

SigmaK 和 GerE 对芽胞外壁基质结构基因 *exsB* 的转录调控

曲宁^{1,2}, 彭琦², 邱丽丽¹, 刘春霞², 陈榛², 张杰², 宋福平^{2*}, 李杰^{1*}

¹东北农业大学生命科学学院, 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

摘要: 【目的】明确 SigmaK 和 GerE 对苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 芽胞外壁 (exosporium) 基质结构基因 *exsB* 的转录调控。【方法】序列比较蜡样芽胞杆菌群 *exsB* 及启动区序列, 利用启动子融合 *lacZ* 技术检测 *exsB* 启动子的转录活性; 通过凝胶阻滞方法检测 GerE 与 *exsB* 启动子的结合。【结果】在蜡样芽胞杆菌群中, *exsB* 及其启动区具有较高的相似性, *exsB* 启动子在芽胞形成期的晚期大量转录; *sigK* 和 *gerE* 的突变影响了 *exsB* 启动子的转录活性, 凝胶阻滞结果显示 GerE 蛋白与 *exsB* 启动子可以结合。【结论】本研究证明 *exsB* 在芽胞形成晚期受到 SigmaK 转录调控, 并直接受到 GerE 的正调控。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, 芽胞外壁, *exsB*, SigmaK, GerE

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 03-0241-08

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 属于蜡样芽胞杆菌群 (*B. cereus* group), 它是一种革兰氏阳性细菌。蜡样芽胞杆菌群在逆境环境中可以形成芽胞, 成熟芽胞的最外层结构是芽胞外壁, 除了蜡样芽胞杆菌群之外, 在其它杆菌属如梭状芽胞杆菌的成熟芽胞中也存在芽胞外壁的结构^[1]。研究发现蜡样芽胞杆菌群芽胞外壁由基质和绒毛构成。基质有如一个帽子把芽胞包裹起来, 丝状绒毛与基质紧密的连接在一起^[2]。BclA 是丝状绒毛的主要成分^[3], ExsFA/BxpB 和其同源蛋白 ExsFB 把 BclA 和基质紧密的连接起来^[4], 基质蛋白有 20 多种, ExsY、CotY 和 ExsB 是基质结构蛋白^[5-7]。ExsB 蛋白由基因组中 *exsB* 编码, 是芽胞晚期表达的磷酸化蛋白, 它在芽胞外壁的组装上起作用。 *B. cereus*、*B. anthracis* 和 *B. thuringiensis* 基因组中都含有 *exsB*,

它处于一个单一基因的转录单元, 其上下游基因与 *exsB* 方向相反^[5]。目前芽胞外壁的研究主要集中在芽胞外壁的结构, 组成蛋白及其功能上, 对芽胞外壁组成相关基因的转录调控研究报道较少。本研究选取芽胞外壁基质的重要组成蛋白 ExsB 为研究对象, 以期明确 *exsB* 的转录调控, 为丰富芽胞母细胞基因的调控网络, 深入研究芽胞外壁的形态和功能奠定基础。

根据对模式菌株枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*, 简称 Bs) 的研究发现, 芽胞形成进程的开始是由一系列连续被激活的 Sigma 因子调控的, 这些 Sigma 因子与核心 RNA 聚合酶结合直接起始芽胞期特异性启动子的转录。SigmaF 和 SigmaG 是前芽胞中的转录因子, SigmaE 和 SigmaK 负责母细胞基因的转录^[8], 母细胞中除了这些 Sigma 因子外, 还受

基金项目: 国家“973 项目”(2009CB118902); 国家自然科学基金(31070083)

* 通信作者。Tel: +86-40-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

作者简介: 曲宁 (1987-), 女, 黑龙江鹤岗人, 硕士研究生, 主要从事苏云金芽胞杆菌功能基因的研究。E-mail: xiaoshi_zia@126.com

收稿日期: 2012-10-31; 修回日期: 2012-12-13

到 SpoIID 和 GerE 小分子蛋白的调控^[9]。GerE 由蜡样芽胞杆菌基因组中 *gerE* 编码, 是小分子 DNA 结合蛋白。GerE 蛋白天然状况下以二聚物形式存在, 每个单体含有 4 个 α -螺旋, 中间的一对能够形成螺旋-折叠-螺旋的 DNA 结合域^[10]。芽胞外壁的形成是在母细胞中进行的, 它在转录水平上受到哪些因子的调控目前还不得而知。

本研究对 ExsB 启动区序列进行生物信息学分析, 分析了 *exsB* 启动子在 *gerE* 和 *sigK* 突变株中转录活性, 通过凝胶阻滞方法检测 GerE 与 *exsB* 启动子的结合, 并对蜡样芽胞杆菌群中的 *exsB* 及其启动

区进行了生物信息学分析。证明 *exsB* 在芽胞形成晚期受到 SigmaK 转录调控, 并直接受到 GerE 的正调控。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 本实验所用菌株与质粒见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 在 LB 培养基中 37℃ 培养; Bt 在 SSM 培养基^[11] (芽胞生成培养基) 中 30℃ 培养。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
<i>E. coli</i> JM110	<i>Rpsl thr leu endA dcm supE44 Δ(lac-proAB)</i>	Novagen
BL21 gerE	<i>E. coli</i> BL21 (λ DE3) carrying pGEXgerE plasmid; Amp ^r	This study
BL21 pGEX	<i>E. coli</i> BL21 (λ DE3) carrying pGEX-4T-1 plasmid; Amp ^r	This study
HD73	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain carrying <i>cry1Ac</i> gene	This lab
HD Δ gerE	HD73 mutant, <i>gerE</i> gene was disrupted by homologous recombination	This lab
HD Δ sigK	HD73 mutant, <i>sigK</i> gene was disrupted by homologous recombination	This lab
HD (<i>exsBp-lacZ</i>)	HD73 strain containing plasmid pHTexsBp	This study
HD Δ gerE (<i>exsBp-lacZ</i>)	HD Δ gerE strain containing plasmid pHTexsBp	This study
HD Δ sigK (<i>exsBp-lacZ</i>)	HD Δ sigK strain containing plasmid pHTexsBp	This study
HD (pHT304)	HD73 strain containing plasmid pHT304	This study
Plasmids		
pHT304-18Z	Amp ^r , Ermr, <i>E. coli</i> -Bt shuttle vector	[12]
pHTexsBp	Amp ^r , Ermr, pHT304-18Z carrying <i>exsBp</i>	This study
pGEX-4T-1	Vector used for gene expression; Amp ^r	GE health
pGEXgerE	Amp ^r ; pGEX-4T-1 carrying <i>gerE</i> gene	This study

1.1.2 主要试剂和仪器: 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PrimerStar HS DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶等酶制剂及 DNA 分子量标准均为 TaKaRa 公司产品。质粒提取及 DNA 回收试剂盒采购于 Axygen 公司。GST 琼脂糖凝胶纯化柱料 (Glutathione Sepharose 4B) 购自 GE 公司。营养肉

汤购于北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.1.3 引物合成及序列测定: 根据未公布的 HD73 菌株已知序列设计引物, 引物名称及序列见表 2。引物合成由上海生工生物工程公司完成, 序列测定由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

表 2 引物序列

Table 2 Primers and sequences

Primer name	Sequences (5'→3')	Restriction site
gerEMF	GGAGTAACTGCTTTTATAGGACG	
gerEMR	GTCAGTATGTGGCACTCCAGC	
gerE-pGEX-4T-1F	CGCGGATCCTTGAAGGAAAAGCGTATCAAT	<i>Bam</i> HI
gerE-pGEX-4T-1R	ACGCGTGGACTTATAACTCGAGCTCTCCCATAC	<i>Sal</i> II
pexsBa	AACTGCAGTGAAGTCTTTTCGCACCTT	<i>Pst</i> I
pexsBb	CGGGATCCACATCTTCTTGGGCATT	<i>Bam</i> HI
pexsBc	CGGTATACGATATCCAAT	
pexsBd	TCGACAGCTTTTCTAAC	

1.2 DNA 遗传操作与转化

质粒提取、琼脂糖凝胶电泳鉴定、酶切反应、DNA 片段回收、连接反应和大肠杆菌转化等遗传操作参照文献 [13]。苏云金芽胞杆菌感受态的制备和电激转化见参考文献 [14]。所得到的 PCR 产物经过测序进行验证。

1.3 pHTexsBp 载体的构建

根据已经测序的 HD73 菌株 *exsB* ATG 上下游设计引物, 上游引物 *pexsBa* 起始位置设计在 ATG 上游 402 bp 处, 下游引物 *pexsBb* 起始位置设计在 ATG 下游 150 bp 处。在 2 个引物的 5' 端分别加入 *Pst*I 和 *Bam*HI 的酶切位点。PCR 扩增, 得到带有酶切位点的 *exsB* 的启动子序列, 插入到带有 *lacZ* 基因的低拷贝载体 pHT304-18Z 的多克隆位点中, 该多克隆位点位于 *lacZ* 基因的前端, 得到重组载体 pHTexsBp。将载体克隆并去甲基化后电击转化进入 HD73 菌株中, 将转化的菌株涂布于添加红霉素的 LB 平板, 在 30℃ 培养并用引物 *pexsBa* 和 *pexsBb* 进行筛选鉴定。

1.4 β -半乳糖苷酶活性分析

将菌株接入含有红霉素的 SSM 培养基中, 30℃, 220 r/min 震荡培养, 由 T_0 开始取样至 T_{23} , 每小时取样 1 次, 每次 2 mL, 离心后弃上清, 样品立即置于 -20℃ 保存。 β -半乳糖苷酶活性分析方法见参考文献 [15], 进行 3 次独立重复试验, 取平均值。

1.5 pGEXgerE 表达载体的构建

利用 PrimerStar HS DNA 聚合酶通过 PCR 扩增方法从苏云金芽胞杆菌 HD73 基因组中获得编码 GerE 蛋白的基因。扩增产物经 *Sal*I 和 *Bam*HI 双酶切后插入同样酶切消化处理的 pGEX-4T-1 载体。得到重组质粒 pGEXgerE 转化大肠杆菌 BL21 菌株, 得到 BL21gerE 菌株。

1.6 GerE 蛋白的提取和纯化

将得到的 BL21gerE 菌种接种活化, 菌液按 1% 转接于含 250 mL 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 培养至 $OD_{600} = 0.5 - 0.6$, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG, 18℃、140 r/min 诱导过夜。4600 \times g 离心 10 min 收集菌体, 用 80 mL pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液悬浮菌体, 用超声破碎仪 (CP750, COLE-PARMER 公司) 进行超声破碎。用 1/2 探头在 600 W 功率下, 破碎 3 min。18000 \times g 离心 10 min

去除细胞沉淀。上清进行 SDS-PAGE (12%) 电泳检测。带有 GST 标签的 GerE 蛋白被诱导表达, 表达产物参照 GE 产品说明书进行谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析纯化。

1.7 GerE 和 *exsB* 启动子的凝胶阻滞实验

以 HD73 基因组为模板, 用 5'-Carboxyfluorescein (简称 5'-FAM) 标记的 *pexsBc* 和 *pexsBd* 引物扩增 *exsB* ATG 上游 315 bp 处和 ATG 下游 29 bp 之间的序列。纯化后的启动子序列在体外与 GerE 蛋白结合。10 μ L 反应体系中: 10X 结和反应液 1 μ L, Poly (dI: dC) 500 ng/ μ L, 1.0 μ L, GerE 蛋白, 双蒸水混匀静止反应 20 min。加入带有 FAM 标记的 *exsB* 启动子 DNA, 1 μ L。混匀室温静止反应 20 min。反应产物在 160 V 电压, 4℃ 条件下进行 (5%) 非变性胶电泳检测。用荧光凝胶成像系统 (富士公司 FLA Imager FLA-5100) 对非变性胶进行扫描。扫描条件为: Laser: 473 nm, Filter: 526-000/01, 电压 900 V。

2 结果和分析

2.1 苏云金芽胞杆菌 ExsB 蛋白序列分析

苏云金芽胞杆菌 HD73 的芽胞外壁相关蛋白 ExsB 由 543 bp 核苷酸编码, 180 个氨基酸组成, 比较其与已公布基因组序列的蜡样芽胞杆菌群代表菌株的 ExsB 氨基酸序列的一致性, 发现其与 *B. thuringiensis* 97-27^[16] 的相似性为 96%, 与炭疽芽胞杆菌 *B. anthracis* str. Ames^[17] (简称 Ba) 的相似性为 92%, 与 *B. cereus* ATCC 14579^[18] (简称 Bc) 的相似性为 85%。说明 *exsB* 在蜡样芽胞杆菌群中具有较强的保守性。

2.2 *exsB* 的转录主要受 SigmaK 因子控制

exsB 在蜡样芽胞杆菌群基因组中具有相似的组织结构, 上下游基因分别编码芽胞衣蛋白 CotH 和磷酸甘油酸变位酶, 编码方向均与 *exsB* 相反。扩增了 *exsB* 启动子片段, 与 *lacZ* 融合获得了重组载体 pHTexsBp, 分别转化到野生型菌株 HD73, HD Δ gerE、HD Δ sigK 中, 命名为 HD (*exsBp-lacZ*)、HD Δ gerE (*exsBp-lacZ*)、HD Δ sigK (*exsBp-lacZ*)。 β -半乳糖苷酶活性测定结果表明 (图 1-A), *exsB* 启动子从 T_0 开始大量转录, T_{10} 达到高峰, 之后持续具有高转录活性, 说明 *exsB* 是晚期表达的基因。与野生型 HD73

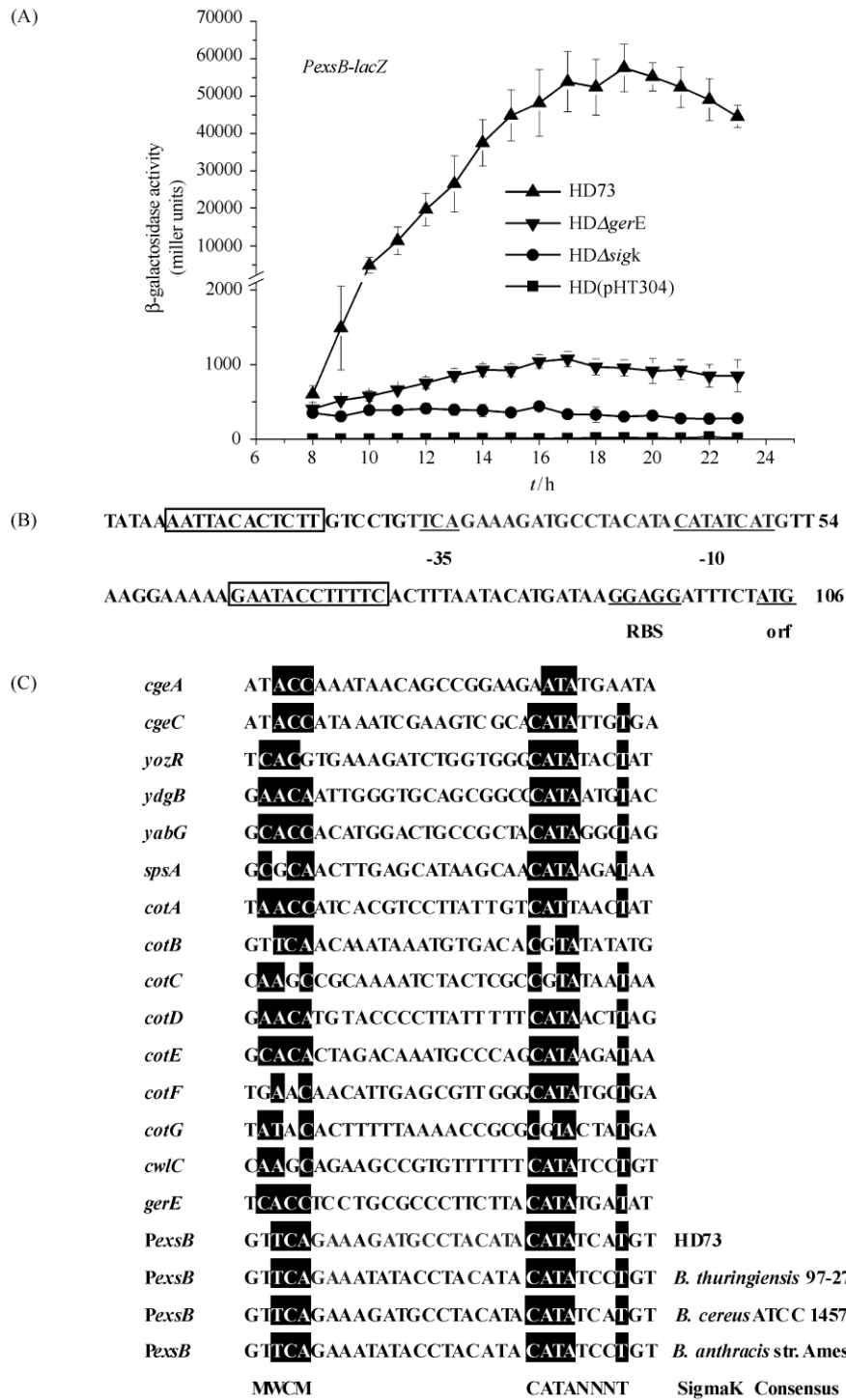


图 1 SigmaK 对 *exsB* 启动子转录调控

Fig. 1 Regulation of the *exsB* gene by SigmaK. A: β -galactosidase activity directed by *exsB* gene promoter in HD73, HD Δ *gerE* and HD Δ *sigk*. B: The promoter region of the operon. The -35 and -10 regions of a possible SigmaK-specific promoter are underlined. A putative ribosome-binding site of the *exsB* gene is underlined (RBS). Putative GerE-binding sites are boxed. C: Sequence similarity between the *PexsB* promoter and the consensus sequences obtained by aligning the SigmaK-dependent promoters of *Bacillus subtilis*. Consensus sequences of SigmaK-dependent promoters are presented above and below the alignment, respectively. W is A or T; M is C or A; N is C, A, T or G.

相比, *exsB* 启动子转录活性在 *sigK* 突变体 HD Δ *sigK* 中降低显著, 说明该基因在芽胞晚期转录主要受 SigmaK 因子控制。进一步分析了启动子中可能的 SigmaK 识别位点, 发现其与枯草芽胞杆菌中受 SigmaK 控制基因启动子中 SigmaK 识别位点相似性极高(图 1-B)。

比较了 HD73 菌株与蜡样芽胞杆菌群代表菌株 *B. thuringiensis* 97-27、*B. anthracis* str. Ames 和 *B. cereus* ATCC 14579 中 *exsB* 启动子的序列, 发现 *exsB* 启动子在 Bc 群菌株中十分保守, 均含有相似的 SigmaK 识别位点。说明 Bc 群菌株中, *exsB* 可能均受到芽胞晚期调控因子 SigmaK 控制(图 1-C)。

2.3 GerE 对 *exsB* 的直接正调控

与野生型 HD73 相比, *exsB* 启动子转录活性在 *gerE* 突变体 HD Δ *gerE* 中活性降低, 说明 GerE 对 *exsB* 转录具有正调控作用(图 1-A), 为了进一步说明 GerE 蛋白是否直接作用于 *exsB* 启动子, 应用凝胶阻滞的方法, 进行了 GerE 蛋白与该启动子的结合实验。

利用载体 pGEXgerE 在大肠杆菌 BL21 中表达 GerE, 得到可溶性的 GerE-GST 融合蛋白。表达产物大小约为 34.6 kDa, 包括 C-末端一个大小约为 7.6 kDa 的 GerE 蛋白和 N-末端一个大小为 27 kDa GST-标签(图 2-A, 泳道 2)。利用 FAM 标记的引物 pexsBc 和 pexsBd 扩增了 *exsBATG* 上游 315 bp 处和 ATG 下游 29 bp 之间 344 bp 的片段。如图 2-B 所示, 凝胶底部的条带为带标记的自由 DNA, 自由 DNA 上层的带为 DNA 与蛋白结合的带, 随着蛋白浓度的增加, 底部自由 DNA 条带浓度越来越低, 上层带浓度逐渐升高, 说明 GerE 蛋白可以与 *exsB* 启动子结合。进一步分析了启动子中可能的 GerE 识别位点, 发现其与枯草芽胞杆菌中受 GerE 控制的基因启动子中 GerE 识别位点相似性极高(图 1-B)。

通过对 Bc 种群 *exsB* 启动子的转录因子位点分析, 我们发现 *exsB* 的启动子在 Bc 种群中是保守的, 其 GerE 识别位点同枯草芽胞杆菌中 GerE 识别位点也具有很高的相似性。这说明在 Bc 种群中, *exsB* 很可能也受到 GerE 蛋白的直接正调控(图 2-C)。

3 讨论

对芽胞外壁的研究工作集中在蜡样芽胞杆菌群和梭状芽胞杆菌这两个种群中, 由于炭疽芽胞杆菌和艰难梭状芽胞杆菌 (*Clostridium difficile*) 等菌种产生的芽胞对人畜具有致病性^[19, 20], 研究芽胞外壁的组成、结构、形态发生以及相关成分的调控对揭示其在芽胞感染人畜过程中所发挥的作用显得尤为重要。目前, 人们陆续报道了 BclA、BxpB、ExsY, CotY, ExsK、ExsB、BetA 和 YwdL^[3, 5-7, 21-24] 芽胞外壁蛋白在芽胞外壁的组装和结构上所发挥的作用。但是这些芽胞外壁蛋白在转录水平上受到哪些因子的调控却没有报道, 本文首次探讨了蛋白 ExsB 编码基因的转录调控机制。

ExsB 蛋白首先在 Bc 中发现^[25], McPherson 等人在 Ba 中对 ExsB 进行了功能的研究。研究发现缺少 *exsB* 的芽胞生长速率、细胞产量、芽胞形成效率不受影响, 虽然可以形成完整的芽胞外壁, 但芽胞外壁极不稳定, 易脱落。他们通过 RT-PCR 的方法确定了 *exsB* 是从芽胞晚期开始转录的, 并预测了 *exsB* 可能受到 SigmaK 因子的转录调控^[5]。

SigmaK 是芽胞晚期母细胞中主要的转录因子, 它控制 71 个转录单位中的 111 个基因, 这些基因主要涉及芽胞皮层合成、芽胞衣骨架成分、芽胞萌发和母细胞的裂解^[9]。GerE 是芽胞母细胞基因表达的最后一个调控蛋白, GerE 激活或抑制依赖于 SigmaK 基因的转录, 这些基因包括编码芽胞衣蛋白的很多基因^[10]。例如, 编码芽胞衣蛋白的基因 *cotC* 由 SigmaK 转录, 并受到 GerE 的正调控^[26]。本研究证实了 *exsB* 主要受到 SigmaK 因子控制, 并发现 GerE 对 *exsB* 在转录水平上有直接的正调控。我们通过对发现, 蜡样芽胞群中 *exsB* 启动子序列相似性高达 95%。这些结果说明 *exsB* 基因在蜡样芽胞杆菌群中具有相同的调控方式。本研究明确了芽胞外壁重要组成蛋白 ExsB 编码基因的转录调控机制, 为研究芽胞外壁其它相关基因的转录调控机制提供了线索, 丰富了芽胞母细胞基因的调控网络, 同时提供了一个新的角度来研究芽胞外壁的形态发生和调控机制。

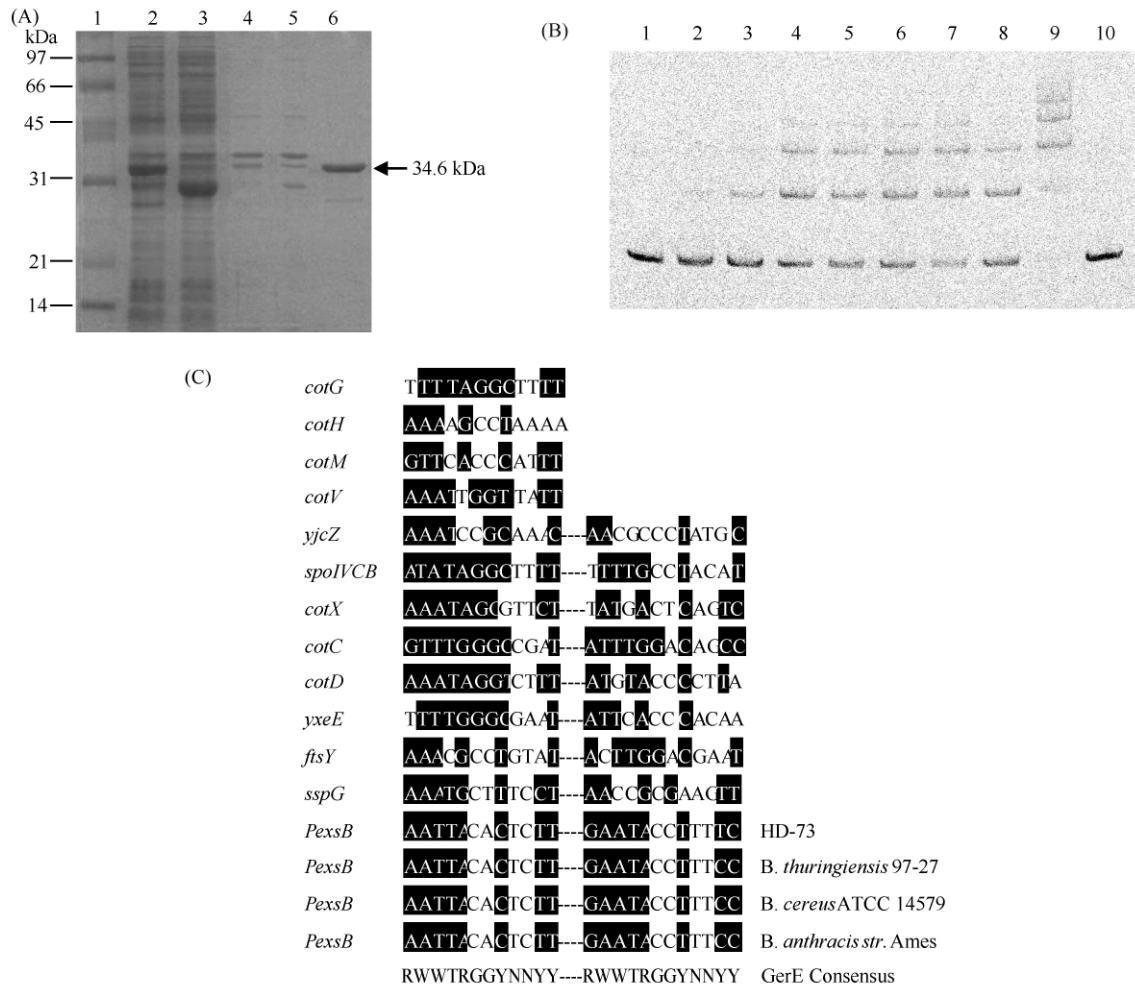


图2 GerE对*exsB*启动子的直接正调控

Fig. 2 Positive regulation of the *exsB* gene by GerE. A: SDS-PAGE analysis of the GerE protein. Lane 1 contained molecular weight standards low range marker, lane 2 and 4 contained respectively crude extract of soluble protein and insoluble protein in BL21gerE, lane 3 and 4 contained respectively crude extract of soluble protein and insoluble protein in BL21pGEX. B: EMSA using labeled *PexsB* and increasing concentrations of recombinant GerE-GST. Lane 1 lacked GerE-GST, lane 2 through 9 contained 1.3, 2.5, 3.8, 5.1, 6.3, 7.6, 8.9 μg/mL GerE-GST, lane 10 lacked GerE, contained 12.7 μg/mL GST. C: Sequence similarity between the *PexsB* promoter and the consensus sequences obtained by aligning the GerE-dependent promoters of *Bacillus subtilis*. Consensus sequences of GerE-dependent promoters are presented above and below the alignment, respectively. R is A or G; W is A or T; Y is T or C; N is C, A, T or G.

参考文献

- [1] Philipp G, Edgar R. Ultrastructure of the Exosporium Enveloping Spores of *Bacillus Cereus*. *Journal of Bacteriology*, 1964, 88 (6) : 1774-1789.
- [2] Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Molecular Microbiology*, 2002, 45 (1) : 169-178.
- [3] Kailas L, Terry C, Abbott N, Taylor R, Mullin N, Tzokov SB, Todd SJ, Wallace BA, Hobbs JK, Moir A, Bullough PA. Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (38) : 16014-16019.
- [4] Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. Contribution of ExsFA and ExsBA proeins to the localization of BelA on

- the spore surface and to the stability of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (15) : 5122-5128.
- [5] McPherson SA, Li M, Kearney JF, Turnbough CL, Jr. ExsB, an unusually highly phosphorylated protein required for the stable attachment of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*, 2010, 76 (6) : 1527-1538.
- [6] Johnson MJ, Todd SJ, Ball DA, Shepherd AM, Sylvestre P, Moir A. ExsY and CotY are required for the correct assembly of the exosporium and spore coat of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (22) : 7905-7913.
- [7] Boydston JA, Yue L, Kearney JF, Turnbough CL, Jr. The ExsY protein is required for complete formation of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (21) : 7440-7448.
- [8] Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews*, 1993, 57 (1) : 1-33.
- [9] Eichenberger P, Fujita M, Jensen ST, Conlon EM, Rudner DZ, Wang ST, Ferguson C, Haga K, Sato T, Liu JS, Losick R. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biology*, 2004, 2 (10) : e328.
- [10] Ducros VM, Lewis RJ, Verma CS, Dodson EJ, Leonard G, Turkenburg JP, Murshudov GN, Wilkinson AJ, Brannigan JA. Crystal structure of GerE, the ultimate transcriptional regulator of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of molecular biology*, 2001 306 (4) : 759-771.
- [11] Schaeffer P, Millet J, Aubert JP. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1965, 54 (3) : 704-711.
- [12] Agaisse H, Lereclus D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cry III A toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 1994, 13 (1) : 97-107.
- [13] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, Lecadet M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 51 (1) : 211-217.
- [15] Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- [16] Han CS, Xie G, Challacombe JF, Altherr MR, Bhotika SS, Brown N, Bruce D, Campbell CS, Campbell ML, Chen J, Chertkov O, Cleland C, Dimitrijevic M, Doggett NA, Fawcett JJ, Glavina T, Goodwin LA, Green LD, Hill KK, Hitchcock P, Jackson PJ, Keim P, Kewalramani AR, Longmire J, Lucas S, Malfatti S, McMurry K, Meincke LJ, Misra M, Moseman BL, Mundt M, Munk AC, Okinaka RT, Parson-Quintana B, Reilly LP, Richardson P, Robinson DL, Rubin E, Saunders E, Tapia R, Tesmer JG, Thayer N, Thompson LS, Tice H, Ticknor LO, Wills PL, Brettin TS, Gilna P. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (9) : 3382-3390.
- [17] Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Holtzapple EK, Okstad OA, Helgason E, Rilstone J, Wu M, Kolonay JF, Beanan MJ, Dodson RJ, Brinkac LM, Gwinn M, DeBoy RT, Madpu R, Daugherty SC, Durkin AS, Haft DH, Nelson WC, Peterson JD, Pop M, Khouri HM, Radune D, Benton JL, Mahamoud Y, Jiang L, Hance IR, Weidman JF, Berry KJ, Plaut RD, Wolf AM, Watkins KL, Nierman WC, Hazen A, Cline R, Redmond C, Thwaite JE, White O, Salzberg SL, Thomason B, Friedlander AM, Koehler TM, Hanna PC, Kolsto AB, Fraser CM. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, 2003, 423 (6935) : 81-86.
- [18] Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, Bhattacharyya A, Reznik G, Mikhailova N, Lapidus A, Chu L, Mazur M, Goltzman E, Larsen N, D'Souza M, Walunas T, Grechkin Y, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Ehrlich SD, Overbeek R, Kyrpides N. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 2003, 423 (6935) : 87-91.
- [19] Joshi LT, Phillips DS, Williams CF, Alyousef A, Baillie L. Contribution of Spores to the Ability of *Clostridium difficile* To Adhere to Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (21) : 7671-7679.
- [20] Welkos S, Little S, Friedlander A, Fritz D, Fellows P. The role of antibodies to *Bacillus anthracis* and anthrax toxin components in inhibiting the early stages of

- infection by anthrax spores. *Microbiology*, 2001, 147 (6) : 1677-1685.
- [21] Thompson BM, Hoelscher BC, Driks A, Stewart GC. Localization and assembly of the novel exosporium protein BetA of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (19) : 5098-5104.
- [22] Terry C, Shepherd A, Radford DS, Moir A, Bullough PA. YwdL in *Bacillus cereus*: its role in germination and exosporium structure. *PLoS One*, 2011, 6 (8) : e23801.
- [23] Severson KM, Mallozzi M, Bozue J, Welkos SL, Cote CK, Knight KL, Driks A. Roles of the *Bacillus anthracis* spore protein ExsK in exosporium maturation and germination. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (24) : 7587-7596.
- [24] Steichen CT, Kearney JF, Turnbough CL. Characterization of the exosporium basal layer protein BxpB of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriol*, 2005, 187 (17) : 5868-5876.
- [25] Todd SJ, Moir AJ, Johnson MJ, Moir A. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (11) : 3373-3378.
- [26] Zheng L, Halberg R, Roels S, Ichikawa H, Kroos L, Losick R. Sporulation regulatory protein GerE from *Bacillus subtilis* binds to and can activate or repress transcription from promoters for mother-cell-specific genes. *Journal of molecular biology*, 1992, 226 (4) : 1037-1050.

Transcriptional regulation of exosporium basal layer structural gene *exsB* in *Bacillus thuringiensis* by SigmaK and GerE

Ning Qu^{1,2}, Qi Peng², Lili Qiu¹, Chunxia Liu², Zhen Chen², Jie Zhang², Fuping Song^{2*}, Jie Li^{1*}

¹College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

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

Abstract: [Objective] To identify the transcriptional regulation of exosporium basal layer structural gene *exsB* in *Bacillus thuringiensis*. [Methods] We analyzed *exsB* and its promoter sequence in *Bacillus cereus* group by sequence alignment. We performed beta-galactosidase assay of *exsB-lacZ* gene fusion to analyze transcriptional activation of *exsB* promoter; we used Electrophoretic mobility shift assays to detect binding of GerE and *exsB* promoter. [Results] *exsB* was the high similarity in *Bacillus cereus* group strains. Beta-galactosidase assay showed that *exsB* promoter had the strong transcriptional activation on the late sporulation phase. Deletion of *gerE* or *sigK* gene decreased the activation of *exsB* promoter. Electrophoretic mobility shift assays showed that GerE could bind with *exsB* promoter. [Conclusion] The *exsB* gene is regulated by SigmaK and GerE on the late sporulation phase.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Exosporium, *exsB*, SigmaK, GerE

(本文责编:张晓丽)

Supported by Key Project of Chinese National Program for Fundamental Research and Development (2009CB118902) and by the National Natural Science Foundation of China (31070083)

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

Received: 31 October 2012/Revised: 13 December 2012