

蜡状芽胞杆菌转录激活子 PlcR 调控多基因的表达

王 玲^{1,2} 陈亚华^{1,2} Mahillon J² 喻子牛^{1*}

(¹ 华中农业大学生命科学技术学院 农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

(² *Laboratory of Microbial Genetics University of Louvain B-1348 Louvain-La-Neuve Belgium*)

摘 要:蜡状芽胞杆菌是一种条件致病菌,它能引起食物中毒和其它形式的疾病。潜在的致病因子包括磷脂酶 C、溶血素、肠毒素和呕吐毒素等。在很多致病菌中致病因子的表达都是协同调控的。从蜡状芽胞杆菌模式菌株 ATCC14579 经转座子诱变的文库,筛选到一株磷脂酶阴性的突变子,该突变子的蛋白酶活性明显减弱了。插入位点的序列分析表明,一个高度同源苏云金芽胞杆菌转录激活子 PlcR 的基因被插入失活了。研究结果表明,除在苏云金芽胞杆菌中能激活磷脂酰肌醇磷脂酶 C 基因的转录外,转录激活子 PlcR 至少还能调控卵磷脂酶和一个或多个蛋白酶基因的表达,这是一个多效调节因子。

关键词:蜡状芽胞杆菌,转座诱变,转录激活子 PlcR,表达调控

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 03-0304-06

蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 是一种能运动、产生内生芽胞的土壤腐生菌,作为一种条件致病菌日益引起人们的注意^[1]。它引起的主要疾病为食物中毒综合症,如呕吐和腹泻等,此外,它也引起其它形式的感染和中毒。蜡状芽胞杆菌能够产生多种胞外生物活性物质,如溶血素、磷脂酶 C、蛋白酶、呕吐毒素和肠毒素等,其中一些被认为与它的致病性有关^[2]。苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 能产生杀虫晶体蛋白和各种酶类,广泛用于防治农业、林业和储藏物害虫,以及医学昆虫,它是蜡状芽胞杆菌的一个近缘种^[3,4]。

在细菌致病性的研究中,突变子的筛选和分析是一种有效的遗传分析方法。最近, Léonard 等^[5] 建立了一个蜡状芽胞杆菌的转座子诱变系统,该系统不仅能对蜡状芽胞杆菌及相近革兰氏阳性细菌进行有效的转座突变,还能对突变子的物理图谱、遗传图谱、插入位点序列进行快速地分析。本文利用该系统对蜡状芽胞杆菌模式菌株 ATCC14579^T 进行诱变,得到的转座子诱变文库,并从中筛选得到一个卵磷脂酶和总蛋白酶活性均减弱的突变子。对该突变子插入位点的序列分析表明,一个高度近似于苏云金芽胞杆菌转录激活因子 PlcR 的基因被插入失活,而 PlcR 在苏云金芽胞杆菌中是磷脂酰肌醇磷脂酶 C 基因的正调控因子。以上结果表明蜡状芽胞杆菌的转录激活因子 PlcR 至少还能调控卵磷脂酶和一个或多个蛋白酶基因的表达,是一种多效调节子。本文报道这些研究结果。

* 通讯作者

作者简介:王 玲(1970-),女,湖北省江陵市人,华中农业大学 1999 年微生物专业硕士研究生毕业,赴美国休斯顿大学攻读博士学位。

收稿日期:2000-04-03, **修回日期:**2000-10-04

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒(表 1)

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Name	Features	Source
Strains		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 ^T	Type strain	Léonard, <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus cereus</i> AH183KB	ATCC14579 with Tn-4430::mini-IS231A, Km ^r	Léonard, <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus cereus</i> WL200	AH183KB with PleR::mini-IS231A, Km ^r , Sp ^r	This study
<i>Bacillus thuringiensis</i>		Lab stock
<i>E. coli</i> TG1	Cloning host	Lab stock
Plasmids		
pBluescriptSK	Cloning vector, ori, Ap ^r	Stratagen, USA
pWL200S2	pBluescript with a Sall fragment containing The mini-IS231A-Sp and upstream sequence	This study

1.2 培养基和培养方法

蜡状芽胞杆菌和大肠杆菌均用 LB 培养基(固体培养基加 2% 琼脂)^[6]。培养温度:蜡状芽胞杆菌 28℃,大肠杆菌 37℃。根据需要,加抗生素:卡拉霉素(Km, 25μg/mL)、壮观霉素(Sp, 大肠杆菌 200μg/mL, 蜡状芽胞杆菌 400μg/mL)和氨苄青霉素(Ap, 100μg/mL)。

1.3 卵磷脂酶活性

卵磷脂酶活性采用卵黄平板进行测定,卵黄平板的制备参考 Gerhardt 等^[7]。细菌采用点种或涂布的方法接种于平板的表面,培养 24h 后观察,菌落周围有浑浊带为阳性反应,否则为阴性。

1.4 总蛋白水解酶活性

菌株总蛋白酶活性用分解明胶的能力来测定,培养基制备和测定的方法参照文献^[7]。

1.5 溶血反应

单菌落点种于马血平板上,适宜温度培养过夜,菌落周围出现有一透明圈为阳性反应,否则为阴性。血平板购自 Sanofi Diagnostics S.A.(法国)。

1.6 DNA 的制备

芽胞杆菌总 DNA 采用小量抽提^[8]。大肠杆菌采用美国 GENOMED 公司的 JETSTAR 质粒纯化系统提取。

1.7 大肠杆菌的转化方法

质粒 DNA 采用电转化的方法导入大肠杆菌,大肠杆菌感受态细胞的制备和转化参考 Sambrook 等^[6]方法。

1.8 DNA 序列测定与分析

DNA 序列由比利时 EUROGENTEC 公司测定,引物为 5'-TCATCCTTCTAGTTAGC-3'。该

引物可以读出插入位点 mini-IS231A 上游的序列(以抗生素基因转录方向为标准)。DNA 和蛋白质序列分析以及数据库采用 GCG 软件(美国 Genetic Computer Group)。

2 结果和讨论

2.1 卵磷脂酶活性突变子的筛选

Léonard 等^[5]建立了一种对蜡状芽胞杆菌进行物理和遗传图谱综合分析的方法。该系统采用了两种自杀质粒, pGIC055 和 pGIC057^[8], 两者之间唯一区别是插入序列 mini-IS231A 上含有不同的抗生素基因, 前者含有壮观霉素抗性基因, 后者含有卡拉霉素抗性基因, 其复制子都为温度敏感型。在构建文库时, 首先将 pGIC057 转化到蜡状芽胞杆菌 ATCC14579 中, 先 28℃ 培养, 让转座发生(由于插入序列 mini-IS231A 上的转座酶基因被放在方向重复序列的外侧, 所以转座只会发生一次), 然后利用高温 46℃ 培养, 丢掉温度敏感的载体, 从中挑取一个突变子 AH183KB, 用 pGIC055 进行第二轮转化, 同样经过先低温后高温地培养, 最后得到 ATCC14579 的转座子诱变文库^[5]。

本研究利用含有卡拉霉素和壮观霉素的卵黄平板筛选 ATCC14579 的转座子诱变文库, 28℃ 培养 24h 后观察结果。最后从大约 1500 个菌落中, 共筛得 9 个卵黄反应阴性的菌株。从这 9 个菌株中提取总 DNA, 用 Hind III 酶切后(mini-IS231A 中无 Hind III 酶切位点), 在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳, 将之转到尼龙膜上, 与插入序列 mini-IS231A 上的壮观霉素基因作探针进行杂交。显影后, 发现所有菌株各有一条显影带, 并且到点样孔距离相等(结果未显示), 这些结果说明插入序列在这几株菌中的插入位置相同。将这类突变子被命名为 WL200, 该突变子与菌株 ATCC14579 和突变子 AH183KB 同时在卵黄平板上培养, 24h 后观测卵磷脂酶活性的差异。结果显示, 突变子 WL200 的卵磷脂酶活性水平较出发菌 ATCC14579 和突变子 AH183KB 大幅度降低。

2.2 突变子的溶血活性和总蛋白酶活性测定

分别将原始菌株 ATCC14579、突变子 AH183KB 和 WL200 接种于血平板和明胶平板上, 28℃ 培养 24h 后观察结果。三者的溶血活性没有明显差别(结果未显示), 但它们分解明胶能力则有所不同, 其中突变子 WL200 的分解明胶的活性明显减弱, 如图 1 所示。

2.3 插入位点的序列分析

提取突变子 WL200 的总 DNA, 利用限制性内切酶 Sal I 位点与载体 pBluescript 进行重组, 然后转化到大肠杆菌 TG1 中, 在含有壮观霉素和氨苄青霉素的抗性平板上筛选克隆。从克隆子 WL200S2 中提取质粒 pWL200S2, 进行序列分析, 得到了插入位点 mini-IS231A 上游的部分核苷酸序列, 将之与数据库中的已知序列比较, 发现该序列与苏云金芽胞杆菌的转录调节基因 *plcR* 高度同源, 它们的核苷酸序列

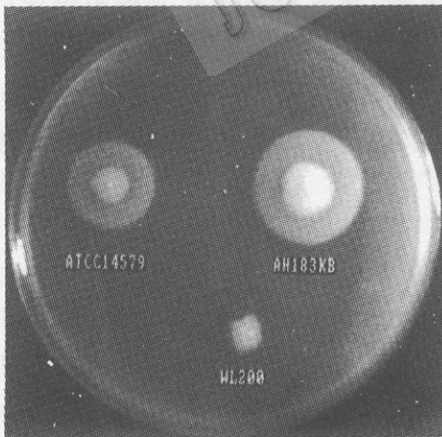


图 1 原始菌株和突变子的总蛋白酶活性比较

Fig.1 Comparison of proteolytic activity

ATCC14579 *Bacillus cereus* strain; AH183KB

Bacillus cereus mutant; WL200 *Bacillus cereus* mutant.

相似性为 96% (图 2), 由此推断出的氨基酸序列同一性为 96%, 相似性为 100% (图 3)。mini-IS231A 插入在 *plcR* 基因的 40/41 碱基对之间 (图 4)。

```

.3  gtgatgagaggattaacacagaaacagttatccgataatatatgcatcaatcggaagtg 62
.43  gtggtgagaggattaacacaaaaacagttatccgagaacatatgcatcaatcggaagta 102
.63  agtagaattgaatcggggtgcgggtatacccaagtatggatattgcaaggatccgagca 122
103  agcagaattgaatcggggtgcaggtatacccaagtatggatattgcaaggattgagca 162
123  aaattacaagttcctattattcatttttatgagggtactcatttattccgatattgaaaga 182
163  aaattacaattcccattattcatttttatgagggtactcatttattccgatattgaaaga 222
183  aaaaaacagtttaaaagatcaaatcattatgctttgtaagcaaaaaagatataaagaaatt 242
223  aaaaaacagtttaaaagatcaagtcattatgctttgtaagcaaaaaagatataaagaaatt 282
243  tataataaagtatggaatgagctgaaaaaggaagaatatcatcctgaattccagcaat 300
283  tataataaagtatggaatgagctgaaaaaggaagaatatcatcctgaattccagcaat 340

```

图 2 插入失活基因与苏云金芽胞杆菌 *plcR* 基因核苷酸序列比较

Fig.2 Comparison of Nucleotide Sequence of *plcR* Gene in *Bacillus thuringiensis* and Insertional Inactivation Gene (The previous is sequence of insertional inactivation gene, the latter is sequence of *plcR*)

```

1  MRGLTQKQLSDNICHQSEVSRIESGAVYPSMDILQGIAAKLQVPIIHFYEVLIYSDIERK 60
+RGLTQKQLS+NICHQSEVSRIESGAVYPSMDILQGIAAKLQ+PIIHFYEVLIYSDIERK
16  LRGLTQKQLSENICHQSEVSRIESGAVYPSMDILQGIAAKLQIPIIHFYEVLIYSDIERK 75
61  KQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVVNELKKEEYHPEFQFL 100
KQFKDQ+IMLCKQKRYKEIYNKVVNELKKEEYHPEFQFL
76  KQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVVNELKKEEYHPEFQFL 115

```

图 3 插入失活基因与 *plcR* 氨基酸序列比较

Fig.3 Comparison of Amino Acid Sequence of *plcR* Gene and Insertional Inactivation Gene (The previous is sequence of insertional inactivation gene, the latter is sequence of *plcR*)

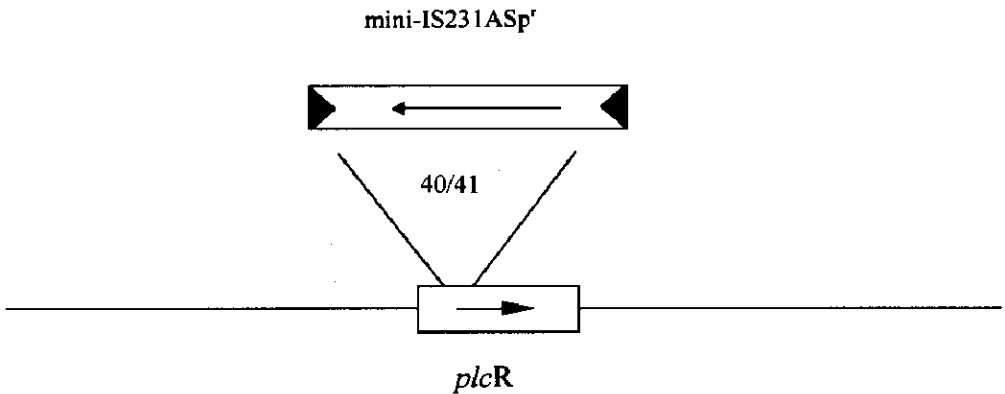


图 4 mini-IS231A Sp' 插入位点示意图

Fig.4 Sketch map of mini-IS231A *spr* insertion site Arrow; Stands for gene; Black triangle; Stands for reverse repeated sequence.

3 讨论

Lereclus 等^[9]在研究特异性水解磷脂酰肌醇的磷脂酶 C (PI-PLC) 在苏云金芽胞杆菌生长的各阶段的活性时, 发现该酶产量在对数生长期非常低, 而在稳定期开始上升, 由此发现 *plcR* 对编码该酶基因 (*plcA*) 的调节, 此外转录激活因子 PlcR 还能正调控自身的转录。

本研究中, 突变子 WL200 的 *plcR* 基因被 mini-IS231A Sp^r 基因插入失活, 该基因与苏云金芽胞杆菌的 *plcR* 基因同源性高, 其氨基酸序列相等性高达 96%。同原始菌株 ATCC14579 和 AH138KB 相比, 突变子 WL200 卵磷脂酶活性极弱, 表明该酶表达减弱, 同样地, 明胶分解实验是一个综合测定菌株蛋白酶活性的指标, 突变子 WL200 分解明胶能力的减弱表明, 该菌株中一种或多种蛋白酶的表达减少, 由此可推知, 该突变子影响了多个基因的表达。

致病因子的共同调节现象也出现在苏云金芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) 中。昆虫病原菌苏云金芽胞杆菌的一个非致病的突变子对噬菌体有抗性, 它的 PI-PLC、卵磷脂酶、 β -内酰胺酶和鞭毛素的表达因 mRNA 的缺少而相应地减少, 显示出这些因子受到了联合调控^[10]。

炭疽芽胞杆菌的致病菌含有两种质粒 pXOI 和 pXO2, pXOI 质粒含有编码三种炭疽毒素蛋白的基因: *cya*、*lef* 和 *pag*。这三种基因都有不同的转录起始, 它们的表达受到另一个位于质粒 pXOI 上的基因 (*atxA*) 的调控, 该基因编码一种转录激活子, *atxA* 突变子中这三种毒素基因的转录降低, 不仅如此, *altA* 基因产物在活体内对毒素表达也起调节作用^[11]。

致谢 在手稿的整理和修改过程中, 花费了硕士研究生李璐不少心血, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Fernanian C, Fremy J, Lahellec C. *J Rap Meth Autom Microbiol*, 1993, 2: 83 ~ 134.
- [2] Granum P E, Lund T. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 157(2): 223 ~ 228.
- [3] 李 林, 刘子铎, 孙 明, 等. 农业生物技术学报, 1998, 6(1): 90 ~ 95.
- [4] 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990.
- [5] Léonard C, Zekri O, Mahillon J. *Infect Immun*, 1998, 66: 2163 ~ 2169.
- [6] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Gerhardt P H, Murray R G E, Costilow R N, et al. *Manual of Methods for General Bacteriology*, Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1981.
- [8] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995.
- [9] Lereches D, Agaisse H, Gominet M, et al. *J Bacteriol*, 1996, 178: 2749 ~ 2756.
- [10] Zhang M Y, Lovgren A M G, Landen R. *Infect Immun*, 1993, 61: 4947 ~ 4954.
- [11] Dai Z, Sirard J C, Mock M, et al. *Mol Microbiol*, 1995, 16(6): 1171 ~ 1181.

TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR PlcR REGULATE THE EXPRESSION OF MULTIPLE GENES IN *BACILLUS CEREUS*

Wang Ling^{1,2} Chen Yahua^{1,2} Mahillion J² Yu Ziniu^{1*}

(¹ Department of Microbial Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Agro-Microbiology, Ministry of Agriculture, Wuhan, 430070, China)

(² Laboratory of Microbial Genetics, Catholic University of LouvainB-1348 Louvain-la-neuve Belgium)

Abstract: Food-poisoning and some diseases of human can be caused by potential pathogenic factors including phospholipases of c-type, hemolysins, enterotoxins, emetic toxin and others from *Bacillus cereus* which is an opportunistic pathogen. Generally, the expression of pathogenic genes is completed by a co-regulation in many bacteria. The isolation of a mutant, displaying significant reducing expression of lecithinase and general proteolytic activities, from a transposon-induced bank of *B. cereus* type strain ATCC14579T were described. Sequencing data revealed that a gene with high homology to transcriptional activator (plcR) of *B. thuringiensis* was inactivated by insertion in this mutant. The results suggest that plcR regulates the expression of multiple genes in *B. cereus*.

Key words: *Bacillus cereus*, Transposon-induced mutagenesis, Transcriptional activator PlcR, Expression regulation

* To whom correspondence should be addressed

※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※

《微生物学报》2001 年征稿计划

为适应新世纪我国生物科技飞速发展的需要,促进国内外学术交流,本刊 2001 年征稿的主要内容如下:

1. 国家高技术研究发展计划项目
2. 国家自然科学基金资助的重点基金项目、青年基金资助项目、杰出青年基金项目、地区基金项目和面上资助项目以及省部级基金资助项目
3. 国家科技攻关项目及省部级科技攻关项目
4. 国际合作项目
5. 具创新性或有重大突破的基础和应用基础研究成果;对我国西部大开发具有重要学术价值和应用价值的研究成果

对高水平的论文将优先刊登,欢迎投稿,感谢您对本刊工作的大力支持!

※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※