

*frtR*基因对变异链球菌产酸及脱矿能力影响的研究*

敬美玲, 卢淼, 郑婷, 龚涛, 李雨庆, 周学东[△]

口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院(成都 610041)

【摘要】目的 研究TetR家族*frtR*基因对变异链球菌产酸能力和诱导牙体脱矿能力的影响。**方法** 检测*frtR*基因框内缺失株($\Delta frtR$)及回复株($\Delta frtR/pDL278-frtR$)的生长情况;通过共聚焦激光扫描显微镜观察菌株的生物膜结构,并用蒽酮-硫酸法定量检测生物膜中的水不溶性胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS);通过糖酵解pH drop实验检测菌株的产酸能力;通过横断显微放射技术(transverse micro radiography, TMR)检测菌株诱导牛牙脱矿的能力。**结果** 菌株生长曲线结果表明*frtR*基因对变异链球菌的生长无明显影响;共聚焦激光扫描显微镜观察结果显示*frtR*基因对变异链球菌生物膜形成无明显影响,硫酸-蒽酮法检测发现*frtR*基因对变异链球菌EPS合成亦无明显影响;糖酵解pH drop实验结果表明,当蔗糖为唯一碳源时,敲除*frtR*基因延缓了变异链球菌的产酸速率;TMR实验结果表明,敲除*frtR*基因降低了变异链球菌在牛牙表面诱导形成的脱矿深度和脱矿量。**结论** *frtR*基因缺失会减弱变异链球菌的产酸能力及诱导牙体组织脱矿能力。

【关键词】 变异链球菌 TetR家族 产酸 磷酸转移酶系统

frtR* Gene Affects Acid Production and Demineralization Ability of *Streptococcus mutans JING Mei-ling, LU Miao, ZHENG Ting, GONG Tao, LI Yu-qing, ZHOU Xue-dong[△]. State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: zhouxd@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of the *frtR* gene of TetR family on the acid production ability of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and the bacteria's ability to induce tooth demineralization. **Methods** The growth of two strains of *S. mutans* UA159, $\Delta frtR$, the *frtR* gene in-frame deletion strain, and $\Delta frtR/pDL278-frtR$, the complement strain, was examined. The structure of biofilm was observed by laser scanning confocal microscopy (LSCM). The quantitative determination of water-insoluble extracellular polysaccharide (EPS) in the bacterial biofilms was done by anthrone-sulfuric acid method. The acid production capacity of *S. mutans* was measured by glycolytic pH drop. The demineralization-inducing ability of the strains on bovine teeth was determined by transverse microradiography (TMR). **Results** The growth curves of the strains showed that *frtR* did not affect the growth of *S. mutans*. According to the findings of LSCM observation, *frtR* did not affect the biofilm formation. According to the findings of the anthrone-sulfuric acid method, *frtR* did not have any significant impact on the EPS synthesis of *S. mutans*. The results of the glycolytic pH drop assay showed that the deletion of *frtR* delayed the rate of acid production by *S. mutans* when sucrose was the only carbon source. In addition, according to the TMR results, knocking out *frtR* reduced the depth and amount of demineralization induced by *S. mutans* on the surface of bovine teeth. **Conclusion** The deletion of *frtR* can weaken the acid production ability and the demineralization ability of *S. mutans*.

【Key words】 *Streptococcus mutans* TetR family Acid production Phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system

龋病是一种多因素复合导致的牙齿硬组织进行性病损,表现为无机物的脱矿及有机物的分解^[1]。变异链球菌是最早发现也是目前研究最多的口腔致龋菌之一,亦是致龋性生物膜中的重要定植菌之一^[2-4]。变异链球菌的主要致龋毒力包括产酸、耐酸和合成胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)等。变异链球菌可以通过磷酸烯醇式丙酮酸依赖的磷酸转移酶系统(the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system, PEP-PTS)和结合蛋白运输系统(binding-protein transport system, BPTS)转运

环境中的糖类物质并将其磷酸化,再通过糖酵解途径将磷酸化的糖发酵为丙酮酸,丙酮酸又可以通过一系列支链途径形成乳酸、甲酸、乙酸等酸性物质^[5-8]。变异链球菌产生的酸性物质可以有效降低牙菌斑微环境的pH值,形成局部酸性位点,促进牙体组织脱矿^[9]。

TetR家族转录因子在细菌中普遍存在,参与新陈代谢、抗生素合成、群体感应、生物膜形成和耐药性等多种生命活动^[10-14]。变异链球菌UA159编码至少18个TetR家族转录因子,其中*frtR*基因已被证实通过调控*frtP*基因表达量影响变异链球菌对氟化物的敏感性^[7, 15]。然而*frtR*基因是否参与调控变异链球菌的产EPS能力、产酸及脱矿

* 国家自然科学基金面上项目(No. 31870065、No. 32170046)资助

[△] 通信作者, E-mail: zhouxd@scu.edu.cn

能力等致龋毒力尚未可知。本研究围绕致龋毒力对变异链球菌 UA159、*fritR* 基因缺失株 ($\Delta fritR$) 和回复株 ($\Delta fritR/pDL278-fritR$) 的产酸能力、EPS 合成能力和诱导牙体组织脱矿能力进行了系统的检测。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株及生长条件

本研究中使用的变异链球菌 UA159 来自于口腔疾病研究国家重点实验室口腔微生物资源库, $\Delta fritR$ 和 $\Delta fritR/pDL278-fritR$ 来自课题组前期制备^[15]。变异链球菌 UA159 及其突变株使用牛脑心浸出液 (BHI, BD) 作为培养基, 在 37 °C, 体积分数分别为 90% N₂、5% CO₂、5% H₂ 环境下培养。培养变异链球菌生物膜时则在 BHI 培养基中添加 1% 蔗糖 (命名为 BHIS 培养基)。过夜培养回复株时, 在 BHI 培养基中添加 1 000 μg/mL 壮观霉素。

1.2 生长曲线

将过夜培养的变异链球菌菌株 1 : 10 稀释至 BHI 培养基中, 继续培养至指数生长期 (600 nm 下的光密度值 (OD₆₀₀) = 0.5), 再用新的 BHI 培养基将其 1 : 100 稀释。将稀释后的菌液加入无菌 96 孔板 (Corning, NY) 中 (200 μL/孔), 并在菌液上覆盖无菌矿物油, 利用无菌 BHI 作为空白对照。使用 Multiskan Spectrum (Thermo, Multiskan Go, USA) 每半小时测量 OD₆₀₀, 每个样本均有至少 3 个重复。

1.3 水不溶性 EPS 定量检测

将过夜培养的变异链球菌菌株 1 : 10 稀释至 BHI 培养基中, 继续培养至指数生长期 (OD₆₀₀ = 0.5), 再用新的 BHIS 培养基将其 1 : 100 稀释。将稀释后的细菌立即转移到无菌 24 孔板 (Corning, NY) (1 mL/孔) 中, 在 37 °C, 体积分数分别为 90% N₂、5% CO₂、5% H₂ 中孵育 24 h。孵育后, 轻轻倒出培养基, 用无菌 PBS 轻柔洗涤生物膜 3 次, 以去除浮游细胞和贴壁疏松的细胞。最后用 1 mL 无菌 PBS 重悬生物膜后, 离心 (6 000 r/min, 10 min, 4 °C)。丢弃上清液后, 重新悬浮细胞颗粒, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 以去除水溶性细胞外多糖。从这些样品中提取的水不溶性 EPS 在 37 °C 下用 1 mol/L NaOH 振荡溶解 2 h。将离心得到的上清液与 3 倍体积的萘酚-硫酸试剂混合, 在 95 °C 水浴中加热 6 min, 冷却至室温后, 测定样本在 625 nm 处的 OD 值并记录。每组实验重复 3 次。

1.4 共聚焦显微镜观察生物膜

将过夜培养的变异链球菌菌株 1 : 10 稀释至 BHI 培养基中, 继续培养至指数生长期 (OD₆₀₀ = 0.5), 再用新的 BHIS 培养基将其 1 : 100 稀释。将稀释后的细菌立即转入含有无菌玻璃圆片的 24 孔板 (Corning, NY) (1 mL/孔)

中, 在菌液中加入 1 μmol/L 的 Alexa Fluor 647 葡聚糖偶联物 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 以标记葡聚糖, 37 °C, 体积分数分别为 90% N₂、5% CO₂、5% H₂ 中孵育 24 h 后, 用双蒸水清洗盖玻片 2 次, 以去除浮游和松散结合的细胞。随后, 用 2.5 μmol/L SYTO 9 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 染色 15 min。采用尼康共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM; Nikon, N-SIM), 60×油浸物镜观察生物膜。SYTO 9 的激光波长设置为 495 ~ 515 nm, Alexa Fluor 647 的激光波长设置为 655 ~ 690 nm, 每个生物膜随机选择 5 个位置进行扫描。除此之外, 利用 COMSTAT 和 Image J 软件分析上述生物膜中的菌体含量及 EPS 含量, 每组样本至少含 3 次重复。

1.5 细菌产酸能力检测

本研究通过糖酵解 pH drop 实验检测细菌的产酸能力^[16]。首先将过夜培养的变异链球菌菌株 1 : 10 稀释至 BHI 培养基中, 继续培养至指数生长期 (OD₆₀₀ = 0.5)。取等体积菌液离心 (4 000 r/min, 10 min, 4 °C), 去除上清, 用等体积 pH = 6.5 的 0.5 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (含 37.5 mmol/L KCl 和 1.25 mmol/L MgCl₂) 重悬菌体沉淀, 离心后用等体积含不同糖 (10 g/L 蔗糖、10 g/L 果糖、10 g/L 葡萄糖) 的上述磷酸钾缓冲液重悬, 间隔相同时间检测并记录溶液 pH 值。每组实验重复 3 次, 计算平均值。

1.6 细菌脱矿能力检测

利用横断显微放射技术 (transverse microradiography, TMR) 检测菌株诱导牙体组织脱矿的能力^[17]。首先选择肉眼观察表面光滑、平整一致且无裂痕无着色无缺损的牛牙 (汶川百瑞农业, 中国), 将其冠根切开。牙冠制备为直径 1 cm、高 0.5 cm 的类圆柱体, 利用 AB 胶包埋样本。后续使用砂纸在牙釉质面开窗, 周围利用指甲油封闭, 检测显微硬度以淘汰已脱矿的样本。剩余的样本经高压蒸汽灭菌处理后, 在含有变异链球菌菌株 (OD₆₀₀ = 0.5) 的 BHIS 培养基中培养 24 h, 后续每天更换新鲜的 BHIS 培养基, 持续 5 d。将处理后的样本切割并打磨抛光至厚度为 100 ~ 150 nm, 再利用横断面显微成像系统 (SOFTX) 通过与标准 “铝阶” 对比, 利用软件 (TMR 2012, Inspektor Research BV, Amsterdam, The Netherlands) 计算样本脱矿深度及脱矿量。

1.7 统计学方法

以上实验均重复 3 次, 每次重复实验均设置 3 组平行对照。组间差异使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行比较, 两两差异用 Student's *t* test 进行比较, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *ftrR* 缺失对变异链球菌生长的影响

如图1所示, $\Delta ftrR$ 的生长曲线相较于 UA159 和 $\Delta ftrR/pDL278-ftrR$, 没有明显差异。这说明 *ftrR* 缺失不影响变异链球菌的生长。

2.2 *ftrR* 缺失对变异链球菌水不溶性EPS合成的影响

通过硫酸-蒽酮法定量检测水不溶性EPS, 发现变异链球菌 UA159、 $\Delta ftrR$ 、 $\Delta ftrR/pDL278-ftrR$ 之间水不溶性EPS合成量无明显差异(图2A)。分别用不同的荧光染料对生物膜中的变异链球菌和水不溶性EPS进行染色, 在共聚焦激光扫描显微镜下观察发现, 变异链球菌 UA159、 $\Delta ftrR$ 、 $\Delta ftrR/pDL278-ftrR$ 之间细菌生物量和水不溶性EPS含量均无明显改变(图2B、图2C)。说明敲除 *ftrR* 不影响变异链球菌水不溶性EPS合成。

2.3 *ftrR* 缺失对变异链球菌产酸的影响

如图3A所示, 在蔗糖作为唯一碳源时, $\Delta ftrR$ 的菌液 pH 值在 7 ~ 19 min 时间段与 UA159 及 $\Delta ftrR/pDL278-ftrR$ 的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。当果糖或葡萄糖作为唯一碳源时, $\Delta ftrR$ 的菌液 pH 值与 UA159 和 $\Delta ftrR/pDL278-$

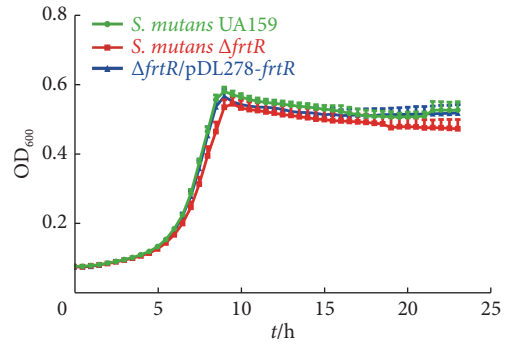


图 1 变异链球菌生长曲线 ($n=3$)

Fig 1 The growth curves of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ($n=3$)

ftrR 之间无明显差异(图3B, 图3C)。以上结果说明, 蔗糖作为唯一碳源时, 敲除 *ftrR* 会延缓变异链球菌的产酸速率。

2.4 *ftrR* 缺失对变异链球菌诱导牙体组织脱矿能力的影响

经变异链球菌 UA159、 $\Delta ftrR$ 和 $\Delta ftrR/pDL278-ftrR$ 处理后的牙体组织都表现出明显的脱矿(图4A)。相比于 UA159 和 $\Delta ftrR/pDL278-ftrR$, $\Delta ftrR$ 在牛牙牙体组织表面诱导形成的脱矿深度和脱矿量均降低 ($P < 0.05$, 图4B、4C)。说明敲除 *ftrR* 会减弱变异链球菌诱导牙体组织脱矿能力。

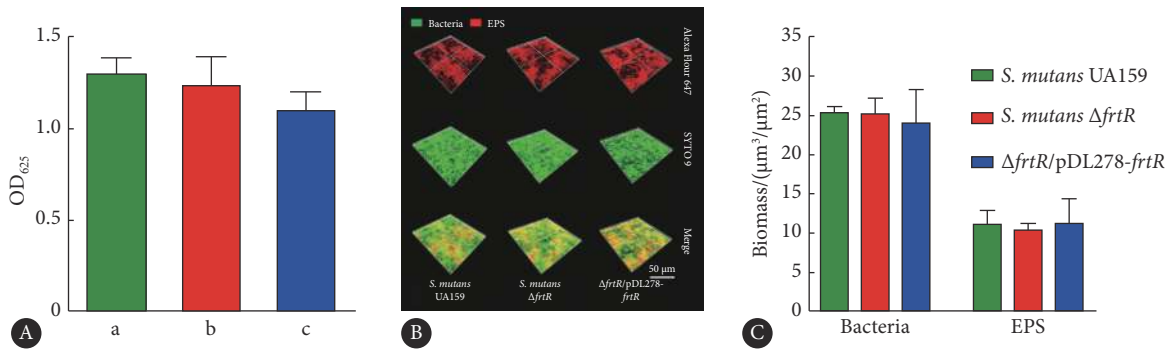


图 2 变异链球菌水不溶性EPS含量及生物膜形成

Fig 2 The water-insoluble EPS content and biofilm formation of *S. mutans* strains

A: Water-insoluble EPS content of biofilms quantified using the anthrone-sulfuric method (a: *S. mutans* UA159, b: *S. mutans* $\Delta ftrR$, c: $\Delta ftrR/pDL278-ftrR$, $n=3$); B: The biofilm dual-labeled images of EPS (red, Alexa Flour 647) and bacteria (green, SYTO 9), which were captured using a 60 \times oil immersion objective; C: The quantitative analysis of biofilms performed using COMSTAT and Image J ($n=3$).

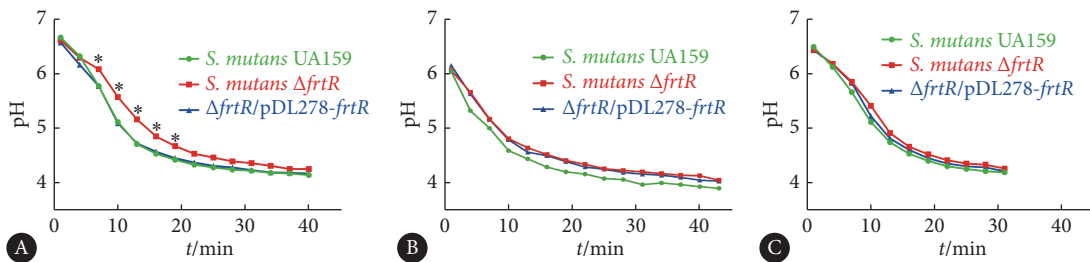


图 3 变异链球菌在不同生长环境下的产酸能力

Fig 3 Acid production of *S. mutans* under different growing conditions

Glycolytic pH drop of *S. mutans* solution with 1% sucrose (A), 1% fructose (B) and 1% glucose (C). $n=3$, $*P < 0.05$, vs. UA159 and $\Delta ftrR/pDL278-ftrR$.

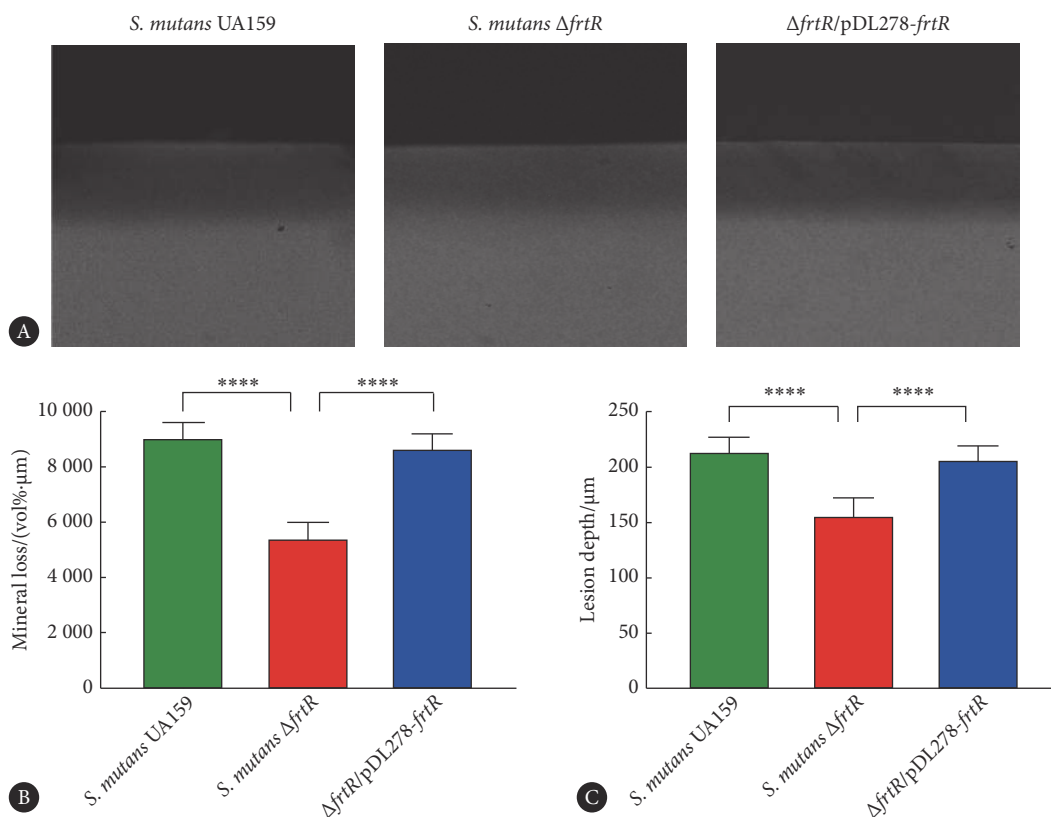


图 4 变异链球菌菌株诱导牙釉质脱矿的检测结果

Fig 4 Measuring enamel demineralization induced by *S. mutans*

A: The cross-section of demineralized enamel by transverse microradiography (TMR); B: The mineral loss of enamel; C: The depth of enamel lesion. $n=5$, **** $P<0.01$.

3 讨论

本研究发现 $ftrR$ 基因缺失会导致变异链球菌在蔗糖环境中产酸能力下降以及诱导牙体组织脱矿能力显著降低,说明 $ftrR$ 基因除了参与调控变异链球菌的氟化钠敏感性^[15],还参与调控变异链球菌的产酸能力和诱导牙体组织脱矿能力。

在龋病的发生发展过程中,细菌会代谢环境中的碳水化合物产生酸性物质,环境的酸化是打破牙釉质脱矿与再矿化平衡,诱导牙体组织脱矿能力的重要原因之一^[18-19]。变异链球菌的产酸途径受到多种因素调控,转录因子在其中起着重要的作用。研究发现,转录因子Rex可以通过调控变异链球菌中乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)的表达影响丙酮酸转化乳酸途径^[20-21]。CcpA和CodY直接调控变异链球菌中磷酸转乙酰酶(phosphotransacetylase, Pta)和乙酸激酶(acetokinase, Ack)的转录,从而影响丙酮酸转化乙酸途径^[22]。在本研究中,敲除 $ftrR$ 会导致变异链球菌产酸能力减弱,但根据前期研究中 $\Delta ftrR$ 的转录组分析,敲除 $ftrR$ 对变异链球菌 ldh 、 pta 、 ack 的转录表达均没有显著影响^[15],这说明 $ftrR$ 可能不是通过调控丙

酮酸转化为乳酸和乙酸途径关键酶的转录起作用。

TetR家族转录因子已被证明与多种细菌的毒力表型相关^[23-25]。除此之外,研究发现TetR家族转录因子参与调控脂肪酸、甘油、烟酸、苯乙酸和间苯二酚等不同碳分解代谢途径^[25-28]。在前期研究中,我们发现与变异链球菌UA159相比, $\Delta ftrR$ 中有16个差异表达基因与碳水化合物的转运和代谢相关,其中13个下调,3个上调^[15]。经过GO富集分析发现,这16个差异表达基因又多与PEP-PTS相关,例如 $smu.115$ (果糖特异性酶II A)、 $smu.114$ (果糖特异性酶II BC)、 $smu.1961c$ (N-乙酰半乳糖胺特异性酶II A)、 $smu.1598$ (纤维二糖特异性酶II A)、 $smu.1600$ (纤维二糖特异性酶II B)、 $smu.1596$ (纤维二糖特异性酶II C)、 $lacF$ (乳糖特异性酶II A)和 $lacE$ (乳糖特异性酶II BC)在 $\Delta ftrR$ 中显著下调,而 $smu.100 \sim smu.103$ (甘露糖特异性酶II ABCD)显著上调^[15]。这提示 $ftrR$ 可能参与调控变异链球菌碳水化合物转运及代谢途径。

综上所述,本研究发现TetR家族基因 $ftrR$ 与变异链球菌产酸能力和诱导牙体组织脱矿的能力密切相关,进一步说明 $ftrR$ 是一个潜在的抗龋作用靶点。在后续的研究中,本课题组将会就碳水化合物的转运与代谢和变异链

球菌产酸及诱导牙体组织脱矿能力之间的分子机制进行探究,并且进一步研究*fritR*调控碳水化合物的转运与代谢的具体作用机制。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] MACHIULSKIENE V, CAMPUS G, CARVALHO J C, *et al.* Terminology of dental caries and dental caries management: Consensus report of a workshop organized by ORCA and cariology research group of IADR. *Caries Res*, 2020, 54(1): 7–14.
- [2] VALM A M. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J Mol Biol*, 2019, 431(16): 2957–2969.
- [3] BOWEN W H, BURNE R A, WU H, *et al.* Oral biofilms: Pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol*, 2018, 26(3): 229–242.
- [4] 陈婧, 程磊, 周学东, 等. 龋病微生物因素研究进展. *华西口腔医学杂志*, 2018, 36(1): 104–108.
- [5] VADEBONCOEUR C, PELLETIER M. The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 19(3): 187–207.
- [6] TAKAHASHI N. Oral microbiome metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?" *J Dent Res*, 2015, 94(12): 1628–1637.
- [7] AJDIĆ D, MCSHAN W M, MCLAUGHLIN R E, *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(22): 14434–14439.
- [8] ZENG L, BURNE R A. Molecular mechanisms controlling fructose-specific memory and catabolite repression in lactose metabolism by *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol*, 2021, 115(1): 70–83.
- [9] SEKIYA M, IZUMISAWA S, IWAMOTO-KIHARA A, *et al.* Proton-pumping F-ATPase plays an important role in *Streptococcus mutans* under acidic conditions. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 666: 46–51.
- [10] 吴攀攀, 李博文, 陈克涛, 等. TetR家族转录调控因子配体的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2379–2392.
- [11] WANG K, SYBERS D, MAKLAD H R, *et al.* A TetR-family transcription factor regulates fatty acid metabolism in the archaeal model organism *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1542.
- [12] GRAU F C, JAEGER J, GROHER F, *et al.* The complex formed between a synthetic RNA aptamer and the transcription repressor TetR is a structural and functional twin of the operator DNA-TetR regulator complex. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(6): 3366–3378.
- [13] ZHOU S, BHUKYA H, MALET N, *et al.* Molecular basis for control of antibiotic production by a bacterial hormone. *Nature*, 2021, 590(7846): 463–467.
- [14] 倪静姝, 汪焰胜, 吴杭, 等. 放线菌中与抗生素合成相关TetR家族转录因子的研究进展. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 407–414.
- [15] LU M, XIANG Z, GONG T, *et al.* Intrinsic fluoride tolerance regulated by a transcription factor. *J Dent Res*, 2020, 99(11): 1270–1278.
- [16] VIJAYAKUMAR K, MUHILVANNAN S. 3, 5-Di-tert-butylphenol combat against *Streptococcus mutans* by impeding acidogenicity, acidurance and biofilm formation. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(12): 202.
- [17] FAN M, ZHANG M, XU H, *et al.* Remineralization effectiveness of the PAMAM dendrimer with different terminal groups on artificial initial enamel caries *in vitro*. *Dent Mater*, 2020, 36(2): 210–220.
- [18] ABRANCHES J, ZENG L, KAJFASZ J K, *et al.* Biology of oral *Streptococci*. *Microbiol Spectr*, 2018, 6(5): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
- [19] PITTS N B, ZERO D T, MARSH P D, *et al.* Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17030[2021-10-15]. <https://www.nature.com/articles/nrdp201730>. doi: 10.1038/nrdp.2017.30.
- [20] BITOUN J P, WEN Z T. Transcription factor Rex in regulation of pathophysiology in oral pathogens. *Mol Oral Microbiol*, 2016, 31(2): 115–124.
- [21] BITOUN J P, LIAO S, YAO X, *et al.* The redox-sensing regulator Rex modulates central carbon metabolism, stress tolerance response and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44766[2021-10-15]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044766>.
- [22] KIM J N, BURNE R A. CcpA and CodY coordinate acetate metabolism in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(7): e03274–16[2021-10-15]. <https://doi.org/10.1128/AEM.03274-16>.
- [23] COLCLOUGH A L, SCADDEN J, BLAIR J M A. TetR-family transcription factors in Gram-negative bacteria: conservation, variation and implications for efflux-mediated antimicrobial resistance. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 731.
- [24] SARANATHAN R, PAGAL S, SAWANT A R, *et al.* Disruption of tetR type regulator *adeN* by mobile genetic element confers elevated virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 2017, 8(7): 1316–1334.
- [25] DONG W, NIE X, ZHU H, *et al.* Mycobacterial fatty acid catabolism is repressed by FdmR to sustain lipogenesis and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(16): e2019305118[2021-10-15]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019305118>.
- [26] CHRISTEN S, SRINIVAS A, BÄHLER P, *et al.* Regulation of the Dha operon of *Lactococcus lactis*: A deviation from the rule followed by the Tetr family of transcription regulators. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 23129–23137.
- [27] JIMÉNEZ J I, JUÁREZ J F, GARCÍA J L, *et al.* A finely tuned regulatory circuit of the nicotinic acid degradation pathway in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol*, 2011, 13(7): 1718–1732.
- [28] CHENG M, PEI D, HE X, *et al.* The operon encoding hydrolytic dehalogenation of 4-chlorobenzoate is transcriptionally regulated by the TetR-type repressor FcbR and its ligand 4-chlorobenzoyl coenzyme A. *Appl Environ Microbiol*, 2021, 87(6): e02652-20[2021-10-15]. <https://doi.org/10.1128/AEM.02652-20>.

(2021-10-14收稿, 2021-12-14修回)

编辑 余琳