



苏云金芽胞杆菌 Sigma H 对芽胞形成的影响

樊鑫桐^{1,2}, 杜立新², 高坦坦², 彭琦², 张杰², 宋福平^{1,2*}

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】检测苏云金芽胞杆菌 HD73 中的转录调控因子 Sigma H (σ^H)对 *spo0A* 基因转录的调控作用; 异源表达纯化 Sigma H 蛋白, 验证其对 *spo0A* 基因启动子的直接结合; 检测 *sigH* 基因的缺失对苏云金芽胞杆菌 HD73 芽胞形成和晶体蛋白产生的影响。【方法】通过测定 *spo0A* 基因启动子指导的 β -半乳糖苷酶活性评价 *spo0A* 基因在苏云金芽胞杆菌 HD73 野生型和 *sigH* 缺失突变体中的转录水平; 通过 PCR 扩增苏云金芽胞杆菌 HD73 的 *sigH* 基因并插入到表达载体 pET21b 上, 将质粒转入到表达菌株 BL21 (DE3)中, 得到重组菌株 BL21 (pETsigH); 利用镍柱亲和纯化和阴离子交换纯化得到纯化的 Sigma H 蛋白; 通过凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)验证 Sigma H 蛋白与 *spo0A* 基因启动子的直接结合; 通过显微镜观察、活芽胞计数的方法对突变株 HD Δ sigH 进行表型特征分析。【结果】*sigH* 缺失后, *spo0A* 基因转录活性降低; 在大肠杆菌中正确表达并纯化出大小约为 28 kDa 的 Sigma H-His 蛋白; EMSA 结果表明纯化后的 Sigma H-His 蛋白可与 *spo0A* 基因启动子结合; 镜检和活芽胞计数结果表明突变株 HD Δ sigH 无法产生芽胞和蛋白晶体。【结论】Sigma H 蛋白通过与 *spo0A* 基因启动子结合直接调控 *spo0A* 基因的表达且 *sigH* 基因的缺失阻断了苏云金芽胞杆菌中芽胞和晶体蛋白的产生。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, Sigma H, 表达纯化, *spo0A* 基因, 芽胞形成

RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)包括核心酶和 Sigma 因子。Sigma 因子与 RNAP 核心酶结合后, 特异性识别并结合启动子共有序列, 从而调控相关基因的表达。模式菌株枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*)在芽胞形成过程中先后激活 6 个不同的 σ 因子, 即营养期生长因子 σ^A 、 σ^H , 芽胞形成

早期在母细胞和前芽胞中分别表达的 σ^E 和 σ^K , 以及芽胞形成晚期在母细胞和前芽胞中具有活性的 σ^F 和 σ^G 因子。通过有序地更换 Sigma 因子, 使 RNA 聚合酶识别与芽胞形成相关的不同基因的启动子, 调控芽胞形成基因在时间和空间上有序且准确无误地表达^[1]。 σ^H 由 *sigH* (*spo0H*)基因编码,

基金项目: 国家自然科学基金(31530095)

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

收稿日期: 2018-03-20; 修回日期: 2018-05-03; 网络出版日期: 2018-05-23

在营养体细胞中一直以较低水平存在, 主要在芽胞杆菌从指数生长期过渡到平稳期时发挥重要功能。 σ^H 主要指导芽胞形成和进入感受态的重要基因的转录, 包括 *spo0A*、*spo0M*、*spo0F*、*spoVG*、*spoVS*、*spoIIA*、*kinA* 等基因和一些编码分泌信号分子的 *phr* 家族中的几个基因^[2]。除上述基因外, 在 *B. subtilis* 中, σ^H 还可以指导许多与生理过程相关基因的表达, 包括细胞色素合成的相关基因, 细胞壁代谢的相关基因和响应营养元素缺乏时所必需的基因^[3]。

苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性细菌, 广泛分布于土壤中, 其特点是在形成芽胞的同时能够产生具有杀虫活性的晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs)^[4]。因 Bt 具有较广的杀虫谱和对环境安全友好等特点, 目前已成为农业上应用最广泛的微生物杀虫剂。Bt 形成芽胞的同时, 在母细胞中, 由 *cry* 基因编码的 ICPs 也在产生和积累。*cry* 基因被分为两类: 一类是芽胞形成依赖型 *cry* 基因, 另一类是非芽胞形成依赖型 *cry* 基因。目前已知的 *cry* 基因大部分为芽

胞依赖型, 其中由 σ^H 控制转录的为 *cry4*、*cry11* 和 *cry8*^[5] 基因。但是 σ^H 在 Bt 中是否还控制芽胞形成相关的基因未见报道, 尤其是 σ^H 如何控制芽胞形成关键调控基因 *spo0A* 的表达迫切需要研究。本研究以苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种 HD73 菌株为研究对象。通过敲除 *sigH* 基因得到突变体 HD Δ *sigH*, 表型研究发现该突变菌株可以正常生长, 然而其营养体不能形成不对称隔膜, 无法进入芽胞形成期, 最终导致无法产生芽胞和 Cry1Ac 晶体蛋白。通过在遗传水平和蛋白水平上检测, 证明了 Sigma H 蛋白通过与 *spo0A* 基因启动子结合直接调控 *spo0A* 基因的表达。本研究为进一步揭示 σ^H 控制 Bt 芽胞形成机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养基

实验所用菌株与质粒见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 在 37 °C、220 r/min 条件下于 LB 培养基(1% NaCl, 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract)

表 1. 本实验用到的菌株与质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characterization	Reference or source
Strains		
HD73	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> carrying the <i>cry1Ac</i> gene	Laboratory collection
HD Δ <i>sigH</i>	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>sigH</i> gene mutant	[5]
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_S</i> <i>m_S</i>), <i>gal</i> , λ (DE3)	[6]
BL21 (pET <i>sigH</i>)	BL21 (DE3) with pET <i>sigH</i> plasmid	This study
BLpET	BL21 strain carrying pET21b plasmid	Laboratory collection
HD73 (pHTP _{<i>spo0A</i>})	HD73 strain carrying pHTP _{<i>spo0A</i>}	This study
HD Δ <i>sigH</i> (pHTP _{<i>spo0A</i>})	HD Δ <i>sigH</i> strain carrying pHTP _{<i>spo0A</i>}	This study
Plasmids		
pET21b	Expression vector, Amp ^r , 5.4 kb	Laboratory collection
pET <i>sigH</i>	pET21b containing <i>sigH</i> gene, Amp ^r	This study
pHT304- <i>lacZ</i>	<i>B. thuringiensis</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector harboring the promoterless <i>lacZ</i> gene	Laboratory collection
pHTP _{<i>spo0A</i>}	pHT304- <i>lacZ</i> carrying the <i>lacZ</i> gene under the control of the P _{<i>spo0A</i>}	This study

中培养; Bt 在 30 °C、220 r/min 条件下于 LB 培养基中进行常规培养, 于 1/2 LB 培养基(0.5% NaCl, 0.5% Tryptone, 0.25% Yeast Extract)中进行诱导产胞实验。抗生素使用终浓度: 5 µg/mL 红霉素, 100 µg/mL 氨苄青霉素。

1.2 主要试剂及仪器

限制性内切酶、Solution IDNA 连接酶、Prime STAR Max DNA 聚合酶(2×)等均购于宝生物(大连)工程有限公司; DNA Marker、2× Taq Mix 等购自北京博迈德科技发展有限公司; DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒等均购自美国 Axygen 公司。CP750 超声波细胞破碎仪购自美国 Cole-Parmer 公司; 蛋白 Marker 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Ni Sepharose 6 Fast Flow column 购自美国 GE 公司; poly(dI:dC) [Poly(ethylene glycol) di-(4-hydroxyphenyl)diphenylphosphine] 购自上海 Sigma 公司; Gel Shift Assay Systems 购自 Promega 公司。其他抗生素与生化试剂均为国产或进口的生化或分析纯级试剂。

1.3 遗传操作

大肠杆菌质粒提取及 DNA 片段纯化按照试剂盒说明书进行; 大肠杆菌转化方法参考分子克隆实验指南; Bt 基因组 DNA 提取和电击转化参考之前发表的实验方法^[7-8]。

1.4 引物合成及序列测定

根据 Bt HD73 菌株的基因组序列设计引物, 具体名称及序列见表 2。引物合成和序列测定由生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.5 菌株构建

以 Bt HD73 基因组(GenBank 登录号: CP004069)^[9]为模板, P_{spo0A-1} 和 P_{spo0A-2} 为引物, PCR 扩增出 *spo0A* 基因启动子(P_{spo0A}), 利用 *Pst* I 和 *Bam*H I 酶切并连接到相同酶切处理的穿梭载体 pHT304-*lacZ* 上, 热激转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(购于中国大连宝生物工程有限公司)中, 获得质粒 pHTP_{spo0A}, 并进行测序确认序列的正确性。进一步将该质粒通过电击分别转进野生菌株 HD73 和 *sigH* 基因缺失突变株 HDΔ*sigH* 中, 得到用于评价 *spo0A* 基因转录水平的菌株 HD73 (pHTP_{spo0A})和 HDΔ*sigH* (pHTP_{spo0A})。

根据 Bt HD73 菌株的 *sigH* (HD73_0093)基因序列设计扩增 *sigH* 基因的引物对 *sigH*-F/*sigH*-R, 并以 HD73 基因组作为模板, PCR 扩增出 *sigH* 基因的开放阅读框(ORF)。利用 *Sal* I 和 *Bam*H I 对该片段进行双酶切, 胶回收后插入 pET21b 载体的相应酶切位点, 并热激转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中获得蛋白表达重组质粒, 命名为 pET*sigH*。提取质粒, 利用 pET21b 质粒上通用引

表 2. 本研究所用引物

Table 2. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Restriction sites
<i>sigH</i> -F	<u>CGGATCCGGTGG</u> AAGCAGGCTTCGTAAG	<i>Bam</i> H I
<i>sigH</i> -R	GTCGACTGAATTTAAAGTTGTACTTTC	<i>Sal</i> I
P _{spo0A-1}	AACTGCAGAGCTCGCTTTTCTGTTGAA	<i>Pst</i> I
P _{spo0A-2}	CGGGATCCTTCTCCACAGCTTTTCCTC	<i>Bam</i> H I
<i>spo0A</i> -FAMf	AGCTCGCTTTTCTGTTGAA	
<i>spo0A</i> -FAMr	TTCTCCACAGCTTTTCCTC	

The underlined part indicates restriction sites; FAM indicates carboxyfluorescein labeling.

物确认插入序列的正确性。进一步将该质粒热激转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)中得到蛋白表达菌株 BL21 (pETsigH)。

1.6 β -半乳糖苷酶活性测定

挑取 Bt 菌株单克隆接种于含红霉素抗性的 LB 培养基中过夜培养。按 1%转接于 100 mL 1/2 LB 培养基中培养至 $OD_{600}=2.0-2.2$, 即为对数生长末期, 将该时期设为 T_0 , T_n 即为 T_0 后第 n 个小时, 分别在 T_0 、 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_5 时取 2 mL 菌液, 12000 r/min, 离心 2 min 收集菌体。加入 Z Buffer (0.04 mol/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0.06 mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0.01 mol/L KCl, 0.001 mol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 使用时加入 1 mmol/L DTT)和石英砂破碎 2 min; 15000 r/min 低温离心 10 min 后取 100 μ L 上清加入 700 μ L Z Buffer, 加入 200 μ L ONPG 开始反应, 待反应体系颜色变黄后加入 500 μ L 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 记录反应时间 T ; 反应液于紫外分光光度计测定 OD_{420} 的值; 再取样品上清 15 μ L 加入到 750 μ L Bradford 中, 反应 5 min, 测定 OD_{595} 值, β -半乳糖苷酶活性计算公式为 $unit = (OD_{420} \times 1500)/(T \times V \times \text{蛋白浓度})$ 。每组数据独立重复 3 次。

1.7 Sigma H-His 蛋白的表达

将 BL21 (pETsigH)菌种活化于含有氨苄青霉素的 5 mL LB 培养基中, 按 1%将菌液转接至 300 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}C$ 、220 r/min 培养至 $OD_{600}=0.7-1.0$, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 18 $^{\circ}C$ 、150 r/min 诱导过夜(12 h)。在 4 $^{\circ}C$ 、7700 r/min 条件下, 离心 15 min 收集菌体, 用 pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液悬浮菌体, 超声破碎(功率 60%, 时间 6 min)。4 $^{\circ}C$ 、7700 r/min 离心 15 min, 分离上清和沉淀, 进行 12% SDS-PAGE 检测,

鉴定在该诱导条件下 Sigma H-His 蛋白表达情况。

1.8 Sigma H-His 蛋白的纯化

取 3 mL Ni Sepharose 6 Fast Flow column 装入层析柱, 用 5 倍柱体积的去离子水清洗柱料; 加入 5 倍柱体积的 Binding Buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 20 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl) 平衡柱料, 将 Sigma H-His 蛋白上清液上样, 反复 3 次; 缓慢加入 5 倍柱体积的 Binding Buffer 清洗柱料中的杂蛋白, 取 10 mL 洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 250 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl) 把目的蛋白洗脱并收集, 每 1 mL 收集 1 管。SDS-PAGE 检测洗脱下来的蛋白样品。对纯化后的 Sigma H-His 蛋白用 pH 8.0 的 Tris-HCl 进行透析。

1.9 Sigma H-His 蛋白的阴离子交换层析纯化和脱盐

将透析过的 Sigma H-His 蛋白用 AKTA avant 25 蛋白液相分析系统进行阴离子交换层析纯化。将阴离子交换柱 HiTrap Q HP column 冲洗后, 用 8 倍柱体积的平衡缓冲液 Buffer A (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)平衡柱子; 将蛋白以 1 mL/min 的速度上样, 上样结束用 5 倍柱体积的 Buffer A 冲洗柱子, 冲洗掉未结合的蛋白; 最后用洗脱缓冲液 Buffer B (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mol/L NaCl)进行线性洗脱, 将吸光值为 260-280 nm 的蛋白收集。

通过 AKTA avant 25 蛋白液相分析系统利用脱盐柱 HiTrap Q HP column 进行脱盐, 用 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 缓冲液平衡脱盐柱, 将蛋白以 5 mL/min 的流速上样, 收集蛋白峰, 用 SDS-PAGE 检测纯度。

1.10 凝胶迁移实验

spo0A 基因启动子与纯化的 Sigma H-His 蛋白在体外结合实验按照之前发表的方法进行^[10]。10 μL 反应体系中: 10 \times 结合反应液 1 μL , Poly (dI:dC) 1 μL (500 mg/L), Sigma H-His 蛋白 1 μL , 去离子水补足混匀, 室温静置反应 20 min。然后加入 1 μL 带有 FAM 标记的 P_{spo0A} 混匀, 室温继续静置反应 20 min。电泳条件: 140 V 电压, 4 $^{\circ}\text{C}$, 非变性胶(5%)检测。非变性胶用荧光凝胶成像系统(富士公司 FLA Imager FLA-5100)进行扫描。

1.11 激光共聚焦显微镜和电镜观察

将野生菌株 HD73 和 *sigH* 基因缺失突变株 HD Δ *sigH* 在 1/2 LB 培养基中培养至 T_0 和 T_3 时期, 各取 1 mL 菌液离心收集菌体, 用去离子水洗涤 3 次后悬浮于 100 μL 去离子水中。取 1 μL 细胞悬浮液和 1 μL 细胞膜染液 FM4-64 (100 $\mu\text{mol/L}$; Thermo Scientific, USA) 在载玻片上混匀反应染色 1 min, 加入盖玻片压紧。将玻片置于激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss 880, LSM T-PMT)下观察。

将野生菌株 HD73 和 *sigH* 基因缺失突变株 HD Δ *sigH* 置于电镜下扫描观察其表型差异。将 HD73 和 HD Δ *sigH* 菌株在 1/2 LB 培养基中培养 24 h 以上, 至细胞裂解, 收集菌体用固定液悬浮, 送至中国农业科学院农产品加工研究所电镜室进行电镜扫描。

1.12 芽胞形成率统计

挑取 Bt 菌株的 3 个单克隆于 100 mL 1/2 LB 培养基 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养至 T_1 时取出 1 mL 菌液, 利用无菌水进行梯度稀释, 取 100 μL 合适浓度的稀释液涂于 LB 平板上; 培养 Bt 菌株生长至大多数芽胞释放后, 取 1 mL 菌液在 65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温育 20 min 杀死营养体细胞。梯度稀释后取 100 μL 合

适浓度的稀释液涂于 LB 平板; 平板在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养过夜, 计算平板上的菌落数; 芽胞形成率=芽胞萌发数/ T_1 的细胞总数^[11]。每组数据独立重复 3 次。

2 结果和分析

2.1 P_{spo0A} -*lacZ* 融合菌株的构建及蛋白表达菌株的构建

为测定 *spo0A* 基因的转录活性, 首先构建 P_{spo0A} -*lacZ* 融合菌株。*spo0A* 基因启动子片段为 287 bp, 利用 PCR 扩增启动子(图 1-A)得到大小正确的片段, 酶切后插入 pHT304-*lacZ* 载体, 获得质粒 pHTP $_{spo0A}$ 。酶切质粒得到插入的目的片段, 大小为 287 bp (图 1-B)。经测序验证插入片段序列完全正确。将 pHTP $_{spo0A}$ 分别电击转入到野生菌株 HD73 和 *sigH* 基因缺失突变株 HD Δ *sigH* 中, 筛选红霉素抗性的单菌落。经 PCR 测序证明用于评价 *spo0A* 基因转录水平的菌株 HD73 (pHTP $_{spo0A}$) 和 HD Δ *sigH* (pHTP $_{spo0A}$) 构建正确。

为了异源表达 Sigma H 蛋白, 构建 Sigma H 蛋白表达菌株。*sigH* 基因的 ORF 区全长为 660 bp, 利用 PCR 的方法扩增后产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在 500–750 bp 处有一条大小与目的片段一致的条带(图 1-C)。提取 pET*sigH* 重组质粒进行酶切鉴定, 双酶切后出现两条带, 且其中一条带与目的片段大小一致(图 1-D)。重组质粒通过测序, 显示插入的 *sigH* 基因片段序列与 *sigH* 在基因组上的序列完全一致, 相似度为 100%。

2.2 *spo0A* 基因的转录活性分析

为了验证 *spo0A* 基因转录水平是否受到 Sigma H 的影响, 测定在野生菌株 HD73 和突变体 HD Δ *sigH* 中 P_{spo0A} 指导表达的 β -半乳糖苷酶转录

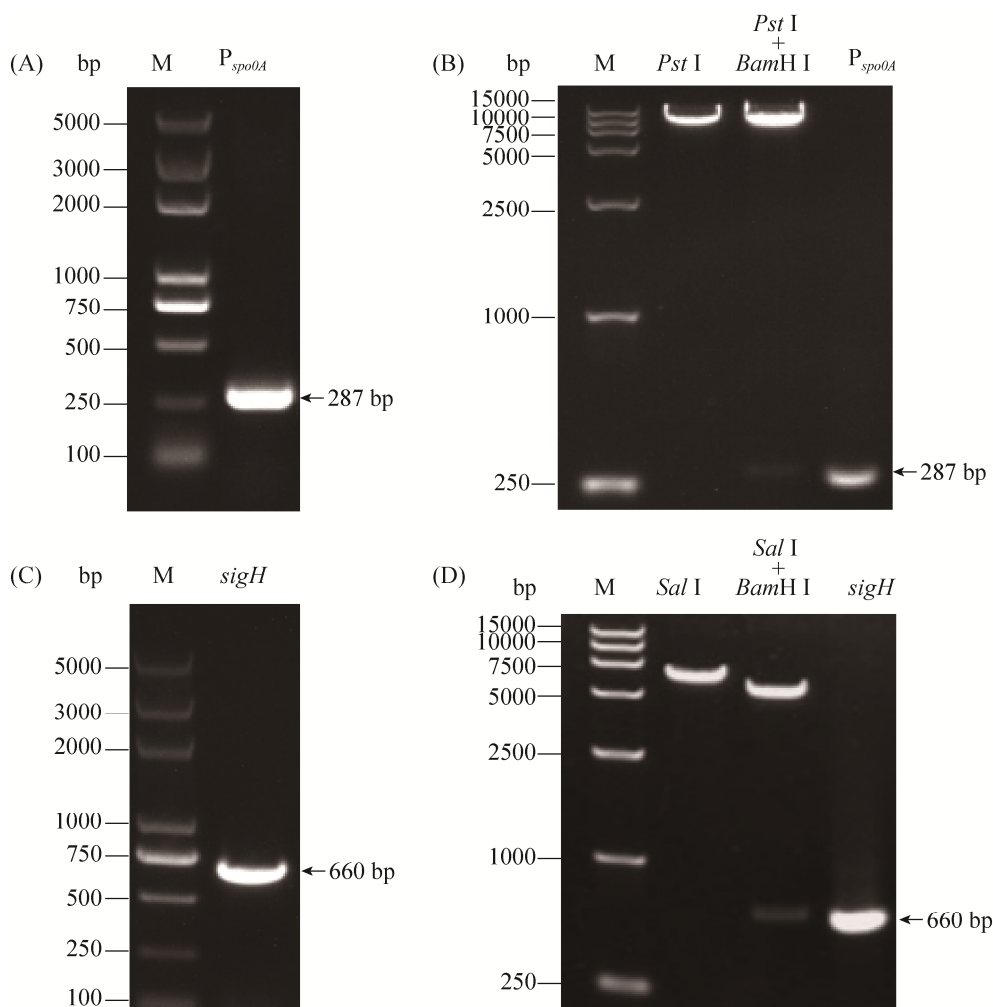


图 1. 目的片段的 PCR 扩增和重组质粒酶切鉴定

Figure 1. PCR amplification of target gene fragments and digestion of recombinant plasmid. PCR amplification of P_{spo0A} (A) and digestion of $pHTP_{spo0A}$ (B); PCR amplification of $sigH$ gene (C) and digestion of $pETsigH$ (D).

活性。结果显示 P_{spo0A} 在野生株 HD73 中从 T_0 至 T_2 时期转录活性持续升高, 后期趋于稳定, P_{spo0A} 在突变株 $HD\Delta sigH$ 中从 T_0 至 T_5 时期转录且活性值缓慢升高; 然而在整个测定阶段, P_{spo0A} 在 $HD\Delta sigH$ 中的活性显著低于其在野生型菌株中的活性(图 2)。结果表明 $spo0A$ 基因在转录水平上受 Sigma H 的控制。

2.3 Sigma H-His 蛋白的表达和纯化

选取测序结果正确的重组菌株 BL21 ($pETsigH$)

进行 Sigma H-His 蛋白表达。经 IPTG 诱导蛋白表达 12 h 后, 用超声法破碎大肠杆菌。通过离心分离上清和沉淀, 并进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示在重组菌株的菌液中, 可溶性组分和不可溶性组分均在相对分子质量为 28 kDa 处出现特异条带, 与预期的 Sigma H-His 融合蛋白的理论值相符, 且可溶性 Sigma H-His 蛋白表达量高于不可溶性蛋白, 而对照组空载体转化的菌株均无特异条带出现(图 3-A)。

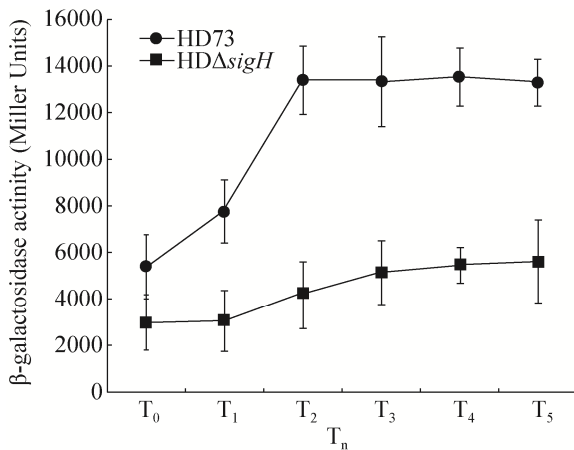


图 2. P_{spo0A} 在 HD73 和 HD $\Delta sigH$ 菌株中的转录活性分析

Figure 2. Transcriptional activity of P_{spo0A} in HD73 and HD $\Delta sigH$ strain. Values represent the means of three independent replicates. Error bars represent standard deviations.

Sigma H-His 粗蛋白通过离心收集, 其上清通过 Ni^{2+} 螯合琼脂糖亲和纯化后, 得到了 Sigma H-His 蛋白, 经紫外分光光度计测得浓度约为 0.4 g/L。用 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 透析后得到 Sigma

H-His 蛋白进行 SDS-PAGE (图 3-B)。对透析后的 Sigma H-His 蛋白进行阴离子交换层析纯化, 用 1 mol/L NaCl 进行线性洗脱, 再用 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 进行脱盐后, 通过 SDS-PAGE 结果显示, 所得蛋白纯度较高且分子量大小正确 (图 3-C)。

2.4 Sigma H-His 蛋白的结合活性

利用 FAM 标记的引物对 $spo0A$ -FAMf/ $spo0A$ -FAMr 扩增 $spo0A$ 启动子(287 bp, 包含 ATG 上游 243 bp 及 44 bp ORF)与纯化的 Sigma H-His 蛋白进行体外结合实验。如图 4 所示, 凝胶底部的条带为带有 FAM 标记的自由 DNA 即 $spo0A$ 基因的启动子 P_{spo0A} , 自由 DNA 上层的条带为 Sigma H-His 蛋白与 P_{spo0A} 的结合条带, 随着蛋白浓度的逐渐增加, 底部 P_{spo0A} 条带浓度逐渐降低, 上层条带浓度逐渐升高, 说明 Sigma H-His 蛋白可以与 $spo0A$ 启动子特异性结合, 但是具体结合区域还未经检测。

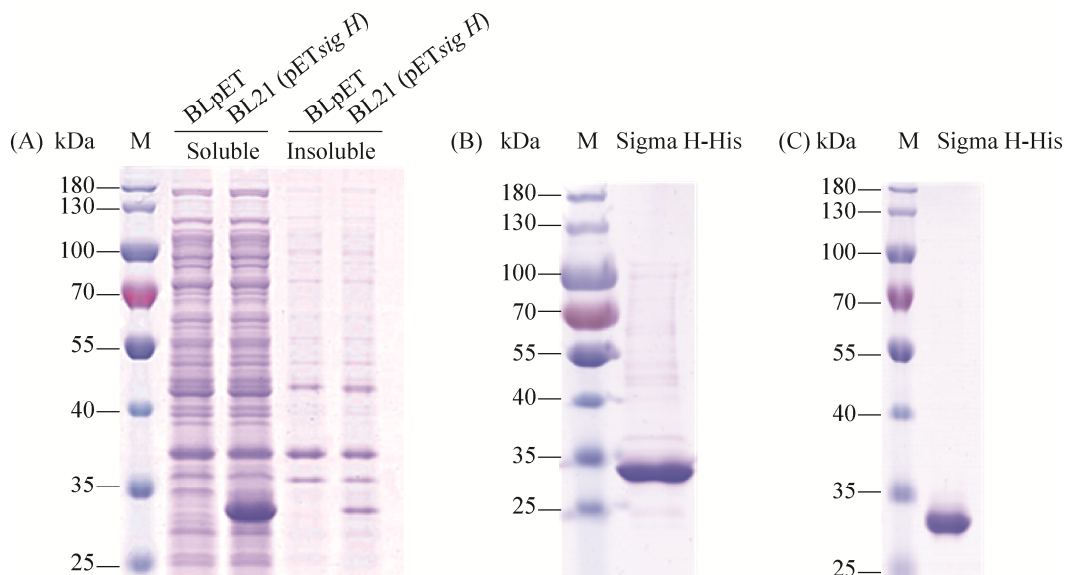


图 3. Sigma H-His 蛋白的表达及纯化

Figure 3. Expression and purification of Sigma H-His protein. A: expression of Sigma H-His protein; B: Sigma H-His protein purification by nickel column; C: Sigma H-His protein purification by desalting.

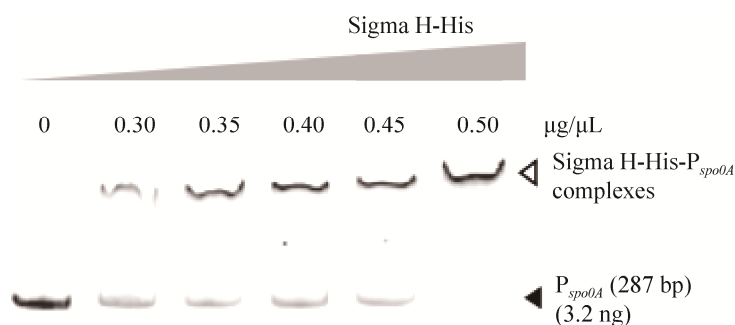


图 4. Sigma H-His 蛋白与 *spo0A* 基因启动子的结合
Figure 4. Sigma H-His protein binding to the promoter of *spo0A* gene.

2.5 突变株 HDΔ*sigH* 产生芽胞和杀虫晶体蛋白能力的分析

将野生株 HD73 和突变株 HDΔ*sigH* 在 1/2 LB 培养基中培养至 T₃ 时期，利用激光共聚焦显微镜观察细胞中不对称隔膜的形成。结果显示，在 T₃ 时期，野生株 HD73 进入不对称隔膜形成期，大部分细胞开始形成不对称隔膜，然而突变株 HDΔ*sigH* 中无不对称隔膜形成，表明 HDΔ*sigH* 无

法进入芽胞形成期，不能形成芽胞(图 5)。在 HD73 菌株中仅产生一种依赖芽胞形成的 Cry 蛋白 Cry1Ac，因此可以确定突变株 HDΔ*sigH* 同样不可产生 Cry1Ac 晶体蛋白。

为了进一步确认上述实验结果，取两个菌株进行电镜观察。结果表明在 1/2 LB 培养基中培养 24 h 后，野生菌株 HD73 能够释放出大量椭圆形的芽胞和双锥体的晶体蛋白(图 6-A)，而突变株

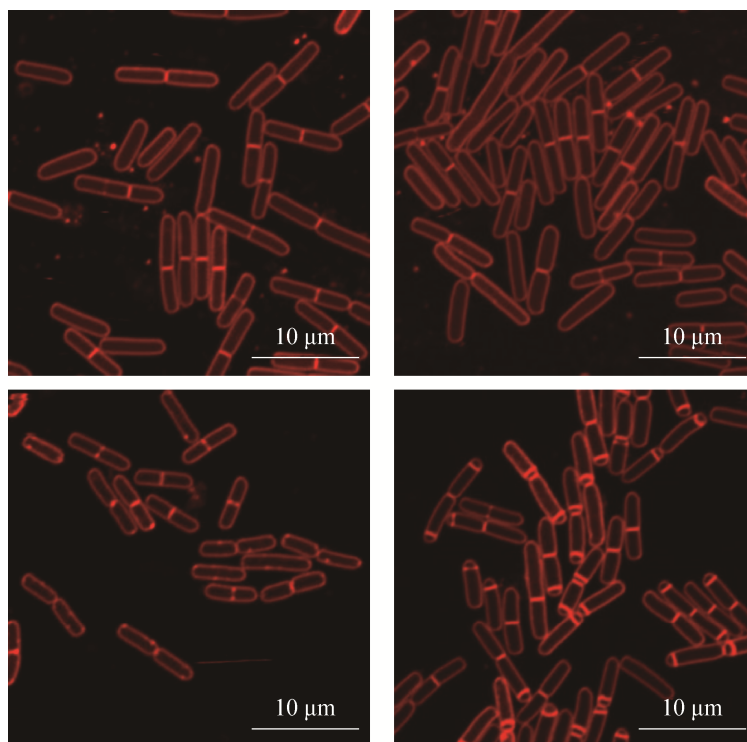


图 5. HD73 和 HDΔ*sigH* 菌株不对称隔膜的形成观察
Figure 5. Observation of asymmetrical septum formation of wild-type HD73 and HDΔ*sigH* cells.

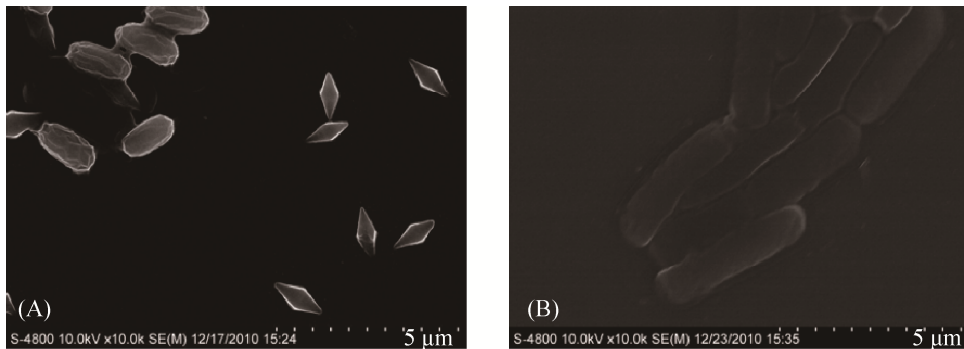


图 6. 不同菌株的扫描电镜观察

Figure 6. Observation of different strains under scanning electron microscopy. A: HD73; B: HD Δ sigH.

HD Δ sigH 则仍以营养体的形式存在, 没有芽胞和伴胞晶体出现(图 6-B)。结果表明 sigH 基因的缺失导致 Bt HD73 菌株丧失了产生芽胞和伴胞晶体的能力。

进一步通过芽胞形成率计算确定突变株 HD Δ sigH 不能形成芽胞。将野生菌株 HD73 和突变株 HD Δ sigH 在 1/2 LB 液体培养基中培养至 HD73 的芽胞和晶体完全释放时, 各取 1 mL 菌液进行活芽胞计数。结果显示野生菌株每 1 mL 菌液可产生 2.4×10^7 个活芽胞, 而突变菌株中则检测不到活芽胞数(图 7), 表明 sigH 基因的缺失, 阻断了菌体产生芽胞的能力。

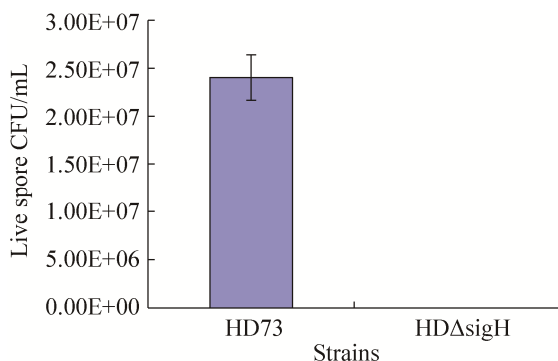


图 7. 不同菌株活芽胞计数分析

Figure 7. Analysis of live spores production in different strain. Values represent the means of three independent replicates. Error bars represent standard deviations.

3 结论和讨论

利用大肠杆菌的 BL21 (DE3) 表达系统^[12]对 Bt HD73 中 Sigma H 蛋白进行了成功的表达与纯化, 得到了相对分子质量与理论值一致的 Sigma H-His 蛋白。1988 年 Dubnau 等在 *B. subtilis* 中表达了地衣芽胞杆菌 *spo0H* 基因的蛋白, 即 σ^H 蛋白^[13]。2003 年, Imamura 等从 *E. coli* 中纯化出单细胞蓝藻的 9 种 σ 因子, 其中包括 σ^H ^[14]。2013 年 Barriuso-Iglesias 等对谷氨酸棒状杆菌的 GST-Sigma H 蛋白进行了表达纯化及相关研究^[15]。1997 年 Cosby 等在不同 pH 值下对 *B. subtilis* 中 σ^H 进行了表达^[16], 但到目前为止, 还没有 Bt 的 Sigma H 蛋白表达纯化的相关研究报道。通过 NCBI 进行 Blast, HD73 中 sigH 基因与炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis*)的 sigH 在核苷酸水平上一致性为 93%, 与 *B. subtilis* 的 sigH 一致性为 67%, 在氨基酸水平上与 *B. anthracis* 和 *B. subtilis* 的一致性分别为 99% 和 85%^[2]。

Spo0A 是一种 DNA 结合蛋白, 对芽胞形成起始至关重要, *spo0A* 的转录受到两种 RNA 聚合酶 σ^A 和 σ^H 的控制^[17], 但是还没有明确报道在 Bt 菌株中 Sigma H 蛋白对 *spo0A* 基因表达的直接调控作用。本实验利用酶活测定及 EMSA 证明 Sigma H

是通过结合在 *spo0A* 基因启动子上面直接控制 *spo0A* 基因的表达。2007 年 Hadjifrangiskou 等构建了 *B. anthracis* 的 *sigH* 基因缺失突变株, 该突变株丧失了形成芽胞和炭疽毒素的能力^[18], 在 *B. subtilis* 中 *sigH* 基因缺失后菌体无法形成不对称隔膜^[3], 本实验也表明了 Bt 中 *sigH* 基因的缺失会导致 Bt 丧失产生芽胞和杀虫晶体蛋白的能力。

在 *B. subtilis* 芽胞形成早期, σ^H 对于激活参与芽胞形成的特定基因发挥不可缺少的作用。但在 Bt 中, Sigma H 因子控制的基因表达的研究甚少。通过与 *B. subtilis* 全基因组相比, Bt 全基因组多了 1000 多个基因, 因此推测在 Bt 中 σ^H 可能控制更多基因的表达。已有报道 σ^H 因子是控制不对称隔膜形成的关键调控因子, 纯化其蛋白为深入研究 σ^H 控制的基因谱奠定基础, 对苏云金芽胞杆菌芽胞形成的调控机制并构建工程菌提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews*, 1993, 57(1): 1–33.
- [2] 杜立新. 苏云金芽胞杆菌 *cry8E* 基因转录调控机制研究. 保定: 河北农业大学博士学位论文, 2011.
- [3] Britton RA, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Fawcett P, Monson R, Losick R, Grossman AD. Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(17): 4881–4890.
- [4] Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1(1): 31–50.
- [5] Du LX, Qiu LL, Peng Q, Lereclus D, Zhang J, Song FP, Huang DF. 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.
- [6] Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(7): 423–431.
- [7] Stobdan T, Kaur S, Singh A. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(14): 1153–1156.
- [8] Lereclus D, Arantès 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.
- [9] Liu GM, Song L, Shu CL, Wang PS, Deng C, Peng Q, Lereclus D, Wang XM, Huang DF, Zhang J, Song FP. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. *Genome Announcements*, 2013, 1(2): e0008013.
- [10] Li R, Liu G, Xie ZJ, He XH, Chen WQ, Deng ZX, Tan HR. PolY, a transcriptional regulator with ATPase activity, directly activates transcription of *polR* in polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi*. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(2): 349–364.
- [11] Zhang Z, Yang M, Peng Q, Wang GN, Zheng QY, Zhang J, Song FP. Transcription of the lysine-2, 3-aminomutase gene in the *kam* locus of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 is controlled by both σ^{54} and σ^K factors. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(16): 2934–2943.
- [12] Yang M, Peng Q, Huang MZ, Kao GW, Zhang J, Song FP. Expression and purification of *Bacillus thuringiensis* Sigma K in *Escherichia coli*. *Microbiology China*, 2016, 43(1): 69–75. (in Chinese)
杨敏, 彭琦, 黄闽忠, 考桂伟, 张杰, 宋福平. 苏云金芽胞杆菌 Sigma K 在大肠杆菌中的表达与纯化. 微生物学通报, 2016, 43(1): 69–75.
- [13] Dubnau E, Weir J, Nair G, Carter III L, Moran Jr C, Smith I. *Bacillus* sporulation gene *spo0H* codes for sigma σ^{30} (σ^H). *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(3): 1054–1062.
- [14] Imamura S, Yoshihara S, Nakano S, Shiozaki N, Yamada A, Tanaka K, Takahashi H, Asayama M, Shirai M. Purification, characterization, and gene expression of all sigma factors of RNA polymerase in a cyanobacterium. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 325(5): 857–872.
- [15] Barriuso-Iglesias M, Barreiro C, Sola-Landa A, Martín JF. Transcriptional control of the *F₀F₁-ATP synthase* operon of *Corynebacterium glutamicum*: Sigma H factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6(2): 178–188.
- [16] Cosby WM, Zuber P. Regulation of *Bacillus subtilis* σ^H (*spo0H*) and AbrB in response to changes in external pH. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(21): 6778–6787.
- [17] Buckner CM, Moran Jr CP. A region in *Bacillus subtilis* σ^H required for Spo0A-dependent promoter activity. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(18): 4987–4990.
- [18] Hadjifrangiskou M, Chen YH, Koehler TM. The alternative sigma factor σ^H is required for toxin gene expression by *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(5): 1874–1883.

Effect of Sigma H on sporulation in *Bacillus thuringiensis*

Xintong Fan^{1,2}, Lixin Du², Tantan Gao², Qi Peng², Jie Zhang², Fuping Song^{1,2*}

¹ College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, 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] To test the regulation of *spo0A* transcription by the regulatory protein Sigma H (σ^H) from *Bacillus thuringiensis* (Bt) HD73; Expressing and purifying Sigma H in *Escherichia coli* to verify its direct binding to the promoter of *spo0A*; To detect the effect of deletion of *sigH* on production of spores and crystal proteins in *B. thuringiensis* HD73. [Methods] The transcription level of *spo0A* was determined by measuring the β -galactosidase activities directed by the promoter of *spo0A* in Bt HD73 and *sigH* deletion mutant. The open reading frame of the *sigH* was amplified by PCR from Bt HD73 genome, and then ligated into the vector pET21b to generate pET*sigH*. The pET*sigH* was transformed into BL21(DE3) to obtain the recombinant strain BL21 (pET*sigH*). The Sigma H protein was extracted and purified by Ni Sepharose 6 Fast Flow column purification and anion exchange purification. The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was carried out to verify the direct binding of Sigma H and the promoter of *spo0A*. The phenotypic characteristics of the *sigH* deletion mutant strain (HD Δ *sigH*) were analyzed by microscopic observation and sporulation efficiency determination. [Results] The deletion of *sigH* decreased the transcription level of *spo0A*. The 28 kDa-Sigma H-His was expressed and purified from *E. coli* strain. EMSA results showed that the Sigma H-His could bind to the promoter of *spo0A*. Microscopic observation and sporulation efficiency determination demonstrated that the HD Δ *sigH* failed to produce spores and crystal proteins. [Conclusion] The Sigma H-His protein directly regulates the expression of *spo0A* by binding to the promoter of *spo0A*. Deletion of the *sigH* blocks the spores and crystal proteins production in Bt strains.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, sigma H protein, expression and purification, *spo0A*, sporulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31530095)

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

Received: 20 March 2018; Revised: 3 May 2018; Published online: 23 May 2018