

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202311010



沼泽红假单胞菌 CGA009 砷调控蛋白(ArsR)的调控作用

金春英¹, 崔亮¹, 陈勇男², 杨素萍¹, 赵春贵¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 北京农学院 国际学院, 北京 102206)

摘要: 采用改良的凝胶电泳迁移滞缓(EMSA)法和砷生物传感法研究沼泽红假单胞菌 CGA009 菌株 6 个高度异质性 ArsR 相关蛋白的调控作用。研究表明:6 个 ArsR 相关蛋白都具有 As(III)依赖的调控活性,改良的 EMSA 图谱可用于系统评价 ArsR 的功能;6 个相关蛋白对异种(*E. coli* pR733 or *Staphylococcus aureus* p I 258)的砷抗性操纵子的调控具有不同的选择性,氨基酸序列同源性(甚至低于 30%同源性)的 ArsR 具有砷依赖的调控作用。

关键词: 沼泽红假单胞菌; 砷; 砷调控蛋白; 砷生物传感

中图分类号: Q 811.4

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0618-08

Regulatory Role of Arsenic Regulatory Protein (ArsR) in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009

JIN Chunying¹, CUI Liang¹, CHEN Yongnan²,
YANG Suping¹, ZHAO Chungui¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. International College, Beijing University of Agricultural, Beijing 102206, China)

Abstract: Using a modified gel electrophoretic mobility shift assay (EMSA) method and Arsenic biosensing method, the regulation of six highly heterogeneous ArsR-associated proteins from *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 bacterial strain is investigated. The research results show that six ArsR-associated proteins exhibited As(III)-dependent regulatory activity. The modified EMSA mappings can systematically evaluate the functions of ArsR. Six ArsR-associated proteins have different selectivity in regulating the arsenic resistance operon of different species (*E. coli* pR733 or *Staphylococcus aureus* p I 258). ArsRs with amino acid sequence homology (even with below 30% homology) have arsenic-dependent regulation.

Keywords: *Rhodopseudomonas palustris*; arsenic; arsenic regulatory protein; arsenic biosensing

砷污染导致的环境和人类健康问题已成为全球关注焦点^[1-2]。在与砷的长期博弈中,微生物进化出多种灵巧的抗砷手段,如氧化/还原、甲基化/去甲基化和外排^[3-4]等。细胞中的砷代谢相关蛋白/基因是应对环境砷胁迫的关键角色,但其表达量的差异导致微生物对砷的抗性有较大差异。深入解析微生物

收稿日期: 2023-11-01

通信作者: 赵春贵(1970-),男,教授,博士,主要从事资源微生物的挖掘与利用的研究。E-mail:chungui@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201505026);福建省自然科学基金资助项目(2018J01049)

砷代谢与调控机制,对于微生物修复与治理环境砷污染具有重要意义^[5-6]。砷调控蛋白(Arsenic regulatory protein,ArsR)在砷代谢调控过程中发挥重要作用^[7],对于仅有 1 个 ArsR 基因微生物的砷调控机制已有较深入研究^[8],但很多微生物不只 1 个砷抗性操纵子(Arsenic resistance operons,ars)^[9-12],不同的砷代谢(如砷还原、外排、甲基化及甲基砷氧化等)基因位于不同的 *arsR*,其复杂的表达调控关系及复杂环境中各基因发挥的作用难以预测和研究。

目前,关于多个 *ars* 的调控机制的研究仅在极少数菌株上,主要包括 *Pseudomonas putida* KT2440 (2 个 *arsR*)^[9],*Shewanella* sp. ANA-3(6 个 *arsR*)^[10],*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032(2 个 *arsR*)^[11]和 *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) 5A(4 个 *arsR*)^[12]等。通过转录分析或敲入报告基因方法,研究 *ars* 本身表达调控关系^[13];通过基因敲除和转录分析方法,研究敲除 *arsR* 与特定靶基因表达关系^[12]。*A. tumefaciens* 5A 砷代谢调控是最为复杂的菌株,4 个 ArsR 都具有砷代谢调控活性,同时,还参与其他非砷代谢基因(如 *pstSI* 和 *phoB1*)调控。ArsR 对特定的靶基因调控不但具有高度特异性,也存在交叉调控和重叠调控的现象,甚至同源性较低的多个 ArsR 都参与同一个 *ars* 操纵子调控,但这 4 个 ArsR 彼此之间的互作调控关系还不清楚^[12]。此外,*Shewanella* sp. ANA-3 的 6 个 ArsR 中,只有 1 个 ArsR₂ 同时参与 2 类不同操纵子(*ars* 和 *arr*)的调控,其他 5 个 ArsR 对这 2 个操纵子没有调控作用^[10],但尚不清楚这 5 个 ArsR 是否具有砷依赖的调控活性或参与其他基因调控。由此可见,关于多个 *arsR* 共存菌株的 ArsR 是否具有砷依赖的调控活性及调控选择性的研究尚待深入。

沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*,*R. palustris*)CGA009 是首次证明细菌具有砷甲基化机制的菌株^[14],其基因组拥有 As(V)还原、As(Ⅲ)外排、As(Ⅲ)甲基化和 MAs(Ⅲ)氧化等相关基因。Zhao 等^[15]研究显示该菌株砷甲基化基因响应高质量浓度 As(Ⅲ)表达,但未检测到砷甲基化产物。Yang 等^[16]进一步揭示该菌株的 2 个砷外排蛋白(ArsB 和 Acr3)抑制了砷甲基化。Ke 等^[17]研究表明该菌株的 4 个 ArsR 与 As(Ⅲ)结合能力差异很大,ArsR₂ 活性最高,但其是否具有调控活性尚不清楚。在此基础上,本文对沼泽红假单胞菌 CGA009 砷调控蛋白(ArsR)的调控作用进行研究。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

砷操纵子缺失突变株 *E. coli* AW3110 (Δ *arsRBC*)(北京市中科院朱永官研究员赠送);*R. palustris* CGA009 (BAA-98)(美国 ATCC);*E. coli* BL21 (DE3),BL21 (pET-28a, Kan^r)及 DH5 α (pUC19, Amp^r)保存于实验室;*E. coli* AW3110(pUC19-OP-*gfp-arsR*)设计构建于实验室,其中,*gfp* 基因为报告基因,其登录号为 BAG13002.1。

1.2 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、离心柱型通用型 DNA 纯化回收试剂盒及质粒小提试剂盒(北京市天根生化科技有限公司);Taq DNA 聚合酶、DL2000 Marker、限制性内切酶 *Hind* Ⅲ,*Xho* Ⅰ,*Pst* Ⅰ,*Bam*H Ⅰ,*Kpn* Ⅰ,*Xba* Ⅰ和 T4 DNA 连接酶(上海市百赛生物技术股份有限公司);Trans2K DNA Marker 与 DNA Marker P(北京市全式金生物技术有限公司);蛋白胨与酵母抽提物(美国 OXOID 公司);琼脂糖(北京市索莱宝公司);氨基青霉素和卡那霉素(上海市生物工程股份有限公司);NaAsO₂ (As(Ⅲ)),Merck (德国 Darmstadt)及其他分析纯试剂(北京市国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 培养基和培养条件

在温度为 37 ℃,转速为 200 r·min⁻¹下,培养基为 Lysogeny Broth (LB)液体培养基和固体培养基。CGA009 菌株采用改良的 Ormerod 培养基,在温度为 30 ℃,光照度为 3 000 lx 中静置培养^[15]。

1.4 ArsR 氨基酸序列聚类分析

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载基因或氨基酸序列,采用 MEGA 7.0 软件 (<http://www.megasoftware.net/>)邻接法(neighbor joining)构建基于 ArsR 氨基酸序列系统发育树。

1.5 ArsR 克隆表达纯化和调控活性的测定

以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *ars* 基因。经酶切(*Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ)、连接(T4 连接酶)、转化

BL21 菌株、卡那霉素平板筛选和 PCR 验证^[17],获得重组菌株 BL21(pET-28a-*arsR*)。将 BL21(pET-28a-*arsR*)接种到 $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素 LB 培养基中,培养 6 h,加入 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactoside),在 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 20 h。超声波破碎细胞,收集蛋白提取液,通过 Ni-NTA 柱层析纯化 *ArsR*,采用 SDS-PAGE 进行纯度检测。采用改良的凝胶电泳迁移滞缓(EMSA)法测定 *ArsR*、基因组 DNA 与 As(Ⅲ)三者相互作用^[18]。将纯化的 *ArsR*,基因组 DNA 与 As(Ⅲ)混合($30\text{ }\mu\text{L}$),在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 h,采用琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.6 砷生物传感菌株的构建

1) 砷生物传感系统的组成。由 OP, *arsR* 和 *gfp* 三个基因元件组成砷生物传感系统,砷生物传感菌株的基因元件和酶切位点,如图 1 所示。

2) 基因元件设计和合成。从 NCBI 数据库下载基因元件序列,采用 Snap gene 软件(6.0.2)对基因元件进行分析,并按图 1 设计 OP_{E1}-*arsR*_{E1} (630 bp, *E. coli* J62.1 pR773), OP_S-*arsR*_S (417 bp, *S. aureus* pI258)序列和酶切位点,由苏州金唯智公司合成。

3) *gfp* 扩增和重组。以 5'-CATGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3' 和 5'-CCGGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3' 为引物,以 AW3110(pUC19-Pars-*gfp-arsR*)质粒为模板,PCR 扩增 *gfp*;通过 *BamH* I 和 *Kpn* I 双酶切和 T4 连接酶连接,转化 AW3110 菌株,筛选验证得到重组质粒 pUC19-*gfp*。

4) 砷生物传感体系的构建。将合成的 OP-*arsR* 基因和重组质粒 pUC19-*gfp* 经双酶切(*Hind* III 和 *Xho* I)、连接转化筛选、双酶切(*Hind* III 和 *Xho* I)验证和荧光活性验证,得到 2 个重组菌株,标记为 OP_{E1}-*arsR*_{E1} 和 OP_S-*arsR*_S。

5) 不同 *ArsR* 与 OP_{E1}, OP_S 相互作用生物传感菌株的构建。用待测 *arsR*_i 基因替换重组菌株 OP_{E1}-*arsR*_{E1} 和 OP_S-*arsR*_S 中的 *arsR*_{E1} 和 *arsR*_S。引物序列,如表 1 所示。表 1 中:CTGCAG 和 CTCGAG 为 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切位点,GGATCC 和 GGTACC 为 *BamH* I 和 *Kpn* I 识别位点。不同的 *arsR* 的重组菌株分别标记为 OP_{E1}-*arsR*₁, OP_S-*arsR*₁, *arsR*_{E1} (*E. coli* J62.1 pR773), *arsR*_S (*S. aureus* pI258), *arsR*_{E2} (*E. coli* BL21)和 *arsR*₁~*arsR*₆ (*R. palustris* CGA009)。

表 1 引物序列表
Tab. 1 Primer sequences

基因	序列(正向)5'-3'	序列(反向)5'-3'
<i>arsR</i> ₁	TGCA CTGCAGATGGATAACGATTCGGCCATC	CCG CTCGAGTCAGCAGCAGGGTGTGAGTTC
<i>arsR</i> ₂	TGCA CTGCAGATGGAAGCAAGTGTAGCC	CCG CTCGAGTCAGACATCGACGGTCTC
<i>arsR</i> ₃	TGCA CTGCAGATGGACACTGAAGCACTCTGTTA	CCG CTCGAGTCATGCAGCCCTCGCG
<i>arsR</i> ₄	TGCA CTGCAGATGACCGACACCGCCGATATC	CCG CTCGAGTCAGTGGGCATTGCGGTTCTC
<i>arsR</i> ₅	TGCA CTGCAGATGGATGAGGTCTTCAAAGC	CCG CTCGAGTTACTCATCGCGCGTCTC
<i>arsR</i> ₆	TGCA CTGCAGATGGTGAGTTTCGTTTCATC	CCG CTCGAGCTACTCGTCCGCGTGTTC
<i>arsR</i> _S	CATG GGATCCATGTTGCAACTAACACCACT	CCG GGTACCTTAGATGCAGACAGCCTTAC
<i>arsR</i> _{E1}	CATG GGATCCATGTCTTATAAAGAACTATC	CCG GGTACCTCAACAGTCACCTGATTTCA
<i>arsR</i> _{E2}	TGCA CTGCAGATGTCATTTCTGTTACCC	CCG CTCGAGTTAACTGCAAATGTTCTTAC

1.7 不同 *ArsR* 与 OP_{E1} 和 OP_S 相互作用选择性的测定

将构建的砷生物传感菌株接种到 LB 培养基中培养 10 h,离心收集菌体,重新悬浮菌体,将菌悬液生物量调整至 1.00,将体积分数为 1% 的接种量接种到不同质量浓度的 As(Ⅲ)的 LB 液体培养基中,在温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,离心率为 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中进行培养,在不同时间取样,测定菌体生物量和荧光光谱。以同样的方式培养,在优化测定时间(10 h)取样,测定各重组菌株荧光强度,考察其对 As(Ⅲ)相应的剂量和效应的关系。

在 1 cm 荧光比色杯中,采用分光光度计测定菌悬液在波长 660 nm 的菌悬液中菌体生物量(*D*)。将 *D* 调整为 0.10,采用 F97pro 型荧光分光光度计,激发波长设置为 479 nm,激发单元狭缝为 10.0

nm,发射单元狭缝为 5.0 nm,光电管高压为 780 V,扫描速度为 1 000 nm · min⁻¹,在 1 cm 荧光比色杯中,扫描波长 94~600 nm 的荧光光谱或记录波长为 512 nm 的荧光强度(*F*₅₁₂)。

2 实验结果与分析

2.1 砷调控蛋白(ArsR)系统发育分析

基于 ArsR 氨基酸序列的系统发育分析,如图 2 所示。由图 2 可知:*E. coli* 菌株的 3 个 ArsR 具有较高的同源性,紧密地聚类在一起;*R. palustris* CGA009 的 6 个 ArsR(ArsR₁~ArsR₆)聚类在 3 个大的分支上,同源性差异较大。ArsR₁,ArsR₂,ArsR₄ 和 ArsR₆ 聚类在一个分支上;CGA009 的 ArsR₃ 与 *E. coli* 的 3 个 ArsR 聚在 1 个分支上,但与这 3 个 ArsR 同源性具有较大差异;ArsR₅ 独立在 1 个大的分支上。由此可见,同种不同菌株间的 ArsR 可以具有高度同源性,同一菌株不同的 ArsR 也可以具有高度异质性。

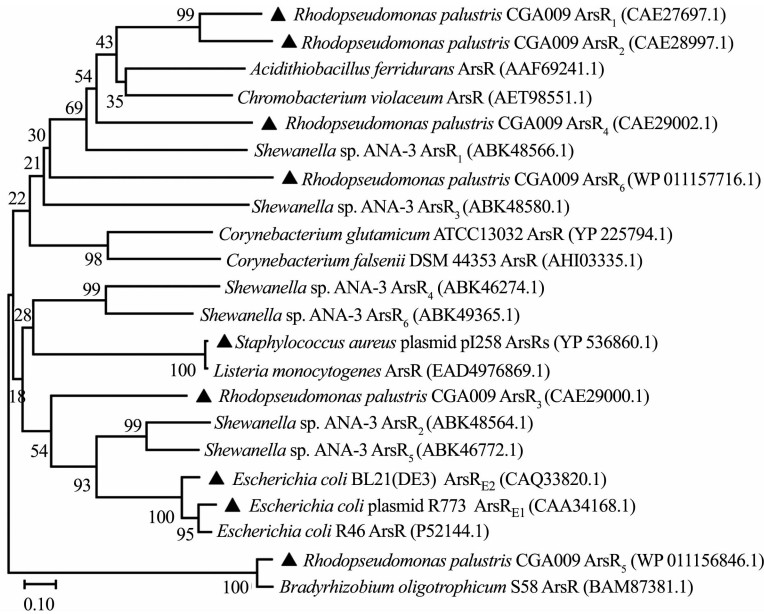


图 2 基于 ArsR 氨基酸序列的系统发育分析

Fig. 2 System phylogenetic analysis based on ArsR amino acid sequences

2.2 ArsR 依赖 As(Ⅲ)调控活性的测定

ArsR 依赖 As(Ⅲ)调控活性的测定,如图 3 所示。图 3 中:1 为蛋白质粗提液;2 为纯化的蛋白质;M 为标准分子量蛋白。

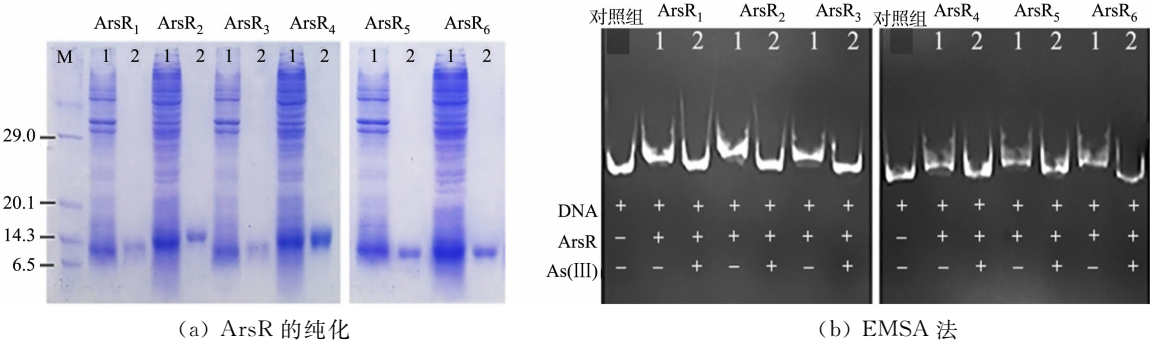


图 3 ArsR 依赖 As(Ⅲ)调控活性的测定

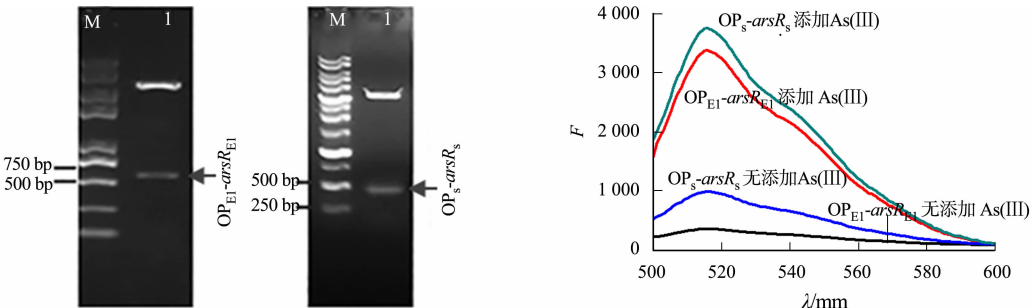
Fig. 3 Determination of ArsR dependent As(Ⅲ) regulatory activity

由图 3(a)可知:经过异源表达、纯化和电泳检测,获得 CGA009 菌株的 6 个 ArsR。基因组 DNA, ArsR 和 As(Ⅲ)三者相互作用的检测结果,如图 3(b)所示。由图 3(b)可知:无砷时,ArsR 可与识别的基因组 DNA 序列结合,使基因组 DNA 电泳迁移率降低;有 As(Ⅲ)时,As(Ⅲ)诱导 ArsR 构象变化,使

其与结合的基因组 DNA 分离,基因组 DNA 电泳迁移率升高。由此可见,无砷时,基因组 DNA 迁移率较低,添加 As(Ⅲ)时迁移率升高,表明 CGA009 的 6 个 ArsR 均具有 As(Ⅲ)诱导基因“开关”的功能。由于基因组 DNA 上拥有不同 ArsR 的所有结合位点,基于基因组 DNA 改良的 EMSA 法能够良好评价 ArsR 的功能,图谱清楚,结果明确。

2.3 砷生物传感体系构建

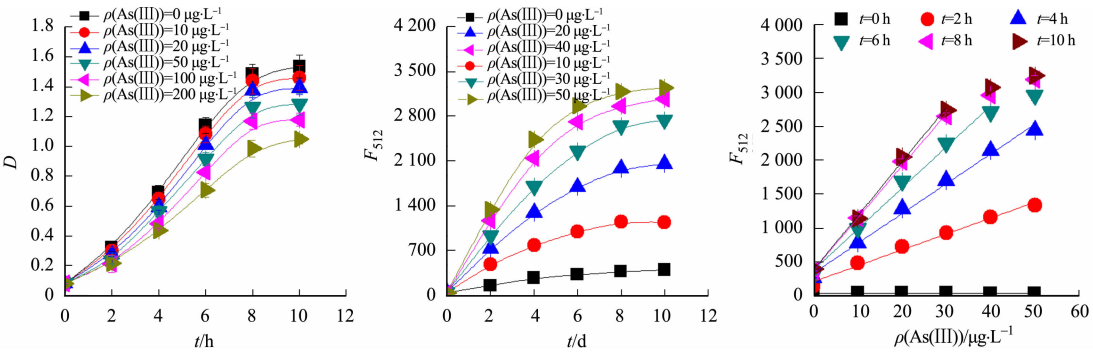
以 *gfp* 为报告基因,构建 $OP_{E1}\text{-ars}R_{E1}$ 和 $OP_S\text{-ars}R_S$ 砷生物传感菌株。重组菌株 $OP_{E1}\text{-ars}R_{E1}$ 和 $OP_S\text{-ars}R_S$ 双酶切验证和荧光光谱,如图 4 所示。图 4 中: F 为荧光强度; λ 为波长。由图 4 可知:电泳条带与预期 $OP_{E1}\text{-ars}R_{E1}$ (630 bp)和 $OP_S\text{-ars}R_S$ (416 bp)DNA 片段条带吻合(图 4(a));与无砷对照相比,添加 As(Ⅲ)能够诱导菌株报告基因(*gfp*)高效表达,荧光强度明显升高(图 4(b)),表明 $OP_{E1}\text{-ars}R_{E1}$ 和 $OP_S\text{-ars}R_S$ 菌株具有 As(Ⅲ)生物荧光传感活性。在此基础上,将这 2 个重组菌株中的 *arsR*_{E1} 和 *arsR*_S 替换成其他菌株的 *arsR*(检测结果未显示),用于研究异种间 OP 和 ArsR 相互作用。



(a) 双酶切验证 (b) 荧光光谱
图 4 重组菌株 $OP_{E1}\text{-ars}R_{E1}$ 和 $OP_S\text{-ars}R_S$ 双酶切验证和荧光光谱
Fig. 4 Verification of $OP_{E1}\text{-ars}R_{E1}$ and $OP_S\text{-ars}R_S$ by enzyme digestion and fluorescence spectra of recombinant strains

2.4 ArsR 与 OP 相互作用条件的确定

As(Ⅲ)对菌株的影响,如图 5 所示。图 5 中: $\rho(\text{As(Ⅲ)})$ 为 As(Ⅲ)质量浓度。由图 5 可知:随着时间延长,菌体 D 和 F_{512} 升高,8 h 基本稳定;随着时间延长,线性关系的斜率升高,本底值也升高,但线性关系范围减小,线性关系范围降至 As(Ⅲ)质量浓度为 $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,8~10 h 直线的斜率和本底值无明显差异;随着 As(Ⅲ)质量浓度的升高,菌株生长速率降低, F_{512} 升高。由此表明,砷生物传感菌株可用于 As(Ⅲ)质量分数的测定,培养时间短,线性范围宽,本底值低,但灵敏度低。因此,研究不同 ArsR 与 OP 的相互作用,选择 As(Ⅲ)质量浓度为 $0\sim50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,培养时间为 10 h。



(a) 生长影响 (b) F_{512} (c) As(Ⅲ)质量浓度与 F_{512}
图 5 As(Ⅲ)对 $OP_{E1}\text{-ars}R_{E1}$ 菌株生长和绿色荧光蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of As(Ⅲ) on the growth and expression of green fluorescent protein of $OP_{E1}\text{-ars}R_{E1}$ strain

2.5 荧光生物传感法检测 ArsR 与 OP 的相互作用

ArsR 为转录抑制蛋白,若不与 OP 识别结合,基因表达将不受抑制,菌株产生 GFP 的荧光;若能相互作用,则抑制基因表达,菌株的荧光强度降低;As(Ⅲ)诱导可解除 ArsR 的转录抑制,使基因表达、菌体荧光强度升高。ArsR 与 OP 的相互作用,如图 6 所示。由图 6 可知:除了 $ArsR_{E1}$ 外, $ArsR_{E2}$ 和 $ArsR_S$

也能与 OP_{E1} 相互作用,抑制菌株 GFP 表达;随着 As(Ⅲ)质量浓度升高,GFP 表达量升高,其余 5 个 ArsR 均不能与 OP_{E1} 相互作用(图 6(a));除了 ArsR_S 外,ArsR₁ 和 ArsR₅ 也能与 OP_S 相互作用,其余 6 个 ArsR 均不能与 OP_S 相互作用(图 6(b))。由此表明,ArsR 具有高度特异性调控作用,但也具有交叉反应的现象,除了菌株自身 ArsR 外,其他不同菌株甚至异种的外源 ArsR 也能发挥调控作用。

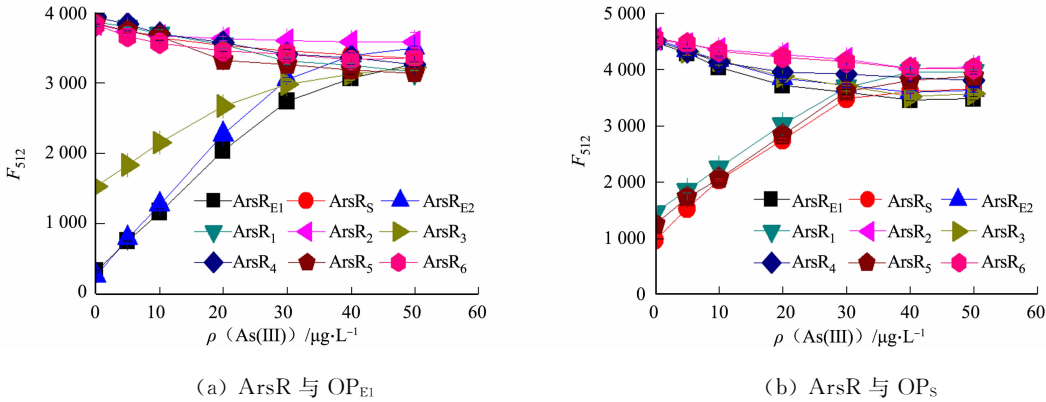


图 6 ArsR 与 OP 的相互作用

Fig. 6 Interaction role between ArsR and OP

将图 6 的 As(Ⅲ)和 GFP 荧光(F_{512})的剂量效应关系进行线性拟合,从定量水平分析 ArsR,OP 和 As(Ⅲ)三者之间的相互作用。不同重组菌株的 F_{512} 对 As(Ⅲ)浓度响应的线性拟合方程,如表 2 所示。表 2 中: k 为斜率,反映砷解除 ArsR 对基因表达的抑制的能力,斜率越大,GFP 表达越高,说明 ArsR 对砷响应活性高,反之则低; b 为截距,反映 ArsR 与 OP 结合能力的大小,截距大,说明 ArsR 与 OP 结合能力弱,反之则强;上标 a,b,c,d,e 表示显著性差异分析,不同字母间具有显著性差异($P<0.05$)。

表 2 不同重组菌株的线性拟合方程

Tab. 2 Linear fitting equations of different recombinant strains

菌株	b	k	R^2
OP _{E1} -ArsR _{E1}	322.9±15.8 ^a	84.49±1.06 ^a	0.998 7
OP _{E1} -ArsR _{E2}	295.5±14.5 ^a	96.03±0.95 ^b	0.996 1
OP _{E1} -ArsR ₃	1 529.0± 22.5 ^b	57.58±1.03 ^c	0.998 6
OP _S -ArsR _S	1 084.1±27.9 ^c	84.53±1.33 ^a	0.976 1
OP _S -ArsR ₁	1 495.1±27.0 ^d	74.93±1.43 ^d	0.996 6
OP _S -ArsR ₅	1 258.9±14.8 ^e	79.18±1.26 ^e	0.998 9

由表 2 可知:与 OP_{E1}-ArsR_{E1} 相比,OP_{E1}-ArsR_{E2} 亲和力相近,但对砷响应活性更高,OP_{E1}-ArsR₃ 亲和力和对砷响应活性则显著降低;与 OP_S-ArsR_S 相比,OP_S-ArsR₁ 与 OP_S-ArsR₅ 对砷响应线性方程的斜率显著降低,OP_{E1}-ArsR_{E1} 的亲和力更高,无砷环境中调控系统更有效,基因本底表达量更低。

3 结论

3.1 ArsR 调控活性

ArsR 在微生物砷代谢调控及砷代谢转化过程中具有重要的作用。对于只有 1 个 *arsR* 菌株而言,*arsR* 通常位于 1 个 *ars* 操纵子上,在无砷的环境中,*ars* 操纵子基因表达产生 ArsR,ArsR 与操纵子的操纵区结合抑制基因表达。当 As(Ⅲ)存在时,可诱导 *ars* 操纵子基因的表达^[18]。在已报道的多个 *arsR* 菌株中,*Shewanella* sp. ANA-3 拥有 6 个 *arsR*,但调控方式则相对简单,只有 ArsR₂ 发挥调控作用,可同时调控 2 种类型操纵子(*ars* 和 *arr*)靶基因的表达,其余 5 个 *arsR* 却未呈现明确的调控作用^[10],但这 5 个 *arsR* 是否具有 As(Ⅲ)依赖的调控活性或参与其他基因调控尚不明确。

EMSA 法和 DNA 足迹法是 2 种经典的定性的研究蛋白质与 DNA 相互作用的方法^[19]。DNA 足迹法能全面地解决 ArsR 功能评价的问题,但需要高灵敏的放射性核素(³²P)标记基因组 DNA,常规使用受限。EMSA 法简单,主要用于评价 ArsR 对特定的基因组 DNA 片段是否具有识别作用,但菌株中不同的 ArsR 识别的基因组 DNA 片段并不清楚,即使 ArsR 对特定基因组 DNA 片段不识别,也不能证

明 ArsR 没有调控活性,ArsR 可能对基因组 DNA 其他区域具有识别作用。在 4 个 *arsR* 相关基因^[17]的基础上,CGA009 菌株又预测了 2 个新型的 *arsR*,但这 6 个 ArsR 识别的基因组 DNA 序列并不清楚。鉴于此,以 CGA009 菌株的 6 个 ArsR 为对象,通过 EMSA 法研究 ArsR、基因组 DNA 和 As(Ⅲ)三者之间的相互作用。结果表明,基于基因组 DNA 改良的 EMSA 法能够全面地评价 ArsR 的功能,且图谱清楚,结果明确;CGA009 菌株的 6 个 ArsR 都具有 As(Ⅲ)依赖的调控活性,但这 6 个 ArsR 的作用位点及其在菌株中调控机制尚不清楚,还有待于进一步的分析。

3.2 ArsR 与基因组 DNA 的识别

ArsR 与 OP 的选择性识别是 ArsR 调控的基础。ArsR 系统发育表明,同种 (*E. coli*) 不同菌株 (BL21, pR733 和 R46) 的 ArsR 的同源性也较高,但同一菌株 (如 CGA009 或 ANA-3) 的不同 *arsR* 同源性差异很大 (图 2),这与文献^[12]在其他菌种 (株) 中分析结果基本一致。在生物进化过程中 *arsR* 可能存在横向转移现象^[12],从理论上分析 ArsR 在异种间应该具有调控作用,但尚未见报道。因此,利用 2 个 OP 序列,构建可替换基因元件的砷生物传感菌株,探讨异种菌株 ArsR、基因组 DNA 和 As(Ⅲ)三者之间的相互作用的可行性。结果发现,外源 ArsR 能在同种不同菌株及异种菌株中发挥调控作用。

A. tummefaciens 5A 拥有 4 个 ArsR,高度同源性 (93%) 的 ArsR₁ 和 ArsR₄ 具有高度的调控特异性,二者不能等效替代;而同源性只有 44% 的 ArsR₁ 和 ArsR₃,却能发生交叉反应^[12]。ArsR 与 OP_{E1} 相关作用表明:与 ArsR_{E1} 同源性为 77% 的 ArsR_{E2} 对 OP_{E1} 识别作用与 ArsR_{E1} 一致,且砷诱导表达活性更高,即 ArsR_{E2} 可替代 ArsR_{E1} 的作用,这与高度同源的 ArsR“不能相互替代”的结果不同^[12];与 ArsR_{E1} 同源性为 42.4% 的 ArsR₃,也能识别 OP_{E1} 发挥调控作用,这与同源性较低的 ArsR 之间能发生交叉反应的结果基本一致^[12];其他 6 个 ArsR 虽然都具有砷依赖的调控活性,但均不能识别 OP_{E1},表明 ArsR 对 DNA 识别又具有高度特异性。

与菌株自身 ArsR_s 相比,同源性低于 30% 的 ArsR₅ (28.6%) 和毫无同源性的 ArsR₁,却能识别异源的 OP_s 发挥调控作用,但同源性相对较高的 ArsR₃ (41%) 却不能识别 OP_s 发挥调控作用。这与文献报道的 ArsR 的特异性调控和交叉调控结果^[12]是一致的,只是显示亲缘关系差别更大、甚至毫无亲缘关系的 ArsR 也具有相互识别调控的作用。

高度同源的 ArsR 彼此之间却没有等效调控作用,表明 ArsR 对基因组 DNA 识别序列具有高度特异性,可能是因为 ArsR 与基因组 DNA 结合域的个别氨基酸差异^[12]。由此可知,同源性很高的 ArsR 由于基因组 DNA 结合域的关键氨基酸不同,ArsR 与基因组 DNA 识别序列特异性也不同;同源性很低甚至毫无同源性的 ArsR 却能识别相同的基因组 DNA 片段,原因可能是 ArsR 与基因组 DNA 结合域的某些氨基酸相似度较高,也可能是识别的基因组 DNA 片段的位点不同。由此可知,ArsR 对基因组 DNA 的识别序列具有丰富的多样性,目前难以准确预测。这可能也是多个 ArsR 菌株的砷代谢调控机制难以分清 ArsR 识别基因组 DNA 位点的原因之一。根据异种已知的基因组 DNA 序列,推测研究菌株中未知的 ArsR 作用位点,还有待进一步研究。

通过改良的 EMSA 法研究 ArsR、基因组 DNA 和 As(Ⅲ)三者之间的相互作用。结果表明,CGA009 菌株的 6 个 ArsR (包括预测的 2 个 ArsR 相关基因) 都具有 As(Ⅲ)依赖的调控活性;由于基因组 DNA 上具有相关 ArsR 全部的识别位点,基于基因组 DNA 改良的 EMSA 法能够良好地评价 ArsR 的功能,图谱清楚,结果明确。采用砷生物传感法研究了异种间 ArsR、基因组 DNA 和 As(Ⅲ)三者之间的相互作用。结果显示,同种不同菌株 (亲缘关系相对较近, ArsR_{E2} 与 OP_{E1}),甚至异种间 (亲缘关系很远 ArsR₁ 和 ArsR₅ 与 OP_s) 的外源 ArsR,也具有相互识别作用,反而一些亲缘关系相对较近 ArsR (ArsR₃ 与 OP_s) 却不能相互作用,表明 ArsR 调控选择性并不是由氨基酸序列的同源性高低决定的,可能与 ArsR 识别基因组 DNA 结构域的关键氨基酸有关,这为深入研究微生物复杂调控机制提供了思路和研究方法。

参考文献:

[1] JOSHI V C, GUPTA A R, INDURKAR P, *et al.* Rationally designed in-chain porous metallo-polymericmicrosphere: A highly efficient and regenerative scavenger for ultra-trace arsenic from water[J]. Chemical Engineering Journal,

- 2022,449;138420. DOI:10.1016/j.cej.20.22.138420.
- [2] WU Jingwen,LIANG Jieliang,BJÖRN L O,*et al.* Phosphorus-arsenic interaction in the ‘soil-plant-microbe’ system and its influence on arsenic pollution[J]. *Science of the Total Environment*,2022,802:149796. DOI:10.1016/j.scitotenv.2021.149796.
- [3] ZHUANG Fan,HUANG Jingyi,LI Hongguang,*et al.* Biogeochemical behavior and pollution control of arsenic in mining areas: A review[J]. *Frontiers in Microbiology*,2023,14:1043024. DOI:10.3389/fmicb.2023.1043024.
- [4] HUANG J H. Impact of microorganisms on arsenic biogeochemistry: A review[J]. *Water Air and Soil Pollution*,2014,225:1848. DOI:10.1007/s11270-013-1848-y.
- [5] BISWAS R,SARKAR A. Microbes: Key players of the arsenic biogeochemical cycle[M]. Cham:Springer International Publishing,2022.
- [6] LI Ping,JIANG Zhou,WANG Yanhong,*et al.* Analysis of the functional gene structure and metabolic potential of microbial community in high arsenic groundwater[J]. *Water Research*,2017,123:268-276. DOI:10.1016/j.waters.2017.06.053.
- [7] WANG Liping,JEON B,SAHIN O,*et al.* Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2009,75(15):5064-5073. DOI:10.1128/aem.00149-09.
- [8] KAUR S,KAMLI M R,ALI A. Role of arsenic and its resistance in nature[J]. *Canadian Journal of Microbiology*,2011,57(10):769-774. DOI:10.1139/W11-062.
- [9] FERNÁNDEZ M,MOREL B,RAMOS J L,*et al.* Paralogous regulators ArsR1 and ArsR2 of *Pseudomonas putida* KT2440 as a basis for arsenic biosensor development[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2016,82(14):4133-4144. DOI:10.1128/aem.00606-16.
- [10] MURPHY J N,SALTIKOV C W. The ArsR repressor mediates arsenite-dependent regulation of arsenate respiration and detoxification operons of *Shewanella* sp. strain ANA-3[J]. *Journal of Bacteriology*,2009,191(21):6722-6731. DOI:10.1128/JB.00801-09.
- [11] SCHRÖDER J,TAUCH A. The transcriptional regulatory network of *Corynebacterium glutamicum*[M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg,2012.
- [12] KANG Y S,BRAME K,JETTER J,*et al.* Regulatory activities of four ArsR proteins in *Agrobacterium tumefaciens* 5A[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2016,82(12):3471-3480. DOI:10.1128/aem.00262-16.
- [13] CHEN Jian,NADAR V S,ROSEN B P. A novel MAs (III) selective ArsR transcriptional repressor[J]. *Molecular Microbiology*,2017,106(3):469-478. DOI:10.1111/mmi.13826.
- [14] QIN Jie,ROSEN B P,ZHANG Yang,*et al.* Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2006,103(7):2075-2080. DOI:10.1073/pnas.0506836103.
- [15] ZHAO Chungui,ZHANG Yi,CHAN Zhuhua,*et al.* Insights into arsenic multi-operons expression and resistance mechanisms in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009[J]. *Frontiers in Microbiology*,2015,6(17):986. DOI:10.3389/fmicb.2015.00986.
- [16] YANG Pengmin,KE Changdong,ZHAO Chungui,*et al.* ArsM-mediated arsenite volatilization is limited by efflux catalyzed by As efflux transporters[J]. *Chemosphere*,2020,239:124822. DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.124822.
- [17] KE Changdong,ZHAO Chungui,RENSING C,*et al.* Characterization of recombinant *E. coli* expressing *arsR* from *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 that displays highly selective arsenic adsorption[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2018,102:6247-6255. DOI:10.1007/s00253-018-9080-8.
- [18] CHEN Xingjuan,JIANG Xin,TIE Cuijuan,*et al.* Contribution of nonconsensus base pairs within ArsR binding sequences toward ArsR-DNA binding and arsenic-mediated transcriptional induction[J]. *Journal of Biological Engineering*,2019,13:1-12. DOI:10.1186/s13036-019-0181-4.
- [19] CHEN Yanxiang,ROSEN B P. Metalloregulatory properties of the ArsD repressor[J]. *Journal of Biological Chemistry*,1997,272(22):14257-14262. DOI:10.1074/jbc.272.22.14257.