



## 转录因子 *cpcR* 同源基因 *cpcR-cl* 和 *cpcR-t* 的功能鉴定

刘欢欢<sup>1,2</sup>, 张睿彬<sup>2</sup>, 侯烁<sup>2</sup>, 彭琦<sup>2</sup>, 宋福平<sup>1,2\*</sup>

1 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

2 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

刘欢欢, 张睿彬, 侯烁, 彭琦, 宋福平. 转录因子 *cpcR* 同源基因 *cpcR-cl* 和 *cpcR-t* 的功能鉴定. 微生物学报, 2022, 62(5): 1711–1721.

Liu Huanhuan, Zhang Ruibin, Hou Shuo, Peng Qi, Song Fuping. Functional characterization of *cpcR-cl* and *cpcR-t*, homologous genes of transcription factor gene *cpcR*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(5): 1711–1721.

**摘要:** 苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) LM1212 菌株与典型的 Bt 菌株表型不同, 可分化形成芽胞、形成细胞和晶体产生细胞。在 LM1212 菌株中, 转录因子 CpcR 不仅参与了细胞分化过程, 而且能够激活晶体蛋白基因 *cry35-like* 的启动子( $P_{35}$ )。【目的】筛选 *cpcR* 同源基因, 验证其生物学功能。【方法】本研究克隆了 2 个 *cpcR* 同源基因, 来源于蜡样芽胞杆菌的 *cpcR-cl* 和来源于东洋芽胞杆菌的 *cpcR-t*, 将 *cpcR* 及其同源基因分别构建在 pHT304- $P_{35}$ -*gfp*、pHT304- $P_{35}$ -*lacZ* 报告载体上, 获得的重组质粒转入无 *cpcR* 基因且无晶体蛋白基因的 Bt HD73<sup>-</sup> 菌株中。利用激光共聚焦显微镜观察重组菌 HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl*- $P_{35}$ -*gfp*)和 HD<sup>-</sup>(*cpcR-t*- $P_{35}$ -*gfp*)的细胞表型并进行芽胞计数实验。测定 HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl*- $P_{35}$ -*lacZ*)和 HD<sup>-</sup>(*cpcR-t*- $P_{35}$ -*lacZ*)菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。【结果】与对照菌株相比, HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl*- $P_{35}$ -*gfp*)菌株和 HD<sup>-</sup>(*cpcR-t*- $P_{35}$ -*gfp*)菌株的芽胞细胞数分别降低了 80.79%和 90.14%, 晶体产生细胞比例分别提高了 7 倍和 9 倍, 并且 *gfp* 基因在这 2 个菌株中均能表达。 $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测结果显示, 启动子  $P_{35}$  在 HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl*- $P_{35}$ -*lacZ*)菌株和 HD<sup>-</sup>(*cpcR-t*- $P_{35}$ -*lacZ*)菌株中有较高的转录活性。【结论】*cpcR* 同源基因 *cpcR-cl*、*cpcR-t* 也能够影响细胞分化, 激活  $P_{35}$  的转录, 且 *cpcR-cl* 对  $P_{35}$  的激活能力大于 *cpcR*。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌; *cpcR-cl*; *cpcR-t*; 细胞分化

**基金项目:** 国家自然科学基金(31530095); 中国博士后科学基金(2021M693463)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31530095) and by the China Postdoctoral Science Foundation (2021M693463)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

Received: 23 August 2021; Revised: 19 October 2021; Published online: 22 February 2022

## Functional characterization of *cpcR-cl* and *cpcR-t*, homologous genes of transcription factor gene *cpcR*

LIU Huanhuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Ruibin<sup>2</sup>, HOU Shuo<sup>2</sup>, PENG Qi<sup>2</sup>, SONG Fuping<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** Compared with typical strains of *Bacillus thuringiensis* (Bt), LM1212 strain can differentiate into spore-formers and crystal-producers. In LM1212, the crystal-producing cell regulator (CpcR) not only participates in cell differentiation but also activates the promoter of crystal protein gene *cry35-like* ( $P_{35}$ ). **[Objective]** We aimed to screen out the homologous genes of *cpcR* and verify their biological functions. **[Methods]** We cloned two *cpcR* homologous genes, *cpcR-cl* from *Bacillus cereus* and *cpcR-t* from *B. toyonensis*. Then, we inserted *cpcR* and its homologous genes into pHT304- $P_{35}$ -*gfp* and pHT304- $P_{35}$ -*lacZ* vectors, respectively. The recombinant plasmids were transferred into Bt HD73<sup>-</sup> strain without *cpcR* and the crystal protein gene. We then observed the cell phenotypes of recombinant strains HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl*- $P_{35}$ -*gfp*) and HD<sup>-</sup>(*cpcR-t*- $P_{35}$ -*gfp*) by using a laser confocal microscope and quantified the sporulation efficiency. The  $\beta$ -galactosidase activities of HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl*- $P_{35}$ -*lacZ*) and HD<sup>-</sup>(*cpcR-t*- $P_{35}$ -*lacZ*) strains were determined. **[Results]** Compared with the control strain, strain HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl*- $P_{35}$ -*gfp*) and HD<sup>-</sup>(*cpcR-t*- $P_{35}$ -*gfp*) showed the number of spores decreasing by 80.79% and 90.14% and the percentage of crystal-producers increasing by 7 and 9 times, respectively. Gene *gfp* was expressed in these two strains. The  $\beta$ -galactosidase activity assay demonstrated that promoter  $P_{35}$  had high transcriptional activity in strain HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl*- $P_{35}$ -*lacZ*) and HD<sup>-</sup>(*cpcR-t*- $P_{35}$ -*lacZ*). **[Conclusion]** The homologous genes of *cpcR*, *cpcR-cl* and *cpcR-t* can regulate cell differentiation and activate the transcription of  $P_{35}$ , and *cpcR-cl* had better performance in activating  $P_{35}$  transcription than *cpcR*.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; *cpcR-cl*; *cpcR-t*; cell differentiation

典型的 Bt 菌株在形成芽胞的同时产生 1 个或者多个伴胞晶体，且伴胞晶体与芽胞产生于同一个细胞，伴胞晶体主要由 *cry* 基因和 *cyt* 基因编码的杀虫晶体蛋白组成<sup>[1-2]</sup>。按照转录调控机制的不同，可以将苏云金芽胞杆菌的 *cry* 基因分为两类：芽胞依赖型 *cry* 基因的转录受到芽胞期母细胞特异型 sigma 因子  $\sigma^E$  和  $\sigma^K$  的控制，如 *cryI*<sup>[3]</sup>、*cry4*<sup>[4]</sup>、*cry8*<sup>[5]</sup>；非芽胞依赖型 *cry* 基因(*cry3* 类基因)的转录受营养期细胞中主要 sigma 因子  $\sigma^A$  的控制<sup>[6]</sup>。此外，一些 *cry* 基

因的转录还受其他转录因子的调控。例如，Spo0A 能够正调控 *cryIac* 的转录<sup>[7]</sup>，丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH) E2 亚基可以正调控 *cryI* 类基因的转录<sup>[8]</sup>，磷酸载体蛋白(phosphocarrier protein, HPr)可通过抑制葡萄糖代谢途径来抑制 *cry4A* 的转录<sup>[9]</sup>。

Bt LM1212 菌株与典型的 Bt 菌株不同，其芽胞和晶体在不同的细胞中产生，即细胞亚群分化为芽胞形成细胞和晶体产生细胞<sup>[10]</sup>。苏云金芽胞杆菌云南亚种(*Bacillus thuringiensis*

subsp. *yunnanensis*)与 LM1212 菌株的表型类似, 仅在不形成芽胞的细胞中产生大的晶体<sup>[11]</sup>。Srinivas 等研究发现, 苏云金芽胞杆菌云南亚种 HD977 菌株的 103-MDa 质粒参与了晶体的产生, 该质粒的缺失会影响菌株细胞分化的表型, 由此推测细胞分化与 *cry* 基因或 *cry* 基因的顺式作用元件有关, 且晶体蛋白的产生不影响芽胞形成过程<sup>[12]</sup>。Ohba 等使用相差显微镜观察发现, Bt 云南亚种 113 菌株、116-72 菌株等 15 个菌株在无芽胞细胞中都形成了巨大的晶体, 而芽胞细胞中没有晶体, 且各菌株的晶体产生细胞数小于总细胞数的 1%<sup>[13]</sup>。

前期研究发现, LM1212 菌株的细胞分化过程与转录调控因子 CpcR (crystal producing cell regulator)有关<sup>[14]</sup>。典型的 Bt 菌株不含有 *cpcR* 基因, Bt HD73 菌株的表型为大多数细胞可形成芽胞, 且芽胞和伴胞晶体均产生于同一细胞中, 由于 Bt HD73 菌株缺失了携带晶体蛋白基因 *cryIac* 的质粒, 其表型为大多数细胞可形成芽胞, 但并不形成伴胞晶体。将转录因子 CpcR 引入 Bt HD73 菌株和 Bt HD73<sup>-</sup>菌株中可提高 *cry35-like* 基因的启动子(P<sub>35</sub>)的活性, 且 P<sub>35</sub> 启动子仅在非芽胞形成细胞中转录<sup>[14-15]</sup>。CpcR 属于 OmpR 蛋白家族, 由响应调节结构域和 DNA 结合结构域组成。在 NCBI 数据库中分析发现, 在不产生伴胞晶体的蜡样芽胞杆菌族中的其他菌株中也含有 CpcR 同源蛋白, 它们的结构域与 CpcR 相似, 但是功能未知。因此, 本研究选取具有该 *cpcR* 同源基因的 2 个芽胞杆菌菌株, 提取其同源基因, 命名为 *cpcR-cl* 和 *cpcR-t*, 针对它们的生物学功能进行研究, 预期结果可为揭示细菌细胞发育分化提供理论基础, 同时可为 Bt 制剂的分子设计提供遗传改良的新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

#### 1.1.2 培养基与抗生素

培养基在 121 °C 条件下湿热灭菌 20 min。

大肠杆菌培养使用 LB 液体培养基(g/L): 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, NaCl 10。芽胞计数实验使用 LB 固体培养基(g/L): 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, NaCl 10, 琼脂 16。苏云金芽胞杆菌培养使用 SSM 液体培养基(g/L): 营养肉汤 8, KCl 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.002, 调节 pH 至 7.0。使用前加入过滤除菌的 CaCl<sub>2</sub> 和 FeSO<sub>4</sub>, 终浓度分别为 5×10<sup>-4</sup> mol/L 和 1×10<sup>-6</sup> mol/L。抗生素: 氨苄青霉素(ampicillin)的配制浓度为 100 mg/mL, 工作浓度为 100 μg/mL; 红霉素(erythromycin)的配制浓度为 10 mg/mL, 工作浓度为 10 μg/mL。抗生素使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

#### 1.1.3 主要试剂与引物

QuickCut 限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 用于测定总蛋白浓度的 Bradford 购自上海兰易科学仪器有限公司; FM4-64 染料购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; PCR 产物纯化、DNA 回收和质粒提取试剂盒购自爱思进科学有限公司中国办事处(连云港市); 无缝克隆试剂盒购自中美泰和生物技术(北京)有限公司。实验中所用引物合成由上海生工生物工程公司完成。基因序列测序由北京六合华大基因科技有限公司完成。

#### 1.1.4 溶液

(1) Z-Buffer (g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 16.08, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 5.52, KCl 0.75, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.246, 调节 pH 值至 7.0。(2) ONPG: 0.4 g ONPG

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resources
Strains		
<i>E. coli</i> TG1	$\Delta(lac-proAB) supE thi hsd-5 (F' traD36 proA^+ proB^+ lacI^q lacZ\Delta M15)$ , general purpose cloning host	This lab
<i>E. coli</i> ET	$F' dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202::Tn10 galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1$ , for generation of unmethylated DNA	This lab
HD73 <sup>-</sup>	HD73 acrySTALLIFEROUS strain by curing the pHT73 plasmid	This lab
HD73 <sup>-</sup> ( <i>cpcR-gfp</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>cpcR-gfp</i> plasmid	This study
HD73 <sup>-</sup> ( <i>P<sub>35</sub>-gfp</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>P<sub>35</sub>-gfp</i> plasmid	This study
HD73 <sup>-</sup> ( <i>cpcR-P<sub>35</sub>-gfp</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>cpcR-P<sub>35</sub>-gfp</i> plasmid	This study
HD73 <sup>-</sup> ( <i>cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp</i> plasmid	This study
HD73 <sup>-</sup> ( <i>cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp</i> plasmid	This study
HD73 <sup>-</sup> ( <i>cpcR-lacZ</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>cpcR-lacZ</i> plasmid	This study
HD73 <sup>-</sup> ( <i>P<sub>35</sub>-lacZ</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>P<sub>35</sub>-lacZ</i> plasmid	This study
HD73 <sup>-</sup> ( <i>cpcR-P<sub>35</sub>-lacZ</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>cpcR-P<sub>35</sub>-lacZ</i> plasmid	This study
HD73 <sup>-</sup> ( <i>cpcR-cl-P<sub>35</sub>-lacZ</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>cpcR-cl-P<sub>35</sub>-lacZ</i> plasmid	This study
HD73 <sup>-</sup> ( <i>cpcR-t-P<sub>35</sub>-lacZ</i> )	HD73 <sup>-</sup> harboring <i>cpcR-t-P<sub>35</sub>-lacZ</i> plasmid	This study
Plasmids		
pHT304	<i>B. thuringiensis</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector, Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This lab
pHT304-18Z	Promoterless <i>lacZ</i> vector, Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This lab
<i>cpcR-gfp</i>	pHT304 carrying the <i>gfp</i> gene and the <i>cpcR</i> gene, Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This lab
<i>P<sub>35</sub>-gfp</i>	pHT304 carrying the <i>gfp</i> gene under the control of the <i>P<sub>35</sub></i> , Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This lab
<i>cpcR-P<sub>35</sub>-gfp</i>	<i>P<sub>35</sub>-gfp</i> carrying the <i>cpcR</i> gene under the control of the <i>P<sub>cpcR</sub></i> , Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This lab
<i>cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp</i>	<i>P<sub>35</sub>-gfp</i> carrying the <i>cpcR-cl</i> gene under the control of the <i>P<sub>cpcR</sub></i> , Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This study
<i>cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp</i>	<i>P<sub>35</sub>-gfp</i> carrying the <i>cpcR-t</i> gene under the control of the <i>P<sub>cpcR</sub></i> , Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This study
<i>cpcR-lacZ</i>	pHT304-18Z carrying the <i>cpcR</i> gene under the control of the <i>P<sub>cpcR</sub></i> , Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This lab
<i>P<sub>35</sub>-lacZ</i>	pHT304-18Z carrying the <i>lacZ</i> gene under the control of the <i>P<sub>35</sub></i> , Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This lab
<i>cpcR-P<sub>35</sub>-lacZ</i>	<i>P<sub>35</sub>-lacZ</i> carrying the <i>cpcR</i> gene under the control of the <i>P<sub>cpcR</sub></i> , Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This lab
<i>cpcR-cl-P<sub>35</sub>-lacZ</i>	<i>P<sub>35</sub>-lacZ</i> carrying the <i>cpcR-cl</i> gene under the control of the <i>P<sub>cpcR</sub></i> , Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This study
<i>cpcR-t-P<sub>35</sub>-lacZ</i>	<i>P<sub>35</sub>-lacZ</i> carrying the <i>cpcR-t</i> gene under the control of the <i>P<sub>cpcR</sub></i> , Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This study

溶于 100 mL Z-Buffer, 分装后用锡箔纸包裹, -20 °C 备用。(3) 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液(g/L): Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 106。

## 1.2 载体构建

### 1.2.1 以 *gfp* 为报告基因的载体构建

根据 NCBI 数据库中的核苷酸序列合成基因 *cpcR-cl*、*cpcR-t*, 将其构建在 *P<sub>35</sub>* 与 *gfp* 融合表达的载体上, 使用 *cpcR* 基因的启动子指导 *cpcR-cl* 基因和 *cpcR-t* 基因的表达, 获得的重组质粒分别命名为 *cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp*、*cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp*

(重组质粒的构建由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 示意图如图 1)。

### 1.2.2 以 *lacZ* 为报告基因的载体构建

以质粒 *cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp*、*cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp* 为模板, 使用引物对 *cl/t-F* (5'-GTAATGGAA GGATAAACAACGGATCCCGGGAAGAATGG AT-3')、*cl/t-R* (5'-ACGGCCAGTGCCAAGCTCC CGGGTTAGTAATCAAAGTCATGCA-3') 扩增基因 *cpcR-cl*、*cpcR-t*, PCR 产物纯化后, 使用无缝克隆试剂盒连接到经过 *Bam*H I 和 *Sma* I

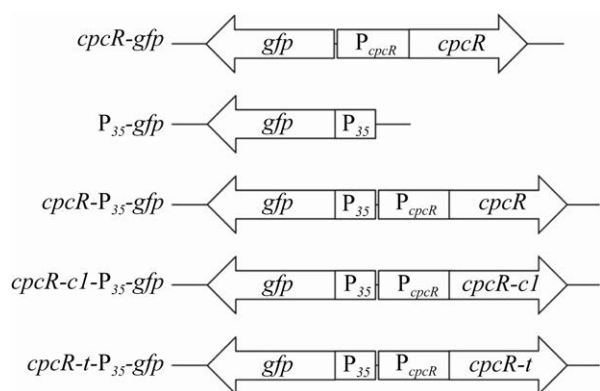


图 1 以 *gfp* 为报告基因的载体构建示意图

Figure 1 Construction of vectors with *gfp* as reporter gene.

双酶切的 *cpcR*-*P<sub>35</sub>*-*lacZ* 载体上, 转化 *E. coli* TG1 菌株, 获得重组质粒 *cpcR-cl*-*P<sub>35</sub>*-*lacZ*、*cpcR-t*-*P<sub>35</sub>*-*lacZ* (图 2)。

### 1.3 生长曲线测定

挑取单克隆接种于 5 mL LB 液体培养基 (含抗生素) 中进行活化, 按 1% 转接到 100 mL SSM 培养基中, 30 °C、220 r/min 条件下培养。以刚接入菌液的时间点为 0, 每隔 1 h 取 1 次菌液。在 600 nm 下测定菌液的吸光值 ( $OD_{600}$ ), 将取样时间与  $OD_{600}$  的对数一一对应, 绘制生长曲线。

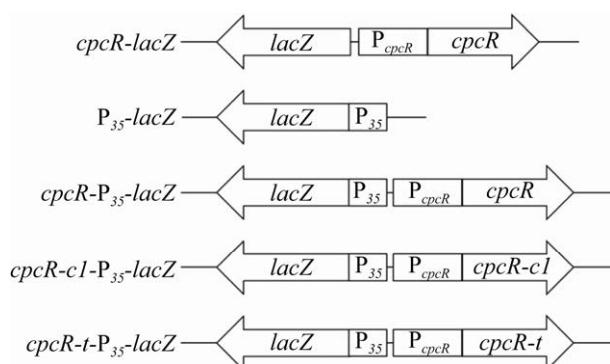


图 2 以 *lacZ* 为报告基因的载体构建示意图

Figure 2 Construction of vectors with *lacZ* as reporter gene.

### 1.4 激光共聚焦显微镜观察及晶体细胞比例统计

将菌株在 SSM 中培养至  $T_{12}$  时期 ( $T_0$  为指数生长期结束的时期,  $T_n$  为  $T_0$  后的  $n$  小时)。取 1 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 菌体用 500  $\mu$ L 灭菌水清洗 3 次, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 沉淀用 10  $\mu$ L 的灭菌水重悬。吸取 1  $\mu$ L 样品与 100 ng FM4-64 红色荧光染料 [N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide] 混匀, 利用蔡司激光共聚焦显微镜 880 观察菌体形态。

分别选取  $T_{12}$  时期显微镜下 3 个不同视野的细胞进行统计分析, 每个视野选取总细胞数为 100 个, 记录晶体细胞个数为  $n$ , 计算 3 个不同视野中晶体产生细胞比例的平均值和标准误并绘制柱状图。

### 1.5 细胞计数实验

将菌株在 SSM 中培养至  $T_{24}$  时期。取 1 mL 菌液于试管中, 从中取 100  $\mu$ L 菌液进行梯度稀释 (以 10 倍为一个梯度), 将试管中剩余的菌液置于 65 °C 水浴锅中加热 30 min, 取 100  $\mu$ L 加热后的菌液进行梯度稀释。每个梯度取 100  $\mu$ L 均匀涂布于 LB 固体平板, 每个梯度 3 个平板重复, 30 °C 恒温培养 10 h。菌液加热前在平板上形成的单克隆数 (colony-forming units, CFU) 为总细胞数, 加热后在平板上形成的单克隆数为产芽胞细胞数。

### 1.6 $\beta$ -半乳糖苷酶活性分析

(1) 菌株在 SSM 中培养至  $T_0$  时期开始取样, 之后每小时取 1 次样, 取到  $T_8$ , 每次取 2 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体存于 -20 °C 备用。

(2) 向菌体中加入 500  $\mu$ L 预冷的 Z-Buffer, 约 100  $\mu$ L 石英砂, 低温振荡破碎 150 s。

(3) 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取 20  $\mu$ L 上清加入 1 mL Bradford 中, 反应 5 min 后测定

$OD_{595}$  值, 计算蛋白浓度(mg/mL)。

(4) 在 Ep 管中加入 700  $\mu$ L Z-Buffer 和 200  $\mu$ L ONPG, 混匀, 37  $^{\circ}$ C 预热。

(5) 向反应管中加入 100  $\mu$ L 上清, 37  $^{\circ}$ C 反应至液体呈现黄色, 加入 500  $\mu$ L 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应, 记录反应时间, 测定  $OD_{420}$  值。

(6) 根据以下公式计算  $\beta$ -半乳糖苷酶转录活性:

$$U = \frac{OD_{420} \times 1500 \times 1000}{T \times V \times \text{蛋白浓度}}$$

$T$ -反应时间(min),  $V$ -加入的样品体积( $\mu$ L)。

## 2 结果与分析

### 2.1 CpcR-C1、CpcR-T 与 CpcR 的序列比对

在 NCBI 数据库中, 以 CpcR 氨基酸序列为参考序列进行 BLASTp 分析, 结果中与 CpcR 序列相似性大于 50% 的序列共有 99 条, 其中相似性在 50%–60% 的序列有 89 条, 相似性在 60%–80% 的序列有 1 条, 相似性大于 80% 的序列有 9 条。我们重点关注了相似性大于 80% 的 9 条序列, 其中有 8 条序列来源于蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*), 1 条序列来源于东洋芽胞杆菌(*Bacillus toyonensis*)。从 8 条序列中选择与

CpcR 序列相似性最高的 1 条序列(相似性为 85.45%), 将其编码基因命名为 *cpcR-cl*, 蛋白产物命名为 CpcR-C1 (WP\_086410509.1)。来源于东洋芽胞杆菌的氨基酸序列与 CpcR 序列相似性为 85.91%, 将其编码基因命名为 *cpcR-t*, 蛋白产物命名为 CpcR-T (WP\_098072443.1)。利用 Clustal X 和在线软件 ESPript 3.0 (<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) 进行同源序列比对, 结果表明 CpcR-C1 和 CpcR-T 与 CpcR 具有相同的结构域(响应调节结构域和 DNA 结合结构域分别位于 4–117 和 126–220 氨基酸残基位置, 图 3), 由此推测 CpcR-C1、CpcR-T 应当与 CpcR 具有相同的功能。

### 2.2 CpcR-C1 和 CpcR-T 影响 HD73<sup>-</sup> 菌株的细胞分化

为了确定 CpcR-C1 和 CpcR-T 能否影响 HD73<sup>-</sup> 菌株的细胞分化, 构建以 *gfp* 为报告基因的重组质粒 *cpcR-gfp*、*P<sub>35</sub>-gfp*、*cpcR-P<sub>35</sub>-gfp*、*cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp* 和 *cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp*。将重组质粒转入 HD73<sup>-</sup> 菌株, 获得菌株 HD<sup>-</sup>(*cpcR-gfp*)、HD<sup>-</sup>(*P<sub>35</sub>-gfp*)、HD<sup>-</sup>(*cpcR-P<sub>35</sub>-gfp*)、HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp*) 和 HD<sup>-</sup>(*cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp*)。以 HD73<sup>-</sup>、HD<sup>-</sup>(*cpcR-gfp*)、HD<sup>-</sup>(*P<sub>35</sub>-gfp*)、HD<sup>-</sup>(*cpcR-P<sub>35</sub>-gfp*)

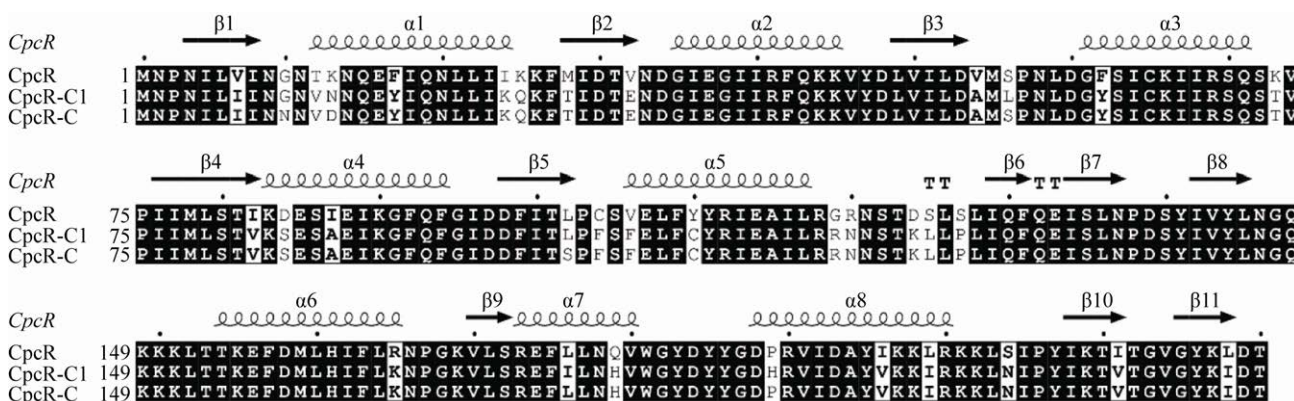


图 3 CpcR-C1、CpcR-T 与 CpcR 氨基酸序列比对

Figure 3 Amino acid sequence alignment between CpcR-C1, CpcR-T and CpcR. Amino acids are numbered and secondary structures are labeled.



菌株为对照测定  $HD^-(cpcR-cl-P_{35}-gfp)$  和  $HD^-(cpcR-t-P_{35}-gfp)$  菌株的生长曲线, 结果显示(图 4):  $HD^-(cpcR-t-P_{35}-gfp)$  菌株与对照菌株的生长趋势一致, 到达  $T_0$  时期的  $OD_{600}$  值约为 2.0;  $HD^-(cpcR-cl-P_{35}-gfp)$  菌株的生长较缓慢, 到达  $T_0$  时期的  $OD_{600}$  值约为 1.0。

将上述菌株培养至  $T_{12}$  时期, 通过激光共聚焦显微镜观察, 对照菌株  $HD73^-$  和  $HD^-(P_{35}-gfp)$  的大部分细胞为芽胞形成细胞,  $HD^-(cpcR-gfp)$ 、 $HD^-(cpcR-P_{35}-gfp)$ 、 $HD^-(cpcR-cl-P_{35}-gfp)$  和  $HD^-(cpcR-t-P_{35}-gfp)$  菌株只有极少数的芽胞细胞形成(图 5)。  $T_{24}$  时期的芽胞计数结果显示,

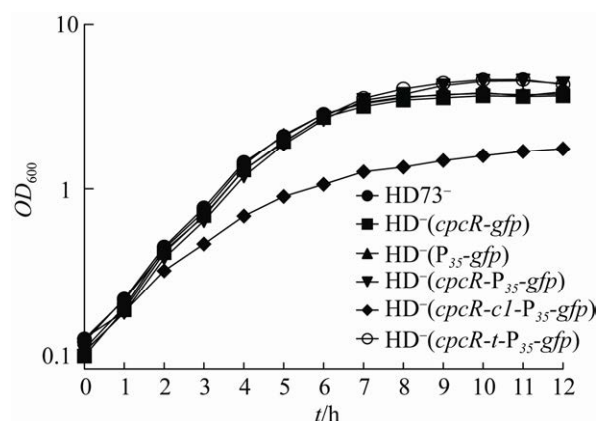


图 4 含 *gfp* 基因的菌株生长曲线测定  
Figure 4 The growth curve of strains containing *gfp* gene.

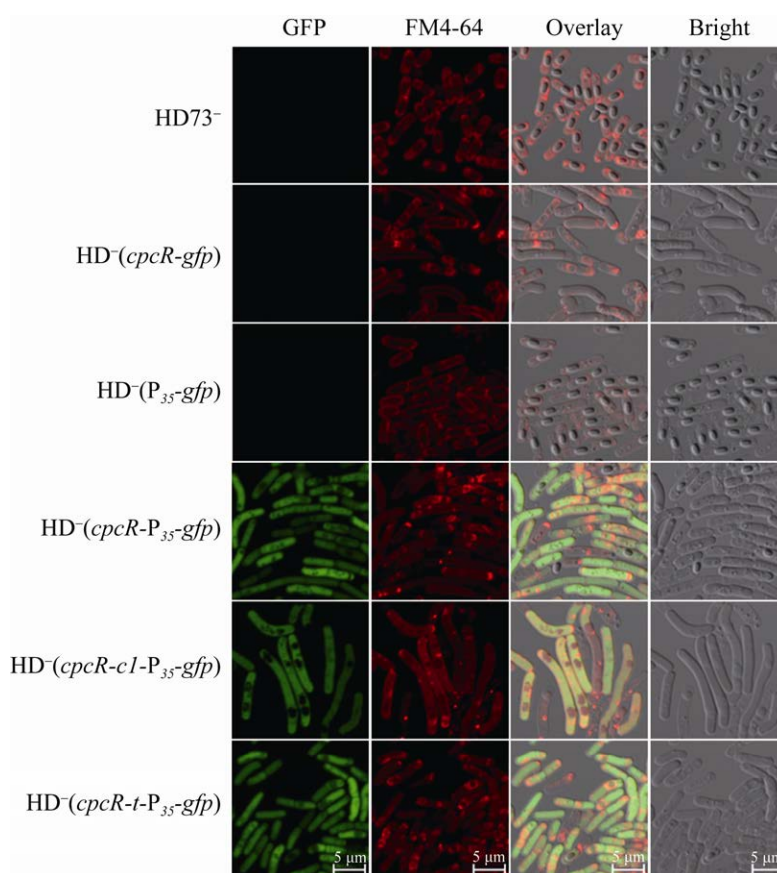


图 5 激光共聚焦显微镜观察

Figure 5 Confocal laser microscope observation. Overlay: GFP/FM4-64 overlay. Bright: bright-field image. Cells were cultured to  $T_{12}$  in SSM medium. Green fluorescent protein-expressing cells are crystal-producers and red fluorescence indicates staining with FM4-64.

与对照菌株 HD<sup>-</sup>(P<sub>35</sub>-gfp)相比, HD<sup>-</sup>(cpcR-P<sub>35</sub>-gfp)菌株的总细胞数和芽胞细胞数分别降低了 90.22%和 90.56%; HD<sup>-</sup>(cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp)菌株的总细胞数和芽胞细胞数分别降低了 87.76%和 90.14%; HD<sup>-</sup>(cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp)菌株的总细胞数与对照菌株相似, 但芽胞细胞数降低了 80.79%(图 6 和表 2)。对 T<sub>12</sub>时期显微镜视野中的晶体产生细胞所占比例进行计数统计分析, 结果显示, 与对照菌株 HD<sup>-</sup>(P<sub>35</sub>-gfp)相比, HD<sup>-</sup>(cpcR-P<sub>35</sub>-gfp)和 HD<sup>-</sup>(cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp)菌株的晶体细胞比例提高了 9 倍, HD<sup>-</sup>(cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp)菌株的晶体细胞比例提高了 7 倍(图 7)。以上结果表明, cpcR-cl 和 cpcR-t 的表达均能够引起 HD73 菌株的芽胞细胞比例降低, 晶体细胞比

例提高。

### 2.3 CpcR-C1 和 CpcR-T 激活启动子 P<sub>35</sub> 的转录

激光共聚焦显微镜观察结果显示, HD<sup>-</sup>(cpcR-gfp)和 HD<sup>-</sup>(P<sub>35</sub>-gfp)菌株无 GFP 表达, HD<sup>-</sup>(cpcR-P<sub>35</sub>-gfp)、HD<sup>-</sup>(cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp)和 HD<sup>-</sup>(cpcR-t-P<sub>35</sub>-gfp)菌株均可检测到 GFP 的表达(图 5), 这表明 CpcR-C1、CpcR-T 均能够激活启动子 P<sub>35</sub> 的转录。为了定量地研究 CpcR-C1 和 CpcR-T 对启动子 P<sub>35</sub> 转录的激活效率, 构建重组质粒 cpcR-cl-P<sub>35</sub>-lacZ 和 cpcR-t-P<sub>35</sub>-lacZ。将重组质粒转入 HD73 菌株, 获得菌株 HD<sup>-</sup>(cpcR-cl-P<sub>35</sub>-lacZ)和 HD<sup>-</sup>(cpcR-t-P<sub>35</sub>-lacZ)。测定生长曲线发现(图 8A): HD<sup>-</sup>(cpcR-lacZ)、HD<sup>-</sup>(P<sub>35</sub>-lacZ)、

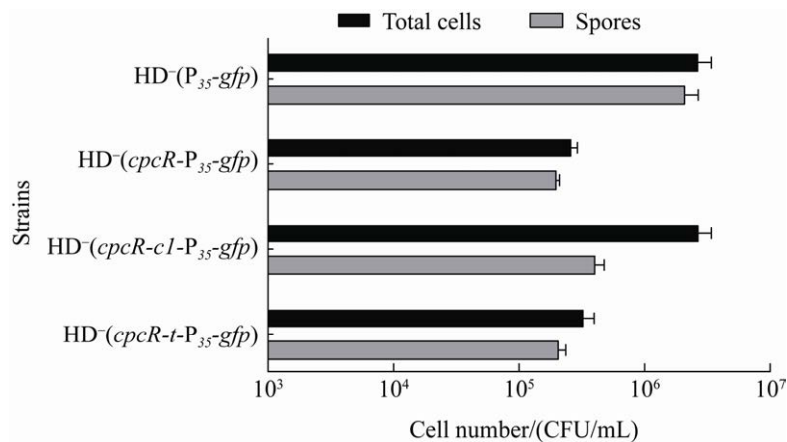


图 6 芽胞形成率分析

Figure 6 Analysis of sporulation efficiency. Cells were cultured to T<sub>24</sub> in SSM medium. Data were represented as mean±SEM.

表 2 总细胞数与芽胞细胞数统计结果

Table 2 Statistical data of total cells number and spores number

Strains	Mean of total cells/(CFU/mL)	Mean of spores/(CFU/mL)
HD <sup>-</sup> (P <sub>35</sub> -gfp)	2.77×10 <sup>6</sup> ±6.32×10 <sup>5</sup>	2.15×10 <sup>6</sup> ±5.27×10 <sup>5</sup>
HD <sup>-</sup> (cpcR-P <sub>35</sub> -gfp)	2.71×10 <sup>5</sup> ±2.16×10 <sup>4</sup>	2.03×10 <sup>5</sup> ±8.00×10 <sup>3</sup>
HD <sup>-</sup> (cpcR-cl-P <sub>35</sub> -gfp)	2.79×10 <sup>6</sup> ±6.18×10 <sup>5</sup>	4.13×10 <sup>5</sup> ±6.40×10 <sup>4</sup>
HD <sup>-</sup> (cpcR-t-P <sub>35</sub> -gfp)	3.39×10 <sup>5</sup> ±5.76×10 <sup>4</sup>	2.12×10 <sup>5</sup> ±2.34×10 <sup>4</sup>

Cells were cultured to T<sub>24</sub> in SSM medium. Results are given as mean ± standard error of the mean (SEM).



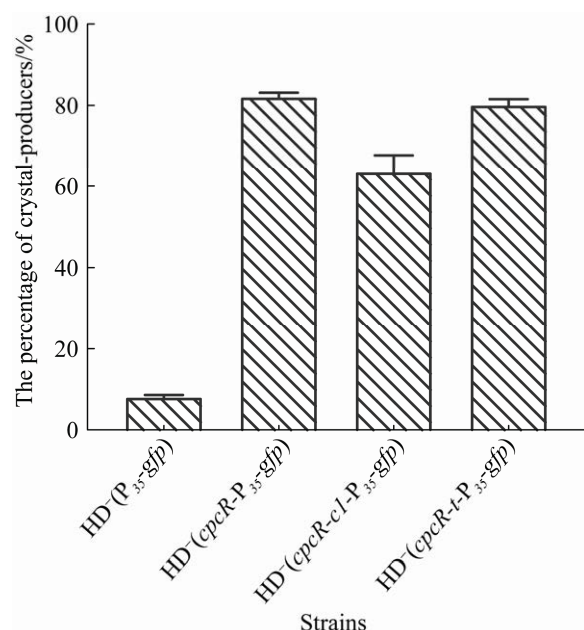


图 7 晶体产生细胞所占比例

Figure 7 The percentage of crystal-producers. Cells were cultured to  $T_{12}$  in SSM medium. Data were represented as mean $\pm$ SEM.

HD<sup>-</sup>(cpcR-cl-P<sub>35</sub>-lacZ)与 HD73<sup>-</sup>菌株的生长趋势一致, 无显著差异, 到达  $T_0$  时期的  $OD_{600}$  值约为 2.0; HD<sup>-</sup>(cpcR-P<sub>35</sub>-lacZ)和 HD<sup>-</sup>(cpcR-t-P<sub>35</sub>-lacZ)菌株的生长趋势与其他菌株相比较缓慢, 到达

$T_0$  时期的  $OD_{600}$  值约为 1.0。

$\beta$ -半乳糖苷酶活性检测结果显示(图 8B):  $T_0$ - $T_8$  时期, 启动子 P<sub>35</sub> 在对照菌株 HD<sup>-</sup>(cpcR-lacZ)和 HD<sup>-</sup>(P<sub>35</sub>-lacZ)中的转录活性几乎为 0;  $T_1$  之前, 启动子 P<sub>35</sub> 在 HD<sup>-</sup>(cpcR-cl-P<sub>35</sub>-lacZ)菌株和 HD<sup>-</sup>(cpcR-t-P<sub>35</sub>-lacZ)菌株中的转录活性低于在 HD<sup>-</sup>(cpcR-P<sub>35</sub>-lacZ)菌株中的转录活性;  $T_1$  之后, 启动子 P<sub>35</sub> 在 HD<sup>-</sup>(cpcR-t-P<sub>35</sub>-lacZ)菌株中的转录活性低于在 HD<sup>-</sup>(cpcR-P<sub>35</sub>-lacZ)菌株中的转录活性, 在 HD<sup>-</sup>(cpcR-cl-P<sub>35</sub>-lacZ)菌株中的转录活性高于在 HD<sup>-</sup>(cpcR-P<sub>35</sub>-lacZ)菌株中的转录活性, 且启动子 P<sub>35</sub> 在 HD<sup>-</sup>(cpcR-cl-P<sub>35</sub>-lacZ)菌株中的转录活性持续增强。说明 3 个 CpcR 蛋白对启动子 P<sub>35</sub> 的转录激活能力是不同的, 其中 CpcR-C1 的激活能力最强, 蛋白 CpcR-C1 对启动子 P<sub>35</sub> 的转录激活能力大于 CpcR, CpcR-T 的激活能力最弱。

### 3 讨论与结论

Zhang 等在 HD73<sup>-</sup>菌株中引入 CpcR, 利用启动子 P<sub>35</sub> 指导杀虫蛋白基因 *cryIAb* 表达, 发现重

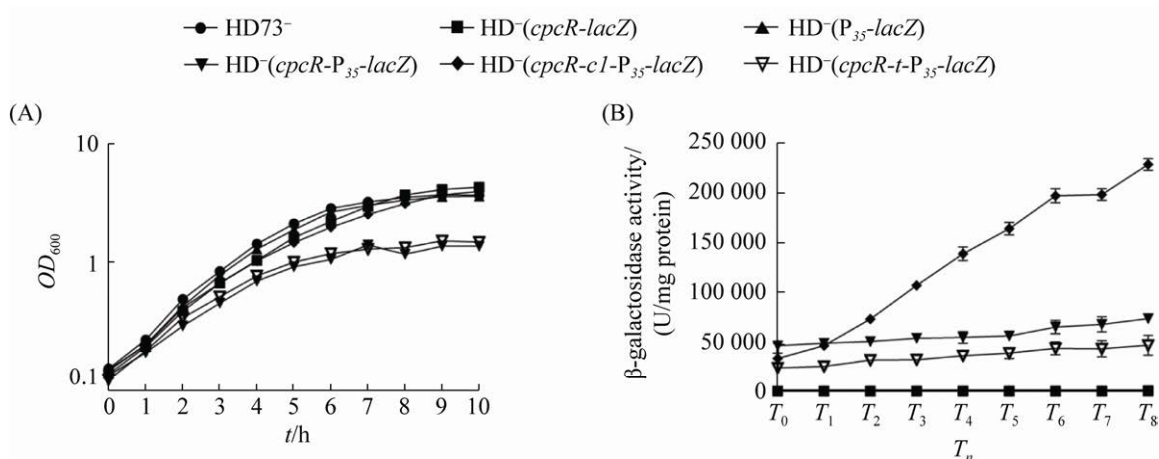


图 8 重组菌株的生长曲线测定及 P<sub>35</sub> 的转录活性测定

Figure 8 The growth curve and the transcriptional activity of P<sub>35</sub> of the recombinant strains. A: growth curve; B: transcriptional activity of P<sub>35</sub>, the data were presented as mean $\pm$ SEM.

组菌株在非芽胞细胞中产生大量晶体,在芽胞细胞中不产该晶体而且芽胞细胞数量明显降低,这表明 CpcR 不仅可以在 HD73<sup>-</sup>菌株的非芽胞细胞中指导晶体蛋白产生,而且可以降低芽胞细胞数量<sup>[15]</sup>。因此,转录调控因子 CpcR 成为了构建全新的非芽胞 Cry 蛋白表达体系的核心元件。本研究将 *cpcR* 基因或 *cpcR* 同源基因、启动子 P<sub>35</sub> 和报告基因(*gfp/lacZ*)构建在同一个载体上,转入 HD73<sup>-</sup>菌株,通过表型观察和 β-半乳糖苷酶活性检测,明确了 CpcR 同源蛋白也能够引起 HD73<sup>-</sup>菌株的芽胞细胞数量减少,并且能够激活启动子 P<sub>35</sub> 的转录。激光共聚焦显微镜观察结果显示,含有 CpcR-C1 的菌株细胞更加细长(图 5),推测 CpcR-C1 的功能并不局限于调控细胞分化过程,可能还参与了其他的细胞发育过程,这也可能是 HD<sup>-</sup>(*cpcR-cl-P<sub>35</sub>-gfp*)菌株生长相对缓慢,总细胞数无明显变化的原因。

来源于蜡样芽胞杆菌的 CpcR-C1 和来源于东洋芽胞杆菌的 CpcR-T 不仅可以参与苏云金芽胞杆菌的细胞分化过程,而且可以在苏云金芽胞杆菌中激活 P<sub>35</sub> 的转录,这对于非苏云金芽胞杆菌中的 CpcR 同源蛋白的功能研究具有指导意义,暗示了非苏云金芽胞杆菌也可能存在细胞分化的现象。本研究结果显示, CpcR-C1、CpcR-T 与 CpcR 对启动子 P<sub>35</sub> 的激活能力不同,推测这种活性差异可能是由于关键氨基酸位点的不同引起的,即 CpcR-C1、CpcR-T 与 CpcR 对启动子 P<sub>35</sub> 的亲合力存在差异。根据 CpcR-C1、CpcR-T 与 CpcR 氨基酸一致性的比对结果(图 3)和激活能力的差异,推测 CpcR 第 56 位氨基酸残基(Ser56)是导致 CpcR 与其同源蛋白活性差异的关键位点,接下来可以通过氨基酸突变进行验证。目前已经取得的实验结果揭示了 CpcR 同源蛋白对于 P<sub>35</sub> 的转录激活能力

是不同的,继续研究其余的 CpcR 同源蛋白的功能是有必要的。后续工作可改造 CpcR 以提高其对 P<sub>35</sub> 的转录激活能力,从而构建全新的非芽胞 Cry 蛋白表达体系:利用启动子 P<sub>35</sub> 指导杀虫蛋白基因表达,同时利用改造的 CpcR 激活启动子 P<sub>35</sub>,使杀虫蛋白在非芽胞细胞中大量表达。

## 参考文献

- [1] Lereclus D, Agaisse H, Grandvalet C, Salameitou S, Gominet M. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2000, 290(4/5): 295–299.
- [2] Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 2014, 6(12): 3296–3325.
- [3] Bravo A, Agaisse H, Salameitou S, Lereclus D. Analysis of *cryIaA* expression in *SigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 1996, 250(6): 734–741.
- [4] Poncet S, Dervyn E, Klier A, Rapoport G. Spo0A represses transcription of the *cry* toxin genes in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology: Reading, England*, 1997, 143 ( Pt 8): 2743–2751.
- [5] Du LX, Qiu LL, Peng Q, Lereclus D, Zhang J, Song FP, Huang DF. Identification of the promoter in the intergenic region between *orf1* and *cry8Ea1* controlled by sigma H factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(12): 4164–4168.
- [6] Salameitou S, Agaisse H, Bravo A, Lereclus D. Genetic analysis of *cryIIIa* gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, 1996, 142(8): 2049–2055.
- [7] Yang H, Wang PS, Peng Q, Rong R, Liu CX, Lereclus D, Zhang J, Song FP, Huang DF. Weak transcription of the *cryIaC* gene in nonsporulating *Bacillus thuringiensis* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(18): 6466–6474.
- [8] Walter T, Aronson A. Specific binding of the E2 subunit of pyruvate dehydrogenase to the upstream region of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(12): 7901–7906.
- [9] Khan SR, Banerjee-Bhatnagar N. Loss of catabolite repression function of HPr, the phosphocarrier protein of the bacterial phosphotransferase system, affects

- expression of the *cry4A* toxin gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(19): 5410–5417.
- [10] Deng C, Slamti L, Raymond B, Liu G, Lemy C, Gominet M, Yang J, Wang H, Peng Q, Zhang J, Lereclus D, Song F. Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain. *The ISME Journal*, 2015, 9(2): 286–296.
- [11] Ohba M, Aizawa K. Crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Yunnanensis* are produced only in asporogenous cells. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1986, 48(2): 254–256.
- [12] Srinivas G, Vennison SJ, Sudha SN, Balasubramanian P, Sekar V. Unique regulation of crystal protein production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *Yunnanensis* is mediated by the cry protein-encoding 103-megadalton plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(7): 2792–2797.
- [13] Ohba M, Maeda M, Ohgushi A, Lee DH, Mizuki E. A unique morphological feature commonly associated with *Bacillus thuringiensis* serovar *Yunnanensis* isolates: an electron microscopic observation. *Applied Entomology and Zoology*, 2003, 38(3): 333–338.
- [14] 马丽霞, 彭琦, Lereclus Didier, 张杰, 郭淑元, 宋福平. 苏云金芽胞杆菌 LM1212 质粒缺失对细胞分化的影响. *微生物学通报*, 2017, 44(3): 574–582.  
Ma LX, Peng Q, Didier L, Zhang J, Guo SY, Song FP. Effect of plasmid curing on cell differentiation of *Bacillus thuringiensis* strain LM1212. *Microbiology China*, 2017, 44(3): 574–582. (in Chinese)
- [15] Zhang RB, Slamti L, Tong L, Verplaetse E, Ma LX, Lemy C, Peng Q, Guo SY, Zhang J, Song FP, Lereclus D. The stationary phase regulator CpcR activates *cry* gene expression in non-sporulating cells of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 2020, 113(4): 740–754.

(本文责编 李磊)