

苏云金芽胞杆菌 *clpP* 基因缺失对碱刺激敏感性的影响

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

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】比较苏云金芽胞杆菌与枯草芽胞杆菌在碱性培养条件下生长情况, 明确 *clpP* 基因在碱刺激条件下的作用。【方法】采用同源重组技术敲除苏云金芽胞杆菌 HD73 菌株 *clpP* 基因, 通过在不同 pH 下生长曲线的测定明确了 *clpP* 基因缺失突变体对碱性环境的敏感性, 测定 *clpP* 基因的缺失对芽胞形成率、芽胞萌发效率和盐胁迫的影响。【结果】苏云金芽胞杆菌在碱刺激后, 当培养基 pH 值为 8.9-9.1 时可以恢复生长, 而枯草芽胞杆菌在 pH 值为 8.2-8.4 时可以恢复生长, 说明苏云金芽胞杆菌对碱性环境适应能力更强, 这有助于作为病原菌的 Bt 适应昆虫中肠的碱性环境。*clpP* 基因缺失对芽胞形成率和萌发效率没有明显的影响。在将培养基中 NaOH 终浓度调节至 30 mmol/L NaOH 时, *clpP* 基因缺失突变体的生长较出发菌株慢。说明 ClpP 在苏云金芽胞杆菌对碱性环境的适应过程中具有重要作用。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, *clpP* 基因, 碱刺激

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 06-0615-08

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 属于蜡样芽胞杆菌族, 是一种广泛存在于土壤中的革兰氏阳性细菌, 其可以在芽胞形成的同时产生对多种昆虫具有特异毒性的杀虫晶体蛋白 (Cry 或 Cyt), 杀虫晶体蛋白多为酸性蛋白, 在昆虫中肠碱性环境中易于溶解, 并由中肠蛋白酶消化成活性毒素才能够发挥杀虫作用^[1]。但 Bt 的营养体在被昆虫食入后遇到中肠的碱性环境能否生存尚不清楚。同属蜡样芽胞杆菌族的蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*, 简称 Bc) 营养体单独不具有杀虫活性, 但研究发现 Bc 营养体和非致死量的 Cry 蛋白混合能够产生致死效应^[2], 说明蜡样芽胞杆菌的营养体在昆虫中肠的碱性环境中能够生存并与 Cry 蛋白共同发挥杀虫

作用, 但是蜡样芽胞杆菌族菌株如何适应碱性环境和在其中生存仍不清楚。

在枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*, 简称 Bs) 中比较系统地研究了菌株对碱性环境的应答。碱刺激枯草芽胞杆菌后, 涉及大量基因表达变化, 其中有 83 个基因表达量被诱导了超过 4 倍以上, 有至少 60 个基因表达量下降, 说明枯草芽胞杆菌对于碱刺激具有十分复杂的的应答机制^[3]。在被诱导表达的基因中很多受 SigW 控制, 但是 *sigW* 基因的缺失并没有改变菌株对碱性环境的敏感性^[4], 而参与 SigW 激活的 *clpP* 基因的缺失使得菌体对碱性刺激敏感性增加^[5]。此外, 枯草芽胞杆菌中的 *clpP* 基因参与到多种与压力刺激相关的途径中, 如 DNA 损伤、热

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

* 通信作者。Tel: +86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

作者简介: 邱丽丽(1987-), 女, 黑龙江人, 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: qiu.li-li@163.com

收稿日期: 2012-11-05; 修回日期: 2013-03-01

刺激、感受态细胞的激活和芽胞相关信号等^[6]。

ClpP (Caseinolytic protease) 是一类蛋白水解酶^[7], 最早发现于大肠杆菌中^[8]。广泛存在于原核生物和真核生物中, 高度保守的依赖于 ATP 的 ClpP 蛋白酶由 Clp ATP 酶亚单位和 ClpP 肽酶亚单位组成, 起水解作用的区域是位于活性中心的 ClpP 肽酶, 是由 2 个堆积在一起的丝氨酸肽酶七聚体组成, 并将活性区域隐藏在内部的相对独立的区域; ClpP 肽酶和一个或两个 Clp ATP 酶六聚体结合获得蛋白水解的活性, Clp ATP 酶的作用是通过识别、解折叠或易位将底物转移至具有蛋白酶活性的区域内, 以发挥水解酶活性。编码 ClpP 肽酶的 *clpP* 基因突变会引起许多表型上的变化, 包括提高对压力的敏感性、引起细胞形态混乱、停止分裂、细菌毒力减弱等^[6], *clpP* 基因在许多细菌中还能影响生物膜的形成^[9-12]。

苏云金芽胞杆菌中研究了 *clpP* 基因缺失对高盐和低温的影响, 发现在培养基中添加浓度为 6%

NaCl 时, 突变体与野生型菌株相比更加敏感; 同样, 对于较低温度 (25℃、28℃) 的刺激突变体也比野生型敏感^[13]。但苏云金芽胞杆菌中 *clpP* 基因缺失对于碱刺激的影响仍不清楚。

本研究比较了苏云金芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌对碱刺激的适应能力, 利用同源重组方法构建了 HD73 菌株 *clpP* 基因缺失突变体 HDΔ*clpP*, 并且分析了突变体在碱刺激下的生长情况、芽胞形成率、芽胞萌发效率和在盐胁迫下的生长情况。本研究的发现将为苏云金芽胞杆菌与环境 and 宿主的互作研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 所用的菌株和质粒见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和 Bt 的培养采用 LB 培养基; 芽胞萌发实验采用 CCY 培养基^[14]。

表 1. 菌株和质粒
Table 1. Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
Strains		
<i>E. coli</i> JM110	<i>Dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi</i> , <i>leu</i> , <i>rpsL1</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>thr</i> , <i>tsx</i> , <i>D (lac-proAB)</i> (<i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIq Z M15</i>)	Novagen
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rpsL (Strr)</i> <i>thrl</i> <i>euendA</i> <i>thi-1</i> <i>lacYgalKgalTaratons</i> <i>Atsx</i> <i>dam</i> <i>dcm</i> <i>supE44Δ</i> (<i>lac-proAB</i>) [<i>F'</i> <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacIqZΔM15</i>]	This Lab
HD73	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain carrying <i>cry1Ac</i> gene	This Lab
HDΔ <i>clpP</i>	HD73 Mutant, <i>clpP</i> gene was deleted by homologous recombination	This study
Bs 168	<i>trpC2</i>	[15]
Plasmids		
pMAD	Bt- <i>E. coli</i> shuttle, temperature-sensitive plasmid, Amp ^r , Em ^r	This Lab
pMADΔ <i>clpP</i>	pMAD carrying partial <i>clpP</i> flank gene	This study

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶购自于博迈德生物技术公司; PCR 产物回收试剂盒购自于 AXYGEN 公司, PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、相关的内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自于宝生物工程 (大连) 有限公司。培养基 pH 测定采用 METTLER TOLEDO 公司 SevenEasy Plus S20P 型微电极 pH 计。芽胞萌发采用 Biotech 公司 Synergy-4 多功能酶标仪。

1.1.3 引物合成及序列测定: 所用引物均根据 Bt HD73 株基因组序列设计, 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

由中国农业科学院作物科学研究所开放实验室完成。

表 2. 引物序列

Table 2. sequences of primers

Primer name	Sequences (5'→3')
ClpPIF	(<i>Bam</i> HI) CGCGGATCCTTTTCACGGCGTCTTTGCGATAC
ClpPIR	CGCTTTTAGTTATTACATCTGTTATTTCCTCCTTATAAAG
ClpP2F	AGGAAATAACAGATGTAATAACTAAAAGCGAAAGC
ClpP2R	(<i>Eco</i> RI) CGGAATTCTGGTCGACACTAAGGCAGATT
ClpPLF	TGCAACAGTCGTACGGTCAT
ClpPLR	TGTGAAGTATGATGAACGGATTTG

1.2 细菌的培养条件

苏云金芽胞杆菌在 30℃ 培养, 摇床转速为 220 r/min; 在突变过程中苏云金芽胞杆菌的培养温度为 32℃, 摇床转速为 180 r/min, 红霉素的使用浓度均为 5 μg/mL。 *E. coli* JM110 在 37℃ 培养, 摇床转速为 220 r/min, 氨苄霉素使用浓度为 100 μg/mL。

1.3 DNA 操作、转化、PCR

大肠杆菌质粒提取及转化, DNA 片段纯化参考文献 [16]。苏云金芽胞杆菌总 DNA 提取和电击转化参考文献 [17]。

1.4 突变体的构建

pMAD 是 *E. coli-Bacillus* 穿梭载体, 含有革兰氏阳性菌温度敏感型的复制区, 用于同源重组, 进行基因敲除操作, 方法见参考文献 [18]。应用重叠 PCR 技术扩增得到重叠片段 ClpPAB。插入到 pMAD 质粒相应位点构建敲除载体 pMAD Δ ClpP, 转化进入 HD73 菌株中, 高温突变缺失 *clpP* 基因。挑选对红霉素敏感的菌株, 并以引物 ClpP1F、ClpP2R 进行筛选鉴定。

1.5 菌株生长曲线测定

将各菌株接种于 LB 液体培养基中 220 r/min、30℃ 培养, 每 1 h 取样 1 mL, 利用分光光度计测定在波长 600 nm 的吸光值 OD_{600} , 确定各菌株的生长曲线; 同时用 pH 计检测培养基 pH 变化情况。

1.6 芽胞萌发率分析

将活化过夜的菌液 1% 接种于 CCY 培养基, 30℃, 200 r/min 培养 72 h, 镜检至体系中芽胞率大于 99% 为止; 离心收集芽胞, 用灭菌水洗涤 10 次, 镜检至无晶体; 最后用萌发缓冲液悬浮芽胞至 $OD_{600} = 1.0$ ($= 4.0 \times 10^8$ 个芽胞/mL)。在测定芽胞萌发率时, 将制备的芽胞离心收集, 并用灭菌水将芽胞悬浮至 $OD_{600} = 1.0$, 85℃ 处理 15 min。用灭菌水洗涤芽胞 3 次, 再用萌发缓冲液悬浮芽胞至初始浓度, 然后将芽胞放置于 37℃, 预培养 30 min, 然后分别以 50 mmol/L 肌苷和 100 mmol/L 丙氨酸为萌发剂, 37℃, 萌发 45 min, 每 2 min 检测反应体系中芽胞悬浮液在 600 nm 的光密度, 每 45 s 震荡一次, 使芽胞均匀分布^[14]。

1.7 芽胞形成率分析

取培养至对数生长期结束后一小时的菌体进行梯度稀释涂平板, 12 h 后记录平板上长出的克隆数, 计为 N_1 ; 取完全释放芽胞的培养液进行梯度稀

释, 65℃ 热处理 30 min 后涂平板, 12 h 后记录平板上长出的克隆数, 记为 N_2 , 计算芽胞形成率 = $N_1/N_2 * 100\%$ 。

2 结果

2.1 碱刺激对菌株生长的影响

为了研究碱刺激对 Bt 和 Bs 生长情况的影响, 在 LB 培养基中向对数期 ($OD_{600} = 0.7$) 的菌液中分别添加 NaOH 至终浓度为 0 mmol/L (CK)、24 mmol/L、26 mmol/L、28 mmol/L、30 mmol/L, 对应初始 pH 分别为 7.05 (CK)、9.15、9.22、9.28、9.38; 对于 Bs 168 则用同样的方法添加 NaOH 至终浓度为 0 mmol/L (CK)、18 mmol/L、20 mmol/L、22 mmol/L、24 mmol/L, 对应 pH 分别为 7.03 (CK)、8.80、8.89、9.02、9.11。测定菌株生长情况及培养基 pH 变化并进行 3 次重复, 趋势完全一致, 结果发现培养基中加入 NaOH 后 Bt HD73 和 Bs 168 生长都受到抑制, 在 NaOH 浓度不同的培养基中受到的抑制情况不同, 恢复生长时间不同, NaOH 浓度越高, 生长越滞后, 恢复生长需要的时间越长; 但无论初始 NaOH 的浓度为多少, Bt 和 Bs 恢复生长都对各自对应固定的 pH 范围 (图 1), 其中实线均代表 Bt、Bs 在不同 NaOH 浓度下的生长情况, 虚线代表此生长情况下所对应的培养基 pH, 被放大的点表示在受到 NaOH 抑制后恢复生长时所对应的 OD 值及 pH 值。即 Bt HD73 在培养基 pH 为 8.9 - 9.1 时可以恢复生长; Bs 168 在培养基 pH 为 8.2 - 8.4 时可以恢复生长, 说明 Bt 对碱刺激的适应能力要强于 Bs。

2.2 *clpP* 基因缺失突变株的构建

从 HD73 的基因组序列中克隆得到 *clpP* 基因缺失突变盒的侧臂构建 pMAD Δ ClpP (图 2-A), 并转化 HD73 菌株中进行高温突变, 筛选对红霉素敏感的菌株。用突变盒引物 ClpPLR 和 ClpPLF, 以红霉素敏感菌株和出发菌株 HD73 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 鉴定。出发菌株扩增得到的片段约 2.3 kb, 敏感菌株扩增片段约 1.8 kb, 较出发菌株扩增片段小 500 bp, 即为缺失 *clpP* 基因菌株 (图 2-B), 命名为 HD Δ *clpP*。

2.3 *clpP* 基因缺失在碱刺激下对菌株生长的影响

分别在培养基中加入 NaOH 终浓度为 24 mmol/L 和 30 mmol/L 时, 测定了 HD73 和 HD

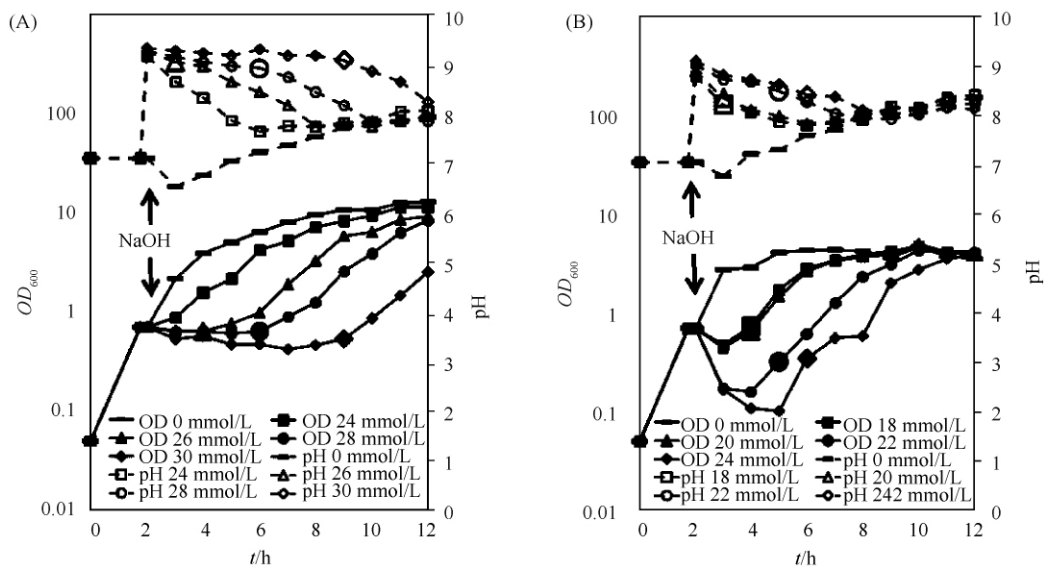


图 1. 碱刺激对菌株生长的影响

Figure 1. Growth curves of *Bacillus* strains after alkaline shock. A: *B. thuringiensis* HD73; B: *B. subtilis* 168; Closed symbols and straight lines stand for growth curves, open symbols and dotted lines stand for pH value curves of the correspondent growth medium. The enlarged symbols indicate pH value and OD_{600} for the recovery point of growth.

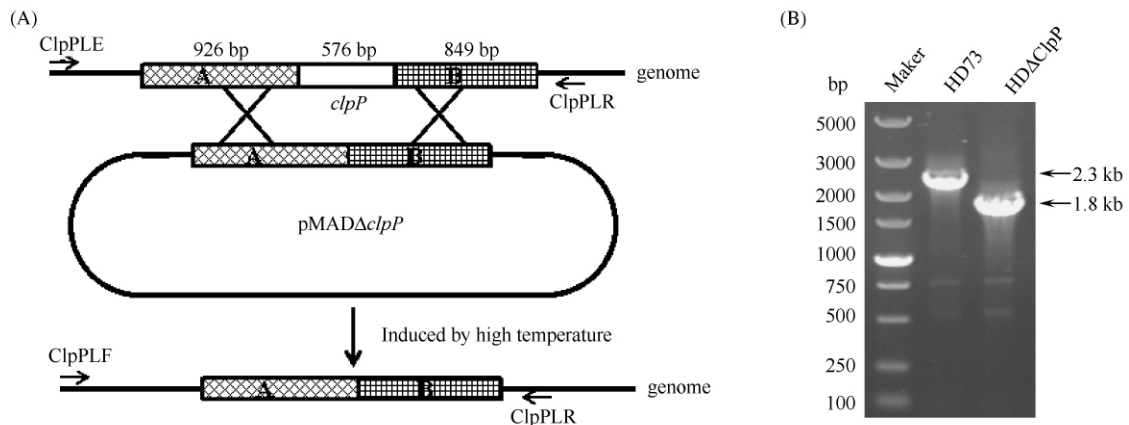


图 2. *clpP* 基因缺失突变体的构建 (A) 和 PCR 鉴定 (B)

Figure 2. Construction (A) and PCR identification (B) of *clpP* gene deletion mutant.

$\Delta clpP$ 的生长曲线及生长过程中 pH 的变化情况, 其中实线代表 Bt 下所对应的培养基 pH, 被放大的点表示在受到 NaOH 抑制后恢复生长时所对应的 OD 值及 pH 值。结果表明在 NaOH 终浓度为 24 mmol/L (pH = 9.15) 情况下 HD73 和 HD $\Delta clpP$ 生长情况基本没有差异 (图 3-A), 但在 NaOH 终浓度为 30 mmol/L (pH = 9.38) 情况下 HD $\Delta clpP$ 比 HD73 生长滞后的时间更长、恢复生长所需要的时间更长 (图 3-B), 说明 *clpP* 基因对碱刺激的适应起着重要的作用。

HD73 及 HD $\Delta clpP$ 在 NaOH 浓度为 24 mmol/L 和 30 mmol/L 下的生长情况, 虚线代表此生长情况。

2.4 *clpP* 基因缺失对菌株芽胞形成率的影响

活芽胞计数实验表明: 与 HD73 相比, HD $\Delta clpP$ 的芽胞形成率没有明显变化 (图 4), 说明 *clpP* 基因的缺失并没有对芽胞形成产生影响。

2.5 HD $\Delta clpP$ 在不同 pH 下的萌发情况

在萌发剂终浓度为 50 mmol/L 肌苷和 100 mmol/L 丙氨酸的条件下, 测定了在不同 pH 值的萌发缓冲液中芽胞的萌发情况, 结果发现 HD73

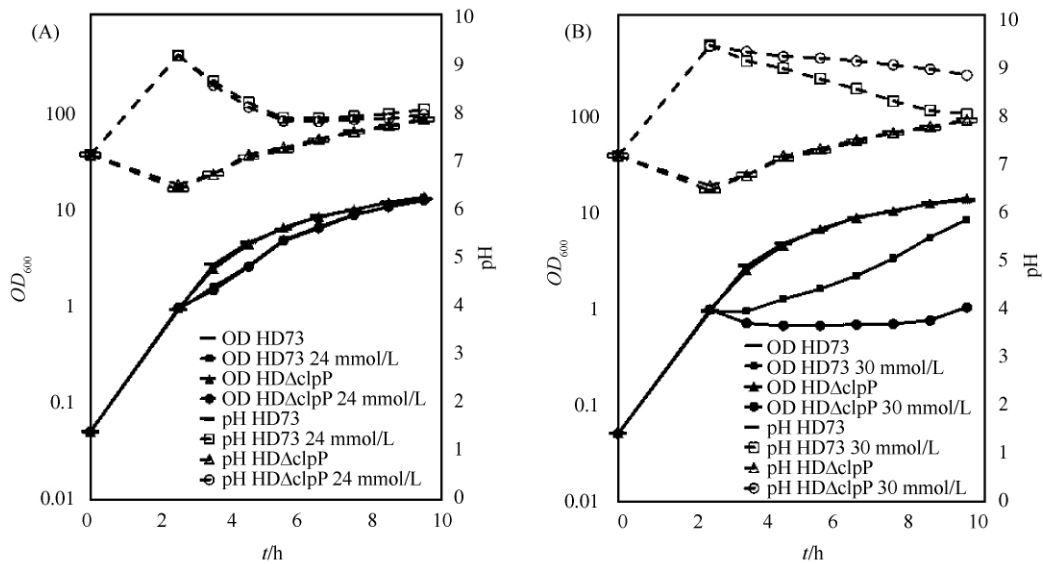


图 3. HD Δ *clpP* 在不同 pH 下的生长情况

Figure 3. Growth curves of HD Δ *clpP* under different pH. A. NaOH 24 mmol/L; B. NaOH 30 mmol/L. Closed symbols and straight lines stand for growth curves, open symbols and dotted lines stand for pH value curves of the correspondent growth medium. The enlarged symbols indicate pH value and OD_{600} for the recovery point of growth.

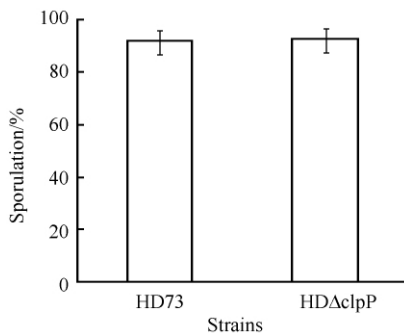


图 4. HD73 和 HD Δ *clpP* 芽胞形成率

Figure 4. Sporulation of HD73 and HD Δ *clpP*.

菌株随着 pH 浓度增加, 萌发速率变慢, 但萌发效率增加 (图 5-A), 说明高 pH 有利于芽胞萌发。HD Δ *clpP* 在不同 pH 值下, 芽胞萌发效率与野生型 HD73 没有明显的差异 (图 5-B), 说明 *clpP* 基因的缺失不影响芽胞的萌发。

2.6 盐刺激对菌株生长的影响

为了进一步证实 *clpP* 基因在逆境环境下的作用及与之前研究结果是否符合, 测定了 *clpP* 基因缺失对高浓度盐刺激的影响, 在 LB 培养基中将对数期 ($OD_{600} = 0.7$) 的菌液离心收集, 转接至正常浓度 NaCl (1%) 和高浓度 NaCl (6%) 的 LB 培养基中, 结果发现转接到高浓度 NaCl 培养基中 HD73 和 HD Δ *clpP* 生长均受到抑制, 但 HD73 受到的抑制作用

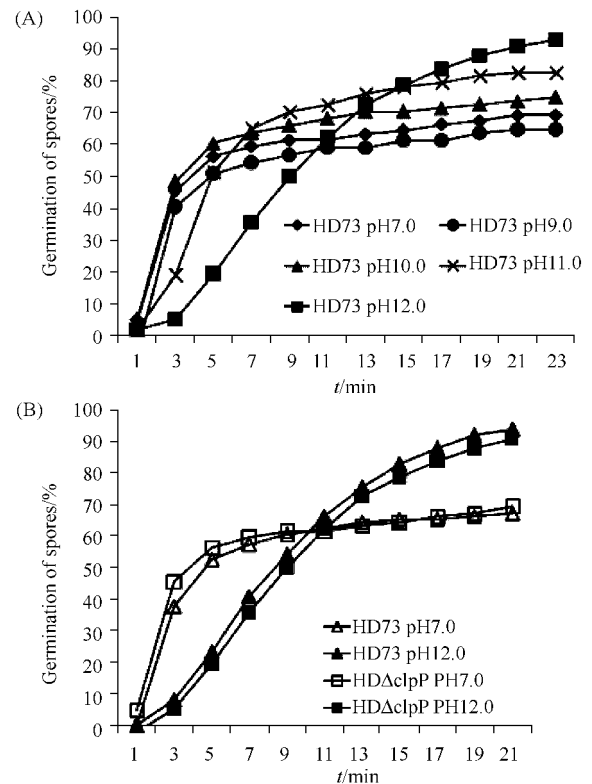


图 5. 芽胞萌发效率

Figure 5. Germination of spores. A. HD73. B. HD Δ *clpP*.

要比 HD Δ *clpP* 弱, 说明 *clpP* 基因在盐胁迫的条件下对菌株的生长具有重要作用, 并与已知文献报道

结果一致。

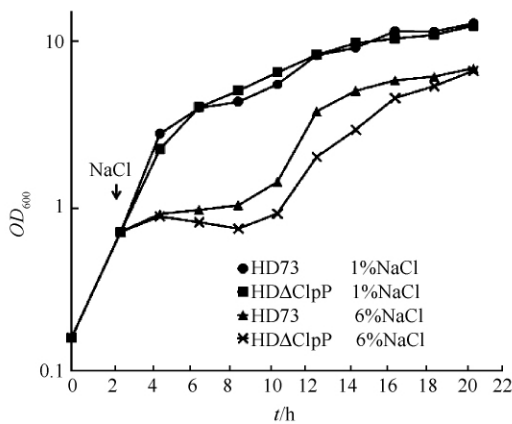


图 6. HD73 和 HD Δ clpP 在 6% NaCl 刺激下的生长情况

Figure 6. Growth curves of HD73 and HD Δ clpP after salt shock.

3 讨论

在培养基中加入 NaOH 后, Bt 在培养基 pH 降低到 8.9 – 9.1 时可以恢复生长, 但是 Bs 只有在培养基 pH 降低至 8.2 – 8.4 时才可以恢复生长, 说明与枯草芽胞杆菌相比, 苏云金芽胞杆菌对碱刺激具有更好的适应性。研究发现 *clpP* 基因缺失使枯草芽胞杆菌对碱刺激更敏感^[5], 苏云金芽胞杆菌 *clpP* 基因缺失也具有同样的表型, 但在碱刺激下, 当培养基初始 NaOH 浓度在较低水平 (24 mmol/L) 时, 野生型 HD73 和 HD Δ clpP 的生长情况没有明显的差异; 当培养基初始 NaOH 浓度在较高水平 (30 mmol/L) 时, 相对于野生型 HD73, HD Δ clpP 在恢复生长时间变长, 而枯草芽胞杆菌中 *clpP* 基因的缺失使得枯草芽胞杆菌在 NaOH 浓度为 24 mmol/L 时相对与野生型生长明显滞后。进一步说明 Bt 比 Bs 对碱性环境的适应能力更强, 以上分析说明在碱刺激条件下, Bt 和 Bs 可能具有不同响应途径, 或者应答机制更为复杂, 因此进一步深入研究苏云金芽胞杆菌在碱性环境条件下应答的分子机制十分必要。

ClpP 蛋白酶复合物除了具有清除受损蛋白维持细胞内蛋白量的作用外^[20], 还具有在蛋白水平调控的功能, 其可以通过控制关键调控蛋白水平来控制细胞在特定压力下的响应^[6], 如在热刺激或 DNA 损伤时, ClpXP 复合物水解 HidR (heat and

DNA damage-inducible regulator), 激活其抑制的相关基因的表达^[21]; 在革兰氏阳性细菌中 Spx 是氧压力下的全局调控因子, 是 ClpXP 蛋白酶的水解底物之一, Spx 与 RNA 聚合酶的 α 亚基相互作用调控相关基因的转录, 而 ClpXP 缺失会使 Spx 积累, 从而影响与 RNA 聚合酶相互作用的转录激活因子的功能, 如控制感受态细胞产生的 ComA 和对氧压力应答的 ResD 等^[21-25]; 在枯草芽胞杆菌中反 Sigma 因子 RsiW 与 ECF sigma 因子 (extracytoplasmic alternative sigma factor) SigW 结合抑制其控制基因的转录, 在碱刺激下, RsiW 被 ClpXP/ClpEP 复合物水解, 释放 SigW 激活其控制基因的表达^[5]; 但是进一步研究发现 SigW 的缺失没有影响细菌对碱刺激的敏感性^[4], 说明 ClpP 水解酶可能控制着未知调控蛋白的水解对碱刺激作出应答。在金黄色葡萄球菌中, *clpP* 基因缺失突变体与野生型的基因芯片结果显示, *clpP* 基因的缺失降低了 *lrgA* 基因的表达^[26], *lrgA* 基因可能是参与到细菌对 pH 调节的基因^[27], 因此 *clpP* 基因对于碱刺激的敏感性增加可能是通过调控 *lrgA* 基因的 LytS/LytR 双组份信号系统起作用。

本研究发现了苏云金芽胞杆菌比枯草芽胞杆菌对碱刺激具有更强的适应性, 同时证明了 *clpP* 基因在菌株碱适应过程中发挥重要作用, 为研究细菌适应碱性刺激的机制提供了线索。

参考文献

- [1] Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 2010, 18 (5): 189–194.
- [2] Fedhila S, Buisson C, Dussurget O, Serron P, Glomski IJ, Liehl P, Lereclus D, Nielsen-LeRoux C. Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103 (1): 24–29.
- [3] Wiegert T, Homuth G, Versteeg S, Schumann W. Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* sigma (W) regulon. *Molecular Microbiology*, 2001, 41 (1): 59–71.
- [4] Helmann JD. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in Microbial physiology*, 2002, 46: 47–110.

- [5] Zellmeier S, Schumann W, Wiegert T. Involvement of Clp protease activity in modulating the *Bacillus subtilis* sigmaW stress response. *Molecular Microbiology*, 2006, 61 (6) : 1569-1582.
- [6] Frees D, Savijoki K, Varmanen P, Ingmer H. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 2007, 63 (5) : 1285-1295.
- [7] Yu AY, Houry WA, ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Letters*, 2007, 581 (19) : 3749-3757.
- [8] Gottesman S, Clark WP, Maurizi MR. The ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence of *clpA* and identification of a Clp-specific substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265 (14) : 7886-7893.
- [9] Lemos JA, Burne RA. Regulation and physiological significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (22) : 6357-6366.
- [10] Nair S, Poyart C, Beretti JL, Veiga-Fernandes H, Berche P, Trieu-Cuot P. Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest. *Microbiology*, 2003, 149 (Pt 2) : 407-417.
- [11] Wawrzynow A, Wojtkowiak D, Marszalek J, Banecki B, Jonsen M, Graves B, Georgopoulos C, Zylicz M. The ClpX heat-shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *The EMBO Journal*, 1995, 14 (9) : 1867-1877.
- [12] Gaillot O, Pellegrini E, Bregenholt S, Nair S, Berche P. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 2000, 35 (6) : 1286-1294.
- [13] Fedhila S, Msadek T, Nel P, Lereclus D. Distinct *clpP* genes control specific adaptive responses in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (20) : 5554-5562.
- [14] Clements MO, Moir A. Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (24) : 6729-6735.
- [15] Smith TJ, Foster SJ. Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (13) : 3855-3862.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (11) : 6887-6891.
- [19] Fisher N, Hanna P. Characterization of *Bacillus anthracis* germinant receptors in vitro. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (23) : 8055-8062.
- [20] Kruger E, Witt E, Ohlmeier S, Hanschke R, Hecker M. The Clp proteases of *Bacillus subtilis* are directly involved in degradation of misfolded proteins. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (11) : 3259-3265.
- [21] Savijoki K, Ingmer H, Frees D, Vogensen FK, Palva A, Varmanen P. Heat and DNA damage induction of the LexA-like regulator HdiR from *Lactococcus lactis* is mediated by RecA and ClpP. *Molecular Microbiology*, 2003, 50 (2) : 609-6021.
- [22] Zuber P. Spx-RNA polymerase interaction and global transcriptional control during oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (7) : 1911-1918.
- [23] Duwat P, Ehrlich SD, Gruss A. Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 1999, 31 (3) : 845-858.
- [24] Frees D, Varmanen P, Ingmer H. Inactivation of a gene that is highly conserved in Gram-positive bacteria stimulates degradation of non-native proteins and concomitantly increases stress tolerance in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 2001, 41 (1) : 93-103.
- [25] Hong SH, Wang X, O'Connor HF, Benedik MJ, Wood TK. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microbial Biotechnology*, 2012, 5 (4) : 509-522.
- [26] Michel A, Agerer F, Hauck CR, Herrmann M, Ullrich J, Hacker J, Ohlsen K. Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (16) : 5783-5796.
- [27] Patton TG, Yang SJ, Bayles KW. The role of proton motive force in expression of the *Staphylococcus aureus* *cid* and *lrg* operons. *Molecular Microbiology*, 2006, 59 (5) : 1395-1404.

Effect of *clpP* disruption on alkaline sensitivity of *Bacillus thuringiensis*

Lili Qiu^{1,2}, Qi Peng², Ning Qu^{1,2}, Chunxia Liu², Jie Li¹, Jie Zhang², Fuping Song^{2*}

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

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

Abstract: [Objective] We compared alkaline tolerance between *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *B. subtilis* (Bs) and to determine the effect on growth when the *clpP* gene encoding caseinolytic protease is disrupted after alkaline shock. [Methods] *B. thuringiensis* HD73 mutant with the deletion of *clpP* gene was constructed by homologous recombination. The effects of *clpP* deletion on the growth after alkaline shock, sporulation and germination were analyzed. [Results] Bt can recover growth from alkaline shock when the medium pH was between 8.9 and 9.1 whereas that was between 8.2 and 8.4 for Bs. Bt tolerated alkaline more than Bs, leading Bt to adapt in alkaline environment of the midgut as a pathogen of insect. Deletion of *clpP* gene had no influence on sporulation and germination. The *clpP* mutant grew slower than Bt HD73 in the LB medium in addition to NaOH of 30 mmol/L. It indicates that the ClpP plays an important role in the alkaline tolerance of Bt strain.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *clpP* gene, alkaline shock

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Major Project of China National Programs 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@ippcaas.cn

Received: 5 November 2012/Revised: 1 March 2013

科学出版社新书推介(2013年3、4月)

比较蛋白质组学的生物信息学(影印版)



作者:(美) C. H. Wu等; ISBN:9787030369901; 定价:120; 开本:16; 装帧:平装; 页码:404

内容简介:随着生命科学和临床应用蛋白质组学技术的快速发展,许多生物信息学的研究方法、数据库、软件工具已经可以用于支持比较蛋白质组学的研究。《比较蛋白质组学的生物信息学(影印版)》分为3个主要部分,包括与比较蛋白质组学相关的基础生物信息学框架、蛋白质组学数据分析的生物信息学数据库和工具,以及在系统生物学背景下的比较蛋白质组学关于整合生物信息的系统学和研究方法。本书提供了详细的操作建议,逐步地描述操作过程,务求让使用者在实验室获得最佳的实验结果。

订购方式1:网上购书

淘宝商城科学出版社旗舰店:<http://kxcbs.tmall.com/>; 卓越亚马逊:<http://www.amazon.cn/>;

当当网:<http://www.dangdang.com/>; 京东图书:<http://book.360buy.com/>

订购方式2:电话购书

联系人:科学出版社 贾海涛 13501022258 010-64017321

订购方式3:邮件购书

生物分社:lifescience@mail.sciencep.com; 贾海涛:jjahaitao@mail.sciencep.com