



苏云金芽胞杆菌 BkdR 和 CcpA 对 *bkd* 基因簇的转录调控

温继龙^{1,2}, 彭琦², 赵欣^{1,2}, 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】通过分析苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)转录调控因子 BkdR 和多效调控因子 CcpA 对亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸代谢基因簇 *bkd* 的转录调控, 明确 *bkd* 基因簇的转录调控机制。【方法】通过 β -半乳糖苷酶活性测定分析 *bkd* 基因簇启动子的诱导转录活性, 采用同源重组技术敲除 Bt HD73 菌株的 *ccpA* 基因, 通过融合 His 标签的方法在大肠杆菌中表达纯化 BkdR 和 CcpA 蛋白, 通过凝胶阻滞实验明确 BkdR 和 CcpA 蛋白与 *bkd* 基因簇启动子的结合作用。【结果】亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸可诱导 *bkd* 基因簇启动子 *Pptb* 的转录活性。*Pptb* 的诱导活性在 *bkdR* 突变体中明显降低, 而在 *ccpA* 突变体中明显上升。BkdR 和 CcpA 蛋白与 *Pptb* 均有结合作用。【结论】*bkd* 基因簇的转录活性受 BkdR 正调控, 而受 CcpA 负调控。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, BkdR, CcpA, 转录调控

在低 GC 含量的革兰氏阳性细菌中, 含有一种分解代谢物控制蛋白 A (catabolite control protein A, CcpA), 属于 LacI-GalR 家族的转录因子^[1]。CcpA 作为一个多效调控因子, 通过与启动子上的保守 *cre* (catabolite repression element) 序列结合^[2], 在细菌中调控许多重要的生理功能, 如在变异链球菌(*Streptococcus mutans*)中, Cid/Lrg 操纵子系统与细胞自溶、生物膜形成、葡萄糖基转移酶表达和氧化应激反应相关, CcpA 通过与 *cid* 和 *lrg* 启动子的结合从而调控该菌株的这些生理

功能^[3-4]; 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*, Bs)中, GntR 调控 *gntRKPZ* 操纵子, CcpA 通过分别与 *gnt* 的启动子和 *gntR* 的启动子结合从而调控葡萄糖酸盐的代谢过程^[5]。

Sigma 因子是 RNA 聚合酶核心酶的亚基, 在细菌的转录起始调控过程中具有重要的作用。Sigma 因子按照功能可分为 Sigma70 和 Sigma54 两种, 区别在于 Sigma70 识别启动子的-10 和-35 区, 而 Sigma54 识别启动子的-12 和-24 区, 并需要与特定的增强子结合蛋白(enhancer binding proteins, 简

基金项目: 国家自然科学基金(31772243, 31530095)

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

收稿日期: 2019-01-23; 修回日期: 2019-03-11; 网络出版日期: 2019-03-18

称 EBPs)共同作用,才能激活起始转录^[6]。EBPs 具有 3 个典型的结构域: N 端的信号结构域(R domain),负责感应外界信号;中间的 AAA⁺结构域(C domain),负责与 Sigma54 因子相互作用;C 端的 HTH 结构域(D domain),通过与启动子上特定序列结合,从而起到调控作用^[6]。许多细菌中含有多种 EBPs,例如在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中有 13 种 EBPs,大多数与碳氮源代谢相关^[6-7];恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)中有 22 种 EBPs,参与的代谢途径很广泛,包括鞭毛合成、不同种碳氮源利用和藻朊酸盐生物合成等^[8];枯草芽胞杆菌中有 5 种 EBPs,调控精氨酸、支链氨基酸等碳氮源代谢^[9-12]。这些转录因子在许多生理代谢途径中具有重要作用,如 NtrC 调控氮源代谢^[13]、XylR 调控芳香烃代谢^[14]、PspF 调控内膜压力^[15]等。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是革兰氏阳性细菌,其在芽胞形成的同时能够产生杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs),对多种鳞翅目和鞘翅目等昆虫都有特异性的毒杀活性,是应用最为广泛的微生物杀虫剂^[16-17]。本实验室前期研究发现,在 Bt HD73 菌株中有 8 种 EBPs^[18],调控多种代谢途径,包括 γ -氨基丁酸代谢^[19-20]、赖氨酸代谢^[21]、肌氨酸代谢^[22]等,其中 BkdR 调控 *bkd* 基因簇的转录,可能与支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)的代谢相关^[18]。

细菌中,支链氨基酸降解代谢形成的产物参与细胞重要的生理功能,例如支链氨基酸可降解成支链脂肪酸,在链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)中^[23],是聚酮化合物抗生素生产的一些前体的唯一来源;在 Bs 中,支链脂肪酸参与芽胞形成过程中细胞膜的形成^[10,24];在粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)中,参与 ATP 和能量代谢^[25];在黄色粘球

菌(*Myxococcus xanthus*)中参与细胞发育过程中的信号传导^[26]。Bs 中,从支链氨基酸降解成支链脂肪酸的代谢途径由 *bkd* 基因簇编码的酶系统催化,*bkd* 基因簇的转录受 Sigma54 因子控制,并受转录因子 BkdR 和全局调控因子 CodY 的调控^[10]。本实验室前期研究发现, Bt 中 *bkd* 基因簇的基因组织和转录调控模式与 Bs 相似,*bkd* 基因簇由 8 个基因组成,其中 *ptb-bkdB* 7 个基因形成一个转录单元,*bkdR* 单独形成一个转录单元。*bkd* 基因簇启动子 *Pptb* 的转录活性受 Sigma54 控制,并受 BkdR 正调控。Bt 中 *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,但使菌体运动能力减弱^[27]。本研究在此基础上,对 *bkd* 基因簇启动子 *Pptb* 的诱导转录活性的调控机制进行深入分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细菌培养条件:所用菌株和质粒见表 1。大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的培养使用 LB 培养基,培养条件 37 °C、220 r/min; Bt 的培养分别使用 LB 培养基、SSM 培养基^[28]和 M9 培养基(购自 Sigma 公司,货号: M6030),培养条件 30 °C、220 r/min。抗生素使用终浓度分别为:氨苄青霉素 100 μ g/mL,红霉素 5 μ g/mL,卡那霉素 100 μ g/mL。

1.1.2 主要仪器和材料:限制性内切酶、DNA 聚合酶和 DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司和北京博迈德科技发展有限公司;质粒提取、DNA 回收和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen 公司。镍亲和层析柱填料购自 GE 公司。poly(dI:dC)购自 Sigma 公司。Gel Shift Assay Systems 购自 Promega 公司。

表 1. 菌株与质粒
Table 1. Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
Strains		
HD73	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> carrying the <i>cryIAc</i> gene	This lab
HD($\Delta bkdR$)	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>bkdR</i> gene insertion mutant; Kan ^R	[27]
HD($\Delta ccpA$)	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>ccpA</i> gene insertion mutant; Kan ^R	This study
HD(Pptb)	HD73 strain containing plasmid pHTPptb	[27]
$\Delta bkdR$ (Pptb)	HD($\Delta bkdR$) strain containing plasmid pHTPptb	[27]
$\Delta ccpA$ (Pptb)	HD($\Delta ccpA$) strain containing plasmid pHTPptb	This study
<i>E. coli</i> TG1	$\Delta(lac-proAB)$ <i>supE thi hsd-5 (F' traD36 proA⁺ proB⁺ lacI^f lacZΔM15)</i> , general purpose cloning host	This lab
<i>E. coli</i> ET	<i>F' dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202::Tn10 galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1</i> , for generation of unmethylated DNA	This lab
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, <i>F⁻</i> , <i>dcm</i> , <i>ompT hsdS(rB-mB-)</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)	This lab
BL21(pET $ccpA$)	BL21(DE3) strain containing plasmid pET $ccpA$	[29]
BL21(pET $bkdR$)	BL21(DE3) strain containing plasmid pET $bkdR$	This study
BLpET	BL21 strain carrying pET21b	This lab
Plasmids		
pMAD	Amp ^R , Em ^R shuttle vector, thermosensitive origin of replication	Institute Pasteur
pMAD $\Delta bkdR$	pMAD with <i>bkdR</i> insertion fragment	This study
pET21b	Expressional vector, Amp ^r , 5.4 kb	This lab
pET $ccpA$	pET21b containing <i>ccpA</i> gene, Amp ^r	[29]
pET $bkdR$	pET21b containing <i>bkdR</i> gene, Amp ^r	This study
pHTPptb	pHT304-18Z carrying promoter upstream from <i>ptb</i>	[27]

1.1.3 引物合成及序列测定: 根据 Bt HD73 基因组序列^[30]设计引物, 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司北京合成部完成, 序列测定由北京诺赛基因基因组研究中心有限公司完成, 引物名称及序列见表 2。

表 2. 引物序列

Table 2. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
ccpA-A1	CGGGATCCTCTGATGCAGCGCAACAAATG
ccpA-A2	CTCAAATGGTTCGCTGTGAAACGTTCGCTTC
Kan-1	GAAGCGAACGTTTCACAGCGAACCATTTGAG
Kan-2	ACGGTGAGGTAAGATAAATTCCTCGTAGGC
ccpA-B1	GCCTACGAGGAATTTATCTTACCTCACCGT
ccpA-B2	CCGGAATTCGTACCATAATGCTACCTGCA
bkdR-F	CGGGATCCGATGAAACAAAAAGTATTAATTG
bkdR-R	ACGCGTCGACTTGCATGCTATTTTTTGCATG
Pptb-1	GTGACAGAGTTTGAAGGG
Pptb-2	ATTTTGTAAATCAACCCTTTC

1.2 *ccpA* 突变菌株构建及筛选

为了研究 CcpA 对 *bkd* 基因簇的转录调控, 利用同源重组的原理, 构建了 *ccpA* 突变体, 方法见参考文献[31]。简述如下: 以 Bt HD73 基因组为模板, 用引物 *ccpA*-A1/*ccpA*-A2 扩增 *ccpA* 基因上游片段(*ccpA*-A), 大小为 618 bp; 用引物 *ccpA*-B1/*ccpA*-B2 扩增 *ccpA* 基因下游片段(*ccpA*-B), 大小为 646 bp。以 $\Delta bkdR$ 突变体^[27]为模板, 用引物 Kan-1/Kan-2 扩增卡那抗性基因(*kan*), 大小为 1503 bp。以 *ccpA*-A、*ccpA*-B 和 *kan* 为模板, 用引物 *ccpA*-A1/*ccpA*-B2 通过重叠 PCR 扩增 *ccpA* 缺失突变盒(含有卡那霉素抗性基因)。PCR 产物经限制性内切酶 *Bam* HI 和 *EcoR* I 双酶切后, 连接到温敏穿梭载体 pMAD, 转化至大肠杆菌 TG1 菌株中, 获得重组质粒命名

为 pMAD Δ ccpA。将重组质粒转入 ET 去甲基化,再电击转入 HD73 菌株,转化方法见文献[32],获得具有红霉素抗性的 HD (pMAD Δ ccpA)菌株。该菌株进行 38 °C 高温突变,筛选出有卡那霉素抗性并且没有红霉素抗性的菌株,进行 PCR 鉴定:以 ccpA-A1/ccpA-B2 为引物,以具有卡那霉素抗性并且无红霉素抗性的菌株为模板,获得的突变菌株命名为 HD(Δ ccpA)。

1.3 BkdR 表达菌株构建

根据 GenBank 中 Bt HD73 菌株(GenBank 登录号: CP004069)的 *bkdR*(HD73_4469)基因序列及 pET21b 质粒的酶切位点,设计扩增 *bkdR* 基因 ORF 的引物 *bkdR*-F 和 *bkdR*-R (表 2),以 HD73 基因组为模板扩增 *bkdR* 基因(2040 bp),PCR 产物纯化后经 *Bam* HI 和 *Sal* I 双酶切,连接含有 His 标签的 pET21b 质粒 *Bam* HI 和 *Sal* I 双酶切片段上,转化 *E. coli* TG1 菌株,获得重组质粒 pET*bkdR*。重组质粒经 PCR、酶切和测序鉴定,转化至 *E. coli* BL21(DE3)菌株,获得表达菌株 BL21(pET*bkdR*)。

1.4 蛋白表达纯化与凝胶迁移实验

BkdR 蛋白和 CcpA 蛋白的表达与纯化见文献[29]。以 Bt HD73 为模板,用带有 FAM (羧基荧光素)标记的引物(表 2)扩增 *Pptb* 片段(345 bp)。凝胶阻滞实验(EMSA, Electrophoresis mobility shift assays)确定 *Pptb* 片段与 BkdR 蛋白和 CcpA 蛋白的结合,方法见文献[29]。

1.5 β -半乳糖苷酶活性测定

Bt 菌株过夜活化,1%转接至 50 mL LB 培养基,30 °C、220 r/min 振荡培养至对数生长期 ($OD_{600}=2.0$),取 1 mL 菌液加入到 100 mL M9 培养基(含有终浓度为 17 mmol/L 的葡萄糖),30 °C、

220 r/min 振荡培养至 $OD_{600}=0.1$ (约 3 h),分别加入终浓度为 3 mmol/L 的氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸),继续培养 2 h 后开始取样(记为 A2),每 2 h 取样 1 次,共取 9 个点,每次取样 10 mL,离心收集菌体,保留沉淀, β -半乳糖苷酶活性测定见参考文献[22],每组数据至少独立重复 3 次。

2 结果和分析

2.1 *bkd* 基因簇的诱导转录活性分析

为了研究 *bkd* 基因簇的诱导转录活性,构建了 *bkd* 基因簇的启动子 *Pptb* 融合 *lacZ* 基因的表达载体 pHTP*Pptb*,分别电击转入 Bt HD73 菌株和 *bkdR* 突变体,获得菌株 HD(*Pptb*)和 Δ *bkdR*(*Pptb*)。 β -半乳糖苷酶活性测定表明,在分别含有 3 mmol/L 亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的 M9 培养基中,*Pptb* 启动子在 Bt HD73 出发菌株中的转录活性明显高于不含氨基酸的 M9 培养基[图 1-A, HD(*Pptb*)],说明在基础培养基中,亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸可诱导 *Pptb* 的转录活性。而在含有 3 mmol/L 亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸的 M9 培养基中,*Pptb* 启动子在 *bkdR* 突变体中的转录活性均显著下降[图 1-B, Δ *bkdR*(*Pptb*)],说明 *Pptb* 的诱导转录活性受 BkdR 的正调控。

2.2 BkdR 对 *bkd* 基因簇的转录调控作用

为了进一步明确 BkdR 对 *bkd* 基因簇的转录调控作用,构建 Bt HD73 菌株的 BkdR 表达纯化载体,PCR 扩增 *bkdR* 基因全长并与含有 His 标签的 pET21b 载体连接,转化 *E. coli* TG1 菌株,获得重组质粒 pET*bkdR*,经 PCR 鉴定得到 2040 bp 的条带(图 2-A),经 *Bam* HI 和 *Sal* I 双酶切鉴定得到 5.4 kb 大小的载体条带和 2040 bp 左右大小的

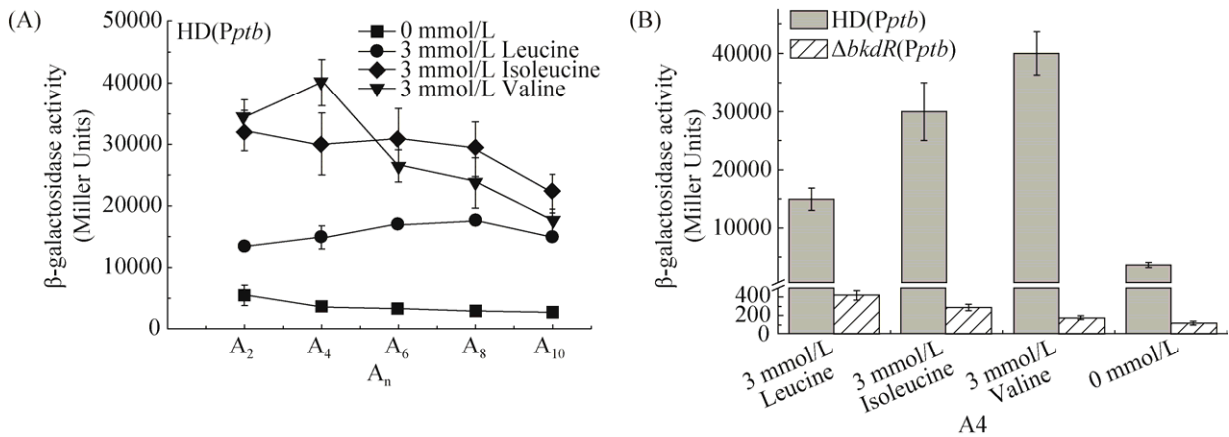


图 1. *Pptb* 的转录活性分析

Figure 1. Analysis of transcription of *Pptb*. A: Transcription of *Pptb* induced with different amino acid; B: comparison of transcription of HD(*Pptb*) and Δ*bkdR*(*Pptb*) induced with different amino acid at A₄ point. The *OD*₆₀₀ reached 1.0 (mid-exponential phase), that defined as A₀, and A_n is n hours after A₀. A₄ is 4 hours after A₀.

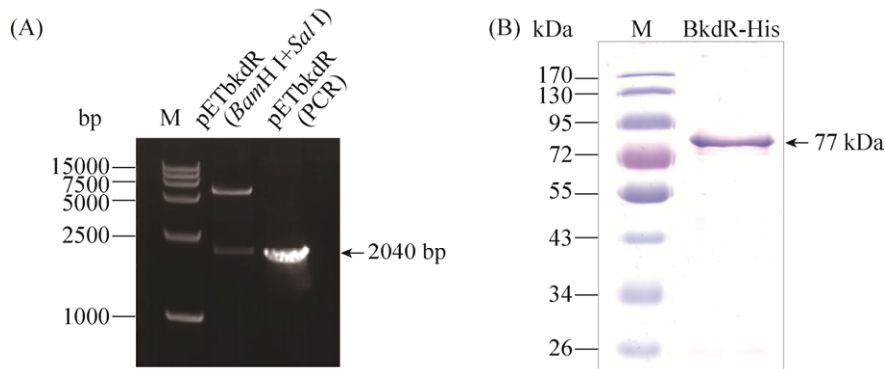


图 2. BkdR 表达载体构建及纯化

Figure 2. Construction and purification of BkdR. A: Identification of pET*bkdR* plasmid; M: DNA marker. B: purification of BkdR-His fusion protein; M: protein marker.

目的片段条带(图 2-A), 经测序分析和序列比对表明重组质粒 pET*bkdR* 构建正确。重组质粒转化至 *E. coli* BL21 菌株, 获得 BL21(pET*bkdR*) 表达菌株, 经 IPTG 诱导表达, 超声破碎细胞, 离心收集可溶性组分, 对 BkdR-His 融合蛋白进行 Ni²⁺螯合琼脂糖亲和纯化, SDS-PAGE 结果表明所得蛋白纯度较高, 分子量大小约为 77 kDa (图 2-B)。

利用 FAM 标记的引物 Pptb-1 和 Pptb-2 扩增 *bkd* 基因簇的启动子片段(*Pptb*, 345 bp), 与纯化的 BkdR-His 蛋白进行体外结合实验, 结果表明(图 3), 凝胶底部的条带为 20 ng 带标记的自由 DNA, 上

层为 DNA 与蛋白结合的条带, 随着 BkdR 蛋白浓度的增加, 底部未结合的 DNA 条带浓度越来越低, 上层与蛋白结合的条带浓度逐渐升高, 说明 *Pptb* 与 BkdR 蛋白有结合作用; 而加入 500 倍浓度非标记的 DNA 可以与标记的 DNA 产生竞争作用(图 3, lane 7); 阴性对照为 20 ng *cwlC* 基因^[33] (*cwlC* 基因编码母细胞水解酶, 其转录受 SigmaK 因子控制)的启动子与 0.37 μg BkdR 蛋白无结合作用(图 3, 条带 8)。以上结果说明 *Pptb* 与 BkdR 蛋白具有特异性的结合作用, 这些结果表明 *Pptb* 的转录受 BkdR 的直接调控。

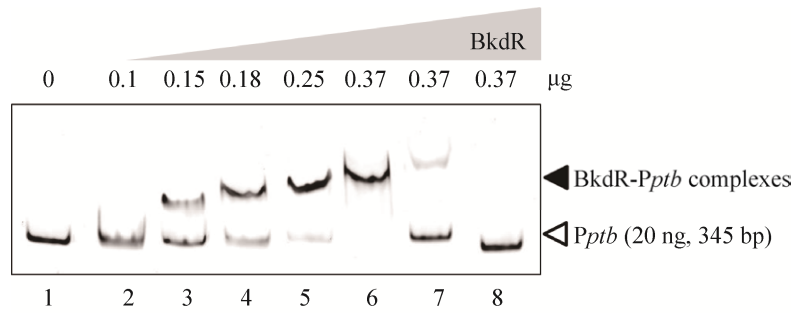


图 3. BkdR 与 *Pptb* 的结合

Figure 3. Binding of BkdR and *Pptb*. Lane 1: FAM-labeled DNA probe; lanes 2–6: incubation of the probe with increasing concentrations of purified BkdR indicated at the top of the figure; lane 7: incubation of labeled DNA and 500-fold unlabeled DNA with 0.37 μg BkdR; lane 8: negative control: incubation of 20 ng *cwdC* promoter with 0.37 μg BkdR.

2.3 CcpA 对 *bkd* 基因簇的转录调控作用

前期研究表明, *Pptb* 序列中包含一段序列 (TTGAATGCGTTTTCA) 与受 CcpA 调控的一致序列 (WTGNAANCGNWNWCW) 相似, 为了明确 CcpA 是否对 *Pptb* 的转录有调控作用, 构建了 *ccpA*

突变体, 并将 *Pptb* 融合 *lacZ* 基因的表达载体 pHTP*Pptb* 电击转入 *ccpA* 突变体中, 获得菌株 $\Delta\text{ccpA}(\text{Pptb})$ 。β-半乳糖苷酶活性测定表明, 在 SSM 培养基中(图 4-A), HD(*Pptb*) 菌株与 $\Delta\text{ccpA}(\text{Pptb})$ 菌株的转录活性无明显差异; 而在含有葡萄糖

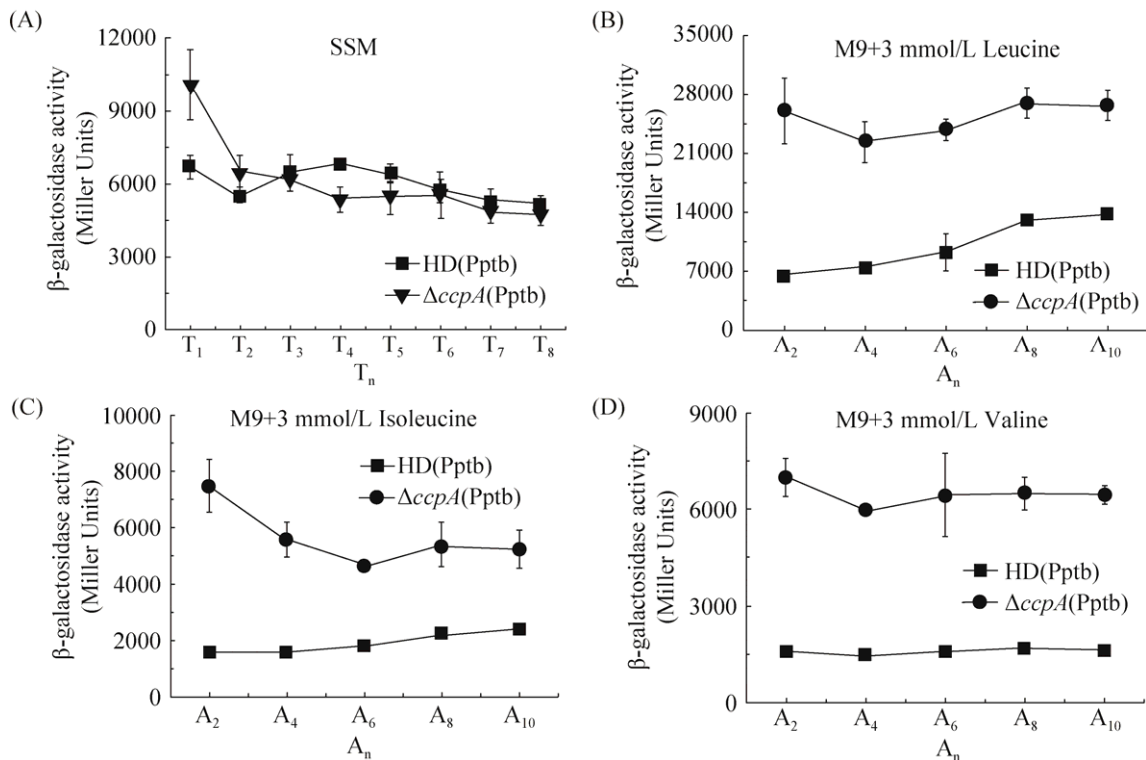


图 4. HD(*Pptb*) 菌株与 $\Delta\text{ccpA}(\text{Pptb})$ 菌株的转录活性比较

Figure 4. Comparison of transcription of HD(*Pptb*) and $\Delta\text{ccpA}(\text{Pptb})$. A: SSM; B: M9 with glucose and 3 mmol/L leucine; C: M9 with glucose and 3 mmol/L isoleucine; D: M9 with glucose and 3 mmol/L valine. The OD_{600} reached 1.0 (mid-exponential phase), that defined as A_0 , and A_n is n hours after A_0 .

(17 mmol/L)和 3 mmol/L 氨基酸的 M9 培养基中(图 4-B, C, D), $\Delta ccpA$ (Pptb)菌株的转录活性显著高于 HD(Pptb)菌株的活性, 这些结果说明, 在葡萄糖培养基中, Pptb 的诱导转录活性受 CcpA 的负调控, 而在普通培养基中, Pptb 的基础转录活性不受 CcpA 的调控。

为了进一步明确 CcpA 对 Pptb 是否存在直接调控作用, 应用前期构建的 CcpA 表达菌株 BL21(pETccpA)^[29], 经 IPTG 诱导表达和 Ni²⁺螯合琼脂糖亲和纯化, 获得 CcpA-His 融合蛋白。利用 FAM 标记的引物 Pptb-1 和 Pptb-2 扩增得到的 *bkd* 基因簇的启动子片段(Pptb, 345 bp), 与纯化的 CcpA-His 蛋白进行体外结合实验, 结果表明(图 5), 底部带标记的 20 ng 自由 DNA 条带浓度越来越低, 上层 DNA 与蛋白结合的条带浓度逐渐升高, 说明 Pptb 与 CcpA 蛋白有结合作用, 而加入 500 倍浓度非标记的 DNA 可以与标记的 DNA 产生竞争结合作用(图 5, lane 7), 说明 Pptb 与 CcpA 蛋白具有特异性的结合作用, 这些结果表明 Pptb 的转录受 CcpA 的直接调控。

3 讨论

本实验室前期研究发现, Bt HD73 菌株中 *bkd* 基因簇的启动子 Pptb 的转录受 Sigma54 因子的控制, 并受 BkdR 的正调控^[27], 本研究进一步发现, Pptb 的转录受亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的诱导, 该诱导活性受 BkdR 直接调控, 这种调控模式与 Bs 中的 *bkd* 基因簇的转录相似^[10]。本研究通过 EMSA 实验, 进一步明确了纯化的 BkdR 蛋白和 CcpA 蛋白与 Pptb 启动子均存在结合作用, 为 *bkd* 基因簇的转录调控机制提供了新的证据。BkdR 蛋白是增强子结合蛋白, 具有 3 个典型的结构域(图 6-A): N 端的 PAS 信号结构域, 可能与识别亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸信号有关; 中间的 AAA⁺ 结构域, 具有保守氨基酸序列 GAFTGA, 可能与 Sigma54 因子进行相互作用; C 端的 HTH 结构域, 可能识别 Pptb 启动子上的回文序列(图 6-B)并为之相结合。Pptb 启动子序列中存在一个典型的受 Sigma54 控制的保守-12/-24 序列(图 6-B), Sigma54 可能通过与该序列结合从而起始转录。Pptb 启动

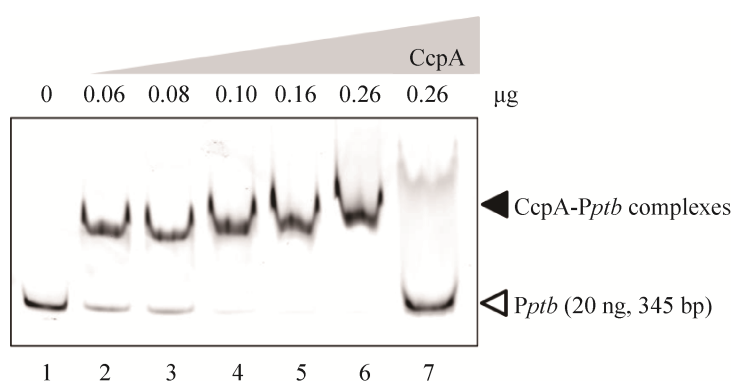


图 5. CcpA 与 Pptb 的结合

Figure 5. Binding of CcpA and Pptb. Lane 1: FAM-labeled DNA probe; lanes 2–6: incubation of the probe with increasing concentrations of purified CcpA indicated at the top of the figure; lane 7: incubation of labeled DNA and 500-fold unlabeled DNA with 0.26 μ g CcpA.

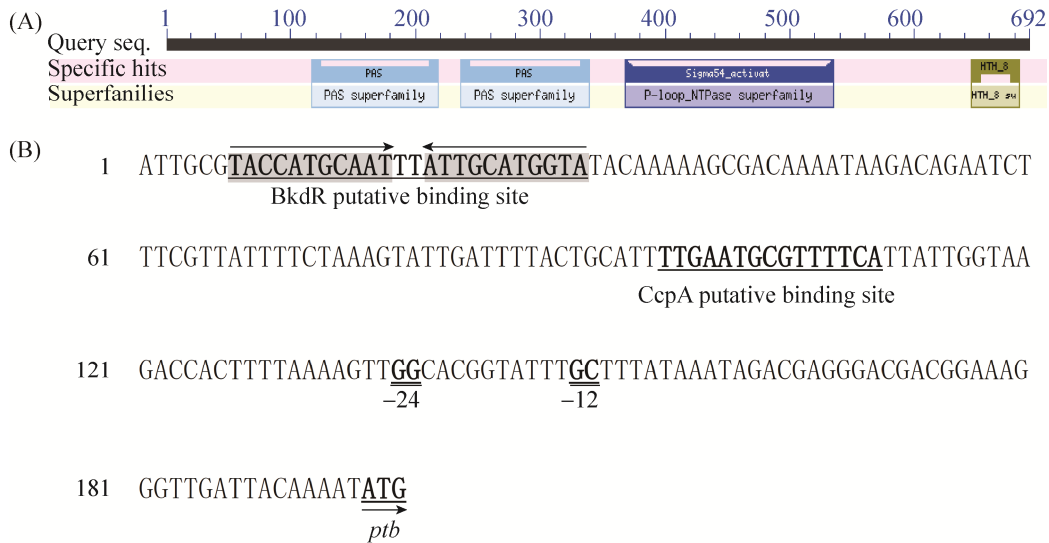


图 6. BkdR 氨基酸结构域分析(A)和 Pptb 启动子序列分析(B)

Figure 6. Sequence analysis. A: Analysis of BkdR domain; B: Analysis of Pptb sequence.

子序列还存在一个 CcpA 识别的保守序列, CcpA 可能通过与该序列结合从而起到调控功能。

本研究通过 EMSA 实验和 β -半乳糖苷酶活性分析实验表明, 在葡萄糖培养基中, *bkd* 基因簇的诱导活性受 CcpA 的直接负调控, 而在 Bs 中, 没有相关报道显示 *bkd* 基因簇的转录与 CcpA 相关, 通过在 DBTBS 数据库(<http://dbtbs.hgc.jp/>)中检索 Bs 168 菌株基因组中 *ptb* 基因上游启动子序列的转录调控因子结合位点, 也没有发现与 CcpA 结合的 *cre* 位点。但是 Bs 中与支链氨基酸生物合成相关的 *ilv-leu* 操纵子受 CcpA 的调控。*ilv-leu* 操纵子编码酶系统参与催化从丙酮酸到支链氨基酸的生物合成, 将碳代谢与氨基酸合成偶联起来^[34-35]。在 Bt 中, CcpA 可能调控了支链氨基酸的合成及降解代谢过程。

参考文献

- [1] Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, Weyler W, Schilling CH, Saier MH, Jr. Catabolite repression and activation in *Bacillus*

subtilis: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(22): 7826-7839.

- [2] Schumacher MA, Allen GS, Diel M, Seidel G, Hillen W, Brennan RG. Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell*, 2004, 118(6): 731-741.
- [3] Kim HM, Waters A, Turner ME, Rice KC, Ahn SJ. Regulation of *cid* and *lrg* expression by CcpA in *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 2019, 165(1): 113-123.
- [4] Ahn SJ, Rice KC, Oleas J, Bayles KW, Burne RA. The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate virulence traits in response to multiple environmental signals. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 10): 3136-3147.
- [5] Majidian P, Kuse J, Tanaka K, Najafi H, Zeinalabedini M, Takenaka S, Yoshida KI. *Bacillus subtilis* GntR regulation modified to devise artificial transient induction systems. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2017, 62(6): 277-285.
- [6] Bush M, Dixon R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of sigma54-dependent transcription. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2012, 76(3): 497-529.
- [7] Studholme DJ, Dixon R. Domain architectures of

- sigma54-dependent transcriptional activators. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(6): 1757–1767.
- [8] Cases I, Ussery DW, de Lorenzo V. The sigma54 regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(12): 1281–1293.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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 of the United States of America*, 1991, 88(6): 2212–2216.
- [12] 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.
- [13] Batchelor JD, Sterling HJ, Hong E, Williams ER, Wemmer DE. Receiver domains control the active-state stoichiometry of *Aquifex aeolicus* sigma54 activator NtrC4, as revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 393(3): 634–643.
- [14] de Las Heras A, Martinez-Garcia E, Domingo-Sananes MR, Fraile S, de Lorenzo V. Rationally rewiring the connectivity of the XylR/Pu regulatory node of the m-xylene degradation pathway in *Pseudomonas putida*. *Integrative Biology (Camb)*, 2016, 8(4): 571–576.
- [15] Osadnik H, Schopf M, Heidrich E, Mehner D, Lilie H, Parthier C, Risselada HJ, Grubmuller H, Stubbs MT, Bruser T. PspF-binding domain PspA1-144 and the PspA.F complex: New insights into the coiled-coil-dependent regulation of AAA+ proteins. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(4): 743–759.
- [16] Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2017, 101(7): 2691–2711.
- [17] Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 1998, 62(3): 775–806.
- [18] Peng Q, Wang G, Liu G, Zhang J, Song F. Identification of metabolism pathways directly regulated by sigma(54) factor in *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 407.
- [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 gamma-aminobutyric acid shunt, are controlled by a sigma54 factor in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(1): 346–355.
- [20] Peng Q, Yang M, Wang W, Han L, Wang G, Wang P, Zhang J, Song F. Activation of *gab* cluster transcription in *Bacillus thuringiensis* by gamma-aminobutyric acid or succinic semialdehyde is mediated by the sigma 54-dependent transcriptional activator GabR. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 306.
- [21] Zhang Z, Yang M, Peng Q, Wang G, Zheng Q, Zhang J, Song F. Transcription of the Lysine-2,3-Aminomutase Gene in the *kam* locus of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 is controlled by both sigma54 and sigmaK factors. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(16): 2934–2943.
- [22] Peng Q, Liu C, Wang B, Yang M, Wu J, Zhang J, Song F. Sox transcription in sarcosine utilization is controlled by sigma(54) and SoxR in *Bacillus thuringiensis* HD73. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29141.
- [23] Denoya CD, Fedechko RW, Hafner EW, McArthur HA, Morgenstern MR, Skinner DD, Stutzman-Engwall K, Wax RG, Wernau WC. A second branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase gene cluster (*bkdFGH*) from *Streptomyces avermitilis*: its relationship to avermectin biosynthesis and the construction of a *bkdF* mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(12): 3504–3511.
- [24] Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria:

- biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(2): 288–302.
- [25] Ward DE, van der Weijden CC, van der Merwe MJ, Westerhoff HV, Claiborne A, Snoep JL. Branched-chain alpha-keto acid catabolism via the gene products of the *bkd* operon in *Enterococcus faecalis*: a new, secreted metabolite serving as a temporary redox sink. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(11): 3239–3246.
- [26] Downard J, Toal D. Branched-chain fatty acids: the case for a novel form of cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Molecular Microbiology*, 1995, 16(2): 171–175.
- [27] Wang GN, Peng Q, Zheng QY, Li J, Zhang J, Song FP. Transcriptional regulation of *bkd* gene cluster in *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(10): 1129–1137. (in Chinese)
王冠男, 彭琦, 郑庆云, 李杰, 张杰, 宋福平. 苏云金芽胞杆菌 *bkd* 基因簇的转录调控. *微生物学报*, 2014, 54(10): 1129–1137.
- [28] 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): 704–711.
- [29] Cheng HJ, Peng Q, Zhang J, Song FP. Identification of genes regulated by Sigma54 and CcpA in *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(3): 380–390. (in Chinese)
程海舰, 彭琦, 张杰, 宋福平. 苏云金芽胞杆菌 Sigma54 和 CcpA 共同调控的基因鉴定. *微生物学报*, 2018, 58(3): 380–390.
- [30] Liu G, Song L, Shu C, Wang P, Deng C, Peng Q, Lereclus D, Wang X, Huang D, Zhang J, et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. *Genome announcements*, 2013, 1(2): e0008013.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Chen X, Gao T, Peng Q, Zhang J, Chai Y, Song F. Novel cell wall hydrolase CwlC from *Bacillus thuringiensis* is essential for mother cell lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(7).
- [34] Tojo S, Satomura T, Morisaki K, Deutscher J, Hirooka K, Fujita Y. Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(6): 1560–1573.
- [35] Ludwig H, Meinken C, Matin A, Stulke J. Insufficient expression of the *ilv-leu* operon encoding enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis limits growth of a *Bacillus subtilis* *ccpA* mutant. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(18): 5174–5178.

bkd* gene cluster is regulated by BkdR and CcpA in *Bacillus thuringiensis

Jilong Wen^{1,2}, Qi Peng², Xin Zhao^{1,2}, 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] We analyzed the transcriptional regulation of *bkd* gene cluster by BkdR and CcpA in *Bacillus thuringiensis* (Bt), which is involved in leucine, isoleucine and valine metabolism. To determine the mechanism of transcriptional regulation of *bkd* gene cluster. [Methods] Induced transcriptional activity of *bkd* promoter (*Pptb*) was analyzed by promoter fusions with *lacZ* gene. *ccpA* insertion mutant was constructed by homologous recombination. Purification of BkdR and CcpA was using HiTrap chelating column. The binding of *bkd* promoter with CcpA protein was verified by electrophoresis mobility shift assays. [Results] Transcriptional activity of *Pptb* was induced by leucine, isoleucine, and valine. The induced transcriptional activity of *Pptb* was sharply decreased in *bkdR* mutant, but increased in *ccpA* mutant. *Pptb* could bind to the BkdR and CcpA protein, respectively. [Conclusion] The induced transcription of *bkd* gene cluster is positively regulated by BkdR and negatively regulated by CcpA.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, BkdR, CcpA, transcriptional regulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31772243, 31530095)

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

Received: 23 January 2019; Revised: 11 March 2019; Published online: 18 March 2019