



双组份系统 YvcPQ 抑制苏云金芽胞杆菌的芽胞形成

范青云, 张舒梦, 巩玉静, 何进*

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】探究双组份系统 YvcPQ 影响芽胞形成的机制。【方法】利用 β -半乳糖苷酶活性实验验证 YvcP 对芽胞形成抑制因子 KapD 的调控作用; 通过无痕基因敲除并分别比较突变株与出发菌株的芽胞产率, 研究 YvcPQ 及 KapD 对芽胞形成的影响; 应用细菌单杂交实验、EMSA 实验和实时荧光定量 PCR 技术探究转录调控因子 AbrB 对 *yvcPQ* 操纵子的转录调节。【结果】YvcP 可以正调控 *kapD* 的表达, 从而抑制芽胞形成; *yvcPQ* 不能受 YvcP 的自调控, 而是受 AbrB 转录激活。【结论】调控因子 AbrB 能够通过正调控 *yvcPQ* 操纵子的转录来提高细胞内 YvcP 的含量, 进而增强 YvcP 对芽胞形成抑制因子编码基因 *kapD* 的表达, 最终抑制芽胞的形成。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, 双组份系统, YvcPQ, AbrB, 芽胞形成

双组份系统(Two-component system, TCS)是存在于微生物细胞中的信号转导系统, 由位于细胞膜上的组氨酸激酶(Histidine kinase, HK)和位于细胞质中的响应调节子(Response regulator, RR)组成^[1-2]。HK 能够感应环境中或细胞内的某些信号的刺激, 并发生自磷酸化, 自磷酸化的 HK 将磷酸基团传递给其对应的 RR, 使 RR 磷酸化; 被磷酸化的 RR 作为转录因子调控相关基因的表达, 从而对信号产生反应^[3]。TCS 响应的信号刺激很广泛, 其调控的下游基因也多种多样, 涉及到细菌的生长、芽胞形成、渗透压、抗生素抗性、趋化性、毒性、致病性以及营养物质的代谢等各个方面。

YvcPQ 是芽胞杆菌中普遍存在的 TCS, 由 YvcQ (HK)和 YvcP (RR)组成。目前关于 YvcPQ 的生物学功能及其调控机制的报导很少, 且主要集中在 *Bacillus subtilis* 中。2003 年, Mascher 等最早在 *B. subtilis* 中发现 YvcPQ 可以通过调控位于 *yvcPQ* 下游的 *yvcRS* 操纵子的转录来响应杆菌肽刺激^[4]。随后的研究表明, YvcPQ 与另一响应杆菌肽的 TCS BceRS 存在信号交叉^[5-6]。2011 年的研究将 YvcPQ 的响应范围扩大到其他一些羊毛硫类抗生素^[7]。本实验室通过生物信息学分析发现在 *B. thuringiensis* BMB171 中 YvcP (编码基因 *BMB171_C4102*, 新编号 *BMB171_RS22135*)调控 4

基金项目: 国家自然科学基金(31270105)

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

收稿日期: 2016-05-19; 修回日期: 2016-06-29; 网络出版日期: 2016-07-19

个候选基因：*yvcR* (*BMB171_C4100*，新编号 *BMB171_RS22125*)、*BMB171_C4385* (新编号 *BMB171_RS23635*)、*kapD* (*BMB171_C4525*，新编号 *BMB171_RS24515*)和 *BMB171_C4835* (新编号 *BMB171_RS26135*)，利用细菌单杂交实验及实时荧光定量 PCR 进行了验证，并进一步证实了 YvcP 能够转录激活 *yvcR* 和 *yvcS1S2*，从而对杆菌肽产生抗性^[8]。

kapD 在基因组上被注释为能够编码芽胞形成抑制因子 KapD 的基因，KapD 能够抑制芽胞形成过程中的 KinA 途径^[9]。AbrB 为调控因子，能够阻遏与芽胞和生物膜形成相关基因的转录。本研究以 *B. thuringiensis* BMB171 为研究对象，发现调控因子 AbrB (编码基因 *BMB171_C0031*，新编号 *BMB171_RS00200*) 激活 *yvcPQ* 的转录，而 YvcP 能够通过正调控芽胞形成抑制因子 KapD 编码基因的表达，从而抑制芽胞的形成。由于蜡样芽胞杆菌菌株之间基因组极其相似，本研究结果为探究蜡样芽胞杆菌群中 YvcPQ 与芽胞形成的关系，全面揭示芽胞形成的调控机制奠定了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用菌株与质粒见表 1。

1.2 引物

本研究所用引物见表 2。

1.3 试剂与耗材

各类限制性内切酶，*Taq* DNA 聚合酶，DNA Ladder Marker，pMD19-T simple vector，质粒抽提试剂盒，PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 来自 TaKaRa Bio Inc；T4 DNA

连接酶来自 Thermo Fisher Scientific Inc；细菌总 DNA 抽提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒来自 Biotek 公司；壮观霉素(Spc)、硫酸多粘菌素(Pmx)、氨苄青霉素(Amp)、硫酸卡那霉素(Kan)、红霉素(Ery)、氯霉素(Chl)、四环素(Tet)和链霉素(Str)来自美国 Sigma 公司；TRIzol Reagent 来自 Life Technologies Corporation；荧光定量 PCR 试剂盒来自康为世纪生物科技有限公司。

常用化学药品来自国药集团化学试剂有限公司。引物合成和 DNA 测序由武汉天一辉远生物科技有限公司完成。

1.4 β -半乳糖苷酶实验

具体的实验操作及计算方法参考文献[13]。

1.5 芽胞计数

分别挑取单菌落于 5 mL 无抗性 LB 培养基中 28 °C、200 r/min 振荡培养 12 h，然后分别以 1 : 100 的接种量转接于 5 mL GYS 培养基中，振荡培养 9 h，之后转接入 200 mL GYS 培养基中，保证各菌液的起始 OD_{600} 为 0.01，28 °C、200 r/min 振荡培养至芽胞期。分别取 1 mL 菌液在 70 °C 中水浴处理 1 h，然后将 OD_{600} 调一致，梯度稀释，涂布无抗性的 GYS 固体平板，28 °C 培养 12 h 后，记录各平板上的菌落形成单位(CFU)^[14]。每次实验 3 个生物学重复。

1.6 细菌单杂交实验

方法参照文献[8,10,15]。具体操作如下：首先以 BMB171 的基因组 DNA 为模板，*yvcP* F/*yvcP* R 为引物(表 2)，PCR 扩增目的蛋白基因 *yvcP*。将扩增的片段用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后，与同样双酶切的 pTRG 载体连接获得表达载体 pTRG-*yvcP* (YvcP 与 RNA 聚合酶的 α 亚基融合

表 1. 本研究所用的菌株和质粒
Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains and Plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	A cloning host	Laboratory stock
<i>E. coli</i> XR	A recipient strain of <i>E. coli</i> for bacterial one-hybrid system	[10]
BMB171	An acrySTALLIFEROUS <i>B. thuringiensis</i> strain	[11]
$\Delta yvcPQ$	<i>yvcPQ</i> markerless deletion mutant derived from BMB171	[8]
$\Delta kapD$	<i>kapD</i> markerless deletion mutant derived from BMB171	[8]
$\Delta abrB$	<i>abrB</i> markerless deletion mutant derived from BMB171	This study
<i>Rv2031p/Rv3133c</i> -hybrid	<i>E. coli</i> XR containing pBX- <i>Rv2031p</i> and pTRG- <i>Rv3133c</i> , positive control	[10]
pTRG/pBX- P_{yvcPQ}	<i>E. coli</i> XR containing plasmids pTRG and pBX- P_{yvcPQ} , self-activated control	This study
pTRG- <i>yvcP</i> /pBX	<i>E. coli</i> XR containing plasmids pTRG- <i>yvcP</i> and pBX- $P_{yvcS1S2}$, self-activated control	This study
pTRG- <i>yvcP</i> /pBX- P_{yvcPQ}	<i>E. coli</i> XR containing plasmids pTRG- <i>yvcP</i> and pBX- P_{yvcPQ}	This study
pTRG/pBX	<i>E. coli</i> XR containing plasmids pTRG and pBX, negative control	This study
BMB171-pHT1K- P_{kapD} - <i>lacZ</i>	BMB171 containing the plasmid pHT1K- P_{kapD} - <i>lacZ</i>	This study
$\Delta yvcPQ$ -pHT1K- P_{kapD} - <i>lacZ</i>	$\Delta yvcPQ$ containing the plasmid pHT1K- P_{kapD} - <i>lacZ</i>	This study
BMB171-pHT1K- <i>lacZ</i>	BMB171 containing the plasmid pHT1K- <i>lacZ</i>	This study
$\Delta yvcPQ$ -pHT1K- <i>lacZ</i>	$\Delta yvcPQ$ containing the plasmid pHT1K- <i>lacZ</i>	This study
BL21-pET- <i>abrB</i>	BL21(DE3) containing the overexpression plasmid pET28b- <i>abrB</i>	This study
DH5 α -pRP1028	<i>E. coli</i> DH5 α containing the plasmid pRP1028	[12]
DH5 α -pSS4332	<i>E. coli</i> DH5 α containing the plasmid pSS4332	[12]
DH5 α -pSS1827	<i>E. coli</i> DH5 α containing the plasmid pSS1827	[12]
Plasmids		
pRP1028	Spc, shuttle plasmid, with temperature-sensitive suicide <i>B. thuringiensis</i> replicon, I- <i>Sce</i> I cleavage site and ori T, etc.	[12]
pSS4332	Kan, expression plasmid for expressing I- <i>Sce</i> I restriction enzyme	[12]
pSS1827	Amp, helper plasmid for conjugation during gene deletion	[12]
pRP1028- <i>UabrB</i> - <i>DabrB</i>	pRP1028 containing upstream and downstream homologous arms of <i>abrB</i> (<i>UabrB</i> and <i>DabrB</i>)	This study
pTRG	Tet, ColE1 replicon, <i>lpp/lac</i> -UV5 promoter, used for bacterial one-hybrid assays	[10]
pBX	Chl, p15A replicon, <i>lac</i> -UV5 promoter, used for bacterial one-hybrid assays	[10]
pTRG- <i>yvcP</i>	<i>yvcP</i> in <i>Bam</i> H I and <i>Xho</i> I sites of pTRG	This study
pBX- P_{yvcPQ}	The promoter region of <i>yvcPQ</i> in <i>Xcm</i> I site of pBX	This study
pHT1K- <i>lacZ</i>	Amp, Ery, <i>E. coli</i> - <i>B. thuringiensis</i> shuttle vector containing <i>lacZ</i> gene	Laboratory stock
pHT1K- P_{kapD} - <i>lacZ</i>	pHT1K carrying <i>kapD</i> promoter region fused with <i>lacZ</i> gene	This study

表 2. 本研究所使用的引物

Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>yvcP</i> F	CTGAGGATCCATGGAAAAAGGAGTA AATGTAAAAG
<i>yvcP</i> R	TTACAGTTTTGTTCATTTTTCTCATC
<i>P_{kapD}</i> F	CTAACCATGGTGC GGATGTAAATGAA AG
<i>P_{kapD}</i> R	GCGGATCCACGATCCCTTCCTTAT
<i>P_{yvcPQ}</i> F	TTACACGTGAAAGTGATGCG
<i>P_{yvcPQ}</i> R	TGTTTCGTTTTCTCCCAATAA
<i>QyvcPQ</i> F	GAGTGGGGCGAAGGGCAT
<i>QyvcPQ</i> R	AGTAAAGAGTCATCTAATGTAGTTCC ACC
Q16S rRNA F	TTTTGCTAGCGCTTTCGCAG
Q16S rRNA R	TAGCGCCTGTTGTGAAGGTG

表达)。以 BMB171 的基因组 DNA 为模板, *P_{yvcPQ}* F/*P_{yvcPQ}* R 为引物(表 2), 扩增 *yvcPQ* 操纵子上游 349 bp 的 DNA 片段, 为 *yvcPQ* 的启动子区域, 用 *P_{yvcPQ}* 表示。用 *Taq* DNA 聚合酶扩增时会在 DNA 片段的末端加上 1 个碱基 A; pBXcmT 载体上有 2 个相邻的 *Xcm* I 酶切位点 经过 *Xcm* I 特异性酶切后会在切口两端分别留下 T 末端。因此, 可以直接以 TA 克隆的方式将 *P_{yvcPQ}* 连接到 pBXcmT 载体报告基因 *His3-aadA* (使共转化菌株能够在含有抑制组氨酸合成的 3AT 及 Str 的 M9 培养基上生长的上游, 得到报告载体 pBX-*P_{yvcPQ}*)。

接着, 将表达载体 pTRG-*yvcP* 与报告载体 pBX-*P_{yvcPQ}* 共转化到宿主菌株 *E. coli* XR 中得到待验证的共转化菌株 pTRG-*yvcP*/pBX-*P_{yvcPQ}*; 将载体 pTRG 与 pBX-*P_{yvcPQ}* 共转化到 *E. coli* XR 中得到片段特异性自激活负对照菌株 pTRG/pBX-*P_{yvcPQ}*; 将载体 pTRG-*yvcP* 与 pBX 共转化到 *E. coli* XR 中得到蛋白特异性自激活负对照菌株 pTRG-*yvcP*/pBX; 含有 *Rv3133c* 的 pTRG 载体和含有 *Rv2031p* 的 pBX 载体的共转化菌株 *Rv2031p*/*Rv3133c*-hybrid 为正对照; pTRG/pBX 为负对照(表 1)。

最后, 将各个共转化菌株依次点滴在不含有 3AT (3-氨基-1,2,4-三氮唑)和 Str 以及含有 3AT 和 Str 的 M9 培养基固体平板上, 30 °C 培养 24 h, 观察菌株的生长情况。

1.7 EMSA 实验

参照文献[16], 具体操作如下: FAM 标记的目的 DNA *P_{yvcPQ}* 和 AbrB 蛋白质(由菌株 BL21-pET-*abrB* 过表达获得)于室温孵育 0.5 h。孵育体系一般为 20 μL, 其中 DNA 为 8 μL, 外加 2 μL 的 10×H 缓冲液, 蛋白质的体积可逐步提高使其浓度呈现梯度变化, 最后用水补足至 20 μL。

电泳分离: 上样之前需向上述体系中加入 5 μL 的 50%甘油, 保证样品沉于上样孔中; 冰浴中电泳分离。电压, 160 V; 电泳时间, 1 h。

成像: 用 FUJIFILM 磷屏成像仪在荧光条件下进行成像。

1.8 细菌总 RNA 的抽提

收集 10 mL 相应时期的菌液(用 2 mL 离心管分两管收集), 13400×g 离心 1 min, 将上清尽量去除干净。立即用液氮速冻, 放-80 °C 冻存; 取出-80 °C 冻存样品, 立即加入 200 μL DEPC-treated ddH₂O 悬浮菌体, 再加入 50 μL 20 mg/mL 的溶菌酶, 室温静置 10 min; 加入 1 mL Trizol 试剂, 振荡混匀器上振荡 2 min, 室温静置 5 min; 加入 200 μL 氯仿, 振荡混匀, 室温静置 5 min, 4 °C、13400×g 离心 15 min; 将 750 μL 水相上清小心转移到 RNase-free 的离心管中, 加入 750 μL 异丙醇, 室温静置 10 min; 4 °C、13400×g 离心 10 min, 小心弃上清, 加入 1 mL 75%的酒精, 轻轻颠倒混匀; 4 °C、13400×g 离心 5 min, 小心尽量吸去上清, 在超净台内吹风烘干 10 min; 最后用 20 μL DEPC 双蒸馏水溶解 RNA 沉淀, 放于-80 °C 备用或立即用于逆转录^[17]。

1.9 实时荧光定量 PCR

总 RNA 中 DNA 的去除和 cDNA 第一链的合成参照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒的说明书进行操作。利用 UltraSYBR Mixture (with ROX) 试剂进行荧光定量 PCR, 以 16S rRNA 作为内参基因。引物对 *QyvcPQ* F/*QyvcPQ* R 及 *Q16S* rRNA F/*Q16S* rRNA R 见表 2。根据得到的原始 C_t 值, 利用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算转录量^[18]。

1.10 归巢内切酶 I-Sce I 介导的基因敲除方法

本实验室利用归巢内切酶 I-Sce I 介导的基因敲除方法, 建立了苏云金芽胞杆菌中的无痕敲除方法。具体原理及操作步骤参照本实验室已发表的相关论文^[8,14,19-21]。

2 结果和分析

2.1 YvcP 正调控 P_{kapD} 的活性

本实验室已经采用细菌单杂交和实时荧光定量 PCR 两种方法证实了 YvcP 能够调控 *kapD* 基因的转录^[8]。为了进一步验证 YvcP 对 *kapD* 的调控, 我们又利用 β -半乳糖苷酶实验检测 BMB171 和 $\Delta yvcPQ$ 菌株在 GYS 培养基中培养 17 h 时 P_{kapD} 的活性差异。

首先, 以 BMB171 的基因组 DNA 为模板, P_{kapD} F/ P_{kapD} R 为引物(表 2), PCR 扩增 *kapD* 的启动子区 DNA 片段, 用 P_{kapD} 表示。扩增的片段经测序验证正确后, 用 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切, 然后将回收得到的片段插入到 pHT1K-*lacZ* 载体上, 得到载体 pHT1K- P_{kapD} -*lacZ*。将 pHT1K- P_{kapD} -*lacZ* 分别转入 BMB171 和 $\Delta yvcPQ$ 中获得菌株 BMB171-pHT1K- P_{kapD} -*lacZ* 及 $\Delta yvcPQ$ -pHT1K- P_{kapD} -*lacZ*, 用来测定 P_{kapD} 的活性。同时将不含有启动子序列

的 pHT1K-*lacZ* 转入 BMB171 和 $\Delta yvcPQ$ 中获得菌株 BMB171-pHT1K-*lacZ* 及 $\Delta yvcPQ$ -pHT1K-*lacZ* 作为负对照。图 1 中将菌株与质粒分开表示, 可以看出在 BMB171-pHT1K- P_{kapD} -*lacZ* 中 P_{kapD} 的活性是 $\Delta yvcPQ$ -pHT1K- P_{kapD} -*lacZ* 中的 3810 倍, 这表明细菌缺失 *yvcPQ* 后 *kapD* 的启动子活性显著下降, 因此, 进一步确证了 YvcP 正调控 P_{kapD} 的活性。

2.2 YvcPQ 和 KapD 抑制芽胞的形成

在相差显微镜下, 我们发现 YvcPQ 和 KapD 能够延迟芽胞的形成^[8]。故我们通过芽胞计数实验进一步确定 YvcPQ 和 KapD 在芽胞形成过程中的作用。结果发现, 在芽胞还没有完全成熟的第 17 h, $\Delta yvcPQ$ 和 $\Delta kapD$ 的芽胞计数明显高于 BMB171, 其中 $\Delta yvcPQ$ 的芽胞计数是 BMB171

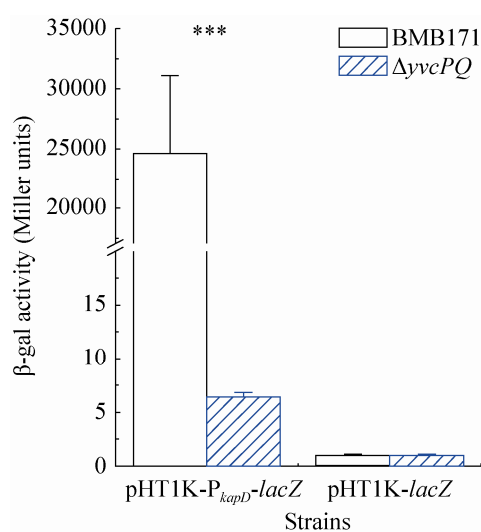


图 1. P_{kapD} 在 BMB171 和 $\Delta yvcPQ$ 中的活性差异

Figure 1. Difference of P_{kapD} activities between BMB171 and $\Delta yvcPQ$. Error bars show the variant range of the data derived from three independent biological replicates. The statistically significant differences were tested via a two-tailed student's *t* test. (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001)

的 14 倍, $\Delta kapD$ 的芽胞计数是 BMB171 的 8 倍; 在芽胞接近成熟的第 20 h 和已经成熟的第 24 h, BMB171、 $\Delta yvcPQ$ 和 $\Delta kapD$ 的芽胞计数结果已经无明显的差异(图 2)。这表明在芽胞形成初期 YvcP 能够激活 *kapD* 基因的表达, 从而抑制芽胞形成。

2.3 YvcP 不能自调控 *yvcPQ* 操纵子的转录

一些 TCS 的调控机制中都包含对自身基因的调控, 如响应万古霉素的 LiaRS^[20,22]。因此本研究采用细菌单杂交的方法来检测 YvcP 是否能够自调控。细菌单杂交技术的 3 个基本元件是目的蛋白表达载体 pTRG、报告载体 pBXcmT 和宿主筛选菌株 *E. coli* XR。如果目的蛋白 (DBD) 与 DNA (DBD binding site) 能够结合, 则相应的共转化菌株就能够在含有 3AT (3-氨基-1,2,4-三氮唑) 和 Str 的 M9 平板上生长。

图 3 显示, 所有共转化菌株都能够在不含有 3AT 和 Str 的 M9 培养基固体平板上生长, 只有正对照可以在含有 3AT 和 Str 的 M9 培养基固体平板

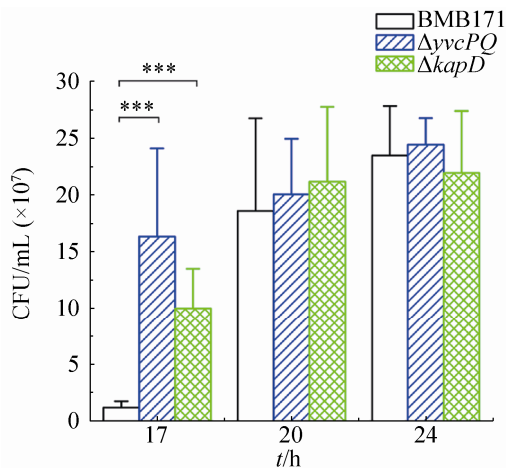


图 2. BMB171、 $\Delta yvcPQ$ 和 $\Delta kapD$ 菌株的芽胞计数
Figure 2. Spore counts in BMB171, $\Delta yvcPQ$ and $\Delta kapD$ strains. Error bars show the variant range of the data derived from three independent biological replicates. The statistically significant differences were tested via a two-tailed Student's *t* test. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

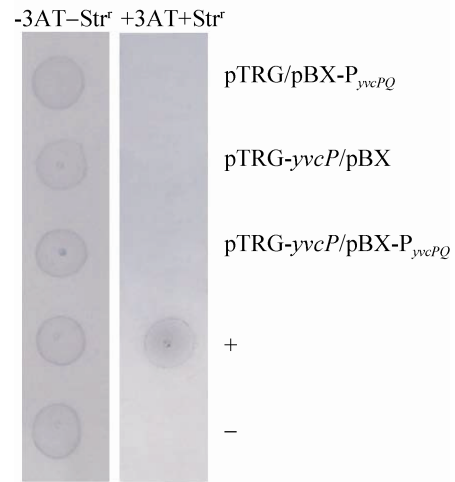


图 3. 细菌单杂交实验验证 YvcP 与 P_{yvcPQ} 的结合
Figure 3. Bacterial one-hybrid assays to investigate the interaction between YvcP and P_{yvcPQ} . +: positive control, *Rv2031p/Rv3133c*-hybrid strain; -: negative control, pTRG/pBX strain.

上生长, 而 pTRG-*yvcP*/pBX- P_{yvcPQ} 自激活菌株(见表 1)和负对照菌株均不能在含有 3AT 和 Str 的 M9 培养基固体平板上生长, 这说明 YvcP 与 P_{yvcPQ} 不能结合, 因此 YvcP 不能够调控自身基因的启动子。

2.4 *yvcPQ* 操纵子的转录受调控因子 AbrB 的激活

细菌单杂交实验验证了 YvcP 不能够自调控, 那么是什么转录调控元件来调节 *yvcPQ* 的转录? 在 *B. subtilis* 中, 形成芽胞是由于 Spo0A 被磷酸化后激活了芽胞形成相关 sigma 因子的转录, 此外, 磷酸化的 Spo0A 也能够抑制负调控芽胞形成的转录调控因子 AbrB 的转录。所以本研究将 AbrB 列为调控 *yvcPQ* 的候选蛋白, 采用体外的 EMSA 实验和体内的实时荧光定量 PCR 实验来检测 AbrB 能否调控 *yvcPQ*。

BL21-pET-*abrB* 经培养, IPTG 诱导, 超声破碎后用 Ni-NTA 柱纯化, 获得 AbrB 蛋白, 与 FAM 标记的 *yvcPQ* 的启动子区 DNA P_{yvcPQ} 混合孵育, 然后用 PAGE 检测 AbrB 与 P_{yvcPQ} 的结合情况, 结

果显示, AbrB 蛋白能使 P_{yvcPQ} 发生明显的阻滞迁移, 且随着蛋白浓度的增加, 阻滞迁移效果更加明显(图 4)。说明 AbrB 在体外可以与 $yvcPQ$ 启动子结合。

随后本研究采用实时荧光定量 PCR 的方法在体内检测了 AbrB 对 $yvcPQ$ 的转录调控。首先利用归巢内切酶 *I-Sce I* 介导的基因敲除方法构建了 *abrB* 缺失突变株 $\Delta abrB$ 。将 BMB171 和 $\Delta abrB$ 在 GYS 培养基中培养至对数期, 然后用 TRIzol 分别提取总 RNA, 如图 5-A 所示, 提取的 RNA 质量很好, 可以用于实时荧光定量 PCR。实时荧光定量 PCR 结果显示, BMB171 中的 $yvcPQ$ 的转录量是 $\Delta abrB$ 中的 1.7 倍(图 5-B), 说明 AbrB 在体内能够激活 $yvcPQ$ 的转录。



图 4. EMSA 实验证实 AbrB 可以与 P_{yvcPQ} 结合
Figure 4. Verification that AbrB binds to P_{yvcPQ} by EMSA. 0: without AbrB, negative control; 1: 1 μ L AbrB; 2: 2 μ L AbrB; 3: 4 μ L AbrB; 4: 8 μ L AbrB.

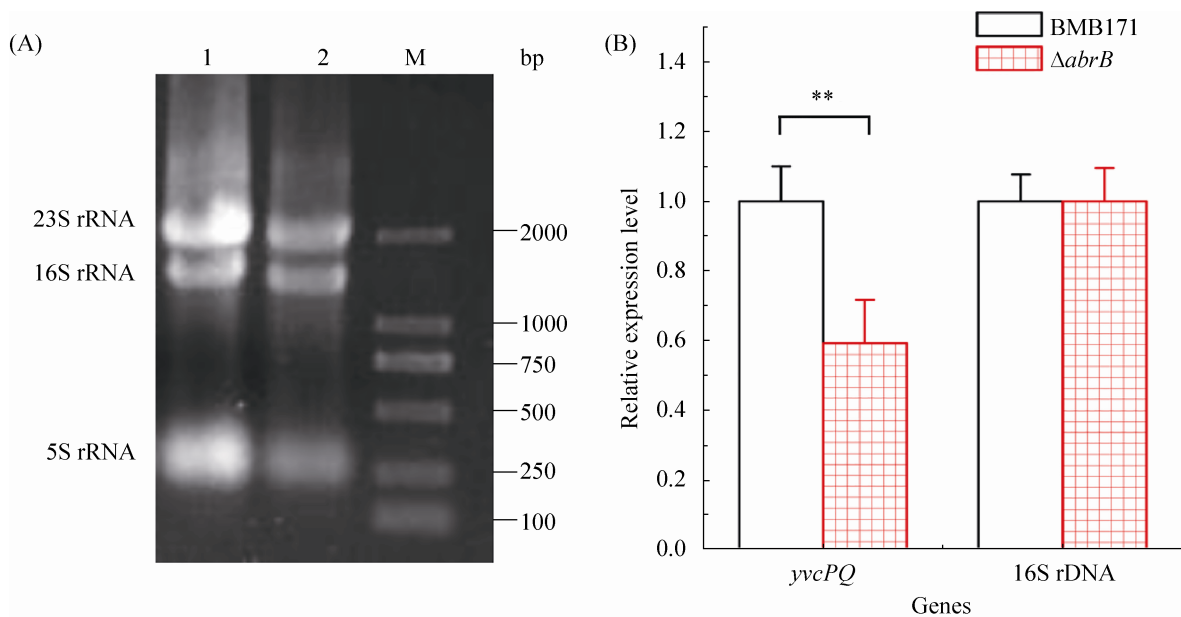


图 5. $\Delta abrB$ 和 BMB171 中 $yvcPQ$ 操纵子转录量的比较

Figure 5. Transcription analysis of $yvcPQ$ in $\Delta abrB$ and BMB171. A: electrophoretogram of the total RNAs. 1: total RNA extracted from BMB171; 2: total RNA extracted from $\Delta yvcPQ$; M: DL2000 DNA ladder marker. B: comparison of $yvcPQ$ transcription level in $\Delta abrB$ with that in BMB171. Error bars show the variant range of the data derived from three independent biological replicates. The statistically significant differences were tested via a two-tailed Student's *t* test. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

3 讨论和结论

B. subtilis 形成芽胞主要是由于 HK KinA 和 KinB 能够感应某种信号刺激(比如德夸霉素和营养匮乏等)并发生自磷酸化,然后将磷酸基团经过 RR Spo0F 和 Spo0B,最终传递给 Spo0A^[23],Spo0A 被磷酸化后抑制调控因子 AbrB 的转录,解除 AbrB 对芽胞形成的关键因子 σ^H 基因的抑制,使 σ^H 正调控其他与芽胞形成相关的 σ 因子的基因的表达,最终形成芽胞^[24-25],而 KapD 能够抑制芽胞形成的 KinA 途径^[7]。因此,参考 *B. subtilis* 中芽胞形成机制,我们分析了 *B. thuringiensis* 中抑制芽胞形成的可能的分子机制。

当细胞外存在某种抑制芽胞形成的信号刺激时,位于细胞膜的 YvcQ 能够感应这种刺激,然后通过磷酸传递激活细胞质中的 RR YvcP,使 YvcP 正调控 *kapD* 的转录,从而使 KapD 抑制 KinA 到

Spo0A 的磷酸传递,没有磷酸化的 Spo0A 不再抑制 *abrB* 基因的转录,导致 AbrB 通过抑制 σ^H 基因的转录来抑制芽胞形成相关的 sigma 因子的基因的表达,最终抑制芽胞的形成,此时, AbrB 还能够正调控 *yvcPQ* 的转录,提高细胞内的 YvcP 的水平,增强 YvcP 对 *kapD* 的转录激活,进而增强对芽胞形成的抑制作用(图 6-A);当细胞外的信号刺激减弱或消失时, YvcPQ 不能够被激活,导致 *kapD* 的转录量下降,此时磷酸基团能够从 KinA 传递到 Spo0A,使 Spo0A 被磷酸化激活,此时 Spo0A 通过抑制 *abrB* 基因的转录,解除 AbrB 对 σ^H 基因的转录抑制,使 σ^H 正调控芽胞形成相关的 σ 因子的基因的表达,最终形成芽胞,同时磷酸化的 Spo0A 也能够通过抑制 *abrB* 基因的转录,来抑制 *yvcPQ* 的转录,使细胞内 KapD 水平下降,减弱其对芽胞形成的抑制作用,保证芽胞顺利的形成(图 6-B)。

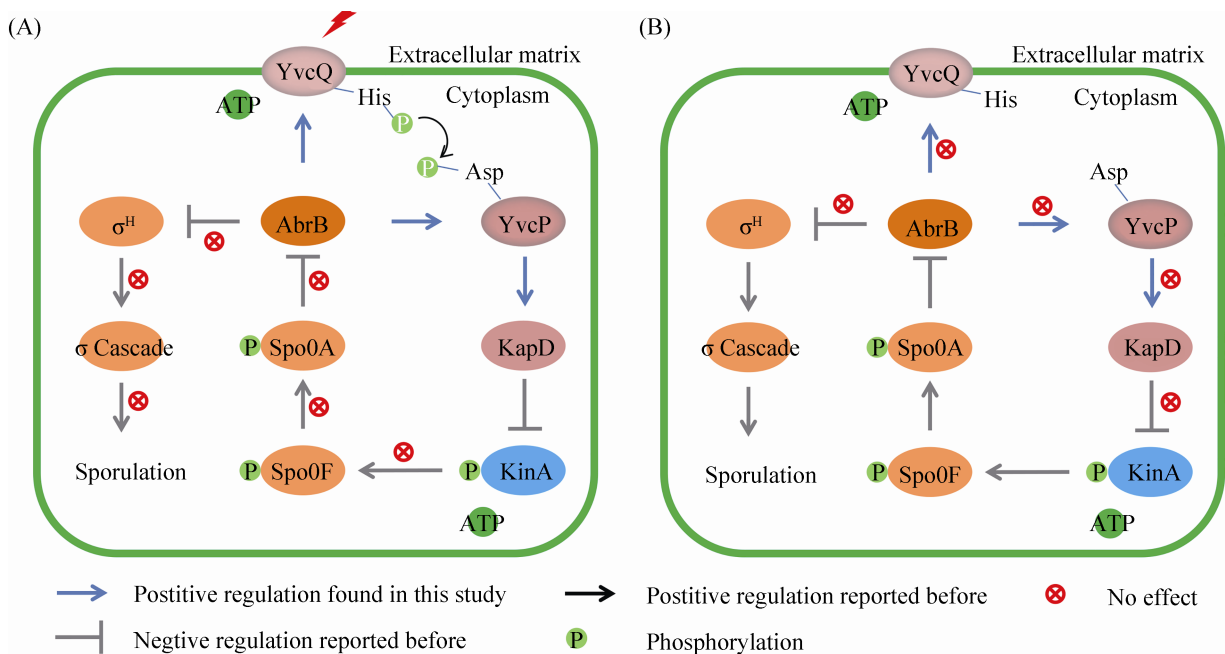


图 6. AbrB-YvcPQ-KapD 对芽胞形成的抑制
 Figure 6. Inhibition of sporulation by AbrB-YvcPQ-KapD.

参考文献

- [1] West AH, Stock AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26(6): 369–376.
- [2] Bourret RB, Silversmith RE. Two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 113–115.
- [3] Szurmant H, Hoch JA. Interaction fidelity in two-component signaling. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 190–197.
- [4] Mascher T, Margulis NG, Wang T, Ye RW, Helmann JD. Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(5): 1591–1604.
- [5] Procaccini A, Lunt B, Szurmant H, Hwa T, Weigt M. Dissecting the specificity of protein-protein interaction in bacterial two-component signaling: orphans and crosstalks. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19729.
- [6] Rietkötter E, Hoyer D, Mascher T. Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(3): 768–785.
- [7] Staroń A, Finkeisen DE, Mascher T. Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(2): 515–525.
- [8] Zhang SM, Li XF, Wang X, Li Z, He J. The two-component signal transduction system YvcPQ regulates the bacterial resistance to bacitracin in *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*, 2016, 198(8): 773–784.
- [9] Miller DA, Suen G, Clements KD, Angert ER. The genomic basis for the evolution of a novel form of cellular reproduction in the bacterium *Epulopiscium*. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 265.
- [10] 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.
- [11] Li L, Yang C, Liu ZD, Li FD, Yu ZN. Screening of acrySTALLIFEROUS mutants from *Bacillus thuringiensis* and their transformation properties. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(1): 85–90. (in Chinese)
李林, 杨超, 刘子铎, 李阜棣, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌无晶体突变株的逐级升温筛选及其转化性能. *微生物学报*, 2000, 40(1): 85–90.
- [12] Janes BK, Stibitz S. Routine markerless gene replacement in *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity*, 2006, 74(3): 1949–1953.
- [13] Wang JP, Ai XL, Mei H, Fu Y, Chen B, Yu ZN, He J. High-throughput identification of promoters and screening of highly active promoter-5'-UTR DNA region with different characteristics from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62960.
- [14] Wang X, Li Z, Li X, Qian HL, Cai X, Li XF, He J. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism is unrelated to the sporulation and parasporal crystal protein formation in *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 836.
- [15] Meng XD, Brodsky MH, Wolfe SA. A bacterial one-hybrid system for determining the DNA-binding specificity of transcription factors. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(8): 988–994.
- [16] Tang Q, Li XF, Zou TT, Zhang HM, Wang YY, Gao RS, Li ZC, He J, Feng YJ. *Mycobacterium smegmatis* BioQ defines a new regulatory network for biotin metabolism. *Molecular Microbiology*, 2014, 94(5): 1006–1023.
- [17] Wang JP, Mei H, Zheng C, Qian HL, Cui C, Fu Y, Su JM, Liu ZD, Yu ZN, 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.
- [18] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [19] Zheng C, Ma Y, Wang X, Xie YQ, Ali MK, He J. Functional analysis of the sporulation-specific diadenylate cyclase CdaS in *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 908.
- [20] Zhang SM, Hu YM, Fan QY, Wang X, He J. Two-component system YvqEC-dependent bacterial resistance against vancomycin in *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 108(2): 365–376.
- [21] Tang Q, Yin K, Qian HL, Zhao YW, Wang W, Chou SH, Fu Y, He J. Cyclic di-GMP contributes to adaptation and virulence of *Bacillus thuringiensis* through a riboswitch-regulated collagen adhesion protein. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28807.
- [22] Mascher T, Zimmer SL, Smith TA, Helmann JD. Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(8): 2888–2896.

- [23] Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7(6): 579–586.
- [24] Fujita M, Losick R. Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes & Development*, 2005, 19(18): 2236–2244.
- [25] Tojo S, Hirooka K, Fujita Y. Expression of *KinA* and *KinB* of *Bacillus subtilis*, necessary for sporulation initiation, is under positive stringent transcription control. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(8): 1656–1665.

Regulation of sporulation by two-component system YvcPQ in *Bacillus thuringiensis*

Qingyun Fan, Shumeng Zhang, Yujing Gong, Jin He *

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

Abstract: [Objective] To study the regulation of sporulation controlled by two-component system (TCS) YvcPQ. [Methods] β -galactosidase experiment was used to verify the regulation of YvcP on *kapD* expression; bacterial one-hybrid assay, EMSA and RT-qPCR were applied to study the regulation of AbrB on *yvcPQ* expression; markerless gene deletion coupled with spore count was used to reveal the influence of *yvcPQ* and *kapD* expressions on sporulation. [Results] The transcriptional regulator AbrB up-regulated the expression of *yvcPQ*; YvcP promoted the expression of *kapD* to inhibit sporulation. [Conclusion] AbrB up-regulated the transcription of *yvcPQ* operon, then the increased YvcP strengthened the transcriptional activation of sporulation inhibitor gene *kapD*, and subsequently inhibited sporulation.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, two-component system, YvcPQ, AbrB, sporulation

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270105)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-87280670; E-mail: hejin@mail.hzau.edu.cn

Received: 19 May 2016; Revised: 29 June 2016; Published online: 19 July 2016