

## 鼠疫菌 OxyR 调控子蛋白对 *dps* 的转录调控机制

倪斌<sup>1</sup>, 张义全<sup>2</sup>, 黄新祥<sup>1</sup>, 杨瑞馥<sup>2</sup>, 周冬生<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013

<sup>2</sup>军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

**摘要:**【目的】利用分子生物学实验研究鼠疫菌调控子 OxyR 对 *dps* 的转录调控机制。【方法】提取鼠疫菌野生株(WT)和 *oxyR* 突变株( $\Delta oxyR$ )的总 RNA, 采用引物延伸实验研究 *dps* 的转录起始位点, 并根据产物的丰度判断 OxyR 对 *dps* 的调控关系。进一步采用实时定量 RT-PCR 的方法验证 OxyR 对 *dps* 的调控关系。PCR 扩增 *dps* 的整个启动子区 DNA 序列, 并纯化 His-OxyR 蛋白, 通过凝胶阻滞实验(EMSA)验证 OxyR 对 *dps* 启动子区是否具有直接的相互作用。利用大肠杆菌 OxyR 识别基序, 预测鼠疫菌 OxyR 对 *dps* 启动子区的结合位点, 从而得出鼠疫菌 OxyR 对 *dps* 的转录调控机制。【结果】鼠疫菌 *dps* 有一个转录起始位点 G(-40) (翻译起始位点为 +1), 其转录表达受 OxyR 的激活; 体外实验及生物信息学预测结果表明 OxyR 能结合到 *dps* 启动子区-111 到-78 之间的碱基上。【结论】OxyR 能直接结合到 *dps* 启动子区而激活其转录表达。

**关键词:**鼠疫菌, OxyR, *dps*, 转录调控

**中图分类号:**Q933 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2013)07-0685-06

活性过氧化物是天然的杀菌物质之一, 它能直接与细菌膜脂和膜蛋白相互作用, 影响膜流动性而致细菌死亡; 也能通过破坏 DNA 结构, 影响 DNA 复制和转录表达而致细菌死亡<sup>[1]</sup>。OxyR 调控子蛋白在细菌抗氧化过程中起着重要的作用, 其 N-末端具有 DNA 结合结构域, C-末端具有寡聚化结构域。OxyR 分子内具有两个对过氧化物十分敏感的半胱氨酸残基(Cys-199 和 Cys-208), 当其被氧化后导致蛋白空间结构发生改变, 促进其寡聚化(二聚体或四聚体), 而具有 DNA 结合活性, 调节下游与抗氧化密切相关基因的转录表达<sup>[2]</sup>。在大肠杆菌中, OxyR 能激活过氧化氢酶基因 *katG*<sup>[3]</sup>、*dps*<sup>[4]</sup>、谷氧还

蛋白基因 *grxA*<sup>[5]</sup>、烃基过氧化物还原酶基因 *ahpFC* 等的表达, 这些基因的表达产物都有助于解除过氧化物对细胞的损害。其中 Dps 是一种在营养不足条件下(例如平台期)表达的 DNA 结合蛋白, 大肠杆菌的 *dps* 在对数中期时受 OxyR 的激活, 而在平台期时受 HIF 和  $\sigma^s$  的激活<sup>[6]</sup>。Dps 具有多种生物学功能: 它能非特异的结合到 DNA 序列上, 使其高度聚合而免受破坏<sup>[7]</sup>; 它还能在  $Fe^{2+}$  的帮助下直接降解  $H_2O_2$ , 而解除其对细胞的氧化破坏作用<sup>[8]</sup>; 另外 Dps 还参与细菌的耐酸性调节<sup>[4]</sup>、参与锰离子平衡<sup>[9]</sup>、参与解除  $Cu^+$  的细胞毒性<sup>[7]</sup>、甚至有利于细菌粘附到非生命体表面<sup>[10]</sup>。

**基金项目:**病原微生物生物安全国家重点实验室开放研究基金资助项目(SKLPBS1112); 江苏大学高级专业人才科研启动基金项目(10JDG044); 江苏省高校自然科学基金项目(12KJD310001)

\* 通信作者。Tel: +86-10-66948594; E-mail: dongshengzhou1977@gmail.com

**作者简介:**倪斌(1978-), 男, 江苏张家港人, 讲师, 主要从事病原菌转录调控及致病机制研究。E-mail: nibinyi@gmail.com

**收稿日期:**2013-01-27; **修回日期:**2013-03-18

与其它细菌中一样,鼠疫耶尔森氏菌(简称鼠疫菌)OxyR蛋白也参与细菌抗氧化作用,它能直接结合到 *katA* 和 *katY* 的启动子区而激活它们的转录,*katA* 和 *katY* 编码产物能降解对鼠疫菌有害的过氧化物,从而有利于鼠疫菌在巨噬细胞内的生存<sup>[11]</sup>。然而,到目前为止对鼠疫菌 *dps* 研究尚未报道,它是否属于 OxyR 的调控元,目前还不得而知。本文中,我们利用引物延伸实验和实时定量 RT-PCR 从转录水平上证实了鼠疫菌 OxyR 蛋白对 *dps* 具有调控作用,进而通过凝胶阻滞(EMSA)及生物信息学预测,得出了鼠疫菌 OxyR 蛋白对 *dps* 具体的转录调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**鼠疫菌 201 株(野生型,WT)及其 *oxyR* 突变株( $\Delta oxyR$ )、His-OxyR 蛋白表达菌等均由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂:**实验所用的 Primer Extension System、fmol<sup>®</sup> DNA Cycle Sequencing System 等为 Promega 产品;TRIzol Reagent 为 Invitrogen 产品;Taq DNA 连接酶、dNTPs 为上海生工生物工程公司产品;PCR 产物纯化试剂盒为 QIAGEN 产品。

### 1.2 鼠疫菌培养

取 50  $\mu$ L 甘油菌种接种于 18 mL 的 TMH<sup>[12]</sup> 培养基中(50 mL 的三角烧瓶,加玻璃珠,下同),26 $^{\circ}$ C 下 230 r/min 培养至平台期,按 1:20 稀释接种至新鲜的 TMH 培养基中,26 $^{\circ}$ C 下 230 r/min 培养至对数中期( $OD_{620} \approx 1.0$ ),而后向该培养物中加入过氧化氢至 20 mmol/L,26 $^{\circ}$ C 下 230 r/min 继续培养 30 min,收集菌体,供后续分子生化实验用。

### 1.3 引物延伸实验

采用 TRIzol 法提取鼠疫菌 WT 及  $\Delta oxyR$  的总 RNA,并通过琼脂糖凝胶电泳监测 RNA 质量。将与 *dps* 的 mRNA 互补的特异性引物(见表 1)5'-末端用 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(5 000 Ci/mmol, 10 mCi/mL)进行放射性标记<sup>[13]</sup>。而后分别以 WT 和  $\Delta oxyR$  的总 RNA 为模板(总 RNA 的量一致),在 AMV 逆转录酶的作用下,将 *dps* 的 mRNA 逆转录成 cDNA。cDNA 产物配伍测序条带[fmol<sup>®</sup> DNA Cycle Sequencing System (Promega)]进行 6% 聚丙烯酰胺变性胶电泳,经放

射自显影后,通过引物延伸条带的位置即可确定转录起始位点,而根据其相对丰度即可判定 OxyR 对 *dps* 的调控关系。

表 1. 实验所用引物

Target	Primers (5'→3')
<b>RT-PCR</b>	
<i>dps</i>	Forward: CTCGGTGCTGTGGCATTG
	Reverse: CGGGAAGCGGCAGTAAAC
<b>Primer extension</b>	
<i>dps</i>	Reverse: ATGCTCCTCAACGTCATTAC
<b>EMSA</b>	
<i>dps</i>	Forward: TGCAGTTGGCGTTCCTAC
	Reverse: ATGCTCCTCAACGTCATTAC

### 1.4 实时定量 RT-PCR

提取 WT 和  $\Delta oxyR$  的总 RNA,并用 DNA-free<sup>TM</sup> Kit (Amibion)消化去除其中的 DNA 污染,再用 N6 随机引物将其逆转录成 cDNA,最后用 Roche 的 LightCycler system 作实时定量 RT-PCR。以 16S rRNA 的表达量为内参绘制标准曲线,用于基因表达水平的相对定量<sup>[14]</sup>。

### 1.5 EMSA 实验

PCR 扩增 *dps*(所用引物见表 1)的启动子区序列并对产物纯化回收,用 T4 多聚核苷酸激酶(T4 PNK)对 DNA 片段 5'末端进行标记<sup>[13]</sup>。利用 Ni-NTA 柱法纯化 His-OxyR 蛋白<sup>[15]</sup>。将不同浓度的 His-OxyR 蛋白与标记的 DNA 探针在 10  $\mu$ L 结合反应体系中<sup>[13]</sup>,室温共同孵育 20 min 后,将样品加入 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,-60 $^{\circ}$ C 放射自显影后分析结果。

### 1.6 OxyR 结合位点的预测

通过比对与鼠疫菌 201 株来自同一疫源地的 91001 株序列和大肠杆菌 K12 的 OxyR 蛋白氨基酸序列,发现二者具有 86% 的一致性。因此,我们汇总了大肠杆菌 OxyR 对 *oxyR*、*grx*、*dsbG*、*fhuF*、*yfdI*、*hemH*、*suf*、*yaaA*、*ybjM* 等基因的结合序列<sup>[5,16-18]</sup>,并对序列作同源比对,找出相对保守的序列,而后用 weblogo(<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)展示比对结果,用 *retrieve-seq*(<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>)计算保守序列上每个位置 4 个碱基出现的权重(Position frequency matrix, PFM),从而确定大肠杆菌 OxyRbox 序列。最后再利用该 box 通过 matrix-scan(<http://rsat.ulb.ac.be/>)预测鼠疫菌 OxyR 对

*dps* 启动子区的结合位置。

## 2 结果和分析

### 2.1 OxyR 正调控 *dps* 的转录表达

OxyR 对 *dps* 调控的引物延伸实验结果如图 1-A 所示:若以翻译起始位点为 +1,则 *dps* 的转录起始位点为 -40 位的 G,且引物延伸产物在 WT 中的亮度远高于  $\Delta oxyR$  中的,这表明 OxyR 能激活 G (-40) 的转录。我们进一步利用实时定量 RT-PCR 的方法研究了 OxyR 对 *dps* 的调控关系,其结果如图 1-B 所示:以 WT 的总 RNA 所得的 cDNA 为模板的  $\Delta CT$  值远高于  $\Delta oxyR$  中的,这说明 WT 中的 *dps* mRNA 远高于  $\Delta oxyR$  中的。以上结果证明,在鼠疫菌对数生长期时,OxyR 能感应过氧化氢刺激信号,而激活 *dps* 的转录表达。

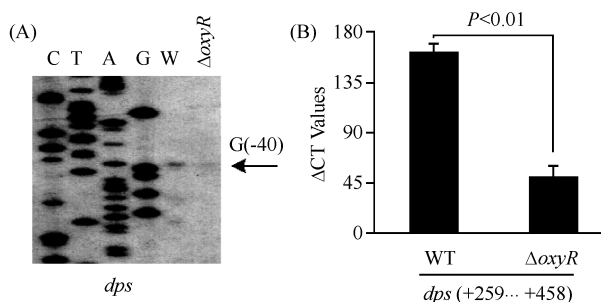


图 1. OxyR 激活 *dps* 的转录

Figure 1. OxyR activates the transcription of *dps*. (A) Primer Extension. One oligonucleotide primer was designed to be complementary to the RNA transcript of *dps*. The primer extension products, detected for  $\Delta oxyR$  or WT grown as described above, were analyzed with 8 mol/L urea - 6% acrylamide sequencing gel. Lanes C, T, A and G represented the Sanger sequencing reactions. Shown on the right side was the transcription start site. The numbers in the card indicated the nucleotide site upstream of translation start (+1). (B) RT-PCR. The mRNA levels of *dps* gene were compared between  $\Delta oxyR$  and WT. On the basis of the standard curves of 16S rRNA expression, the relative mRNA level was determined by calculating the threshold cycle ( $\Delta CT$ ) of the gene using the classic  $\Delta CT$  method. The positive numbers indicated the nucleotide position downstream of translation start.

### 2.2 OxyR 直接激活 *dps* 的转录

引物延伸和 RT-PCR 的实验结果表明 OxyR 能激活 *dps* 的表达,进而我们通过 EMSA 实验验证 OxyR 是否能直接作用于 *dps* 的启动子区,其结果如图 2 所示:当 His-OxyR 蛋白量为 0.5 pmol 时,*dps* 就

出现了阻滞带,且随着蛋白量的增加,阻滞带逐渐增强(见泳道 1-4),当只加入 F1 抗原蛋白(un-related protein,见泳道 7)就未见阻滞带;当先加入未标记 *dps* 启动子 DNA 片段(cold probe,见泳道 5)作为竞争性冷探针时,由于 His-OxyR 先与冷探针结合,从而就不能再与探针结合,此时阻滞带就会减少甚至消失,但加入 16S rDNA(negative probe,见泳道 6)作为阴性对照时就没有此效应。上述结果表明 OxyR 能对 *dps* 的启动子区的结合时特异性的。

### 2.3 OxyR 对 *dps* 启动子区结合位点的预测

我们通过分析大肠杆菌 OxyR 对已知靶基因的结合位点,并利用 weblogo、retrieve-seq 及 matrix-scan 软件,预测出了鼠疫菌 OxyR 对 *dps* 启动子区的结合位置。图 3-A 为大肠杆菌 OxyR 结合基序的 logo 展示,可以看出 OxyR 识别高 AT 的碱基序列;图 3 B 展示的是大肠杆菌 OxyR 结合基序的各个位置出现四种碱基的频率矩阵,利用该矩阵我们预测出了鼠疫菌 OxyR 对 *dps* 启动子区的结合位置(图 3-C):OxyR 对其有 1 个结合位点,位于启动子区 -111 到 -78(翻译起始位点为 +1),其 score 值等于 8.8(7 为 cutoff 值)。

### 2.4 鼠疫菌 *dps* 启动子区结构

根据实验结果与预测,我们可以得出 *dps* 基因的启动子区结构,如图 4 所示:包含翻译起始位点、转录起始位点 P、可能的 OxyR 结合位点、-10 和 -35 区以及 Shine-Dalgarno 序列(SD 序列,为核糖体识别位点)。

## 3 讨论

鼠疫菌是鼠疫的病原菌,人间鼠疫主要表现为 3 种类型:腺鼠疫、肺鼠疫和败血症鼠疫。鼠疫菌侵入人体之后能被巨噬细胞吞噬,巨噬细胞内的一系列杀菌机制(低镁离子、抗菌肽、过氧化物等)对其生长是非常不利的,然而鼠疫菌能通过一系列的自我调节,最终能够生存繁殖<sup>[19]</sup>。在这个过程中,由特定的转录调控子对特定靶基因的转录调节,起着至关重要的作用。比如 PhoPQ 系统能感应低镁离子和抗菌肽信号刺激,从而激活  $Mg^{2+}$  转运系统、渗透压调节系统等基因的表达,从而有利于鼠疫菌生存<sup>[20]</sup>。再比如,OxyR 能感应过氧化物信号,激活 *katA* 和 *katY* 的表达,二者编码产物能直接降解过氧



图 2. His-OxyR 对 *dps* 启动子结合的 EMSA 实验结果

Figure 2. EMSA assay of binding of His-OxyR to *dps* promoter region. The positive and minus numbers in the brackets indicated the nucleotide sites upstream and downstream of the translation start (+1), respectively. The radioactively labeled DNA fragment was incubated with increasing amounts of the purified His-OxyR protein, and then subjected to 4% (W/V) polyacrylamide gel electrophoresis. The band of free DNA disappeared with increasing amounts of His-OxyR protein, and a retarded DNA band with decreased mobility turned up, which presumably represented the DNA-OxyR complex. Shown on the right side was the schematic representation of the EMSA design.

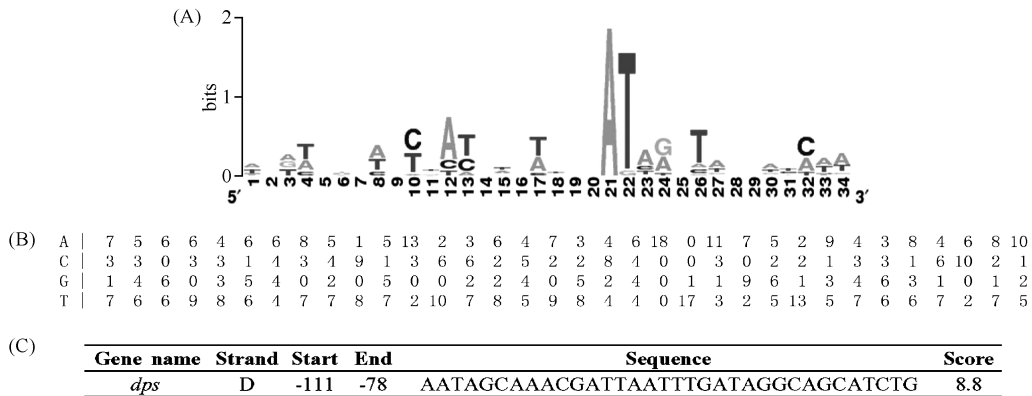


图 3. 鼠疫菌 OxyR 对 *dps* 启动子区的结合序列预测

Figure 3. The OxyR binding sites of *dps* promoter sequence was predicted in *Yersinia pestis*. (A) The sequence logo, generated by the WebLogo tool, representing the binding sites of OxyR. (B) A position frequency matrix describes the alignment of the binding sites, and denotes the frequency of each nucleotide at each position. (C) OxyR binding site of *dps* promoter region. The negative numbers indicate the nucleotide positions upstream of *dps*.

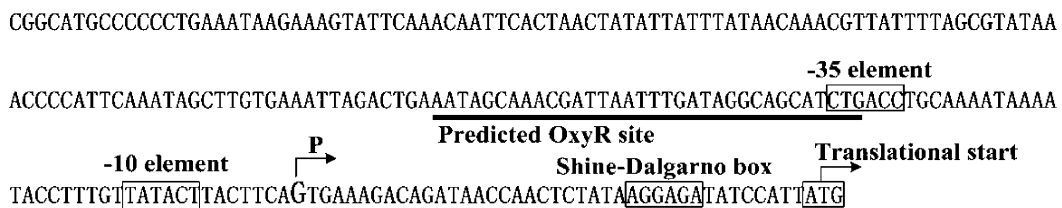


图 4. 鼠疫菌 *dps* 启动子区示意图

Figure 4. Organization of *dps* promoter DNA region. Shown were translation and transcription starts, Shine-Dalgarno box, predicted OxyR sites, and -10 and -35 core promoter elements.

化物<sup>[11]</sup>。本文中,我们利用引物延伸实验、实时定量 RT-PCR、EMSA 等实验技术,验证了 OxyR 还能感应 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号刺激直接激活 *dps* 基因的转录表达。图 4 为 *dps* 启动子区结构:P 为 *dps* 的转录起始位点,-10 和 -35 区为 RNA 聚合酶的识别位点。可以看出 OxyR 的结合位点部分覆盖 -35 区,这表明

OxyR 对 *dps* 的激活可能是通过与 RNA 聚合酶  $\sigma$  亚基的 C-末端结构域 ( $\sigma$ CTD) 相互作用,从而有利于  $\sigma$  亚基对 -10 和 -35 区的结合而实现的。Dps 具有多种功能,能直接参与细菌对过氧化物的抵抗作用,在保护 DNA 的氧化应激损伤中发挥重要作用。可见,鼠疫菌 OxyR 蛋白对 *dps* 的直接激活,可能是鼠疫菌

抗氧化及其能在巨噬细胞内生存的重要机制之一。

## 参考文献

- [ 1 ] Ko KC, Tai PC, Derby CD. Mechanisms of action of escapin, a bactericidal agent in the ink secretion of the sea hare *Aplysia californica*: rapid and long-lasting DNA condensation and involvement of the OxyR-regulated oxidative stress pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(4): 1725-1734.
- [ 2 ] Kim SO, Merchant K, Nudelman R, Beyer WF, Jr Keng T, DeAngelo J, Hausladen A, Stamler JS. OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell*, 2002, 109(3): 383-396.
- [ 3 ] Belkin S, Smulski DR, Vollmer AC, van Dyk TK, LaRossa RA. Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG*::*lux* fusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(7): 2252-2256.
- [ 4 ] Choi SH, Bauml DJ, Kaspar CW. Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 3911-3916.
- [ 5 ] Tao K. oxyR-dependent induction of *Escherichia coli* *grx* gene expression by peroxide stress. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(18): 5967-5970.
- [ 6 ] Altuvia S, Almiron M, Huisman G, Kolter R, Storz G. The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Molecular Microbiology*, 1994, 13(2): 265-272.
- [ 7 ] Thieme D, Grass G. The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis. *Microbiological Research*, 2010, 165(2): 108-115.
- [ 8 ] Calhoun LN, Kwon YM. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110(2): 375-386.
- [ 9 ] Yamamoto K, Ishihama A, Busby SJ, Grainger DC. The *Escherichia coli* K-12 MntR miniregulon includes *dps*, which encodes the major stationary-phase DNA-binding protein. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(6): 1477-1480.
- [ 10 ] Goulter-Thorsen RM, Gentle IR, Gobius KS, Dykes GA. The DNA protection during starvation protein (Dps) influences attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011, 8(8): 939-941.
- [ 11 ] Han Y, Geng J, Qiu Y, Guo Z, Zhou D, Bi Y, Du Z, Song Y, Wang X, Tan Y, Zhu Z, Zhai J, Yang R. Physiological and regulatory characterization of KatA and KatY in *Yersinia pestis*. *DNA and Cell Biology*, 2008, 27(8): 453-462.
- [ 12 ] Straley SC, Bowmer WS. Virulence genes regulated at the transcriptional level by Ca<sup>2+</sup> in *Yersinia pestis* include structural genes for outer membrane proteins. *Infection and Immunity*, 1986, 51(2): 445-454.
- [ 13 ] Zhang Y, Gao H, Wang L, Luo Z, Tan Y, Guo Z, Yang R, Zhou D. Purification of recombinant H-NS protein of *Yersinia pestis* and characterization of its DNA-binding activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(5): 615-621. (in Chinese)  
张义全, 高鹤, 王丽, 罗张, 谭亚芳, 郭兆彪, 杨瑞馥, 周冬生. 鼠疫菌 H-NS 蛋白的表达与纯化及其 DNA 结合活性分析. 微生物学报, 2011, 51(5): 615-621.
- [ 14 ] Gao H, Zhang Y, Yang L, Liu X, Guo Z, Tan Y, Han Y, Huang X, Zhou D, Yang R. Regulatory effects of cAMP receptor protein (CRP) on porin genes and its own gene in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 40.
- [ 15 ] Luo Z, Gao H, Zhang Y, Wang L, Tan Y, Guo Z, Yang R, Zhou D. Expression and purification of important regulatory proteins of *Yersinia pestis* and characterization of their DNA-binding activity. *Letters in Biotechnology*, 2011, 106(04): 468-473. (in Chinese)  
罗张, 高鹤, 张义全, 王丽, 谭亚芳, 郭兆彪, 杨瑞馥, 周冬生. 鼠疫菌重要调控子蛋白的表达纯化及 DNA 结合活性分析. 生物技术通讯, 2011, 106(04): 468-473.
- [ 16 ] Zheng M, Wang X, Doan B, Lewis KA, Schneider TD, Storz G. Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(15): 4571-4579.
- [ 17 ] Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA, Storz G. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(15): 4562-4570.
- [ 18 ] Christman MF, Storz G, Ames BN. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 1989, 86(10): 3484-3488.
- [19] Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*—etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews*, 1997, 10(1): 35-66.
- [20] Zhou D, Han Y, Qin L, Chen Z, Qiu J, Song Y, Li B, Wang J, Guo Z, Du Z, Wang X, Yang R. Transcriptome analysis of the  $Mg^{2+}$ -responsive PhoP regulator in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 250(1): 85-95.

## Transcriptional regulation of *dps* by OxyR protein in *Yersinia pestis*

Bin Ni<sup>1</sup>, Yiquan Zhang<sup>2</sup>, Xinxiang Huang<sup>1</sup>, Ruifu Yang<sup>2</sup>, Dongsheng Zhou<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To study the transcriptional regulation mechanism of *dps* by OxyR in *Yersinia pestis*. [ **Methods** ] Total RNAs were extracted from the wide-type (WT) strain and the *oxyR* null mutant ( $\Delta oxyR$ ). Primer extension assay was used to detect the promoter activity (the amount of primer extension product) of *dps* in WT and that in  $\Delta oxyR$ . Then, quantitative RT-PCR was done to calculate the transcriptional variation of *dps* between the WT and  $\Delta oxyR$ . The entire promoter-proximal region of the *dps* gene was amplified by PCR from *Y. pestis* strain 201. Over-expressed His-OxyR was purified under native conditions with nickel loaded HiTrap Chelating Sepharose columns (Amersham). Then, the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was applied to analyze the DNA-binding activity of His-OxyR to *dps* promoter region *in vitro*. Finally, *Escherichia coli* OxyR consensus was deployed to predict the OxyR binding site to *dps* promoter region. [ **Results** ] The primer extension assay detected only one transcriptional start site located at 40bp upstream of *dps*, whose transcript was under positive regulation by OxyR. The bioinformatics analysis indicated that His-OxyR bound to a single region from 111bp to 78bp upstream of *dps*. [ **Conclusion** ] The transcription of *dps* was directly activated by OxyR in *Yersinia pestis*.

**Keywords:** *Yersinia pestis*, OxyR, *dps*, transcription regulation

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the Open Research Fund Program of the State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity (SKLPBS1112), by the Professional Research Foundation for Advanced Talents of Jiangsu University (10JDG044) and by the Natural Science Foundation for Colleges and Universities in Jiangsu Province (12KJD310001)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-66948594; E-mail: dongshengzhou1977@gmail.com

Received: 27 January 2013/Revised: 18 March 2013