射奇球菌, 铁储备蛋白, 转录水平, 过氧化氢酶活性, 总抗氧化活性

耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*, DR) 是迄今发现的辐射抗性最强的物种之一, 对电离辐射、紫外线、以及双氧水等强氧化剂具有极端的耐受性^[1-3]。研究表明, 耐辐射奇球菌高效的 DNA 修复系统和抗氧化能力是细胞极端抗性的主要原因^[4], 然而其具体的分子机制还有待深入研究。

研究证实细胞内锰铁含量及其比例是耐辐射奇球菌极端抗性的一个重要因素^[5-6]。耐辐射奇球菌编码表达了多种锰铁离子调控蛋白, 通道蛋白

及一系列储备蛋白, 他们参与并组成了复杂的离子代谢网络, 用以维持细胞内铁锰离子的平衡^[4,6]。铁作为一种特殊的金属离子, 由于其价态的多样性, 因而对胞内氧化还原的平衡起着至关重要的作用。研究表明, 耐辐射奇球菌铁结合蛋白 DPS1(DR2263)和 DPS2(DRB0092)对细胞的极端抗性有着至关重要的作用, 该类基因的缺失导致细胞的氧化抗性急剧下降^[7-8]; 铁转运调控蛋白 Mur(DR0865)及 DtxR(DR2539)的突变导致胞内铁

基金项目: 国家“973 计划”(2015CB910600); 国家自然科学基金(31370102, 31570058)

*通信作者。Tel/Fax: +86-571-86971703; E-mail: yjhua@zju.edu.cn

收稿日期: 2016-08-31; 修回日期: 2016-09-25; 网络出版日期: 2016-10-09

锰离子转运代谢受到影响^[9-10],并直接影响了细胞的氧化抗性和辐射抗性;另外通过对 DR1709, DR1102、DR1236 等膜内外铁转运通道蛋白的研究证实该类蛋白对细胞内的铁循环及细胞抗性有着重要作用^[11],以上研究表明胞内铁离子循环参与构成了耐辐射奇球菌的极端抗性机制。

本研究中,我们通过搜索和比较耐辐射奇球菌中未知功能蛋白的结构域,发现基因 *dra0258* 编码的蛋白具有较为保守的铁结合功能基序,推测该蛋白有可能参与了胞内铁离子平衡的代谢途径。经诱导、表达并纯化 DRA0258,测定该蛋白的铁结合活性;构建 *dra0258* 突变株,并比较了突变株和野生型在双氧水处理后的存活率,胞内抗氧化酶类及铁离子转运相关性蛋白编码基因的转录表达水平,并对 DRA0258 在耐辐射奇球菌中的作用机制进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒及生长条件:本文中所需用到的菌株、质粒见表 1。耐辐射奇球菌(*Deinococcus*

radiodurans R1,美国菌株保藏中心 ATCC13939)培养于 TGY 培养基(0.5%蛋白胨,0.3%酵母提取物,0.1%葡萄糖,固体培养基添加 1.5%琼脂粉)中,培养温度为 30 °C,突变株通过抗生素进行筛选,卡那霉素(Kanamycin)用量为 40 µg/mL。大肠杆菌(*Escherichia coli*)均培养于 LB 培养基(1%蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%氯化钠,固体培养基再添加 1.5%琼脂粉)中,一般培养温度为 37 °C,用于菌株筛选的卡那霉素(Kanamycin)浓度为 50 µg/mL,氨苄青霉素(Ampicilin)浓度为 100 µg/mL。

1.1.2 主要试剂:本实验中所需用到的各种限制性内切酶、LA *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。DNA Ladder、质粒提取试剂盒、PCR 纯化和胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司。引物合成及 DNA 测序工作由擎科新业生物公司完成。双氧水购自 Sigma,其他生化试剂如硫酸亚铁铵、柠檬酸钠等试剂均购自上海生物工程有限公司。

1.2 DRA0258 的生物信息学分析

本研究中涉及到的基因及蛋白质序列均来自于美国国家生物技术信息中心 NCBI (<http://www>.

表 1. 实验所需用到的菌种与质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this work

Strains and Plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5α	Host for cloning vectors	TaKaRa
BL21(DE3)	Host for expressing proteins	TaKaRa
DRA0258 BL21	BL21 containing expression plasmid pET28a- <i>dra0258</i>	This work
<i>D. radiodurans</i>		
R1	Wild type strains (ATCC 13939)	Store in this lab
Δ <i>dra0258</i>	<i>D. radiodurans dra0258</i> gene knockout mutant	This work
Plasmids		
pRADK	Resource of Km resistance cassette	Store in this lab
pET28a- <i>dra0258</i>	Plasmid for DRA0258 purification	This work

ncbi.nlm.nih.gov)及日本基因网站 KEGG (<http://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>)。

根据已知大肠杆菌(*E. coli*)的铁结合蛋白 Ferritin 和耐辐射奇球菌中未知功能蛋白 DRA0258 的蛋白序列,采用 Clustal X 进行同源比对,比对结果采用 DNAMAN 进行编辑并分析蛋白序列同源性及保守氨基酸位点。

1.3 DRA0258 表达菌株的构建

蛋白采用大肠杆菌 BL21(DE3)的诱导表达系统。通过引物 PA0258F 5'-GGAATTCATATGGA GTGGTGTGGGCG-3'(划线部分为 *Nde* I 酶切位点)与 PA0258R 5'-TTAGGATCCTTAGCGCTTGG GCGCG-3'(划线部分为 *Bam*H I 酶切位点)扩增得到目的基因片段,经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切后与相同酶切处理后的 pET28a 表达载体连接,转化入大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 中,转化方法采用经典 CaCl₂ 转化法。转化菌株经含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板筛选,并挑取单克隆菌株进行测序鉴定。鉴定正确的菌株经质粒重提并转化入大肠杆菌 BL21(DE3)后,挑取单克隆进行后续蛋白诱导纯化。

1.4 DRA0258 蛋白的表达与纯化

将带有 pET28a-*dra0258* 重组载体的表达菌株培养于 5 mL LB 培养基中,至稳定生长期后扩大培养至 500 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀≈0.6 时,添加终浓度为 200 μ mol/L 的诱导剂 IPTG 进行诱导,诱导条件为 25 $^{\circ}$ C、150 r/min,诱导 16 h 后收集菌体,并用 1 \times PBS 缓冲液清洗菌体 2 次,最后用 40 mL 蛋白上样缓冲液(500 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5)重悬菌体。菌体经超高压细胞破碎仪破碎后,

15000 r/min 离心 50 min,收集上清液用于后续纯化。蛋白纯化采用 AKTA 纯化仪进行。蛋白经 Ni-NTA 纯化柱得到粗纯化体,经脱盐柱除盐后再经离子交换柱进行进一步纯化,纯化所得的蛋白样品经 SDS-PAGE 分析蛋白纯度,并用 milipore 超滤浓缩管进行蛋白浓缩。蛋白浓度采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定。

1.5 DRA0258 蛋白铁结合活性的检测

目的蛋白铁含量的检测采用络合物显色法测定^[12]。铁在 L-半胱氨酸作用下被还原为二价铁,并与菲咯啉络合生成铁络合物,通过检测该底物在 562 nm 处的吸收峰,根据公式计算出样品中铁含量。体内环境下蛋白铁结合能力检测具体步骤如下:测定目的蛋白浓度并添加 194 μ L 纯化得到的目的蛋白于 1.5 mL Eppendorf 离心管中,分别添加 4 μ L 100 mmol/L 的 L-半胱氨酸与 2 μ L 50 mmol/L 的菲咯啉,置于 85 $^{\circ}$ C 水浴锅内加热 20 min,室温冷却后,13000 r/min 离心 5 min,取上清液测定 A₅₆₄ 与 A₇₀₀,按公式(1)进行铁含量测定。并计算单位蛋白上铁结合量。

$$C_{\text{Fe}^{2+}}=(A_{564}-A_{700})/27.9 \text{ (浓度单位为 } \mu\text{mol/L)} \text{ 公式(1)}$$

体外环境下蛋白铁结合能力检测步骤如下:目的蛋白经添加终浓度为 100 mmol/L EDTA (pH 8.0) 溶液去铁,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,经脱盐柱清除 EDTA 及 Fe-EDTA,即得到脱铁 DRA0258 (apo-DRA0258)。取脱铁 DRA0258 (50 μ mol/L)与 Fe²⁺ (25 μ mol/L)、DTT (2 mmol/L)及柠檬酸钠 (2 mmol/L)在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,经脱盐柱除去未结合的铁及柠檬酸钠等成分,即得到 Fe-A0258,进一步采用上述方法进行蛋白上铁含量的测定。

1.6 突变株的构建

本实验采用三段连接反向插入法构建耐辐射

奇球菌 *dra0258* 基因突变株^[13], 突变程序如图 1 所示, 具体操作如下: 以 *D. radiodurans* R1 基因组为模板, 采用敲除引物 PF1 : 5'-CGGTGCAGAA CCTCTCCGAAGTC-3' 与 PR1 : 5'-TATAGGATCC CTTGAGATCATCGGTTCATGGTGG-3' (划线部分为 *Bam*H I) 扩增出 *dra0258* 基因的上游序列 (region 1); 以敲除引物 PF2 : 5'-TTGAAGCTTCT CGCGCCTTACCTCAAGGTG-3' (划线部分为 *Hind* III) 和 PR2 5'-GTCTACACCGTGGTCGAGC AGCAGT-3' 扩增出 *dra0258* 基因的下游序列 (region 2), 然后上下游片段分别经限制性内切酶 *Bam*H I 与 *Hind* III 酶切。用于同源替换的抗性片段来自 pRADK 质粒, 通过 *Bam*H I 与 *Hind* III 双酶切得到带有 *gro*EL 启动子的卡那霉素抗性片段, 将上下游片段与卡那霉素片段连接并转化入耐辐射奇球菌细胞中, 经上下游基因片段与目的基因上下游之间的同源性经重组得到基因突变株, 采用含有 40 μ g/mL 卡那霉素的 TGY 平板筛选得到突变菌株, 并采用引物 PF1、PR2 经 PCR 及 DNA

测序鉴定。筛选所得突变株命名为 Δ *dra0258*。

1.7 突变株 H₂O₂ 抗性测定

细胞过氧化氢处理方法参照文献[14]。具体步骤如下 挑取野生型及突变株的单克隆, 采用 TGY 培养基培养至对数生长期初期 ($OD_{600} \approx 0.8$), 细胞采用 10 mmol/L MgSO₄ 稀释 10 倍后, 添加终浓度为 50 mmol/L 的过氧化氢进行胁迫处理, 经不同时间段 (0, 5, 10, 20, 40 min) 处理, 最后添加 10 μ L 过量的过氧化氢酶 (30 mg/mL) 终止反应。处理后的样品倍比稀释并点样于 TGY 平板上或稀释至合适浓度后均匀涂布于 TGY 平板上。30 $^{\circ}$ C 条件下培养 3 d。查数并计算存活率 (以 0 mmol/L H₂O₂ 处理的样品为对照进行计算)。处理实验独立进行 3 次并取平均值。

1.8 突变株的 Fe²⁺ 敏感性检测

细胞 Fe²⁺ 敏感性检测通过抑菌圈试验来测定。突变株与野生型在 TGY 培养基中培养至对数生长期 ($OD_{600} \approx 0.8$), 收集细胞并用 1 \times PBS 缓冲液溶液重悬。吸取 150 μ L 菌液均匀的涂布于 TGY 固体

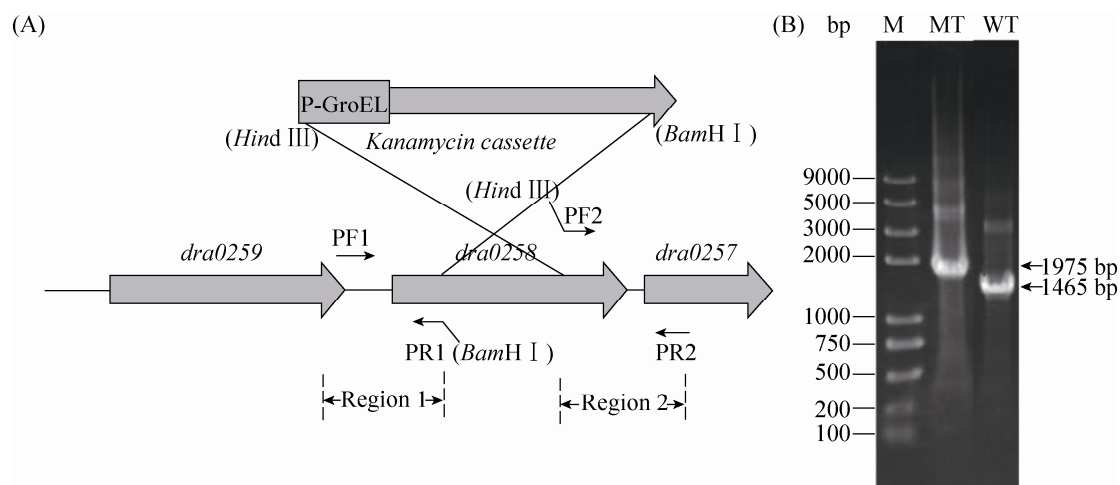


图 1. 突变株 Δ *dra0258* 的构建和鉴定

Figure 1. Construction and identification of the mutant Δ *dra0258*. A: the framework of the *dra0258* construction. B: identification of Δ *dra0258* mutant by PCR analysis with primers PF1 and PR2. M: DNA ladder. MT, WT: represented the Δ *dra0258* and wild-type respectively.

培养基上,于平板中心放置1个已灭菌的5 mm 滤纸片,滤纸片上滴加5 μL 或10 μL 浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 的 FeSO_4 进行处理。30 $^\circ\text{C}$ 恒温培养3 d后测量滤片周围抑菌圈大小。处理实验独立进行3次并取平均值。

1.9 过氧化氢酶活性检测与总抗氧化活性检测

过氧化氢酶活性采用过氧化氢酶检测试剂盒(碧云天)测定^[15]。过氧化氢在过氧化氢酶催化下可以氧化试剂盒中的生色底物,产生红色产物N-(4-antipyryl)-3-chloro-5-sulfonate-p-benzoquinone。通过检测该物质在520 nm处的吸收峰从而计算出细胞中过氧化氢酶在单位时间内的催化活性。具体步骤如下:待测菌株培养于100 mL的TGY液体培养基中,至对数生长期初期,将细胞分成2份,1份作为对照组,1份采用终浓度为40 mmol/L的 H_2O_2 处理30 min,收集菌体后,用1 \times PBS缓冲液清洗菌体3次,最后用2 mL 1 \times PBS缓冲液重悬菌体,经超声破碎细胞,12000 r/min离心20 min后收集上清,用于酶活检测。

总抗氧化活性采用总抗氧化检测试剂盒(Total Antioxidant Capacity Assay Kit,碧云天)检测^[16]。由于ABTS在氧化剂作用下被氧化而生成绿色ABTS $^+$,试剂盒采用Trolox作为抗氧化剂,通过检测ABTS $^+$ 在734 nm或405 nm下的吸收峰,测定细胞内相对于Trolox的抗氧化活性能力。细胞处理过程同上。

1.10 细胞总铁离子含量及其他金属离子的测定

挑取突变株与野生型的单克隆,于5 mL TGY培养基中培养至稳定生长期后,按1:100的比例接种至100 mL TGY培养基中扩大培养,至 $OD_{600}\approx 0.8$ 时,收集菌体,经含有1 mmol/L EDTA的磷酸盐缓冲液清洗3次后,再用无EDTA的磷酸盐缓冲液清洗3次,经冷冻干燥制成菌粉,称

重并采用电感耦合等离子体质谱分析法(ICP-MS)检测菌体内的各类金属离子含量。

1.11 耐辐射奇球菌总RNA的提取及实时荧光定量PCR

将耐辐射奇球菌野生型和突变株的单克隆菌株培养于TGY培养基中,至 $OD_{600}\approx 0.5$ 时,将样品平均分成2份,一份添加终浓度为30 mmol/L的 H_2O_2 处理30 min,另一份作为对照。处理后将菌液转移至1.5 mL Eppendorf中,用DEPC水清洗菌体2次,去除剩余的 H_2O_2 ,后续操作采用Total RNA Extraction Kit试剂盒提取,提取的总RNA采用ND-1000 Spectrophotometer测定 OD_{260}/OD_{280} 及 OD_{260}/OD_{230} 的比值来判定RNA浓度和纯度。逆转录RNA(Reverse transcription PCR, RT-PCR)根据Tanaka的方法进行^[17]。反应体系如下:1 μg RNA,3 μg 随机六聚体引物,1 μL RNase抑制剂,0.5 mmol/L dNTPs,4 μL 5 \times FS缓冲液,2 μL Superscript逆转录酶和DEPC水。反应条件如下:65 $^\circ\text{C}$ 15 min,4 $^\circ\text{C}$ 2 min,42 $^\circ\text{C}$ 2 h,72 $^\circ\text{C}$ 10 min。产物cDNA置于-80 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR)采用Quant SYBR Green PCR试剂盒(TIANGEN)进行,程序设定于荧光定量PCR检测仪(Mx3000P with the real-time PCR detection system, Stratagene, USA)上,采用SYBR作为检测剂。具体反应体系如下:20 μL 反应体系:10 μL 2 \times SYBR Mix,0.6 μL Forward primer,0.6 μL Reverse primer,适量cDNA及无核酸酶水。反应程序设置如下:94 $^\circ\text{C}$ 5 min;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,58 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 30 s,40个循环;溶解曲线设置:94 $^\circ\text{C}$ 30 s,58 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 30 s。基因相对表达量用相对定量方法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算,结果取3次独立实验的平均值。所需用到的引物见表2。

表 2. 实验中用到的引物
Table 2. Primers used in this work

Primers	Primer sequences (5'→3')	Primers	Primer sequences (5'→3')
RT-1998-F	GGGCGTGGACAAGCGTATTC	RT-0865-F	GGTCACCGAGGTACACGCCT
RT-1998-R	GTAGACGGGGGCTTCCTGCT	RT-0865-R	TCCGGACACTGCCATAAAG
RT-a0259-F	GGGCAAGGCTCACCTCGTCA	RT-2539-F	GGTAAGGTGAGCACCCAGGC
RT-a0259-R	CGCCCTGGTCAATGGTCTCC	RT-2539-R	GAAACAGTTCGAGCAGACGGTG
RT-a0146-F	GGCGCCGAGTACCAGCTGC	RT-1219-F	GCCTTTATTCCGCTGATTCT
RT-a0146-R	CGTGCCAGGGGTTGAACTCCAG	RT-1219-R	ACGGGTACGAGGTCTTTTCTC
RT-1546-F	TGTCGCTTTCGCCTGTGC	RT-2263-F	GAAACAGGAGCGCAGGGTG
RT-1546-R	TCGGGTTCTCGTGGATGTGC	RT-2263-R	TCGATGGAGGGGAAAATCT
RT-a0202-F	GAGCCGCAACCACGATACGC	RT-B0092-F	TTTCCAGCCTGCTCCTCGGT
RT-a0202-R	GTCTTGAGTCGTCGGGGTTGG	RT-B0092-R	AGCTCGGTCAAGGTGTTTTGC
RT-1279-F	GGCAAGCTCGATGTCGTGTCC	RT-1709-F	CACGGCAAGAACGTGGAAAAC
RT-1279-R	GGCGGCGGTTCTGGTAGTTG	RT-1709-R	GCCCAGCAGAATGACGATGAAAG
RT-1343-F	GCCTACACCGAAGACCCCAT	RT-1102-F	TCACAACCACCCGCATGAGCAT
RT-1343-R	GAACTTGACGAGGTTGCCCAT	RT-1102-R	CGTAGGCGACTTCGAGGACCAG

2 结果和分析

2.1 耐辐射奇球菌 DRA0258 结构与生物信息学分析

通过 KEGG 网站上对目的蛋白基序的注释, 发现 DRA0258 具有类似于铁蛋白(Ferritin)的结构域。将 DRA0258 与大肠杆菌的铁蛋白 Ferritin 进行氨基酸序列的同源比对, 发现 DRA0258 与 *E. coli* Ferritin 的同源性不高, 只有 16.3% 同源性, 但是具有几个保守的铁结合位点。如图 2 所示, 经 NCBI 蛋白库中对 Ferritin 蛋白结构的分析, 发现 *E. coli* Ferritin 蛋白的氨基酸残基中, E17、S49-N50、Q53、Y94、E126、H129、D130 为金属离子结合位点^[18-19]; 在 DRA0258 氨基酸位点中, S114、E207 与 H129 分别与 *E. coli* Ferritin 中的 S49、E126 和 H129 位点一致, 说明这 3 个位点极有可能是潜在的铁结合位点。同时, 虽然在一些位点

上并没有体现出保守性, 如 DRA0258 与 *E. coli* Ferritin 金属离子结合位点对应的 D48 和 E175, 虽然不保守, 但是这 2 个氨基酸残基属于常见的铁结合位点, 具有潜在的铁结合活性。这些潜在的金屬结合位点暗示了 DRA0258 在金属结合方面的活性。

2.2 DRA0258 蛋白具备铁结合活性

采用大肠杆菌 BL21 表达系统, 通过将带有 *dra0258* 编码序列的片段与 pET 表达载体融合并在大肠杆菌细胞内表达目的蛋白, 经亲和层析和离子交换树脂吸附, 成功得到了目的蛋白 DRA0258。经 SDS-PAGE 检测, 蛋白纯度达到 90% 以上(图 3-A)。

得到目的蛋白后, 为验证蛋白的铁结合活性, 通过检测铁-菲咯嗪络合物在 564 nm 处的吸收峰, 证实了 DRA0258 具有较强的铁结合活性(图 3-B)。

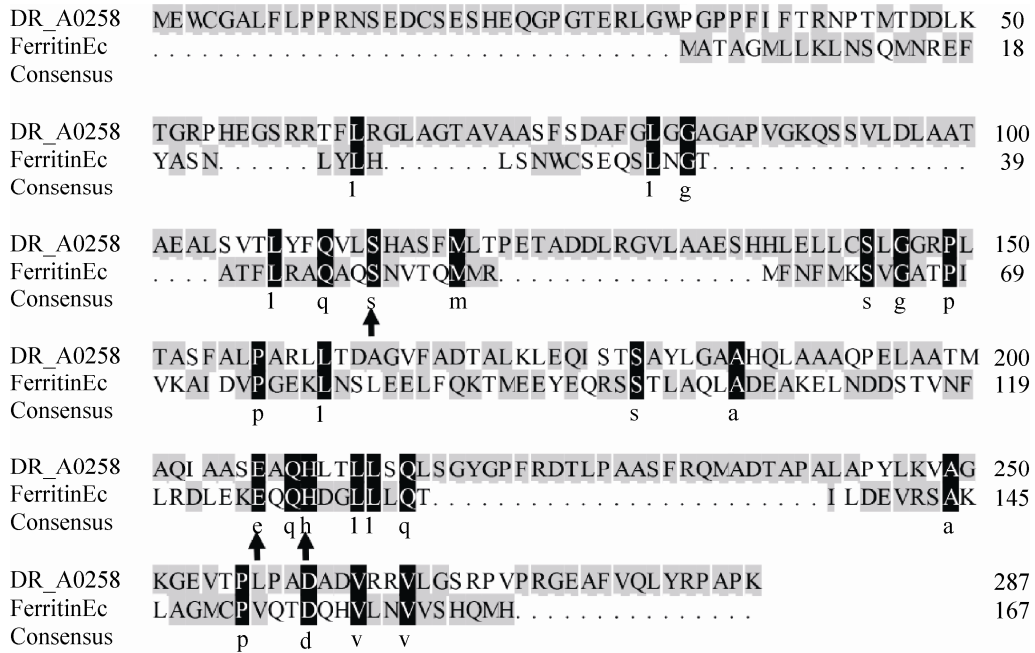


图 2. 耐辐射奇球菌 DRA0258 与大肠杆菌铁蛋白 Ferritin 的蛋白结构同源对比

Figure 2. Alignment of *D. radiodurans* DRA0258 and *E. coli* Ferritin. Cluatal X software was used to align the amino sequence of *D. radiodurans* DRA0258 and *E. coli* Ferritin. Black background: identical residues; Gray background: block of similar residues. Thick arrows pointed the positive iron binding residues.

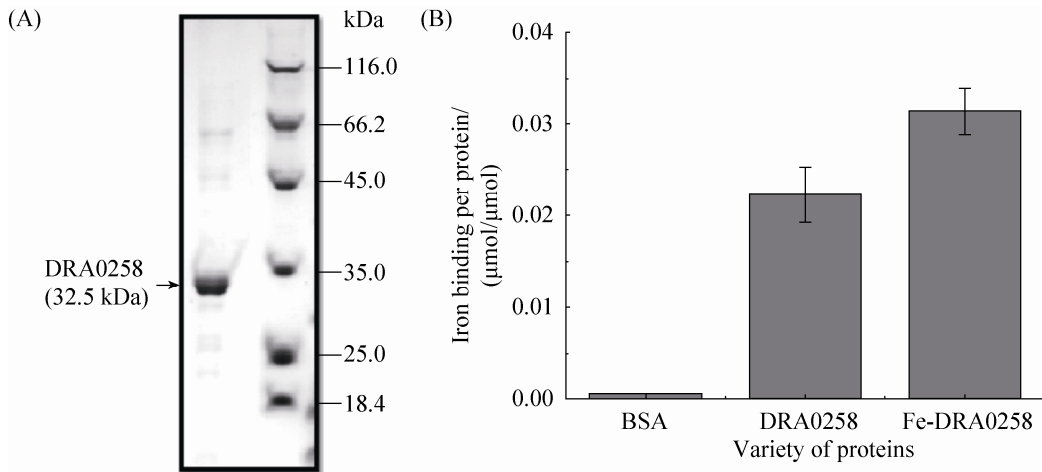


图 3. DRA0258 蛋白铁结合能力检测

Figure 3. Detection of iron binding activity of DRA0258. A: the purification identified by SDS-PAGE; B: iron binding per protein. BSA was selected as control. DRA0258 represented the iron binding activity of the purified protein *in vivo*. Fe-DRA0258 represented the iron binding activity of the ferrous iron incubated protein *in vitro*. $P < 0.05$.

2.3 耐辐射奇球菌 *dra0258* 突变株的构建与鉴定

通过定点反向插入技术将含有 *groEL* 启动子的卡那霉素抗性基因片段(长度约为 1092 bp)插入到 *dra0258* 基因的上下游之间, 经同源重组将 *dra0258* 基因片段进行替换。以外侧引物 PF1 与 PR2 通过 PCR 反应确定插入片段的正确性。结果表明, 以野生型 R1 的基因组为模板扩增得到的全长片段约为 1465 bp, 而经反向插入突变后, PCR 片段产物大小约为 1975 bp (图 1-B)。电泳结果符合预测, 片段经测序进一步证实实验结果的正确性, 表明 *dra0258* 基因被完全敲除。

2.4 H₂O₂ 处理对菌体存活率的影响

为考察 *dra0258* 缺失是否对细胞抗氧化能力造成影响, 采用高浓度 H₂O₂ 对 R1 野生型和 $\Delta dra0258$ 突变株进行处理。结果显示, 相较野生型, $\Delta dra0258$ 突变株对 H₂O₂ 更加敏感(图 4-A)。在 50 mmol/L H₂O₂ 处理浓度下, 短时间处理后 $\Delta dra0258$ 突变株显示出略低的生存率。随着处理时间逐步上升, $\Delta dra0258$ 突变株与野生型 R1 之间存活率差异越来越大(图 4-B)。当处理时间超过 10 min 时, $\Delta dra0258$

突变株几乎不能存活, 而 R1 仍有 80% 的存活率(图 4-B)。实验证实 *dra0258* 缺失导致了细胞对过氧化氢的抗性降低。

2.5 突变株对 Fe²⁺ 的敏感性增加

通过测定突变株与野生型在不同浓度 Fe²⁺ 处理后的抑菌圈大小, 结果证实野生型与突变株 TGY 平板上的抑菌圈具有较大的差异, 突变株相较野生型细胞表现出更强的生存抑制性, 表明突变株受到了 Fe²⁺ 的强烈抑制(图 5)。这一结果进一步证实 DRA0258 与铁的代谢相关。

2.6 突变株的过氧化氢酶活性与总抗氧化活性降低

为进一步从抗性机制上探究 *dra0258* 突变对细胞抗氧化活性的影响, 我们检测了突变株与野生型细胞在 H₂O₂ 处理前后过氧化氢酶的活性及细胞总抗氧化能力。结果表明, 野生型与突变株在正常的生理状态下过氧化氢酶活性大致相同(图 6-A), 而经 40 mmol/L H₂O₂ 处理后, 野生型细胞的过氧化氢酶活性有了一定的提升, 而突变株中过氧化氢酶活性几乎没有变化, 说明野生型通

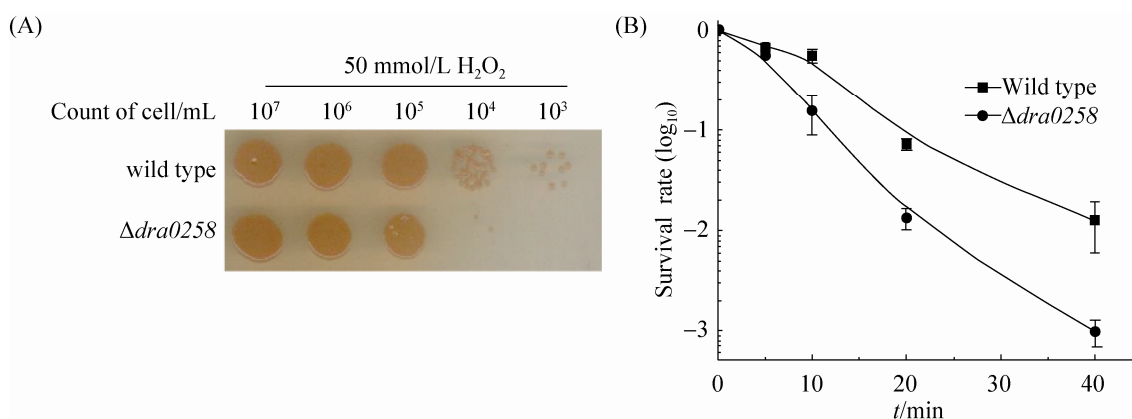


图 4. 耐辐射奇球菌 R1 与突变株 $\Delta dra0258$ 在 50 mmol/L H₂O₂ 处理下的存活比较
Figure 4. Survival profile of $\Delta dra0258$ mutant under 50 mmol/L H₂O₂ treatment. $P < 0.05$.

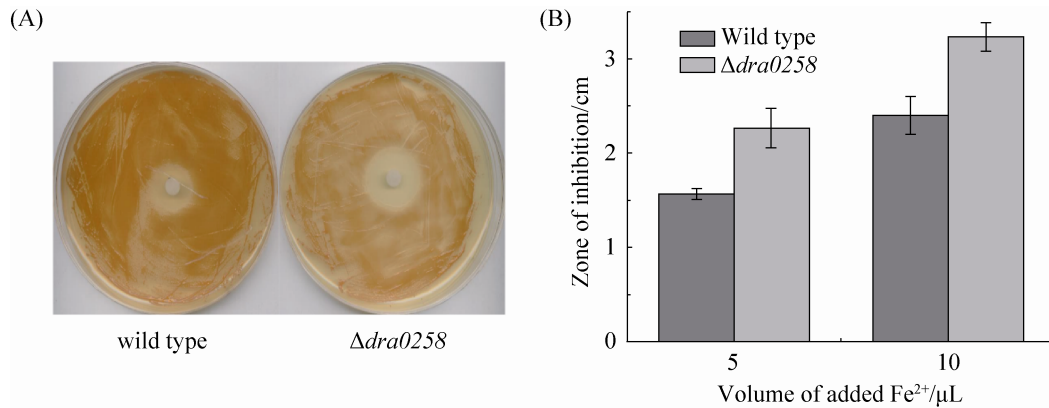


图 5. 野生型与突变株 $\Delta dra0258$ 对 Fe^{2+} 的敏感性差异

Figure 5. The Fe^{2+} sensitivity assay of wild type and $\Delta dra0258$ mutant. A: the comparison of inhibition zone between wild type strain and $\Delta dra0258$; B: the comparison of inhibition zone between wild type strain and $\Delta dra0258$ under different Fe^{2+} concentration. $P < 0.05$.

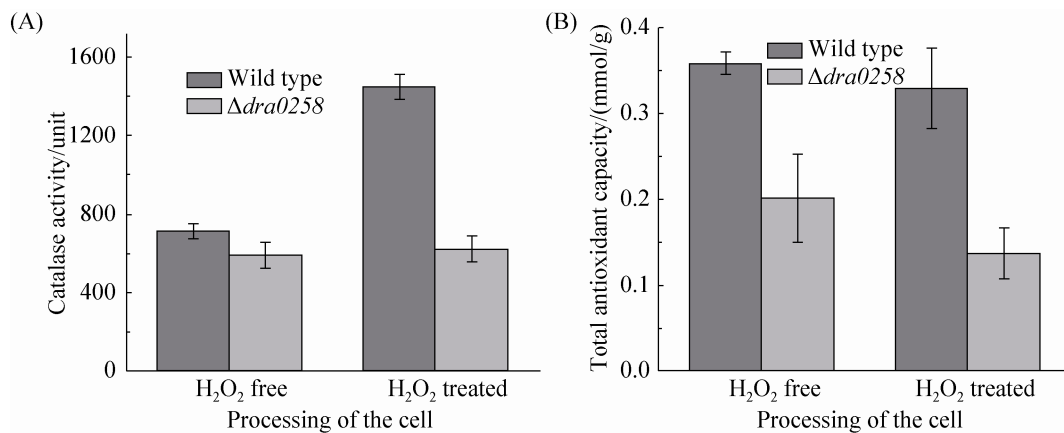


图 6. 野生型与突变株 $\Delta dra0258$ 在 H_2O_2 处理前后过氧化氢酶活性及总抗氧化活性比较

Figure 6. The catalase activity and total antioxidant capacity of wild type and $\Delta dra0258$ mutant under normal condition and H_2O_2 treatment. A: catalase activity of wild type strain and $\Delta dra0258$ under normal condition and 30 mmol/L H_2O_2 treatment; B: total antioxidant capacity of wild type strain and $\Delta dra0258$ mutant under normal condition and 30 mmol/L H_2O_2 treatment. $P < 0.05$.

过细胞应激机制, 在受 H_2O_2 胁迫时诱导表达了一定的过氧化氢酶来消除过量的 H_2O_2 , 而突变株在消耗自身过氧化氢酶消除 H_2O_2 的同时, 不能产生足量的过氧化氢酶来抵御 H_2O_2 的氧化损伤, 证实 $dra0258$ 基因的缺失导致细胞应激机制受到了损伤。

通过检测野生型与突变株的总抗氧化活性

(图 6-B), 发现在 H_2O_2 处理前, 突变株的总抗氧化能力只有野生型的 57%, 说明 $dra0258$ 基因的突变导致了细胞本底抗氧化能力的减弱, 而经 40 mmol/L H_2O_2 处理后, 野生型细胞的总抗氧化能力还维持在较高的水平, 而突变株的总抗氧化能力有所下降, 只有野生型的 40%, 说明突变株在 H_2O_2 胁迫下抗氧化活性进一步下降。

2.7 突变株中抗氧化酶基因的转录水平下降

前面实验显示, 经 H₂O₂ 处理后, 野生型 R1 存活率要显著高于 Δ*dra0258* 突变株, 同时 Δ*dra0258* 突变株的过氧化氢酶活性要低于野生型, 为探究这些表型产生的内在机制, 我们采用荧光定量 PCR 对野生型 R1 与 Δ*dra0258* 突变株中过氧化氢酶(KAT)和超氧化物歧化酶(SOD)的基因转录水平进行分析。耐辐射奇球菌中共有 3 个 KAT 编码基因(*dr1998*, *dra0259* 及 *dra0146*), 和 3 个 SOD 编码基因(*dr1546*、*dra0202* 和 *dr1279*)。通过分析野生型 R1 与突变株在 H₂O₂ 处理前后各抗氧化酶类编码基因的转录水平, 结果显示如表 3 所示。在 H₂O₂ 处理前, 与野生型相比, 突变株中编码过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的基因转录水平基本上无明显变化, 只有 *dra0202(sodC)* 降低了近 2 倍, 说明在细胞正常生理条件下, *dra0258* 基因的缺失不会显著影响过氧化氢酶基因的表达。然而, 经 40 mmol/L H₂O₂ 处理 30 min 后, 相较野生株, 突变株的 3 个过氧化氢酶编码基因分别下调了 2.32、2.98、和 2.11 倍, 同时编码 Mn-SOD 酶的编码基因 *dr1279* 的转录水平也下调了 3.47 倍, 说明过氧化氢在野生型细胞内引起了应激反应, 而

在 *dra0258* 突变株细胞中应激反应受到了一定程度的抑制。该结果从分子水平解释了突变株抗氧化能力减弱的内在机制。

2.8 突变株内铁转运蛋白表达受影响

为研究 Δ*dra0258* 突变对细胞内环境中金属离子转运系统的影响, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测了包括铁调控家族蛋白 Fur 同源蛋白 Mur (DR0865)^[10]、DtxR (DR2539)^[9] 及铁结合蛋白家族 DPS1 (DR2263) 和 DPS2 (DRB0095)^[7] 等编码基因的转录水平(表 4)。结果表明, *mur* 转录水平下调了 2.5 倍, *dps1* 及 *dr1709* 转录水平分别上调了 2.3 倍和 2.0 倍, 证实 *dra0258* 基因的敲除使得胞内铁转运系统受到影响。Fur 家族基因转录水平的下调以及胞内铁储蛋白编码基因 *dps1* 的上调, 证实 *dra0258* 突变后胞内游离铁含量的上调, 导致细胞内离子环境及氧化还原环境的改变, 从而刺激细胞产生应激效应。

2.9 利用 ICP 检测胞内铁离子含量的变化

利用 ICP 检测野生型与突变株细胞的总铁含量(表 5), 结果表明突变株细胞中铁离子含量相比野生型只上调了 20% 左右, 未有非常明显的变化,

表 3. 荧光定量 PCR 检测突变株 Δ*dra0258* 与野生型在双氧水处理前后抗氧化酶类表达水平差异

Table 3. qRT PCR of anti-oxidation-related genes in the *dra0258* mutant relative to wild type R1 with or without H₂O₂ treatment

Locus	Annotation ^a	Fold change (±SD)	
		H ₂ O ₂ free Δ <i>a0258</i> (-H)/R1(-H)	H ₂ O ₂ treatment Δ <i>a0258</i> (+H)/R1(+H)
DR1998	Catalase (KatE)	-0.95 (±0.07)	-2.32 (±0.13)
DRA0259	Catalase (KatE)	-1.09 (±0.09)	-2.98 (±0.56)
DRA0146	Catalase (CatA)	-1.88 (±0.11)	-2.11 (±0.20)
DR1546	Cu/Zn family superoxide dismutase (SodC)	-1.46 (±0.29)	-1.51 (±0.26)
DRA0202	Cu/Zn family superoxide dismutase (SodC)	-2.15 (±0.57)	0.76 (±0.11)
DR1279	Mn family superoxide dismutase (SodA)	-1.58 (±0.17)	-3.47 (±0.15)

^a: functional annotation is based on KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

表 4. 荧光定量 PCR 检测突变株 $\Delta dra0258$ 与野生型细胞中铁转运相关蛋白的表达水平差异
Table 4. *qRT-PCR* of iron-transport-related genes in the *dra0258* mutant relative to wild type R1

Locus	Annotation ^a	Fold change (\pm SD)
		$\Delta dra0258/R1$
DR0865	Ferric uptake regulation protein Mur	-2.56 (\pm 0.94)
DR2539	DtxR family transcriptional regulator	-1.20 (\pm 0.12)
DR1219	Ferrous iron transport protein B	-1.28 (\pm 0.11)
DR2263	Dps family DNA-binding stress response protein	2.38 (\pm 0.18)
DRB0092	Dps family DNA-binding stress response protein	1.38 (\pm 0.19)
DR1709	Manganese transport protein MntH	2.08 (\pm 0.13)
DR1102	Cation efflux system protein	1.47 (\pm 0.18)

^a: functional annotation is based on KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

表 5. 突变株与野生型中的金属离子含量

Table 5. Ions concentration in mutant and wild type strains

Ions concentration (nmol/mg)	$\Delta dra0258$ mutant	Wild type
Fe	1.37 (\pm 0.07)	1.66 (\pm 0.03)
Mn	1.28 (\pm 0.06)	1.33 (\pm 0.10)
Cu	0.13 (\pm 0.02)	0.12 (\pm 0.006)
Zn	0.56 (\pm 0.02)	0.62 (\pm 0.04)
Mg	82.16 (\pm 3.74)	99.06 (\pm 4.65)

锰, 铜, 镁及锌等重要金属离子浓度也无明显变化。结合先前的研究, 我们推测由于细胞内高效金属调控网络的存在, 而且 $\Delta dra0258$ 的铁结合能力未达到 DPS 等经典铁储备蛋白的铁结合水平, 因为并未出现明显的总铁含量的变化。

3 讨论

耐辐射奇球菌极端抗性机制与其特殊的 DNA 修复系统及高效的抗氧化防御机制密切相关。近年来对耐辐射奇球菌独特的抗性防御机制有了深入的研究, 许多细胞抗性机制得到了解析, 包括具有极强抗氧化性质的类胡萝卜素、高效的过氧化氢酶及超氧化物歧化酶和胞内高锰铁比的金属离子环境等等^[6-20]。

金属内环境稳态作为构成耐辐射奇球菌极端抗性的一大因素越来越受到重视。研究表明耐辐射奇球菌细胞具有特殊的高锰铁比的金属离子内环境, 该金属离子内环境对细胞的极端抗性有着非常重要的作用, 当胞内锰离子浓度降低或者铁离子浓度升高时, 细胞的氧化抗性将会明显下降^[21]。铁作为一种过渡金属离子, 由于化合价态的不稳定性会造成细胞内氧化还原环境的变化。当细胞内铁离子浓度升高, 过量的铁离子能催化氧自由基的产生, 导致细胞脂质体、蛋白质及核酸的氧化损伤, 从而加速细胞的凋亡^[22-23]。另外, 金属辅基通常在蛋白酶中起重要的催化作用, 有研究认为铁作为金属辅基, 在胞内容易被氧化而失活, 当被其他金属离子如锰离子或者锌离子代替后, 蛋白的活性才得以恢复。

胞内多数铁离子都储备于铁储蛋白中^[24]。原核生物中铁储蛋白分别是 Dps 和铁蛋白 Ferritins, 该 2 类蛋白都属于 Ferritin 家族蛋白。在耐辐射奇球菌中存在 2 种 Dps 蛋白, 分别是 DR2263 和 DRB0092。同源比对发现耐辐射奇球菌编码的未知功能蛋白 $\Delta dra0258$ 与大肠杆菌的铁蛋白 Ferritin 具有一定的结构相似性。通过蛋白纯化得

到该蛋白后, 经体外铁结合活性检测, 证实了该蛋白具有一定的铁结合能力, 由此证实该蛋白为一种铁结合蛋白。

通过构建该基因的突变株 $\Delta dra0258$, 发现该突变株对双氧水极度敏感, 我们推测是由于该基因缺失后胞内游离的铁离子增加, 与双氧水反应引发羟自由基的产生, 从而使细胞抗氧化能力下降。随后的过氧化物酶活性及细胞总抗氧化活性测定结果表明, 突变株细胞的抗氧化能力受到了损伤, 致使细胞在双氧水胁迫下无法通过正常的应激反应产生足量的过氧化物酶进行抗氧化抵御。

然而, 通过检测野生型与突变株细胞中的总铁含量, 发现突变株中总铁含量相较野生型没有非常显著的变化。综合该蛋白的铁结合能力及胞内各类铁转运相关蛋白的转录水平, 推测该蛋白虽然具有一定的铁结合活性, 但其铁结合能力比 Dps 等铁储蛋白微弱。我们推测由于细胞内存在复杂且高效的金属离子转运系统, 使得突变株内的总铁含量始终维持在一定的水平, 因此对该蛋白在胞内金属离子转运网络中的具体功能还有待进一步研究。另外, 我们还检测了突变株在电离辐射、紫外辐照以及 MMC 处理后的生存率, 结果显示 $dra0258$ 突变后并不会影响细胞的抗辐射能力, 说明该基因主要参与了细胞的抗氧化过程。

4 总结

本研究从细胞及分子水平上证实了未知功能蛋白 DRA0258 具有铁结合活性, 并在耐辐射奇球菌的氧化抗性方面起着重要作用。该基因的缺失导致细胞的双氧水抗性、细胞总抗氧化活性及过氧化物酶应激活性降低, 同时引起细胞内铁转运系统相关蛋白的基因转录水平发生变化。进一步

的研究将集中于寻找并验证该蛋白保守的铁结合位点以及该蛋白在 dps 缺失背景基础上的功能研究。

参考文献

- [1] White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, Haft DH, Gwinn ML, Nelson WC, Richardson DL, Moffat KS, Qin HY, Jiang LX, Pamphile W, Crosby M, Shen M, Vamathevan JJ, Lam P, McDonald L, Utterback T, Zalewski C, Makarova KS, Aravind L, Daly MJ, Minton KW, Fleischmann RD, Ketchum KA, Nelson KE, Salzberg S, Smith HO, Venter JC, Fraser CM. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*, 1999, 286(5444): 1571–1577.
- [2] Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Tatusov RL, Minton KW, Koonin EV, Daly MJ. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(1): 44–79.
- [3] Hua YJ, Gao GJ. Comparative genomics of genes contributed to DNA repair in the radiation-resistant *Deinococcus radiodurans*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(1): 120–126. (in Chinese)
华跃进, 高冠军. 耐辐射异常球菌 DNA 损伤与修复相关基因的比较基因组研究. *微生物学报*, 2003, 43(1): 120–126.
- [4] Liu YQ, Zhou JZ, Omelchenko MV, Beliaev AS, Venkateswaran A, Stair J, Wu LY, Thompson DK, Xu D, Rogozin IB, Gaidamakova EK, Zhai M, Makarova KS, Koonin EV, Daly MJ. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(7): 4191–4196.
- [5] Sun HX, Xu GZ, Zhan HD, Chen H, Sun ZT, Tian B, Hua YJ. Identification and evaluation of the role of the manganese efflux protein in *Deinococcus radiodurans*. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 319.
- [6] Slade D, Radman M. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(1): 133–191.
- [7] Santos SP, Mitchell EP, Franquelim HG, Castanho MARB, Abreu IA, Romão CV. Dps from *Deinococcus radiodurans*: oligomeric forms of Dps1 with distinct cellular functions and Dps2 involved in metal storage. *The FEBS Journal*, 2015,

- 282(22): 4307–4327.
- [8] Yan ZY, Xu ZJ, Xu GZ, Tian B, Hua YJ. Construction of a *dps* mutant and its functional analysis in *Deinococcus radiodurans*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(4): 610–615. (in Chinese)
严卓彦, 许镇坚, 许光治, 天兵, 华跃进. 耐辐射奇球菌 *dps* 突变株的构建和蛋白功能初步研究. *微生物学报*, 2007, 47(4): 610–615.
- [9] Chen H, Wu RR, Xu GZ, Fang X, Qiu XL, Guo HY, Tian B, Hua YJ. DR2539 is a novel DtxR-like regulator of Mn/Fe ion homeostasis and antioxidant enzyme in *Deinococcus radiodurans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 396(2): 413–418.
- [10] Ul Hussain Shah AM, Zhao Y, Wang YF, Yan GQ, Zhang QK, Wang LY, Tian B, Chen H, Hua YJ. A Mur regulator protein in the extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106341.
- [11] Chang SH, Shu HY, Li ZW, Wang YP, Chen LH, Hua YJ, Qin GY. Disruption of manganese ions [Mn(II)] transporter genes *DR1709* or *DR2523* in extremely radio-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(4): 438–444.
- [12] Ding HG, Yang JJ, Coleman LC, Yeung S. Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(11): 7997–8004.
- [13] Markillie LM, Varnum SM, Hradecky P, Wong KK. Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (*katA*) and superoxide dismutase (*sodA*) mutants. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(2): 666–669.
- [14] Yang S, Xu H, Wang JL, Liu CZ, Lu HZ, Liu MJ, Zhao Y, Tian B, Wang LY, Hua YJ. Cyclic AMP receptor protein acts as a transcription regulator in response to stresses in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155010.
- [15] Liu CZ, Wang LY, Li TT, Lin L, Dai S, Tian B, Hua YJ. A PerR-like protein involved in response to oxidative stress in the extreme bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 450(1): 575–580.
- [16] Cao LY, Dai C, Li ZJ, Fan Z, Song Y, Wu YL, Cao ZJ, Li WX. Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40135.
- [17] Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park MJ, Eisen JA, Peterson SN, Battista JR. Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance. *Genetics*, 2004, 168(1): 21–33.
- [18] Thiruselvam V, Sivaraman P, Kumarevel T, Ponnuswamy MN. Revelation of endogenously bound Fe²⁺ ions in the crystal structure of ferritin from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 453(3): 636–641.
- [19] Crichton RR. Ferritin. Structure and function. *Die Medizinische Welt*, 1981, 32(38): 1401–1404.
- [20] Ghosal D, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Venkateswaran A, Zhai M, Kostandarithes HM, Brim H, Makarova KS, Wackett LP, Fredrickson JK, Daly MJ. How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(2): 361–375.
- [21] Sharma A, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Bennett B, Daly MJ, Hoffman BM. Responses of Mn²⁺ speciation in *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* to γ -radiation by advanced paramagnetic resonance methods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(15): 5945–5950.
- [22] Aroun A, Zhong JL, Tyrrell RM, Pourzand C. Iron, oxidative stress and the example of solar ultraviolet A radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2012, 11(1): 118–134.
- [23] Zhou ZZ, Ware JH, Kennedy AR. Carbon and iron ion radiation-induced cytotoxicity and transformation *in vitro*. *Oncology Letters*, 2011, 2(5): 915–918.
- [24] Clegg GA, Fitton JE, Harrison PM, Treffry A. Ferritin: molecular structure and iron-storage mechanisms. *Progress In Biophysics and Molecular Biology*, 1981, 36: 53–86.

Antioxidant function of the iron binding protein DRA0258 in *Deinococcus radiodurans*

Su Yang, Mengjia Liu, Liangyan Wang, Yuejin Hua*

Key Laboratory of Nuclear-Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture, Institute of Nuclear-Agricultural Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] The complete genome of the extreme environmental resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1 was analyzed by sequence comparative method and putative ferritin-like protein DRA0258 was screened. Molecular techniques were applied to validate and analyze its function. [Methods] We applied sequence alignment to analyze amino acid sequence of the hypothetical protein DRA0258 and detected its iron binding activity after purification. We used triple-fraction-ligation method to construct *dra0258* null mutant and detected its survival rate under H₂O₂ treatment, catalase activity and total antioxidant capacity, using QRT-PCR to examine the relative transcriptional level change of the antioxidant relative enzymes and iron transport relative proteins. [Results] We confirmed DRA0258 obtained a certain iron binding activity. The survival rate assay with H₂O₂ treatment suggested that deletion of *dra0258* reduced the cellular antioxidant activity of *D. radiodurans*. The attenuation of catalase activity, total antioxidant capacity as well as the reduction of relative transcriptional levels of antioxidant related genes verified that both the oxidative stress response systems and the iron regulation network were damaged. [Conclusion] This study verified DRA0258 is an iron-binding protein. Deletion of this gene would affect cellular iron transport system and reduce cellular antioxidant capability.

Keywords: *Deinococcus radiodurans*, ferritin, transcriptional level, catalase activity, total antioxidant capacity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Program on Key Basic Research Project (2015CB910600) and by the National Natural Science Foundation of China (31370102, 31570058)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-86971703; E-mail: yjhua@zju.edu.cn

Received: 31 August 2016; Revised: 25 September 2016; Published online: 9 October 2016