



## 苏云金芽胞杆菌转录调控因子CodY的体外靶基因的筛选

梅菲, 齐明霞, 李明顺\*

华中农业大学生命科学技术学院, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

**摘要:** 【目的】利用Avi-tag和Pull down技术建立体外靶基因筛选的新方法, 在苏云金芽胞杆菌YBT-1520基因组范围内进行体外高通量筛选转录调控因子CodY的靶基因, 为深入研究CodY在苏云金芽胞杆菌中的功能及调控网络打下基础。【方法】用Avi-tag技术对CodY蛋白进行体外生物素标记, 酶切苏云金芽胞杆菌YBT-1520总DNA并在两端加上便于测序的adapter序列, 用链霉亲和素树脂筛选与CodY蛋白相互作用的靶基因。【结果】在苏云金芽胞杆菌中得到了46条CodY可以直接作用的靶序列, 分析发现CodY在苏云金芽胞杆菌中主要调控氨基酸代谢、糖代谢、脂肪酸代谢、转运、调控、DNA修复、双组份调控等的转录。【结论】本研究采用的Avi-tag技术具有特异性强、操作简单、成本低等优势, 为转录因子体外靶序列的高通量筛选提供新的方法; 苏云金芽胞杆菌中CodY靶基因的筛选为其他微生物中CodY的功能研究打下基础。

**关键词:** CodY, 靶基因, Avi-tag技术, 苏云金芽胞杆菌, 生物素, 调控

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称Bt)是杆状、革兰氏阳性菌, 在细胞稳定期产芽胞和杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal proteins, ICPs)。其伴胞晶体具有高效、广谱的杀虫作用, 作为微生物农药广泛应用, ICP基因已转入重要的农作物中, 具有广泛的应用前景<sup>[1-2]</sup>。全局性调控因子CodY广泛存在于低GC含量的革兰氏阳性菌中, 首次在枯草芽胞杆菌中作为寡肽透性酶(dppABCDE)操纵子的阻遏物被发现, 后来被证明为调控稳定早期基因及芽胞的起始基因的全局性

转录调控因子<sup>[3-4]</sup>。研究发现苏云金芽胞杆菌*codY*突变株不能形成完整的芽胞和伴胞晶体, CodY蛋白作为全局性转录调控因子在Bt中主要调控氨基酸代谢、糖代谢、PHB代谢、芽胞形成、运动等方面<sup>[5]</sup>。

随着测序技术的发展, 越来越多的微生物菌株的基因组测序完成, 在基因组范围内分析转录因子的结合位点, 构建全局性调控因子的调控网络, 已经成为研究转录因子的热点<sup>[6]</sup>。染色质免疫共沉淀、ChIP-chip、ChIP-Seq、Dam甲基化酶

基金项目: 国家自然科学基金(30900016); 湖北省自然科学基金(2014CFB931)

\*通信作者。Tel: +86-27-87294048; Fax: +86-27-87280670; E-mail: mshli7125@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2015-10-15; 修回日期: 2016-01-24; 网络出版日期: 2016-04-07

鉴定法及Pull-down技术已经在转录因子靶序列筛选的研究中广泛应用<sup>[7-10]</sup>。Pull-down技术是体外筛选转录因子靶序列的一种高通量的方法,通过全基因组范围内体外鉴定蛋白的结合位点的方法(IDAP-Seq)已经成功鉴定了枯草芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌、难辨梭状芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌中CodY的调控基因<sup>[11-14]</sup>。

Avi-tag (BAP)是一个由15个氨基酸残基组成的短肽标签,在体内或体外都能被生物素连接酶在赖氨酸残基连接一个生物素,从而实现蛋白的生物素化,而抗生物素蛋白或链霉亲和素可以专一地与生物素结合<sup>[15-16]</sup>。基于这两个反应,生物素化技术可以应用于蛋白的固定、纯化和显影等方面<sup>[17-19]</sup>。本研究通过建立一种体外的Pull down方法在YBT-1520全基因组范围内寻找CodY蛋白调控的靶基因。应用Avi-tag技术对CodY蛋白进行生物素标记,酶切Bt YBT-1520总DNA并在两端加上便于分析和测序的adapter序列,用链霉亲和素树脂筛选与CodY蛋白相互作用的靶基因,最终得到了CodY可以直接作用的靶序列。经分析得到CodY在Bt中主要调控代谢相关、蛋白酶、膜转运相关、抗逆性相关、双组份调控、鞭毛相关蛋白的表达。该研究方法操作简单、成本低,具有特异性强、可操作性等优势,对转录因子体外靶序列的筛选具有重要的指导意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及培养条件:** Bt YBT-1520, 苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种, 鞭毛抗原血清型为H3abc, 是一株对鳞翅目昆虫幼虫具有高毒力的芽胞杆菌, 带有11个质粒, 6个*cry*基因, 可产生分子量为130 kDa和65 kDa的杀虫晶体蛋白, 基因组测序完成, 但尚未公布<sup>[20]</sup>。Bt菌株培养条件为28 °C振荡培养; 大肠杆菌培养条件为37 °C振荡培养。

**1.1.2 主要试剂:** PCR聚合酶、限制性内切酶、DNA连接酶等购自大连宝生物(TaKaRa)公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶中DNA回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒等购自Axygen公司; DNA序列测序均在北京奥科生物技术公司完成; PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; 其他化学药品均购自国药集团。

### 1.2 CodY的纯化及体外生物素化

以Bt YBT-1520总DNA为模板, 上游引物序列*codYF*为5'-ATTGGATCCATGGAATTATTAGCAAAAAC-3', 下游引物序列*codYR*为5'-CCGCCATGGAACACGCTTATGACACTT-3', PCR扩增*codY*基因ORF序列。将*codY*基因片断连接到已含有15肽Avi-tag序列的pET-28b载体(由王阶平博士馈赠), 并转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中, 酶切验证筛选正确的转化子。将构建好的pET28b-*codY-ap*重组质粒转化到大肠杆菌BL21(DE3)中进行诱导表达, 优化出最佳诱导条件: IPTG终浓度为0.4 mmol/L, 诱导温度28 °C, 诱导时间6 h。收集菌体, 超声破碎5 min后, 离心去沉淀收集上清液, 用镍柱纯化, 得到29 kDa左右的带, 即为带有生物素受体的CodY蛋白, 简称CodY-Ap蛋白。CodY-Ap蛋白终浓度为40  $\mu$ mol/L, 生物素连接酶终浓度45 U/ $\mu$ L, 总体积25  $\mu$ L, 30 °C孵育30-40 min, 将CodY-Ap蛋白在体外完全生物素化。

### 1.3 Western blot

利用western blot检测CodY蛋白是否生物素化。链霉亲和素用辣根过氧化物酶标记(北京博奥森生物技术有限公司), 在生物素-亲和素系统中, 借助所形成的亲和素-生物素-酶复合物, 追踪生物素标记的抗原或抗体, 通过酶催化底物显色, 可检出相应的抗体或抗原。首先将蛋白进行SDS-PAGE, 准备和胶同等大小的PVDF膜和两层滤纸; 然后安装转膜装置, 采用湿转的方法, 恒压100 V, 1 h左右; 4 °C封闭过夜, 洗涤; 将膜与

标记有辣根过氧化物酶的链霉亲和素孵育，洗涤；最后DAB显色。

#### 1.4 100–400 bp基因组片段的获取

*Mbo* I酶切Bt YBT-1520总DNA，酶切后基因组100–400 bp片段两端加上了已知序列的adapter。主要操作步骤为：adapter由2条互补的43 bp的单链退火而成，序列为5'-GATCCGCAACGAAGGTACCATGGCCGCATAGGCCACTAGTGC-3'，条件为：96 °C，10 min，并自然冷却到室温，异丙醇沉淀，回收片段；*Mbo* I酶切Bt YBT-1520总DNA，用Axygen试剂盒回收100–400 bp片段；T4 DNA连接酶连接adapter及100–400 bp片段，连接体系为30 μL，产物回收后用根据adapter设计的引物进行扩增，大量制备带有adapter的片段。

#### 1.5 CodY靶基因的筛选

将链亲和素树脂Streptavidin Agarose Resins (Thermo公司)平衡到室温，将树脂装入柱子，用3倍柱体积的结合缓冲液平衡柱；生物素化的CodY-Ap蛋白和酶切的100–400 bp的DNA片段在28 °C孵育30 min；并放进树脂中，盖上底部和上面的盖子后室温孵育10 min。用10倍柱体积的结合缓冲液洗柱子；用5–10倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱生物素化的样品，收集洗脱液，并用紫外吸收法测定蛋白含量。将收集样品进行SDS-PAGE分析，确定含有蛋白的样品，并加入50 μg/mL的蛋白酶K在55 °C处理1.5 h去除CodY-Ap蛋白，抽酚，异丙醇沉淀，酒精洗1遍，吹干，加入20 μL水溶解。收集液中含有连接好adapter的YBT-1520片段，以adapter上的引物进行扩增，回收后连接到pMD-18T载体上(TaKaRa)，挑取阳性转化子，验证正确后送到北京奥科生物公司测序，测序结果与Bt YBT-1520基因组序列比较，得到具体的基因。

#### 1.6 细菌单杂交

分别构建文库载体pTRG-codY、报告载体

pBXcmT-靶基因，将构建好的载体共同转入XL-blue菌中，筛选正确的转化子；将含有两载体的菌液按一定的浓度梯度点至细菌单杂交筛选培养基上(含3-AT及链霉素)<sup>[21]</sup>。含pTRG-codY及pBXcmT的菌株为负对照，含结核分枝杆菌DevR和ace编码区上游序列(PTRG-RV3133c/PBXcmT-RV2031)菌株为阳性对照<sup>[22]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 CodY-Ap蛋白的生物素化及验证

利用镍柱亲和层析纯化得到的CodY-Ap蛋白，如图1-A所示，将CodY-Ap蛋白在体外进行生物素化，Western验证结果如图1-B，结果表明，CodY蛋白可以在体外进行生物素化标记。生物素连接酶(BirA)能活化生物素形成生物素酰-5'-腺苷酸，将生物素特异结合到生物素受体蛋白上，使蛋白生物素化<sup>[18, 23]</sup>。

### 2.2 体外靶序列的筛选

*Mbo* I酶切Bt YBT-1520总DNA，酶切后基因组100–400 bp片段两端加上了已知序列的adapter(图2)。加入adapter，可以根据adapter的序列设计引物，扩增和方便后续的测序。将得到的生物素化的CodY-Ap蛋白和制备好的连接有adapter的100–400 bp的Bt YBT-1520 DNA片段一起孵育，过链霉亲和素的树脂，经过进一步的筛选纯化得到靶基因，进行测序分析得到目的基因序列，和Bt YBT-1520基因组比对，确定特异基因。整个过程如图3所示。

### 2.3 靶基因的分类及互作验证

测序得到46条基因序列，用KEGG Orthology数据库对46条基因表达出的蛋白质进行功能分类，建立蛋白质功能分析数量饼图(图4)。结果表明：46%的蛋白集中在代谢途径中，包括碳代谢，脂代谢，核苷酸代谢，氨基酸代谢等；20%

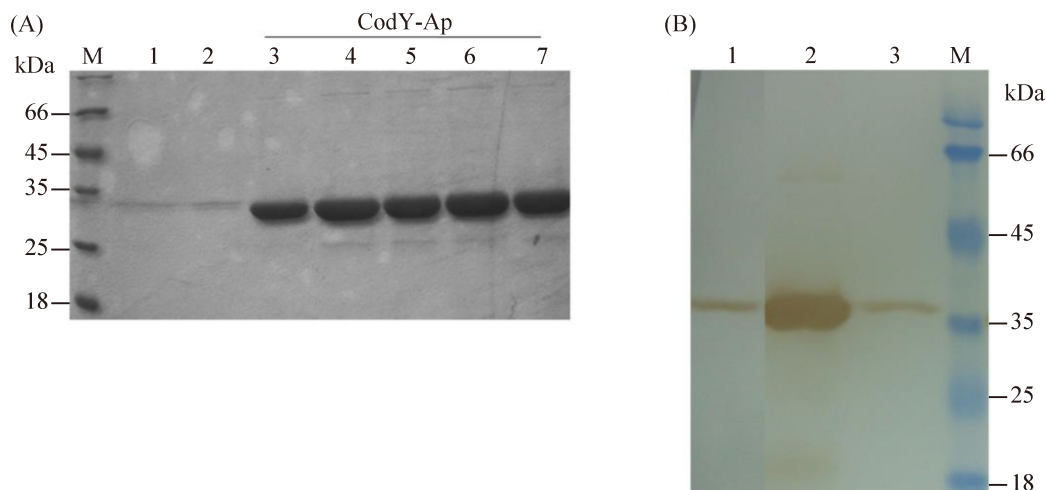


图 1. CodY-Ap蛋白纯化及生物素化验证图谱

Figure 1. The verification of CodY-Ap expression and biotinylation. A: SDS-PAGE of CodY-Ap protein purified from *E. coli*. M: unstained protein molecular weight marker (Fermentas); 1–7: purified CodY-Ap protein from *E. coli*. B: Western blot of CodY and CodY-Ap on different conditions. 1: BirA protein; 2: CodY-Ap biotinylated; 3: CodY biotinylated; M: prestained protein molecular weight marker (Fermentas).

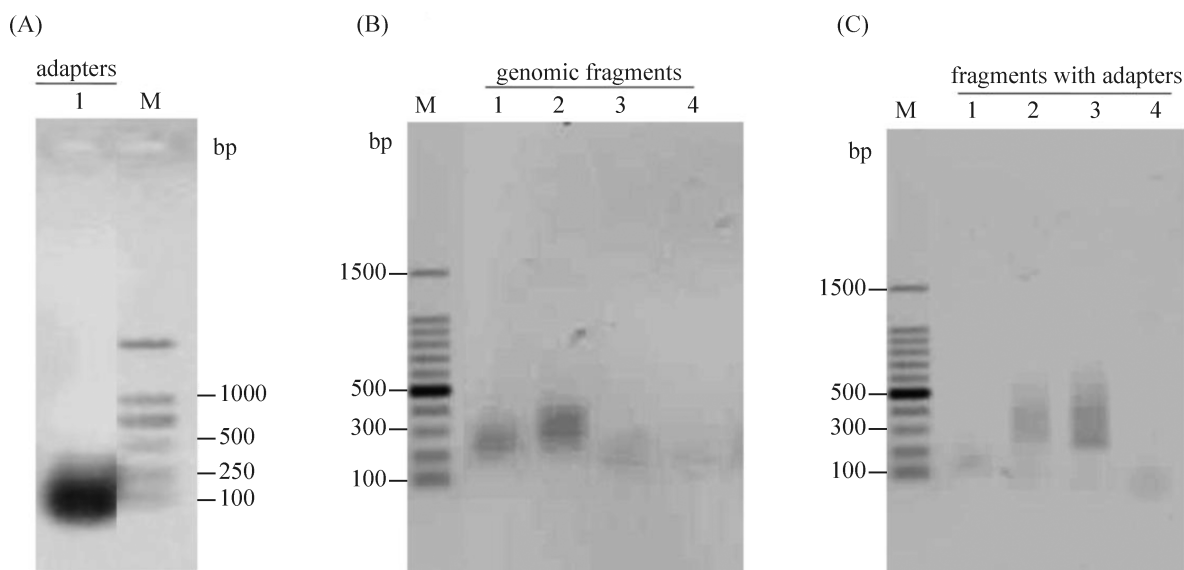


图 2. 含adapter的100–400 bp DNA片段制备

Figure 2. Preparation of 100–400 bp Bt YBT-1520 DNA fragments with adapters. A: M, 100 bp DNA marker (TaKaRa); 1, 43 bp double strand adapters. B: M, 100 bp DNA marker (TaKaRa); 1–4, 100–400 bp YBT-1520 DNA fragments. C: M, 100 bp DNA marker (TaKaRa); 1–4, YBT-1520 DNA fragments ligated with adapters.

的蛋白质则涉及到细胞内途径，比如细菌的运动性等；13%的蛋白与遗传信息的传递有关，参与遗产物质的复制与转录；13%的蛋白参与外界环境信号的传导过程、细菌体内物质的运输等，包

括ABC转运系统及双组分系统；还有4种假定蛋白，没有功能注释。由此可知，CodY在Bt中主要调控物质和能量代谢以及膜转运、信息传递等过程。

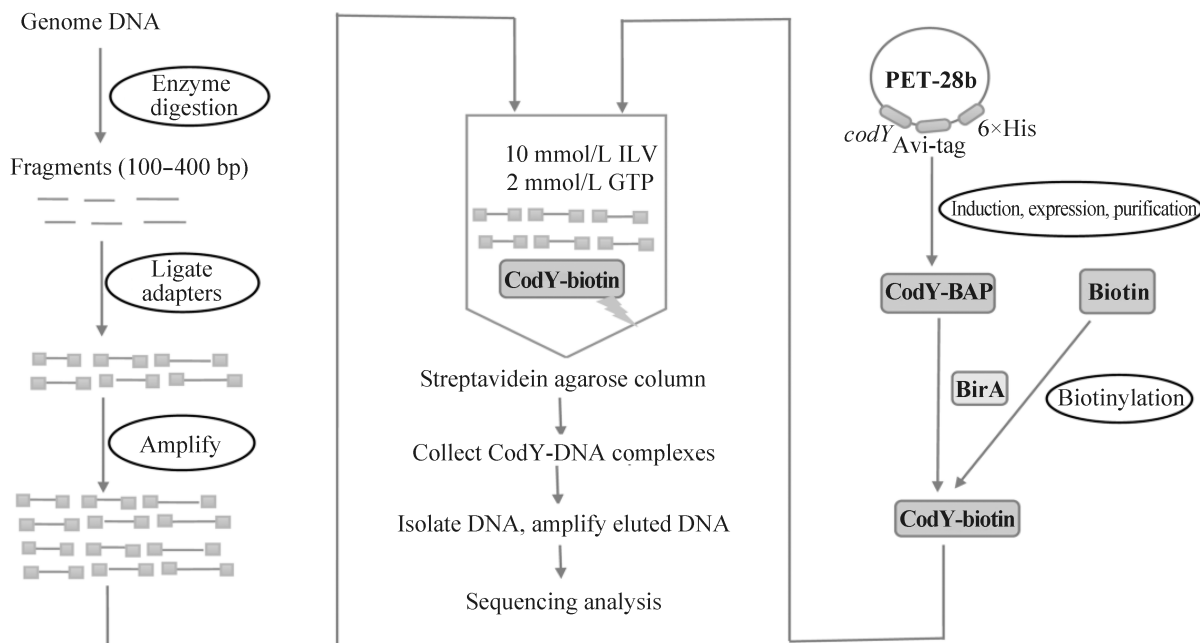


图 3. CodY体外靶基因筛选过程示意图

Figure 3. Protocol for genome-wide identification of CodY binding sites.

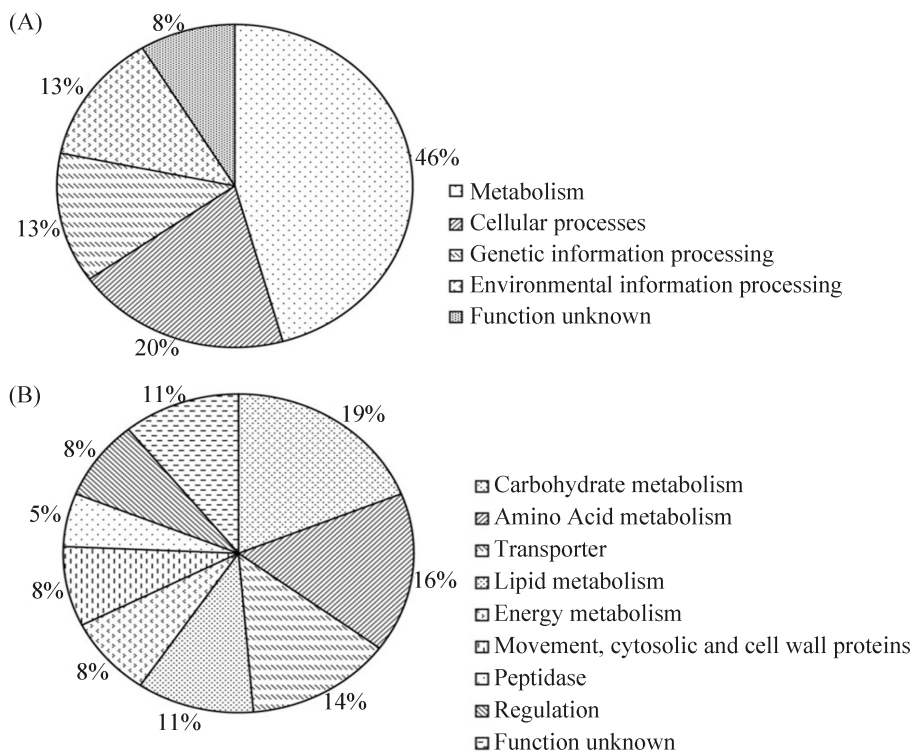


图 4. 筛选目的基因编码蛋白的分类

Figure 4. Functional groups of proteins encoded by target genes. The proteins encoded by target genes are classified based on their functional categories. A: distribution of five functional groups is presented in a pie chart in percentage. B: distribution of the proteins is detailed into sub-groups in a pie chart.

利用细菌单杂交系统在46条序列中选取部分序列*yнкY*、*oppA*、*luxS*、*yhfE*进行互作验证, 结果如图5所示, CodY可直接作用于靶序列*yнкY*、*oppA*、*luxS*、*yhfE*。细菌单杂交及EMSA实验表明*ilvB*上游启动子序列受CodY的直接调控<sup>[5]</sup>。本实验筛选46条靶序列中包含*ilvB*的上游序列。因此CodY蛋白可以特异性结合靶基因的结合位点。

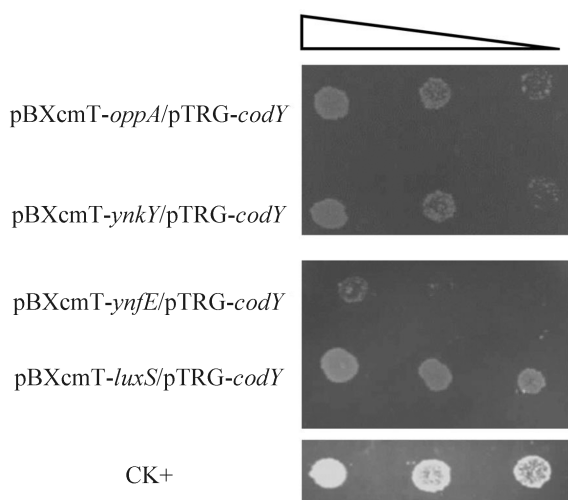


图 5. CodY与目的基因互作的细菌单杂交图

Figure 5. Bacterial one-hybrid assays for the binding of CodY with the target genes. Black triangles indicate threefold titration steps of input and sample template. CK+: control.

### 3 讨论

体外研究转录因子靶基因的方法相对体内方法简单且快速。通过体外Pull down的方法研究转录调控因子靶基因的方法得到越来越多的应用<sup>[11-14]</sup>。本研究首次应用生物素链霉亲和素系统, 在Bt菌株中体外筛选CodY的结合序列。与体内ChIP实验相比此方法操作简单、经济节约; 与最近报道的CodY在其他菌中靶位点的研究方法类似IDAP-Seq, 但不同的是利用了生物素链霉亲和素的高亲和力和特异性<sup>[11-14]</sup>。本研究发现, 在Bt YBT-1520中CodY的结合位点略不同于其他微生物的

CodY结合位点, 但都是含AT丰富的序列。该方法的优点首先在于生物素和链霉亲和素的强作用力和特异性, 可以更好地筛选CodY蛋白的结合序列; 其次我们用酶切Bt YBT-1520总DNA的方法相比超声破碎的方法可以得到更小范围的片段, 集中在100-400 bp之间, 并在序列两端加adapter序列, 方便测序分析<sup>[11]</sup>; 最后, 该方法方便可行, 花费时间短、费用低, 节省人力物力。

本研究在Bt YBT-1520全基因组测序完成的基础上, 通过构建一种体外Pull down方法, 在全基因组范围内寻找与鉴定全局性转录调控因子CodY蛋白的靶基因。该方法应用Avi-tag技术, 通过融合表达生物素受体肽, 在体外进行CodY蛋白的生物素化, 通过生物素链霉亲和素系统筛选CodY的靶序列。得到靶基因进行分类并选取部分基因进行细菌单杂交互作验证。体外筛选靶基因表达蛋白的分类及CodY的蛋白质水平调控分析可知, 在Bt中, CodY主要调控代谢相关基因的表达, 此外参与调控双组份信号传递、感受性、ABC转运、蛋白酶、核糖体再循环因子等<sup>[5]</sup>。

本实验方法首次将生物素链霉亲和素Pull down方法结合Avi-tag技术运用到转录因子靶基因的鉴定中, 相比其他研究方法具有优势, 为体外研究蛋白质与DNA序列互作及体外转录调控因子靶基因的鉴定提供一定的方法依据。本研究得到的CodY的靶基因, 为CodY在Bt中代谢调控网络的构建打下基础, 同时对CodY在其他微生物中的调控研究提供理论基础。

### 参考文献

- [1] Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(21): 6027-6032.
- [2] Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1(1): 31-50.

- [ 3 ] Ratnayake-Lecamwasam M, Serror P, Wong KW, Sonenshein AL. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes & Development*, 2001, 15(9): 1093–1103.
- [ 4 ] Sonenshein AL. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3(6): 561–566.
- [ 5 ] Qi MX, Mei F, Wang H, Sun M, Wang GJ, Yu ZN, Je Y, Li MS. Function of global regulator CodY in *Bacillus thuringiensis* BMB171 by comparative proteomic analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(2): 152–161.
- [ 6 ] Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B. Genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions. *Science*, 2007, 316(5830): 1497–1502.
- [ 7 ] Collas P, Dahl JA. Chop it, ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation. *Frontiers in Bioscience*, 2008, 13: 929–943.
- [ 8 ] Buck MJ, Lieb JD. ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics*, 2004, 83(3): 349–360.
- [ 9 ] Chumsakul O, Nakamura K, Kurata T, Sakamoto T, Hobman JL, Ogasawara N, Oshima T, Ishikawa S. High-resolution mapping of *in vivo* genomic transcription factor binding sites using *in situ* DNase I footprinting and ChIP-seq. *DNA Research*, 2013, 20(4): 325–338.
- [10] Van Steensel B, Henikoff S. Identification of *in vivo* DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(4): 424–428.
- [11] Belitsky BR, Sonenshein AL. Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* CodY-binding sites at single-nucleotide resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(17): 7026–7031.
- [12] Majerczyk CD, Dunman PM, Luong TT, Lee CY, Sadykov MR, Somerville GA, Bodi K, Sonenshein AL. Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(11): 2861–2877.
- [13] Dineen SS, McBride SM, Sonenshein AL. Integration of metabolism and virulence by *Clostridium difficile* CodY. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(20): 5350–5362.
- [14] Château A, van Schaik W, Joseph P, Handke LD, McBride SM, Smeets FMH, Sonenshein AL, Fouet A. Identification of CodY targets in *Bacillus anthracis* by genome-wide *in vitro* binding analysis. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(6): 1204–1213.
- [15] Cull MG, Schatz PJ. Biotinylation of proteins *in vivo* and *in vitro* using small peptide tags. *Methods in Enzymology*, 2000, 326: 430–440.
- [16] Driegen S, Ferreira R, van Zon A, Strouboulis J, Jaegle M, Grosveld F, Philipsen S, Meijer D. A generic tool for biotinylation of tagged proteins in transgenic mice. *Transgenic Research*, 2005, 14(4): 477–482.
- [17] Bayer EA, Wilchek M. Protein biotinylation. *Methods in Enzymology*, 1990, 184: 138–160.
- [18] Li YF, Sousa R. Expression and purification of *E. coli* BirA biotin ligase for *in vitro* biotinylation. *Protein Expression and Purification*, 2012, 82(1): 162–167.
- [19] Maeda Y, Yoshino T, Matsunaga T. *In vivo* biotinylation of bacterial magnetic particles by a truncated form of *Escherichia coli* biotin ligase and biotin acceptor peptide. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5785–5790.
- [20] Sun M, Liu ZD, Yu ZN. Characterization of the insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(4): 365–371. (in Chinese).  
孙明, 刘子铎, 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌YBT-1520杀虫晶体蛋白基因的属性. *微生物学报*, 2000, 40(4): 365–371.
- [21] Guo MM, Feng H, Zhang J, Wang WQ, Wang Y, Li YQ, Gao CH, Chen HC, Feng Y, He ZG. Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system. *Genome Research*, 2009, 19(7): 1301–1308.
- [22] Park HD, Guinn KM, Harrell MI, Liao RL, Voskuil MI, Tompa M, Schoolnik GK, Sherman DR. Rv333c/*dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(3): 833–843.
- [23] Wu SC, Yeung JC, Hwang PM, Wong SL. Design, production, and characterization of an engineered biotin ligase (BirA) and its application for affinity purification of staphylokinase produced from *Bacillus subtilis* via secretion. *Protein Expression and Purification*, 2002, 24(3): 357–365.

# Genome-wide identification of CodY target genes in *Bacillus thuringiensis* by *in vitro* binding analysis

Fei Mei, Mingxia Qi, Mingshun Li\*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

**Abstract:** [Objective] This study is aimed to establish an *in vitro* pull down method combining Avi-tag technology to screen and identify the CodY targets in the whole genomes of *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1520. The method offers a potential biocatalyst for screening target sequences of transcription factors *in vitro*. [Methods] CodY proteins were labeled with biotin using Avi-tag technology. *B. thuringiensis* strain YBT-1520 genomes were enzymatically digested to 100–400 bp DNA fragments that had adapters with known sequences on both ends. Then, the target genes of CodY protein were screened by streptavidin biotin resin. [Results] The 46 targets of CodY were mainly involved in amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, fatty acid metabolism, transport, regulation, DNA replication repair, and two component regulatory systems. [Conclusion] Compared with chromatin immune co-precipitation technology *in vivo*, this pull down method is simple, cheap, fast and specific to biotin streptavidin system.

**Keywords:** CodY, target genes, Avi-tag technology, *Bacillus thuringiensis*, biotin, regulation

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900016) and by the Natural Science Foundation of Hubei Province of China (2014CFB931)

\*Corresponding author. Tel: +86-27-87294048; Fax: +86-27-87280670; E-mail: mshli7125@mail.hzau.edu.cn

Received: 15 October 2015; Revised: 24 January 2016; Published online: 7 April 2016