



苏云金芽胞杆菌 *dxr1* 基因的转录受 SigH 控制

李娜^{1,2}, 温继龙², 宋福平², 张杰², 段江燕^{1*}, 彭琦^{2*}

¹山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041004

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】萜类化合物广泛分布在生物界, 是重要的生命物质。目前发现有两条萜类化合物的生物合成途径, 即甲羟戊酸(MVA)途径和 2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径。MEP 代谢途径中的关键酶 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构化酶(DXR, EC1.1.1.267)催化 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸生成 MEP。枯草芽胞杆菌中 *dxr* 基因编码 DXR 酶, 而在苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)中有 2 个基因(*dxr1* 和 *dxr2*)编码 DXR 酶。通过分析 Bt HD73 菌株的 *dxr1* 基因的转录活性和 *dxr1* 突变体表型, 明确 *dxr1* 基因的转录调控机制和功能。【方法】通过 5'RACE 分析 *dxr1* 的转录起始位点; β -半乳糖苷酶活性测定分析 *dxr1* 基因启动子(*Pdxr1*)的转录活性; 采用同源重组技术分别敲除 Bt HD73 菌株的 *dxr1* 和 *dxr2* 基因; 利用总蛋白定量确定 Cry1Ac 蛋白产量; 利用 DXR 检测试剂盒检测 Bt 菌株的 DXR 活性。【结果】*dxr1* 基因的转录起始位点位于起始密码子上游 39 bp 处的 G 碱基; 与出发菌株 HD73 相比, *Pdxr1* 在 *sigH* 突变体中的转录活性明显降低; *dxr1* 或 *dxr2* 基因的缺失对菌体生长、芽胞形成率和 Cry1Ac 蛋白产量无显著影响, 但使 DXR 活性下降。【结论】Bt 中 *dxr1* 基因的转录受 SigH 控制, *dxr1* 基因的缺失影响 DXR 的活性。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, MEP 代谢途径, DXR, *dxr* 基因, 转录调控

萜类化合物是小分子天然化合物, 广泛分布在生物界, 是重要的生命物质^[1], 在细胞壁的合成、蛋白翻译后修饰和信号传导等过程中具有重要的作用^[2]。目前发现有 2 条萜类化合物的生物合成途径, 即甲羟戊酸(MVA)途径和 2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径。MVA 途径主要存在于哺乳

动物、高等植物胞液、真菌和少数细菌中; MEP 途径主要存在于高等植物质体、大多数原核生物和病原体中^[2]。在 MEP 途径中, 以丙酮酸和 3-磷酸甘油醛为反应底物, 经过 6 个中间产物, 最终形成二甲烯丙基焦磷酸(DMAPP)及其异构物、异戊二烯焦磷酸(IPP)^[3], 这两种化合物是类异戊二

基金项目: 国家自然科学基金(31772243)

*通信作者。E-mail: 彭琦, qpeng@ippcaas.cn; 段江燕, duanjiangyan123@163.com

收稿日期: 2019-03-26; 修回日期: 2019-04-24; 网络出版日期: 2019-05-21

烯的共同前体。MEP 代谢途径在不同的生物体中具有不同的功能,例如在玉米中发现 SCD 酶(种子类胡萝卜素缺乏酶, *SEED CAROTENOID DEFICIENT*)催化 MEP 途径中的倒数第二步:由 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环二磷酸(MEcPP)转化成 4-羟基-3-甲基-2-丁烯基-焦磷酸(HMBPP)。*scd* 基因的缺失导致植物的生长发育受损,在叶片和种子中 MEP 代谢的衍生物(如类胡萝卜素、叶绿素、维生素 E、脱落酸和赤霉素等)的水平下降^[4]。在疟原虫(*Plasmodium falciparum*)的顶质体^[5]和一些致病菌中,如流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)^[6]、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)^[7]和大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[8]等, MEP 代谢途径是抑制病原微生物活性物质的药物分子靶标,通过研究和改造 MEP 代谢途径相关酶的特性,对于筛选新型稳定廉价的抑菌药物具有潜在的应用价值。枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*, Bs)中^[9],过表达 MEP 代谢途径中的相关酶,使类胡萝卜素的产量显著增加,可以将 Bs 发展成为用于生产类异戊二烯的细胞工厂^[1]。

MEP 代谢途径的起始反应是在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)的催化下将 3-磷酸甘油醛和丙酮酸生成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(DXP),DXP 在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸-还原异构酶(DXR)的催化下,生成 MEP,这两步反应是 MEP 代谢途径的限速步骤和关键步骤^[10-12]。在一些药用植物中,如雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)、香茅(*Cymbopogon winterianus*)、薄荷(*Mentha*)等,克隆和表达了编码 DXR 的基因,并通过过表达 DXR 来提高类异戊二烯的产量,使植株积累和产生更多有利于生长和药用价值的物质^[13-15]。在一些病原微生物中,如结核分枝杆菌、大肠杆菌和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)中,克隆表达 *dxr* 基因,并

解析了 DXR 的晶体结构,发现了与金属离子结合的活性位点,这些发现为用于抗菌化合物的 DXR 抑制剂的设计提供基础^[16-17]。目前已经发现膦胺霉素及其类似物是 DXR 的抑制剂^[18-20]。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是革兰氏阳性细菌,属于蜡样芽胞杆菌族,其特点是在产生芽胞的同时还能生成对多种农林害虫具有杀虫活性的晶体蛋白^[21]。在芽胞形成的过程中,与枯草芽胞杆菌相似,不同 Sigma 因子,包括 SigA、SigH、SigE、SigK、SigF 和 SigG,通过与启动子的结合调控芽胞形成的相关基因在时间和空间上有序且准确无误地表达^[22]。其中, SigH 主要在芽胞杆菌从指数生长期到平稳期时发挥重要功能,除了芽胞形成相关的基因, SigH 还在其他生理过程中指导相关基因的表达,包括细胞色素生物合成、营养物质的利用和运输、细胞壁代谢等^[23]。

通过基因组序列比对分析发现, Bt HD73 菌株中也存在 MEP 代谢途径,从丙酮酸和 3-磷酸甘油醛,生成 DMAPP 和 IPP 需要 7 种酶的催化,由 8 个基因编码。其中 DXR 由两个基因编码,即 *dxr1*(HD73_3605)和 *dxr2*(HD73_4104),它们与枯草芽胞杆菌中的同源基因 *dxr*^[1]的相似性分别为 56.6%和 70.1%。目前细菌中对于 *dxr* 基因的克隆和抑制剂的筛选方面的研究报道较多,而关于 *dxr* 基因的转录调控未见报道。本文拟对 Bt 中的 *dxr1* 基因的转录调控机制开展研究,为更深入了解细菌 MEP 代谢途径的调控机制提供基础。

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。

表 1. 质粒与菌株
Table 1. Plasmids and strains

Strains and plasmids	Characterization	Resource
Strains		
HD73	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> carrying the <i>cry1Ac</i> gene	This lab
HD($\Delta sigH$)	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>sigH</i> gene insertion mutant	[25]
HD(P Δxrl)	HD73 strain containing plasmid pHTP Δxrl	This study
$\Delta sigH$ (P Δxrl)	HD($\Delta sigH$) strain containing plasmid pHTP Δxrl	This study
HD($\Delta dxr1$)	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>dxr1</i> gene insertion mutant	This study
HD($\Delta dxr2$)	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>dxr2</i> gene insertion mutant	This study
<i>E. coli</i> TG1	$\Delta(lac-proAB)$ <i>supE</i> <i>thi</i> <i>hsd-5</i> (<i>F'</i> <i>traD36</i> <i>proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺ <i>lacF</i> ⁺ <i>lacZ</i> Δ M15), general purpose cloning host	This lab
<i>E. coli</i> ET	<i>F</i> <i>dam-13::Tn9</i> <i>dcm-6</i> <i>hsdM</i> <i>hsdR</i> <i>recF143</i> <i>zjj-202::Tn10</i> <i>galK2</i> <i>galT22</i> <i>ara14</i> <i>pacY1</i> <i>xyl-5</i> <i>leuB6</i> <i>thi-1</i> , for generation of unmethylated DNA	This lab
Plasmids		
pHT304-18Z	Promoterless <i>lacZ</i> vector, Ery ^r , Amp ^r	This lab
pHTP Δxrl	pHT304-18Z carrying promoter upstream from <i>dxr1</i>	This study
pMAD	Ap ^R , Em ^R shuttle vector, thermosensitive origin of replication	Institute Pasteur
pMAD $\Delta dxr1$	pMAD with <i>dxr1</i> insertion fragment	This study
pMAD $\Delta dxr2$	pMAD with <i>dxr2</i> insertion fragment	This study

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)使用 LB 培养基, 培养条件: 37 °C、220 r/min; Bt 的培养分别使用 LB 培养基和 SSM 培养基^[24], 培养条件: 30 °C、220 r/min。抗生素的使用终浓度分别为: 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 主要生化试剂: 限制性内切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; 质粒提取、DNA 回收和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen 公司。细菌 RNA 提取试剂盒 RNAprep Pure Cell/Bacteria kit 购自天根生化科技(北京)有限公司。SMARTerTM RACE cDNA Amplification 试剂盒购自 Clontech 公司。无缝克隆试剂盒购自中美泰和生物技术(北京)有限公司。

1.1.3 引物合成及序列测定: 根据 Bt HD73 基因组(GenBank 登录号: CP004069)序列^[26]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	Sequence (5'→3') ^a
UPM	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG
<i>dxr1</i> -RACE	GGCATTCTCATATCAGGAGACCGAGC
P Δxrl -F	CCAAGCTTACTAACTCCTCCTTTTCGC
P Δxrl -R	CGGGATCCGAAAAAACCTCCAAAGTTG
<i>dxr1</i> -A1	GGCGATATCGGATCCTCTGAATCATGCACA
<i>dxr1</i> -A2	TCAAATGGTTCGCTGGGATCCTGTGGAACC
<i>dxr1</i> -B1	GCCTACGAGGAATTTGAAGCGGATCAATGG
<i>dxr1</i> -B2	CGGGAGCTCGAATTCAGCAATTGCCGAATC
d1Kan-1	GGTTCCACAGGATCCCAGCGAACCATTGTA
d1Kan-2	CCATTGATCCGCTTCAAATTCCTCGTAGGC
<i>dxr2</i> -A1	CCATATGACGTCGACCATGGATTGGATTAG
<i>dxr2</i> -A2	TCAAATGGTTCGCTGACCAATTGATCCGCT
<i>dxr2</i> -B1	GCCTACGAGGAATTTAGACGGTTTGTGATG
<i>dxr2</i> -B2	CGGGAGCTCGAATTCCAAATCCAAGAATCAC
d2Kan-1	AGCGGATCAATTGGTCAGCGAACCATTGTA
d2Kan-2	CATCACAACCGTCTAAATTCCTCGTAGGC

^a: Restriction enzyme sites are underscored.

1.2 5'RACE 分析

HD73 菌株在 SSM 中培养至 T_5 时期(T_0 为对数期结束的时期, T_n 为 T_0 后的 n 小时), 取菌液低温离心, 沉淀用预冷的 TRIzol 重悬, RNA 提取参照 RNAPrep Pure Cell/Bacteria kit 说明。以纯化后的 RNA 为模板, 以 *dxr1*RACE 和 UPM 为引物合成 cDNA, cDNA 的合成参考 SMARTer™ RACE cDNA Amplification 试剂盒说明。得到的 PCR 产物经纯化后连接 pMD19-T 载体并测序, 对测序结果进行比对分析。

1.3 *dxr1* 基因启动子融合 *lacZ* 基因表达载体构建

以 Bt HD73 基因组为模板, 用 *Pdxr1*-F 和 *Pdxr1*-R 引物扩增 *dxr1*(HD73_3605)基因启动子 *Pdxr1* 片段(389 bp), 将含有 *lacZ* 报告基因的载体 pHT304-18Z 与 PCR 产物经过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 连接、转化至 *E. coli* TG1 菌株获得重组质粒 pHTP*dxr1*, 将重组质粒转入 *E. coli* ET 12567 菌株中去甲基化后通过电击转入 HD73 出发菌株和 $\Delta sigH$ 突变菌株, 转化方法见文献[27], 获得菌株 HD(*Pdxr1*)和 $\Delta sigH$ (*Pdxr1*)。

1.4 *dxr* 基因突变菌株构建及筛选

Bt HD73 菌株中, 有两个基因编码 DXR, 分别为 HD73_3605 基因(记为 *dxr1*)和 HD73_4104 基因(记为 *dxr2*), 利用同源重组的原理^[28], 分别构建 *dxr1* 和 *dxr2* 突变体。以 *dxr1* 为例简述如下: 以 Bt HD73 基因组为模板, 用引物 *dxr1*-A1/*dxr1*-A2 扩增 *dxr1* 基因上游片段(*dxr1*-A, 595 bp); 用引物 *dxr1*-B1/*dxr1*-B2 扩增 *dxr1* 基因下游片段(*dxr1*-B, 604 bp)。以 $\Delta cw1C$ 突变体^[29]为模板(含有卡那霉素抗性基因), 用引物 d1Kan-1/d1Kan-2 扩增卡那霉素抗性基因(*kan*, 1473 bp)。温敏穿梭载体 pMAD 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后, 应

用无缝克隆试剂盒, 与 *dxr1*-A、*dxr1*-B 和 *kan* 三个片段连接, 转化至大肠杆菌 TG1 菌株中, 获得重组质粒 pMAD $\Delta dxr1$ 。将重组质粒转入 ET 去甲基化, 再电击转入 HD73 菌株, 获得具有红霉素和卡那霉素抗性的 HD (pMAD $\Delta dxr1$)菌株。该菌株在 LB 培养基中进行 38 °C 高温突变, 传代 3 次, 筛选出有卡那霉素抗性并且没有红霉素抗性的菌株。经过 PCR 鉴定, 获得的突变菌株命名为 HD ($\Delta dxr1$)。*dxr2* 基因的突变菌株 HD ($\Delta dxr2$)的获得方法与 HD($\Delta dxr1$)菌株相同, 所用引物分别为: *dxr2*-A1/*dxr2*-A2 扩增 *dxr2* 基因上游片段(*dxr2*-A, 634 bp); *dxr2*-B1/*dxr2*-B2 扩增 *dxr2* 基因下游片段(*dxr2*-B, 621 bp); d2Kan-1/d2Kan-2 扩增卡那霉素抗性基因(*kan*, 1473 bp)。

1.5 β -半乳糖苷酶活性测定

Bt 菌株活化 8 h, 1%转接至 SSM 培养基, 30 °C、220 r/min 振荡培养, 从 T_0 至 T_{10} , 每小时取样 2 mL, 低温离心, 沉淀用于测定 β -半乳糖苷酶活性, 方法见参考文献[29], 每组数据 3 次独立重复取平均值并计算标准差。

1.6 生长曲线测定

方法见参考文献[30], 简述如下: 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 h 取样, 测定 600 nm 波长下的吸光值 OD_{600} , 每组数据至少独立重复 3 次。

1.7 芽胞形成率

方法见参考文献[30], Bt 菌株在芽胞形成培养基 SSM 中, 30 °C、220 r/min 培养至 90%左右菌体释放芽胞时, 取适量菌液梯度稀释涂于 LB 固体培养基, 30 °C 培养 10 h, 对 LB 固体培养基上的菌落进行计数, 数值记为 A。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, 对 LB 固体培养基上的菌落进行

计数, 数值记为 B, 芽胞形成率=(B/A)×100%。每组数据至少独立重复 3 次, 取平均值并计算标准差。

1.8 Cry1Ac 蛋白产量测定

Bt 菌株在 SSM 培养基中培养至 T_{24} , 取样离心, 沉淀中加入 50 mmol/L Tris-HCl, 机械振荡破碎 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, 方法见参考文献[30]。

1.9 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶酶活测定

Bt 菌株在 SSM 培养基中培养至 T_3 、 T_5 和 T_7 , 分别取 50 mL 菌液, 离心弃上清, 沉淀中加入 500 μ L 1×PBS 缓冲液和石英砂, 机械振荡破碎 180 s, 离

心取 240 μ L 上清, 应用 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)酶联免疫分析试剂盒(江莱生物)检测 DXR 活性, 方法见说明书。

2 结果和分析

2.1 *dxr1* 基因转录起始位点和启动子序列分析

用 SMARTer[™] RACE cDNA Amplification 试剂盒将 HD73 菌株 T_5 时期的总 RNA 反转录为 cDNA, 用引物 UPM 和 *dxr1*RACE 进行 PCR 扩增, 将纯化后的 DNA 与 pMD19-T 载体进行连接并转化 *E. coli* TG1 菌株, 挑取 20 个阳性克隆测序, 将测序结果与 *dxr1* 基因起始密码子上游序列和接头引物序列(UPM)比对, 结果表明(图 1),

UPM	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG-----
Clone1	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone2	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone3	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone4	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone5	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone6	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone7	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone8	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone9	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone10	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone11	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone12	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone13	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone14	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone15	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone16	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone17	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone18	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA
Clone19	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>A</u> GTTGCAGAAA
Clone20	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>A</u> GTTGCAGAAA
<i>dxr1</i> upstream	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG <u>G</u> TTTGCAGAAA (28 bp) <u>ATG</u>

图 1. 序列比对结果

Figure 1. Sequence alignment.

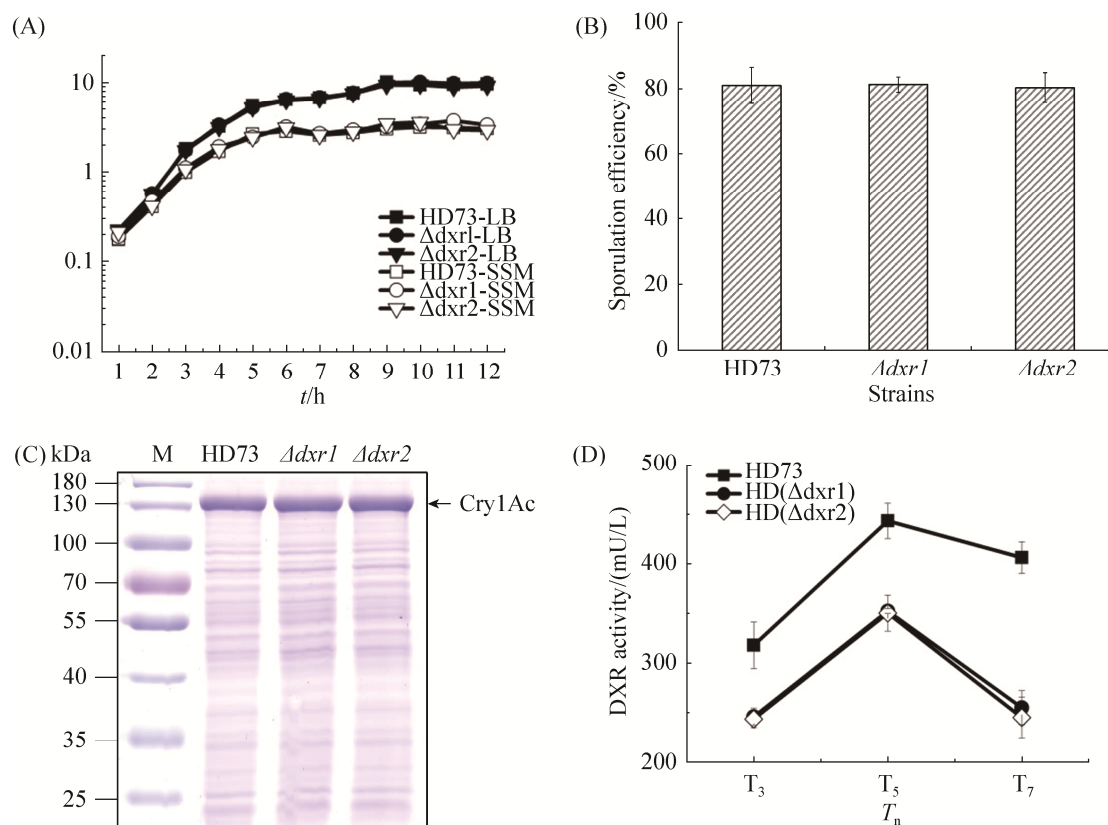


图 4. *dxr* 突变体的表型分析

Figure 4. Phenotype of *dxr* mutants. A: growth curve; B: sporulation efficiency; C: Cry1Ac protein production; D: DXR activity. The standard deviation reflects the degree of dispersion of the value relative to the mean.

明(图 4-B), HD($\Delta dxr1$)和 HD($\Delta dxr2$)菌株芽胞形成率与野生型 HD73 菌株相比无明显差异,说明 *dxr* 基因的缺失不影响芽胞形成率。将 HD73 菌株、HD($\Delta dxr1$)和 HD($\Delta dxr2$)菌株在 LB 培养基中培养至 T_{24} , 收集菌体, 分析蛋白产量, 结果表明在总蛋白量相同的条件下, *dxr* 突变体和 HD73 野生菌株的 Cry1Ac 蛋白产量无明显差异(图 4-C), 说明 *dxr* 基因的缺失对 Cry 蛋白产量无显著影响。1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶活性测定实验表明(图 4-D), HD73 出发菌株中, T_5 时期的 DXR 活性最高, 与启动子的转录活性趋势一致(图 3); 从 T_3 到 T_7 , 与 HD73 出发菌株比较, HD($\Delta dxr1$)和 HD($\Delta dxr2$)突变菌株的 DXR 活性显著下降, 说

明 *dxr* 基因的缺失影响了 DXR 的活性。

3 讨论和结论

本研究发现, *dxr1* 基因上游启动子序列存在 SigH 结合位点, 通过 β -半乳糖苷酶活性测定明确了 *dxr1* 基因启动子的转录受 SigH 的控制。但是在 *sigH* 突变体中(图 3), *dxr1* 基因启动子的转录活性明显降低, 没有完全丧失, 可能还存在其他的 Sigma 因子控制 *dxr1* 的转录。通过 BPROM 预测 (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>), *dxr1* 基因的上游可能还存在另外一个启动子(TTCATTGCTTTTTCGTTATTTTTTACAGTTTATCAC)。前期通过

生物信息学分析和 RT-PCR 实验发现(未发表), *dxr2* 基因与其上游的 6 个基因及下游的 3 个基因共转录, 形成一个转录单元, 该转录单元的上游启动子区域无 SigH 的结合位点, 因此推测 *dxr2* 基因的转录可能不受 SigH 的直接控制。

枯草芽胞杆菌中, DXR 由一个 *dxr* 基因编码, 而在 Bt HD73 中, 有 2 个 *dxr* 基因(*dxr1* 和 *dxr2*) 编码 DXR, 通过序列比对分析发现, Bt 中的 *dxr2* 基因及其上下游基因在基因组中的位置排列与 Bs 相似(图 5), 而在 Bs 中没有发现与 Bt 的 *dxr1* 基因及其上下游基因相似的组织结构。本研究发现, 单独突变 *dxr1* 或 *dxr2*, 对菌体的生长、芽胞形成和 Cry 蛋白的产量没有影响, 但使 DXR 活性下降, 可能是 *dxr1* 和 *dxr2* 基因存在互补功能, 缺失其中一个基因, 不会使 DXR 的活性完全丧失, 也不会使菌株的重要表型受到影响。

在 Bt 中, 通过 MEP 代谢途径产生的 DMAPP 和 IPP 可以进一步生成法尼基二磷酸(FPP)和香叶基香叶基二磷酸(GGPP), FPP 和 GGPP 是(E)-4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯(DMNT)和(E,E)-4,8,12-三甲

基-1,3,7,11-十三碳四烯(TMTT)合成的前体。当大部分裸子植物和被子植物受到食草动物和病原菌胁迫时会大量释放 DMNT 和 TMTT 这些挥发性萜烯类化合物, 它们作为化学信号, 可以被食草性昆虫识别, 驱使其他的食草昆虫远离该植株, 避免再次被取食^[31-32]。最近的研究揭示了植物 DMNT 和 TMTT 合成途径上的关键 2 个萜烯类合成酶基因, 并将这 2 个基因转入水稻中, 使水稻挥发出 DMNT 和 TMTT, 显著吸引了水稻害虫天敌二化螟盘绒茧蜂, 起到了对害虫的间接防御作用, 行为学检测的结果也证明 DMNT 和 TMTT 对小菜蛾绒茧蜂也具有明显的吸引作用^[33]。因此, 通过将植物来源的萜烯类合成酶基因转入 Bt 菌株中, 使其利用自身代谢产生的 FPP 和 GGPP, 产生对天敌有吸引作用的 DMNT 和 TMTT, 可以成为一种既对害虫有毒杀作用, 又吸引天敌的双重绿色防控策略。通过对 Bt MEP 代谢途径的转录调控机制的研究, 加深对该途径的认识, 为更好地利用该代谢途径生产高效广谱的工程菌提供理论基础。

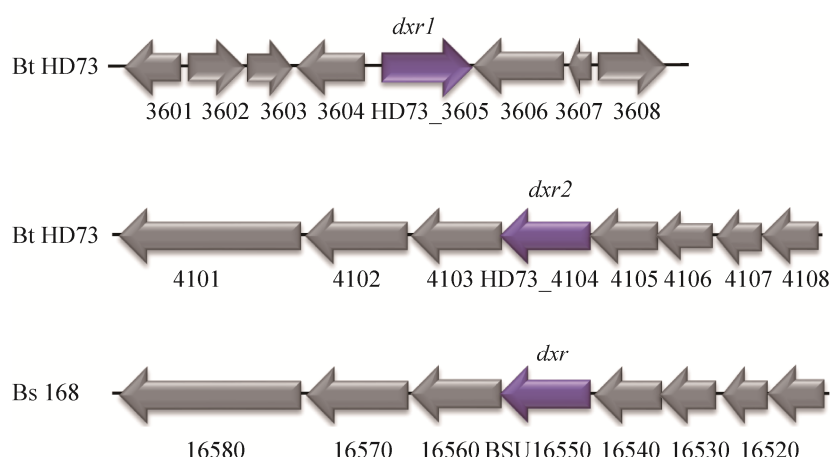


图 5. Bt 和 Bs 中 *dxr* 基因组成结构

Figure 5. The organization of the *dxr* gene in Bt and Bs.

参考文献

- [1] Guan Z, Xue D, Abdallah II, Dijkshoorn L, Setroikromo R, Lv GY, Quax WJ. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for terpenoid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22): 9395–9406.
- [2] Frank A, Groll M. The methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids. *Chemical Reviews*, 2017, 117(8): 5675–5703.
- [3] Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports*, 1999, 16(5): 565–574.
- [4] Zhang LL, Zhang X, Wang XJ, Xu J, Wang M, Li L, Bai GH, Fang H, Hu ST, Li JG, Yan JB, Li JS, Yang XH. Seed carotenoid deficient functions in isoprenoid biosynthesis via the plastid MEP pathway. *Plant Physiology*, 2019, doi: 10.1104/pp.18.01148.
- [5] He L, He P, Luo XY, Li MX, Yu L, Guo JY, Zhan XY, Zhu G, Zhao JL. The MEP pathway in *Babesia orientalis* apicoplast, a potential target for anti-babesiosis drug development. *Parasites & Vectors*, 2018, 11(1): 452.
- [6] Matsue Y, Mizuno H, Tomita T, Asami T, Nishiyama M, Kuzuyama T. The herbicide ketoclozazole inhibits 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway and shows antibacterial activity against *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antibiotics*, 2010, 63(10): 583–588.
- [7] San Jose G, Jackson ER, Uh E, Johnny C, Haymond A, Lundberg L, Pinkham C, Kehn-Hall K, Boshoff HI, Couch RD, Dowd CS. Design of potential bisubstrate inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) 1-Deoxy-D-Xylulose 5-phosphate reductoisomerase (Dxr)-evidence of a novel binding mode. *MedChemComm*, 2013, 4(7): 1099–1104.
- [8] Borel F, Barbier E, Krasutsky S, Janthawornpong K, Chaignon P, Poulter CD, Ferrer JL, Seemann M. Further insight into crystal structures of *Escherichia coli* Isph/LytB in complex with two potent inhibitors of the MEP pathway: a starting point for rational design of new antimicrobials. *ChemBioChem*, 2017, 18(21): 2137–2144.
- [9] Xue D, Abdallah II, de Haan IEM, Sibbald MJJB, Quax WJ. Enhanced C₃₀ carotenoid production in *Bacillus subtilis* by systematic overexpression of MEP pathway genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(14): 5907–5915.
- [10] Xue JF, Ahring BK. Enhancing isoprene production by genetic modification of the 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(7): 2399–2405.
- [11] Hui X, Yue Q, Zhang DD, Li H, Yang SQ, Gao WY. Antimicrobial mechanism of theaflavins: they target 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the key enzyme of the MEP terpenoid biosynthetic pathway. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38945.
- [12] Kuzuyama T, Seto H. Two distinct pathways for essential metabolic precursors for isoprenoid biosynthesis. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 2012, 88(3): 41–52.
- [13] Tong YR, Su P, Zhao YJ, Zhang M, Wang XJ, Liu YJ, Zhang XN, Gao W, Huang LQ. Molecular cloning and characterization of DXS and DXR genes in the terpenoid biosynthetic pathway of *Tripterygium wilfordii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(10): 25516–25535.
- [14] Devi K, Dehury B, Phukon M, Modi MK, Sen P. Novel insights into structure-function mechanism and tissue-specific expression profiling of full-length *dxr* gene from *Cymbopogon winterianus*. *FEBS Open Bio*, 2015, 5: 325–334.
- [15] Mahmoud SS, Croteau RB. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(15): 8915–8920.
- [16] Ussin NK, Bagnell AM, Offermann LR, Abdulsalam R, Perdue ML, Magee P, Chruszcz M. Structural characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Vibrio vulnificus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2018, 1866(12): 1209–1215.
- [17] Armstrong CM, Meyers DJ, Imlay LS, Freely Meyers C, Odom AR. Resistance to the antimicrobial agent fosmidomycin and an FR900098 prodrug through mutations in the deoxyxylulose phosphate reductoisomerase gene (*dxr*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(9): 5511–5519.
- [18] Jackson ER, Dowd CS. Inhibition of

- 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (Dxr): a review of the synthesis and biological evaluation of recent inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, 12(7): 706–728.
- [19] Sooriyaarachchi S, Chofor R, Risseuw MDP, Bergfors T, Pouyez J, Dowd CS, Maes L, Wouters J, Jones TA, Van Calenbergh S, Mowbray SL. Targeting an aromatic hotspot in *Plasmodium falciparum* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase with β -arylpropyl analogues of fosmidomycin. *ChemMedChem*, 2016, 11(18): 2024–2036.
- [20] Cobb RE, Bae B, Li Z, DeSieno MA, Nair SK, Zhao HM. Structure-guided design and biosynthesis of a novel FR-900098 analogue as a potent *Plasmodium falciparum* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (Dxr) inhibitor. *Chemical Communications*, 2015, 51(13): 2526–2528.
- [21] van Frankenhuyzen K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 101(1): 1–16.
- [22] Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews*, 1993, 57(1): 1–33.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé 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.
- [29] Chen XM, Gao TT, Peng Q, Zhang J, Chai YR, Song FP. Novel cell wall hydrolase CwIC from *Bacillus thuringiensis* is essential for mother cell lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(7): e02640–17.
- [30] Huang MZ, Peng Q, Zheng J, Gao JG, Song FP. Transcriptional regulation of *aco* gene cluster in *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(9): 1144–1153. (in Chinese)
黄闽忠, 彭琦, 张杰, 高继国, 宋福平. 苏云金芽胞杆菌 3-羟基丁酮代谢基因簇的转录调控. 微生物学报, 2015, 55(9): 1144–1153.
- [31] Tholl D, Lee S. Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*, 2011, 9: e0143.
- [32] Boggia L, Sgorbini B, Berteau CM, Cagliero C, Bicchi C, Maffei ME, Rubiolo P. Direct contact-sorptive tape extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry to reveal volatile topographical dynamics of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) upon herbivory by *Spodoptera littoralis* Boisd. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 102.
- [33] Li FQ, Li W, Lin YJ, Pickett JA, Birkett MA, Wu KM, Wang GR, Zhou JJ. Expression of lima bean terpene synthases in rice enhances recruitment of a beneficial enemy of a major rice pest. *Plant, Cell & Environment*, 2018, 41(1): 111–120.

Transcription of *dxr1* is controlled by SigH in *Bacillus thuringiensis*

Na Li^{1, 2}, Jilong Wen², Fuping Song², Jie Zhang², Jiangyan Duan^{1*}, Qi Peng^{2*}

¹ School of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004, Shanxi 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] Terpenoids are widely present in various organisms and play key roles in all forms of life. Two pathways have been found for the biosynthesis of terpenoids: the mevalonate (MVA) pathway and 2-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway. 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) is a key enzyme in the MEP pathway that catalyzes 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate to generate MEP. DXR is encoded by a *dxr* gene in *Bacillus subtilis*, while two *dxr* genes (*dxr1* and *dxr2*) encode DXR in *Bacillus thuringiensis* (Bt). To determine the mechanism of transcriptional regulation and the function of *dxr* gene, we analyzed the transcriptional regulation of *dxr1* gene and phenotype of *dxr1* and *dxr2* mutants of Bt HD73. [Methods] Transcriptional start site was analyzed by 5'RACE. Transcriptional activity of *dxr1* promoter (*Pdxr1*) was analyzed by promoter fusions with *lacZ* gene. *dxr1* and *dxr2* mutants of Bt HD73 strain were constructed by homologous recombination. Comparison of the Cry1Ac protein production was determined by protein quantitation. DXR activity was determined by DXR detection kit. [Results] A G residue located 39 bp upstream from the *dxr1* start codon was identified. The transcriptional activity of *Pdxr1* was sharply decreased in *sigH* mutant compared with that in HD73 wild-type. Mutation of *dxr1* or *dxr2* has no significant differences on growth, sporulation efficiency and Cry1Ac protein production. However, the DXR activity was decreased in the mutants. [Conclusion] Transcription of *dxr1* is controlled by SigH. Deletion of *dxr* genes influenced the activity of DXR.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, MEP pathway, DXR, *dxr* gene, transcriptional regulation

(本文责编: 张晓丽)

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

*Corresponding authors. E-mail: Qi Peng, qpeng@ippcaas.cn; Jiangyan Duan, duanjiangyan123@163.com

Received: 26 March 2019; Revised: 24 April 2019; Published online: 21 May 2019