

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(10):1129–1137; 4 October 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.004

苏云金芽胞杆菌 *bkd* 基因簇的转录调控

王冠男^{1,2}, 彭琦², 郑庆云^{1,2}, 李杰¹, 张杰², 宋福平^{2*}

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

摘要: 【目的】通过分析苏云金芽胞杆菌 *bkd* 基因簇的转录调控和 *bkdR* 突变体的表型特征, 明确 *bkdR* 所在基因簇的转录调控机制和对 Cry 蛋白产量的影响。【方法】通过生物信息学方法分析 *bkdR* 所在基因簇的结构, RT-PCR 分析基因簇的转录单元, 采用同源重组技术敲除苏云金芽胞杆菌 HD73 菌株的 *bkdR* 基因, 利用启动子融合 *lacZ* 的方法分析启动子的转录活性。利用总蛋白定量确定 Cry1Ac 蛋白产量。【结果】*bkd* 基因簇由 8 个基因组成, 其中 *ptb-bkdB7* 个基因组成 1 个转录单元。*ptb* 基因的启动子转录活性在 *sigL* 和 *bkdR* 突变体中均明显降低。*bkdR* 基因的缺失对菌体生长、芽胞形成率和 Cry1Ac 蛋白产量无影响, 但使运动能力减弱。【结论】*bkd* 操纵子受 Sigma 54 控制, 并由 BkdR 激活, *bkdR* 基因的缺失对 Cry 蛋白产量无影响, 对菌株的运动能力有影响。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, 增强子结合蛋白 (Enhancer Binding Proteins, 简称 EBPs), *bkdR* 基因, 转录起始因子 Sigma 54

中图分类号: Q933 文章编号: 0001-6209(2014)10-1129-09

Sigma 因子是识别启动子、与 RNA 聚合酶核心酶结合并起始转录的关键因子, 根据识别位点和作用方式不同, 在细菌中主要分为两大类型: 第一类为 Sigma 70 型, 主要识别启动子 -35/-10 区; 另一类是 Sigma 54 型, 与 Sigma 70 型有 3 个不同特点: (1) 它在不与 RNA 聚合酶核心酶结合的条件下可以直接与识别的 DNA 序列结合^[1]; (2) 识别启动子 -24/-12 区^[2]; (3) 必须由增强子结合蛋白 (Enhancer Binding Proteins, 简称 EBPs) 对其激活才能起始转录^[2]。EBPs 一般有 3 个典型的结构域: N

端信号感应结构域, 主要功能是感受信号并调节 EBPs 的活性; 中间 AAA⁺ 结构域, 主要功能是水解 ATP 释放能量, 与 Sigma 54 因子结合; C 端 HTH (helix-turn-helix) 结构域, 负责与特异的 DNA 序列结合。以上 3 个结构域中, AAA⁺ 结构域具有很强的保守性^[2], 可通过其保守序列在细菌的全基因组中寻找 EBPs。目前已知, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中有 13 种 EBPs^[3]; 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 中有 22 种 EBPs^[4]; 枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中有 5 种 EBPs: LevR 调控果

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270111)

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

作者简介: 王冠男 (1987-), 男, 黑龙江省巴彦县人, 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: wang_guannan@126.com

收稿日期: 2014-01-02; 修回日期: 2014-04-29

聚糖酶操纵子^[5]、RocR 调控精氨酸代谢途径^[6]、AcoR 调控 3-羟基丁酮分解代谢途径^[7]、BkdR 调控支链脂肪酸合成途径^[8]、YplP 调控与细胞抵御冷刺激相关的代谢途径^[9]，这些转录调节因子在许多重要的生理代谢途径中起着关键作用。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是革兰氏阳性芽孢杆菌, 在形成芽胞的同时产生伴胞晶体, 伴胞晶体主要成分是杀虫晶体蛋白 (Cry 蛋白), 对多种农林害虫具有特异性毒杀活性, 因其安全、高效等特点在害虫的生物防治领域获得了广泛的应用^[10]。苏云金芽孢杆菌 HD73 是应用上有重要作用的库斯塔克亚种代表菌株之一, 本课题组对其全基因组进行了测序, 为开展基因的功能研究提供充足的技术支持。课题组前期研究发现, 苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种 HD73 菌株中, 编码 Sigma 54 的 *sigL* 基因缺失后, Cry 蛋白产量明显下降, 荧光

定量 PCR 分析在转录水平突变体与野生型无显著差别, 说明 Sigma 54 因子通过其控制的某些代谢途径影响了 Cry 蛋白的产量 (未发表)。目前已经报道, HD73 菌株中, 依赖于 Sigma 54 的转录调节因子 GabR 所调控的 *gab* 基因簇的缺失对 Cry 蛋白的产量无明显影响^[11]。本文意在研究 HD73 菌株中另 1 个 EBPs: BkdR 所在的 *bkd* 基因簇的转录调控机制和 *bkdR* 突变体对芽胞产量和晶体蛋白产量的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 所用菌株和质粒见表 1。*E. coli* 的培养使用 LB 培养基, Bt 的培养分别使用 LB、SSM^[12] 培养基。

表 1. 菌株和质粒

Table 1. Strains and Plasmids

Strain and plasmid	Characterization	Resource
strain		
<i>E. coli</i> TG1	$\Delta(lac-proAB)$ <i>supEthi hsd-5</i> (<i>F'</i> <i>traD36 proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15), general purpose cloning host	This lab
<i>E. coli</i> ET	<i>F</i> - <i>dam</i> -13::Tn9 <i>dcm</i> -6 <i>hsdMhsdR recF</i> 143 <i>zjj</i> -202::Tn10 <i>galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1</i> , for generation of unmethylated DNA	This lab
HD73	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstakii</i> carrying the <i>cry1Ac</i> gene	This lab
HD (Δ <i>bkdR</i>)	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>bkdR</i> gene insertion mutant; Kan ^R	This study
HD (Δ <i>sigL</i>)	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>sigL</i> gene deletion mutant; Kan ^R	[13]
HD (P <i>ptb</i>)	HD73 strain containing plasmid pHTP <i>ptb</i>	This lab
Δ <i>sigL</i> (P <i>ptb</i>)	HD (Δ <i>sigL</i>) strain containing plasmid pHTP <i>ptb</i>	This lab
Δ <i>bkdR</i> (P <i>ptb</i>)	HD (Δ <i>bkdR</i>) strain containing plasmid pHTP <i>ptb</i>	This lab
HD (BkdR)	HD73 strain containing plasmid pHTBkdR	This study
Δ <i>bkdR</i> (BkdR)	HD (Δ <i>bkdR</i>) strain containing plasmid pHTBkdR	This study
plasmid		
pHT315	<i>B. thuringiensis</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector, 6.5 kb	This lab
pHTBkdR	pHT315 containing <i>bkdR</i> promoter and <i>bkdR</i> gene	This study
pMAD	Ap ^R , Em ^R shuttle vector, thermosensitive origin of replication	This lab
pMAD Δ <i>bkdR</i>	pMAD with <i>bkdR</i> insertion fragment	This study
pHTP <i>ptb</i>	pHT304-18Z carrying promoter upstream from <i>ptb</i>	This lab

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶购自康润生物技术公司; 限制性内切酶、PrimeSTAR[□] HS DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶均购自于宝生物工程 (大连) 有限公司, 质粒提取、DNA 回收和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen 公司。

1.1.3 引物合成及序列测定: 根据 Bt HD73 基因组^[14] 序列设计引物, 引物合成由生工生物工程公司北京合成部完成, 序列测定由北京六合华大基因科技股份有限公司完成, 引物名称及序列见表 2。

表 2. 引物序列

Table 2. The sequence of primers

Primer name	Sequence (5'→3')	Restriction site
bkdR1-F	CGGGATCCATTACTGATTACCTGAAACGG	<i>Bam</i> H I
bkdR1-R	CACCTCAAATGGTTCGCTGTTGATGCTTTTGCCAACG	
bkdR2-F	CACCTCAAATGGTTCGCTGTTGATGCTTTTGCCAACG	
bkdR2-F	GAGCGCTACGAGGAATTTATTTGGAGAGATTGATGGG	
bkdR2-R	CGGAATTCCTCCCTTCATAAGCACATC	<i>Eco</i> RI
Km-F	CCTTGGCAAAAGGACTACAACAGCGAACCATTTGAGGTC	
Km-R	CCCATCAAATCTCTCAAATAAATTCCTCGTAGGCGCTC	
bkdR-F	GCCATATGATGGCTCCTGAT	
bkdR-R	CTTCTACTGCTGGCATTGGT	
pMAD-F	AGGCAGACAAGGTATAGG	
pMAD-R	ATTTCTCTGGCCATTGC	
ptb-F	CCAAGCTTGGAGACTTTAGGGAGGATTTAT	<i>Hind</i> III
ptb-R	CGGGATCCATTTTGTAAATCAACCCTTTCCG	<i>Bam</i> H I
BkdR-F	CGGGATCCTGGCTTGAACAAACGAGTTTGCTAC	<i>Bam</i> H I
BkdR-R	CGGAATTCCTTATTGCATGCTATTTTTTGCATGGTC	<i>Eco</i> RI
RT-1F	GCGCTGCTGAATCTGTTAC	
RT-1R	TGTCCTCTCGATCAATTAC	
RT-2F	CAAAGTCAAAGCGTTAGG	
RT-2R	GCTTTCCTGCTGCTTGATCA	
RT-3F	TGATCAAGCAGCAGGAAAGC	
RT-3R	CATAAGCACATCTGCTTCAC	
RT-4F	GAAGCTGAAAATGTGCTATA	
RT-4R	CTTCTTCAGAATCATATGTCC	
RT-5F	GGACATATGATTCTGAAGAAG	
RT-5R	TGCAGCTGCTTTCATACCAC	
RT-6F	GGCATAGCAACTTATGTAGC	
RT-6R	CCATGAGAATGTAGAACTTC	
RT-7F	GAAGTTCTACATTCTCATGG	
RT-7R	CTACTGGTACTGTACCAGCA	
RT-8F	TGCTGGTACAGTACCAGTAG	
RT-8R	TGTGATGCACGAATTGCAGC	
RT-9F	GCTGCAATTCGTGCATCACA	
RT-9R	CTTCTACACCGAAGTCAGCA	
RT-10F	GTAATATCATCACCTTCAGC	
RT-10R	CGTTCGTCAATTTTACGTGC	
RT-11F	GCACGTAAAATTGACGAACG	
RT-11R	CTTCATGGAAATCACCTTGGT	
RT-12F	GGTGTGTTAACTGAGGAATC	
RT-12R	CATCAAGCGCAGCATCTTCA	
RT-13F	TGAAGATCGTGCGCTTGATG	
RT-13R	GTAATATCATCACCTTCAGC	
RT-14F	CGTGAAGGTGATGATATTAC	
RT-14R	GATCGCCAACATTAACGAGCC	
RT-15F	GGCTCGTTAATGTTGGCGATC	
RT-15R	TCCCGTACCTTCTACTAGATC	

1.2 细菌培养条件及 DNA 操作

Bt 在 30℃、220 r/min 条件下培养, 突变体筛选条件为 38℃, 180 r/min; *E. coli* 在 37℃、220 r/min 条件下培养, 氨基霉素使用终浓度为 100 μg/mL, 红

霉素的使用终浓度为 5 μg/mL, 卡那霉素使用终浓度为 100 μg/mL。大肠杆菌质粒提取, DNA 片段的纯化参见试剂盒的说明。苏云金芽胞杆菌电击转化参考文献 [15]。

1.3 RT-PCR

HD73 菌株在 SSM 中培养至 T_7 时期 (T_0 为对数期结束的时期, T_n 为 T_0 后的 n 小时), 取菌液 2 mL 低温离心弃上清, 沉淀立即用预冷的 TRIzol 重悬, RNA 提取参照 Qiagen Easy RNA kit 说明。RNA 纯化后电泳检测, -70°C 保存备用。以纯化后的 RNA 为模板合成 cDNA。RT-PCR 所用引物见表 2。

1.4 突变体的构建筛选

pMAD 是大肠杆菌-芽胞杆菌穿梭载体, 含有革兰氏阳性菌温度敏感型的复制区, 利用同源重组的原理, 进行基因敲除操作, 方法见参考文献 [16], 利用重叠 PCR 扩增得到插入失活片段, 双酶切连接到 pMAD 上, 转化 *E. coli* TG1 菌株, 获得重组质粒 pMAD Δ bkdR, 转化 *E. coli* ET 菌株去甲基化后, 将质粒电击转化至 HD73 菌株, 同源重组敲除 bkdR 基因, 高温缺失重组后的质粒, 获得对卡那霉素有抗性, 而对红霉素没有抗性的突变体, 并以突变盒外侧引物对突变体进行 PCR 鉴定。

1.5 生长曲线测定

将 Bt 菌株分别接种于 LB 和 SSM 培养基中, 30°C , 220 r/min 培养。每 1 小时取样, 用分光光度计测定在 600 nm 波长下的吸光值 OD_{600} , 每组数据至少独立重复 3 次。

1.6 运动能力测定

Bt 菌株活化过夜, 1% 转接至 50 mL LB 培养基, 30°C , 220 r/min 培养至 $OD_{600} = 1.0$ 时, 取 5 μL 菌液点在 0.3% 固体 LB 平板中央, 30°C 培养过夜^[17]。

1.7 芽胞形成率

Bt 菌株在 LB 培养基中, 30°C , 220 r/min 培养至 T_1 时期, 取适量菌液梯度稀释涂于 LB 固体培养基, 30°C 培养 10 h, 计菌落数为 A。镜检观察, 待 90% 左右菌体释放芽胞时, 取 10 mL 菌液 65°C 热处理 25 min 后, 梯度稀释涂于 LB 固体培养基, 30°C 培养 10 h, 计菌落数为 B, 芽胞形成率 = $(B / A) \times 100\%$ ^[18]。

1.8 Cry1Ac 蛋白产量测定

Bt 菌株在 LB 培养基中培养至 T_{40} , 取样 2 mL, 离心弃上清, 沉淀中加入 50 mmol/L Tris-HCl, 机械震荡破碎 100 s 后, 加上样缓冲液, 沸水浴 10 min, 离心取上清液, 利用 Pierce[□]660 nm protein Assay Kit 试剂盒测定蛋白的浓度, 取相同总蛋白量的样品进

行 SDS-PAGE 电泳。

1.9 β -半乳糖苷酶活分析

Bt 菌株过夜活化, 1% 转接至 50 mL SSM 培养基, 30°C 、220 r/min 振荡培养, 从 T_0 取样至 T_8 , 每小时取样 1 次, 每次取样 2 mL, 离心弃上清, 沉淀于 -40°C 保存, β -半乳糖苷酶活性测定参考文献 [19], 每组数据至少独立重复 3 次。

2 结果和分析

2.1 bkd 基因簇的序列分析和 RT-PCR 分析

对 Bt HD73 基因组 (cp004069) 中 bkd 基因簇分析发现, 该基因簇包括 8 个基因, 排列顺序和编码的蛋白产物均与 Bs 中 bkd 基因簇相同 (图 1-A), 8 个基因编码的蛋白产物分别是: 依赖于 Sigma 54 的转录调节因子 (Sigma 54-dependent transcriptional regulator, bkdR, HD73_4469), 磷酸丁酰基转移酶 (Phosphate butyryltransferase, ptb, HD73_4468), 亮氨酸脱氢酶 (Leucine dehydrogenase, bcd, HD73_4467), 支链脂肪酸激酶 (Branched chain fatty acid kinase, buk, HD73_4466), 2-氢硫辛酰胺脱氢酶 (Dihydroliipoamide dehydrogenase, lpdV, HD73_4465), 2-氧异戊酸脱氢酶 α 亚基 (2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, bdkAA, HD73_4464), 2-氧异戊酸脱氢酶 β 亚基 (2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, bdkAB, HD73_4463), 硫辛酰胺酰基转移酶 (Lipoamideacyltransferase component of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, bkdB, HD73_4462), ptb 到 bkdB 基因之间转录方向相同。ptb 基因起始密码子上游序列 TGGCACGGTATTTGCTT 具有 -12/-24 保守序列 (BYGGCMYRNNNYGCGW)^[20] 特征。对 BkdR 的氨基酸序列进行结构域分析, 发现有 3 个典型的 EBP 的保守结构域, 即与 Sigma 54 互作的 AAA⁺ 结构域、与 DNA 结合的 HTH 结构域和感知传导信号的 PAS 结构域。这说明 BkdR 是依赖于 Sigma 54 的转录调控因子。

根据 Bt HD73 菌株全基因组序列信息, 在基因内部以及基因之间设计了多对引物, 将 SSM 培养基中 HD73 菌株 T_7 时期提取并纯化的总 RNA 反转录成 cDNA, 再分别扩增 1-15 片段, 其中“c”表示以

反转录的 cDNA 为模板扩增的产物，“+”表示以 HD73 全基因组为模板扩增的产物，“-”表示以纯

化的 RNA 为模板扩增的产物，核酸电泳 (图 1-B) 结果表明 *ptb* 基因到 *bkdB* 基因组成 1 个转录单元。

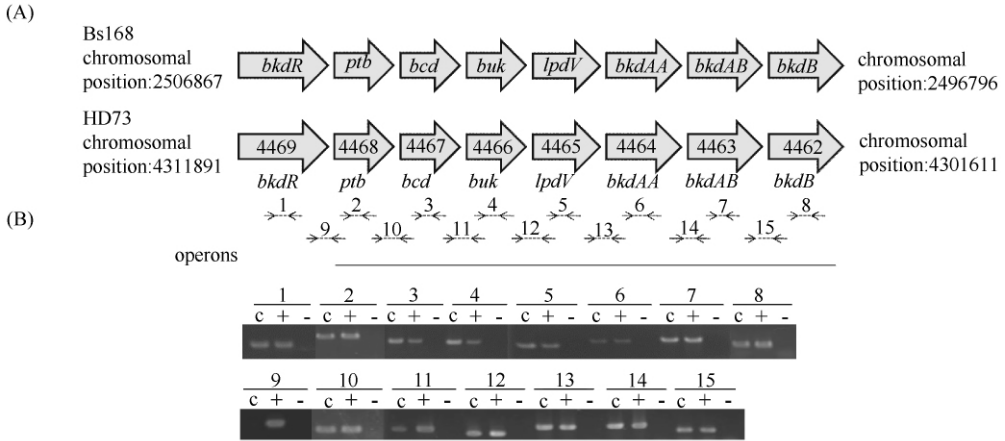


图 1. Bt HD73 中 *bkd* 基因簇结构分析

Figure 1. Analysis of the *bkd* locus structure in Bt HD73. A: Organization of the *bkd* locus in *B. thuringiensis* HD73 and *B. subtilis* 168; B: RT-PCR analysis of the transcription of *bkd* locus in *B. thuringiensis* strain HD73.

2.2 *bkdR* 突变体的筛选及互补菌株和过表达菌株的构建

为了研究 BkdR 对 *bkd* 操纵子的转录调控及 Cry 蛋白产量的影响, 构建了 *bkdR* 突变体。根据 Bt HD73 基因组中 *bkdR* 基因上下游序列设计引物, 以 HD73 基因组为模板, 克隆得到 *bkdR* 缺失突变盒的侧壁构建 pMAD Δ *bkdR* 载体, 并转化 HD73 菌株中进行高温突变, 筛选对卡那霉素有抗性, 红霉素敏感的菌株 (图 2-A)。用突变盒外侧引物 *bkdR*-F 和 *bkdR*-R, 分别以出发菌株 HD73 基因组和对卡那霉素有抗性且红霉素敏感的菌株为模板进行 PCR 鉴

定。出发菌株扩增的片段约 3.5 kb, 突变菌株扩增片段约 3.1 kb, 较野生菌小 400 bp, 即为卡那霉素抗性基因替换 *bkdR* 基因的突变菌株 (图 2-B), 命名为 HD (Δ *bkdR*)。为了研究 *bkdR* 基因突变对菌体运动能力的影响, 构建了 *bkdR* 突变体的互补菌株和过表达菌株。根据 HD73 全基因组序列, 设计引物 BkdR-F 和 BkdR-R, PCR 扩增含有自身启动子的 *bkdR* 基因 (2931 bp), 连接到表达载体 pHT315, 获得过表达载体 pHTBkdR, 分别转入 HD73 和 HD (Δ *bkdR*) 菌株, 获得过表达菌株 HD (BkdR) 和互补菌株 Δ *bkdR* (BkdR)。

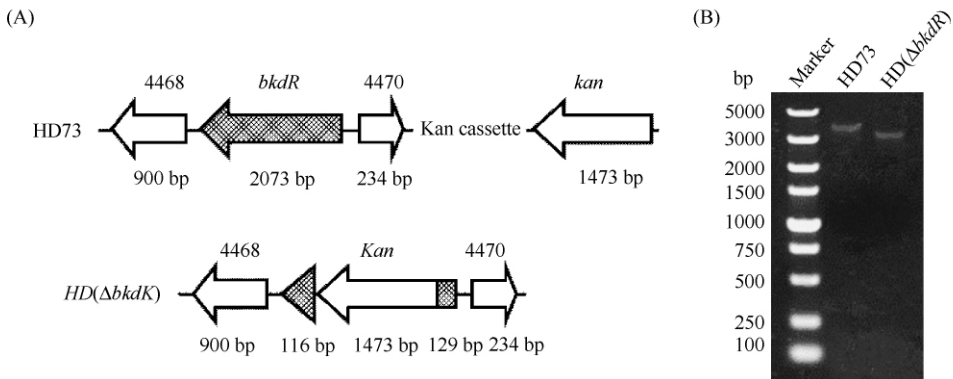


图 2. *bkdR* 基因插入突变体的筛选 (A) 和 PCR 鉴定 (B)

Figure 2. Sketch map of the process for *bkdR* insertion mutant (A) and PCR identification (B).

2.3 *bkd* 基因簇的转录调控分析

根据 HD73 全基因组序列, 设计引物 *ptb*-F 和

ptb-R, PCR 扩增 *ptb* 基因 ATG 上游 708 bp 片段 (其中包括保守的 -12/-24 序列), 与 *lacZ* 融合, 获得

重组载体 pHTP_{ptb}, 分别转入 HD73 野生型、HD ($\Delta sigL$) 和 HD ($\Delta bkdR$) 菌株, 获得相应菌株命名为: HD (P_{ptb})、 $\Delta sigL$ (P_{ptb}) 和 $\Delta bkdR$ (P_{ptb})。β-半乳糖苷酶活性测定结果表明 (图 3), 在 HD73 野生型菌株中, *ptb* 基因的启动子从 T_0 到 T_8 持续高活性, 而在 *sigL* 和 *bkdR* 突变体中, *ptb* 基因的启动子活性明显降低, 这说明 *ptb* 基因的转录受 Sigma 54 的控制, 并受 BkdR 的激活, 而 RT-PCR 结果表明: *bkd* 基因簇中的 *ptb-bkdB7* 个基因共转录形成 1 个操纵子结构, 这说明 *ptb-bkdB* 操纵子的转录是受 Sigma 54 的控制, 并受 BkdR 的激活。

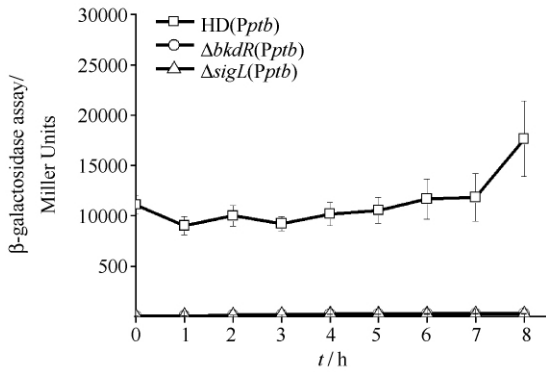


图 3. BkdR 对 *ptb* 启动子的转录调控

Figure 3. Regulation of the *ptb* gene by BkdR.

2.4 *bkdR* 突变体的表型分析

生长曲线测定实验表明 (图 4-A): 无论是在营养丰富的 LB 培养基, 还是在营养贫瘠的 SSM 培养基, *bkdR* 基因的缺失对菌体生长均无明显影响。运动能力分析表明, 与 HD73 野生型 [(5.6 + 1.8) cm] 相比, 相同菌量、培养相同时间的 HD ($\Delta bkdR$) [(1.1 + 0.8) cm] 的运动能力明显下降, 说明 *bkdR* 基因的缺失影响了菌体的运动能力; $\Delta bkdR$ (BkdR) [(2.2 + 1.2) cm] 比 HD ($\Delta bkdR$) 菌株的菌斑大, 比 HD73 野生型的菌斑小, 说明互补菌株部分恢复了菌体的运动能力; HD (BkdR) [(4.5 + 1.5) cm] 比 HD73 野生型的菌斑稍小, 说明过表达 *bkdR* 基因没有影响菌体的运动能力 (图 4-B)。芽胞形成率实验表明 (图 4-C), HD ($\Delta bkdR$) 芽胞形成率与野生型无差异, 说明 *bkdR* 基因缺失对芽胞形成率无显著影响。将 HD73、HD ($\Delta bkdR$) 和 HD ($\Delta sigL$) 在 LB 培养基中培养至 T_{40} , 收集菌体, 分析蛋白产量。在总蛋白量相同的条件下, *sigL* 突变体与 HD73 野生型相比, Cry1Ac 蛋白产量明显下降, 而 *bkdR* 突变体的 Cry1Ac 蛋白产量无明显变化 (图 4-D), 说明 BkdR 调控的代谢途径对 Cry 蛋白产量无显著影响。

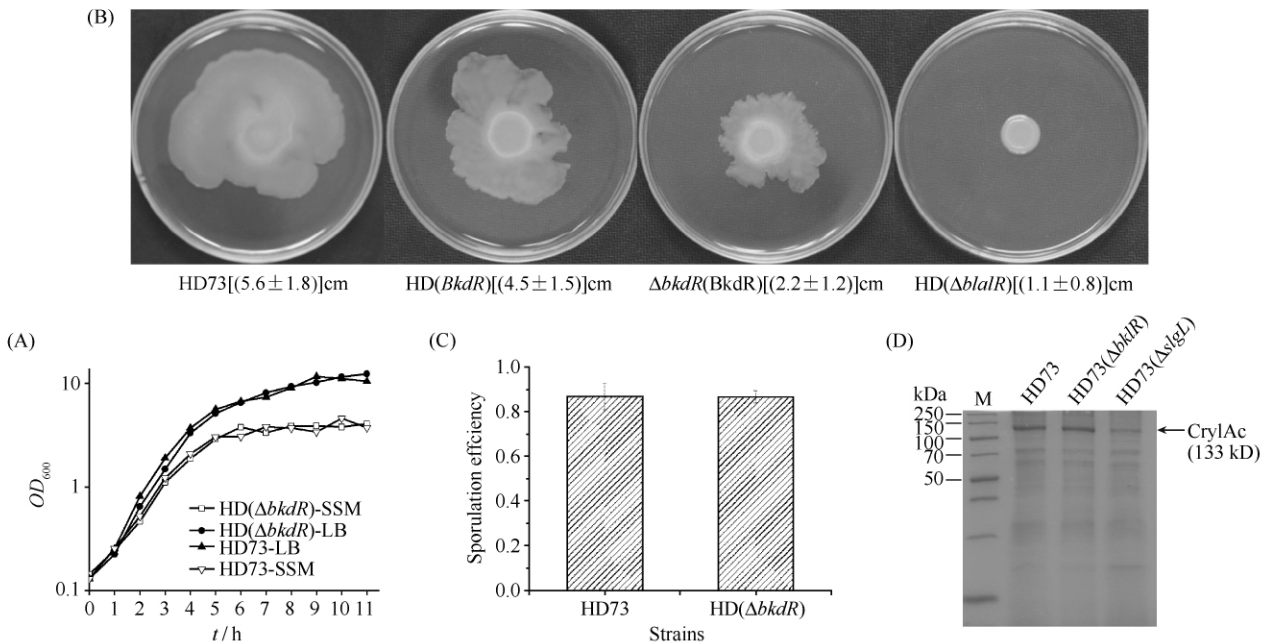


图 4. *bkdR* 突变体的生长曲线 (A)、芽胞形成率 (B)、运动能力 (C) 和 Cry1Ac 蛋白产量 (D) 分析

Figure 4. The growth curve (A), sporulation efficiency (B), motility (C) and analysis Cry1Ac protein production (D) of *bkdR* mutant.

3 讨论

Bt HD73 全基因组测序为开展基因的功能研究比如基因重组、敲除、分子克隆、表达与纯化蛋白等技术提供充足的技术支持。Bt HD73 中 *bkd* 基因簇包括 8 个基因, 与 Bs 中的 *bkd* 基因簇编码的蛋白产物均相同。Bt 与 Bs 的 BkdR 结构域相似^[13]。本研究发现, *bkd* 基因簇中的 7 个基因 *ptb-bkdB* 共转录, 并受 Sigma 54 因子的控制, 受 BkdR 的激活, 这与 Bs 中 *ptb* 操纵子的转录调控机制相同^[8]。Bs 中的 *bkd* 基因簇编码的酶系统催化缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸(支链氨基酸)向支链脂肪酸的合成途径, 在 Bs 中, *sigL* 基因和 *bkd* 基因的缺失突变体都不能利用缬氨酸和异亮氨酸为唯一氮源, 缬氨酸和异亮氨酸是合成支链脂肪酸的前体, 证实了 Bs 中 Sigma 54 和 BkdR 共同控制支链脂肪酸的合成途径; 并且, 本实验室前期的研究表明, Bt 中 *sigL* 基因的缺失导致菌体不能利用缬氨酸和异亮氨酸为唯一氮源^[13], 这可能是通过 Sigma 54 控制的 *bkd* 基因簇的缺失而实现的。以上分析均表明, Bt 和 Bs 的 *bkd* 基因簇可能具有相同的功能。研究发现, 在 Bt 中, 通过转录组学和蛋白质组学的方法来揭示芽胞和伴孢晶体形成的代谢调控, 找到 6 种代谢途径, BkdR 调控的支链脂肪酸的合成途径是其中之一, 并提出了 Bt 中 BkdR 参与支链脂肪酸的合成途径^[21]。

支链脂肪酸几乎存在于所有的生物体内, 发挥着重要的生理功能。支链脂肪酸是细胞膜的主要酰基成分^[22], 它比直链脂肪酸有更低的熔点^[23], 这对于保持细胞膜在低温环境下的流动性是至关重要的^[24]。本研究发现 *bkdR* 基因的缺失会阻断 *bkd* 操纵子的转录, 可能会导致支链脂肪酸的合成受影响, 从而影响细胞膜的流动性, 这可能是 *bkdR* 突变体运动能力显著下降的原因。另有研究发现, 在碱刺激条件下, 细胞中支链脂肪酸的含量会增加^[25], 菌体可能是利用支链脂肪酸含量的增加来适应在碱性环境的生长。由此可见, 菌体在抵抗不利环境时, 支链脂肪酸发挥着重要的作用。Bt 菌株可能会通过 *bkd* 基因簇的转录使自身具有抵御冷刺激和碱刺激的功能, 这也为我们在低温和碱性环境下寻找新的 Bt 菌株资源提供了依据。

本研究发现, *bkdR* 基因的缺失对菌株的生长、

芽胞的形成率和 Cry 蛋白的产量均无明显影响, 而 *sigL* 基因的缺失对这 3 个表型都具有明显的影响, 说明这些表型的变化不是由 BkdR 调控的代谢途径而引起的。在 Bt HD73 全基因组中已经发现 8 种 EBPs(未发表), 其中 GabR 调控的 γ -氨基丁酸代谢途径的阻断对 Cry 蛋白的产量无影响, 但降低了芽胞形成率^[26]; SoxR 调控的肌氨酸代谢途径的阻断对 Cry 蛋白的产量也无影响(未发表)。本研究中的 BkdR 的缺失亦是如此, 这说明 Sigma 54 对 Cry 蛋白产量的影响不是仅通过 1 个 EBP 调控的代谢途径引起的, 可能是通过多种代谢途径共同作用的结果。

参考文献

- [1] Cannon W, Claverie - Martin F, Austin S, Buck M. Core RNA polymerase assists binding of the transcription factor σ^{54} to promoter DNA. *Molecular Microbiology*, 1993, 8 (2) : 287-298.
- [2] Bush M, Dixon R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ^{54} -dependent transcription. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76 (3) : 497-529.
- [3] Studholme DJ, Dixon R. Domain architectures of σ^{54} -dependent transcriptional activators. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (6) : 1757-1767.
- [4] Cases I, Ussery DW, De Lorenzo V. The σ^{54} regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 2003, 5 (12) : 1281-1293.
- [5] Debarbouille M, Martin-Verstraete I, Klier A, Rapoport G. The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both Sigma 54 and phosphotransferase system dependent regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88 (6) : 2212-2216.
- [6] Calogero S, Gardan R, Glaser P, Schweizer J, Rapoport G, Debarbouille M. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176 (5) : 1234-1241.
- [7] Ali NO, Bignon J, Rapoport G, Debarbouille M. Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by Sigma L in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (8) : 2497-2504.
- [8] Debarbouille M, Gardan R, Arnaud M, Rapoport G. Role of BkdR, a transcriptional activator of the SigL-

- dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (7) : 2059-2066.
- [9] Wiegshoff F, Beckering CL, Debarbouille M, Marahiel MA. Sigma L is important for cold shock adaptation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (8) : 3130-3133.
- [10] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler D, Dean D. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 (3) : 775-806.
- [11] Wang W, Gao J, Zhu L, Peng Q, Shu C, Zhang J, Huang D, Song F. Effect of GABA shunt disruption on sporulation and crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2012, 43 (7) : 119-123. (in Chinese)
王维,高继国,朱莉,彭琦,束长龙,张杰,黄大昉,宋福平. γ -氨基丁酸代谢旁路阻断对苏云金芽胞杆菌芽胞形成和晶体蛋白产量的影响. *东北农业大学学报*, 2012, 43 (7) : 119-123.
- [12] 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.
- [13] Peng Q, Zhu L, Song F, Zhang J, Gao J, Hang D. Characteristics of *sigL* mutant in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (9) : 1147-1153. (in Chinese)
彭琦,朱莉,宋福平,张杰,高继国,黄大昉. 苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigL* 基因突变体的特性分析. *微生物学报*, 2008, 48 (9) : 1147-1153.
- [14] Liu G, Song L, Shu C, Wang P, Deng C, Peng Q, Lereclus D, Wang X, Huang D, Zhang J. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. *Genome Announcements*, 2013, 1 (2) : e00080-13.
- [15] Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, Lecadet MM. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 60 (2) : 211-217.
- [16] Du L, Qiu L, Peng Q, Lereclus D, Zhang J, Song F, Huang D. 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.
- [17] Calvio C, Celandroni F, Ghelardi E, Amati G, Salvetti S, Cecilian F, Galizzi A, Senesi S. Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (15) : 5356-5366.
- [18] Yang J, Peng Q, Chen Z, Deng C, Shu C, Zhang J, Huang D, Song F. Transcriptional regulation and characteristics of a novel N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase gene involved in *Bacillus thuringiensis* mother cell lysis. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195 (12) : 2887-2897.
- [19] Zhu L, Peng Q, Song F, Jiang Y, Sun C, Zhang J, Huang D. Structure and regulation of the *gab* gene cluster, involved in the γ -aminobutyric acid shunt, are controlled by a σ^{54} factor in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (1) : 346-355.
- [20] Francke C, Kormelink TG, Hagemeyer Y, Overmars L, Sluijter V, Moezelaar R, Siezen R. Comparative analyses imply that the enigmatic Sigma 54 factor is a central controller of the bacterial exterior. *BMC Genomics*, 2011, 12 (1) : 385.
- [21] Wang J, Mei H, Zheng C, Qian H, Cui C, Fu Y, Su J, Liu Z, Yu Z, He J. The metabolic regulation of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* revealed by transcriptomics and proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12 (5) : 1363-1376.
- [22] Willecke K, Pardee AB. Fatty acid requiring mutant of *Bacillus subtilis* defective in branched chain α -keto acid dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 1971, 246 (17) : 5264-5272.
- [23] Kaneda T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological Reviews*, 1977, 41 (2) : 391.
- [24] Kaan T, Homuth G, Mäder U, Bandow J, Schweder T. Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology*, 2002, 148 (11) : 3441-3455.
- [25] Giotis ES, McDowell DA, Blair IS, Wilkinson BJ. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (3) : 997-1001.

Transcriptional regulation of *bkd* gene cluster in *Bacillus thuringiensis*

Guannan Wang^{1,2}, Qi Peng², Qingyun Zheng^{1,2}, Jie Li¹, Jie Zhang², Fuping Song^{2*}

¹College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, 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] In order to determine the effect of *bkdR* deletion on Cry protein production. We analyzed the transcriptional regulation of *bkd* gene cluster and the phenotype of *bkdR* mutant. [Methods] Sequence of *bkd* gene cluster in *Bacillus thuringiensis* was analyzed by sequence alignment. RT-PCR was used to reveal the transcriptional units of the *bkd* gene cluster. *bkdR* insertion mutant was constructed by homologous recombination. Transcriptional activity was analyzed by promoter fusions with *lacZ* gene. Comparison of the Cry1Ac protein production was determined by protein quantitation. [Results] The *bkd* gene cluster was composed of eight genes. The *ptb-bkdB* formed one transcriptional unit. The transcriptional activity of *ptb* sharply decreased in *sigL* and *bkdR* mutants. Deletion of *bkdR* decreased the motility of cells, but no effect on growth, sporulation efficiency and Cry protein production. The *bkd* gene cluster is controlled by Sigma 54 and activated by BkdR. Deletion of *bkdR* has no effect on Cry protein production, but decreased the motility of the cells. [Conclusion] The *bkd* gene cluster is controlled by Sigma 54 and activated by BkdR. Deletion of *bkdR* has no effect on Cry protein production, but decreased the motility of the cells. It suggested that deletion of *bkdR* do not affect the Cry protein production the same as *sigL* mutant. It means decreasing of Cry protein production in *sigL* mutant was not caused by only one EBP mutation, but might be multiple roles.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, enhancer binding proteins (EBPs), *bkdR* gene, transcription initiation factor Sigma 54

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270111)

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

Received: 2 January 2014 / Revised: 29 April 2014