



苏云金芽胞杆菌 *rocE* 基因的转录调控

赵欣^{1,2}, 张梁威², 宋福平², 张杰², 李晶^{1*}, 彭琦^{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】*rocE* 基因编码精氨酸降解途径中的精氨酸通透酶, 通过分析苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) *rocE* 基因的转录活性, 明确 *rocE* 基因的转录调控机制。【方法】通过 RT-PCR 确定 *rocE* 基因所在基因簇的转录单元; β -半乳糖苷酶活性测定分析 *rocE* 基因启动子(*ProcE*)的转录活性; 采用同源重组技术敲除 Bt HD73 菌株的 *rocE* 基因; 通过融合 His 标签的方法在大肠杆菌中表达纯化 RocR 蛋白的 HTH 结构域; 通过凝胶阻滞实验明确 RocR 与 *rocE* 基因启动子的结合作用。【结果】在 M9 培养基中, 精氨酸可诱导 *ProcE* 的转录活性; 在 SSM 培养基和精氨酸诱导培养基中, 与出发菌株 HD73 相比, *ProcE* 在 *sigL* (编码 Sigma54 因子)突变体和 *rocR* 突变体中的转录活性显著下降。RocR-HTH 蛋白与 *ProcE* 有结合作用。*rocE* 基因的缺失对菌体生长和 Cry1Ac 蛋白产量无显著影响。*rocE* 缺失突变体的芽胞形成率为 65.5%, HD73 出发菌株为 85.7%, 显著性分析结果表明差异显著($P < 0.05$)。【结论】*rocE* 基因的转录活性受 Sigma54 的控制, 并受 RocR 正调控。*rocE* 基因的缺失影响菌株的芽胞形成率。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, 精氨酸代谢, *rocE*, 转录调控

精氨酸是许多营养物质代谢的前体物质, 其代谢产物谷氨酸更是连接碳代谢与氮代谢的重要物质。在细菌中, 精氨酸在通透酶的作用下进入细胞体内; 在精氨酸酶的作用下分解成为鸟氨酸; 进一步在鸟氨酸转氨酶的作用下生成谷氨酸半醛; 再继续酶解最终生成谷氨酸进入细菌的碳循环。精氨酸的分解代谢连接起了氮循环与碳循环^[1-3]。精氨酸分

解代谢分为两个途径: 精氨酸酶途径(arginase pathway)和精氨酸脱亚胺酶途径(arginine deiminase pathway)。其中精氨酸酶代谢途径所产生的尿素能进一步被催化生成氨, 作为菌体生长的氮源被利用^[4]。精氨酸脱亚胺酶途径则与菌体对恶劣环境的适应相关, 能够在菌体受到酸胁迫时提高胞内 pH, 适应酸性环境^[4-5]。以精氨酸作为代谢底物, 最终会

基金项目: 国家自然科学基金(31772243)

*通信作者。E-mail: 李晶, lijing@neau.edu.cn; 彭琦, qpeng@ippcaas.cn

收稿日期: 2020-05-28; 修回日期: 2020-10-21; 网络出版日期: 2020-11-13

生成氨, 二氧化碳和 1 分子 ATP。在营养缺乏时能够以精氨酸为营养物质为菌体供能^[5]。

精氨酸酶途径是枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*, Bs) 中唯一的精氨酸代谢途径, 其代谢过程中相关的酶主要由 *roc* 基因簇编码: *rocC* 和 *rocE* 基因编码通透酶 (arginine/ornithine permease), 使精氨酸由胞外运至胞内; *rocF* 基因编码精氨酸酶 (arginase), 将精氨酸分解成为鸟氨酸; *rocD* 基因编码鸟氨酸转氨酶 (ornithine aminotransferase), 将鸟氨酸生成谷氨酸半醛 (L-glutamate-5-semialdehyde); 谷氨酸半醛与吡咯啉羧酸 (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate) 可相互转化; *rocA* 编码吡咯啉羧酸脱氢酶 (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase), 将吡咯啉羧酸生成 L-谷氨酸; *rocG* 基因编码谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase), 将 L-谷氨酸生成 α -酮戊二酸, 进入三羧酸循环, 为菌体生长提供能量。*roc* 基因簇形成 3 个转录单元: *rocABC-rocG-rocDEF*。这些基因的转录都依赖于 Sigma 54 因子, 并且受到 RocR 的正调控。它们的转录会受到精氨酸、鸟氨酸和脯氨酸的诱导, 某些基因缺失时会导致菌株在精氨酸或鸟氨酸存在的培养条件中不生长。所以精氨酸代谢途径对枯草芽胞杆菌的生长有着一定的影响^[3,6-9]。

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是土壤微生物, 革兰氏阳性菌, 是多种鳞翅目、鞘翅目、双翅目等农业害虫的病原菌^[10]。由于其能产生杀虫晶体蛋白的特性而被广泛应用于生物防治领域^[11-12]。当 Bt 菌体进入虫体中肠, 分泌的毒素蛋白能够在中肠的碱性条件下被消化成为前毒素, 之后在中肠多种酶的作用下溶解, 发挥其毒性。在这个过程中 Bt 能够获取宿主的营

养用于自身的生长和繁殖^[13]。Sigma 54 因子是 RNA 聚合酶核心酶的亚基, 调控许多碳氮源的代谢, 它通过与启动子的 -12/-24 区结合, 在增强子结合蛋白 (enhance binding protein, EBP) 的激活下, 起始基因的转录^[14]。本实验室前期研究发现, Bt HD73 菌株中的 Sigma 54 因子控制了 47 个基因的转录^[15]; 8 个 EBP 调控了 8 个代谢途径, 包括: γ -氨基丁酸^[16-17]、赖氨酸^[18]、肌氨酸^[19]、3-羟基丁酮代谢^[20]等。其中 RocR 可能调控精氨酸代谢途径, 其调控机制尚不明确, 本研究在此基础上, 对编码精氨酸通透酶的 *rocE* 基因的转录调控进行分析, 明确 RocR 对 *rocE* 基因的调控机制。进一步完善 Bt 中 Sigma54 和 EBPs 调控的代谢网络, 从代谢调控角度更经济地优化菌株对碳源、氮源的利用, 为获得高效的 Bt 制剂提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养条件: 本研究所用菌株和质粒见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 在 LB 培养基中 37 °C 培养; Bt 的培养分别使用 LB 培养基、SSM 培养基和 M9 培养基, 在 30 °C 培养。抗生素的使用终浓度分别为: 红霉素 5 $\mu\text{g/mL}$, 氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$, 卡那霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.1.2 主要试剂及引物: DNA 聚合酶、DNA 连接酶和限制性内切酶、PCR 产物纯化、DNA 回收和质粒提取试剂盒等购自宝生物工程(大连)有限公司和 Axygen 公司。细菌 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。无缝克隆试剂盒购自中美泰和生物技术(北京)有限公司。镍亲和层析柱填料购自 GE 公司。poly(dI:dC) 购自 Sigma 公司。引物名称及序列见表 2, 参照 Bt

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>cry1Ac</i> gene | This lab |
| HD(Δ <i>sigL</i>) | <i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>sigL</i> gene insertion mutant | [15] |
| HD(Δ <i>rocR</i>) | <i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>rocR</i> gene insertion mutant | [15] |
| HD(<i>ProcE</i>) | HD73 strain containing plasmid pHT <i>ProcE</i> | This study |
| Δ <i>sigL</i> (<i>ProcE</i>) | HD(Δ <i>sigL</i>) strain containing plasmid pHT <i>ProcE</i> | This study |
| Δ <i>rocR</i> (<i>ProcE</i>) | HD(Δ <i>rocR</i>) strain containing plasmid pHT <i>ProcE</i> | This study |
| <i>CrocR</i> (<i>ProcE</i>) | Δ <i>rocR</i> (<i>ProcE</i>) strain containing plasmid pHT <i>CrocR</i> | This study |
| HD(<i>ProcEMR</i>) | HD73 strain containing plasmid pHT <i>ProcEMR</i> | This study |
| HD(Δ <i>rocE</i>) | <i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>rocE</i> gene insertion mutant | This study |
| <i>E. coli</i> TG1 | Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>supE thi hsd-5 (F' traD36 proA⁺ proB⁺ lacI^q lacZAM15)</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 B, F⁻, dcm, ompT hsdS(rB-mB-), gal, λ(DE3)</i> | This lab |
| BL21(pETRocR-HTH) | BL21(DE3) strain containing plasmid pETRocR-HTH | This study |
| BLpET | BL21 strain carrying pET21b | This lab |
| Plasmids | | |
| pHT304-18Z | Promoterless <i>lacZ</i> vector, Ery ^r , Amp ^r | This lab |
| pHT <i>ProcE</i> | pHT304-18Z carrying promoter upstream from <i>rocE</i> | This study |
| pHT <i>ProcEMR</i> | pHT304-18Z carrying promoter upstream from <i>rocE</i> with the mutated sequence of RocR binding site | This study |
| pMAD | Ap ^R , Em ^R shuttle vector, thermosensitive origin of replication | Institute Pasteur |
| pMAD Δ <i>rocE</i> | pMAD with <i>rocE</i> insertion fragment | This study |
| pETRocR-HTH | pET21b containing RocR HTH domain, Amp ^r | This study |
| pHT1618 | Ap ^R , Tet ^R , <i>E. coli</i> -Bt shuttle vector | This lab |
| pHT <i>CrocR</i> | pHT1618 carrying promoter upstream from <i>rocR</i> and <i>rocR</i> gene | This study |

表 2. 引物序列
Table 2. Primers used in this study

| Primer names | Sequences (5'→3') ^a |
|-----------------|--|
| RT-1F | CATACGTATACGAGTGGGAGAA |
| RT-1R | TTATTTAAAAGATCATCCCTCACTGT |
| RT-2F | CGATGGTTTCCTGATGTACCGT |
| RT-2R | GCAATCATCGTAATTTAAAATAGCGG |
| RT-3F | GGACATATGGATGTAGCTGAAGTGA |
| RT-3R | CCCTGTCCTTGCATATGTAATCA |
| RT-4F | GGAATCAGTGGGTATAGCGAATCAT |
| RT-4R | TCTCCAAGACAGAGCATCGTTAAAT |
| RT-5F | GCAGGGCGGAGATGTGAAG |
| RT-5R | CTGCAACAAATTCTTGCGCC |
| <i>ProcE</i> -F | CCAAGCTTAGATTATCTTCTCCTCATTTTC |
| <i>ProcE</i> -R | CGGGATCCCTTTATAAAATTCCTCCCTCTT |
| <i>rocE</i> -A1 | CGGGAGCTCGAATTCGCGGTTGTGCACACT |
| <i>rocE</i> -A2 | CTCAAATGGTTCGCTGATCCATCATATAAAT |
| <i>rocE</i> -B1 | CCTACGAGGAATTTTATAATATTGAGTAATTT |
| <i>rocE</i> -B2 | GGCGATATCGGATCCGCGTGCCAGCTTCT |
| E1Kan-1 | ATTTATATGATGGATCAGCGAACCATTGAG |
| E1Kan-2 | AAATTAATCAATATTATAAAAAATTCCTCGTAGG |
| RocR-H1 | CGGGATCCGACTCGCTTTCGCGAACGAAT |
| RocR-H2 | ACGCGTCCGACGTGTAATGCAGTTTTTTT |
| <i>rocR</i> -1 | GCTTGCATGCCTGCAGCCTTCTATAACTGTCTTCAC |
| <i>rocR</i> -2 | GGATCCTCTAGAGTCGACTCATATGTGTAATGCAGTTT |

^a: Restriction enzyme sites are underscored.

HD73 基因组序列^[21]设计引物, 引物合成由上海生工生物工程公司完成, 序列测定由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

1.2 RT-PCR

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, 用 TRIzol 重悬沉淀, RNA 提取方法参照试剂盒说明。以纯化后的 RNA 为模板合成 cDNA, 所用引物见表 2。

1.3 *rocE* 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, *ProcE-F* 和 *ProcE-R* 为引物, PCR 扩增 *rocE* (HD73_0562) 基因启动子 *ProcE* 片段(294 bp), PCR 产物经纯化和双酶切(*BamH I* 和 *Hind III*), 连接到穿梭载体 pHT304-18Z 上, 该载体含有 *lacZ* 报告基因。连接产物转入 *E. coli* TG1 菌株, 经鉴定获得重组质粒 pHTProcE, 再将重组质粒转入 *E. coli* ET 12567 菌株中去甲基化, 之后通过电击分别转入出发菌株 HD73、突变菌株 $\Delta sigL$ 和 $\Delta rocR$, 转化方法见文献[22], 获得菌株 HD (*ProcE*)、 $\Delta sigL$ (*ProcE*) 和 $\Delta rocR$ (*ProcE*)。通过序列合成的方法将 *ProcE* 片段上的 RocR 结合位点进行突变, 上述同样方法, PCR 获得片段 *ProcEMR*, 连接到 pHT304-18Z 载体, 获得重组质粒 pHTProcEMR, 电击转入 HD73 出发菌株, 获得菌株 HD (*ProcEMR*)。

1.4 *rocE* 基因突变菌株构建及筛选

利用同源重组的原理^[23], 构建 *rocE* 突变体, 方法见参考文献[24], 以 Bt HD73 基因组为模板, 用引物 rocE-A1/rocE-A2 扩增 *rocE* 基因上游片段(rocE-A, 565 bp); 用引物 rocE-B1/rocE-B2 扩增 *rocE* 基因下游片段(rocE-B, 633 bp)。以含有卡那霉素抗性基因(*kan*, 1473 bp)的 $\Delta dxr1$ 突变体^[24]

为模板, 用引物 E1Kan-1/E1Kan-2 进行 PCR 扩增。应用无缝克隆试剂盒, 将 *rocE-A*、*kan* 和 *rocE-B* 三个片段连接至温敏穿梭载体 pMAD 的 *BamH I* 和 *EcoR I* 酶切片段上, 连接产物转入大肠杆菌 TG1 菌株, 重组质粒 pMAD $\Delta rocE$ 经鉴定正确后再转入 ET 去甲基化。之后电击转入 HD73 菌株, 获得具有红霉素和卡那霉素抗性的 HD (pMAD $\Delta rocE$) 菌株。突变体筛选方法见参考文献[24], 获得的突变菌株命名为 HD($\Delta rocE$)。

1.5 RocR-HTH 蛋白表达纯化与凝胶阻滞实验

根据 RocR 蛋白结构域分析结果, 以 HD73 基因组为模板, 以 RocR-H1 和 RocR-H2 为引物, PCR 扩增 RocR-HTH 片段(225 bp), PCR 产物经纯化、双酶切(*BamH I* 和 *Sal I*), 连接到 pET21b 质粒上, 转化 *E. coli* TG1 菌株, 获得重组质粒 pETRocR-HTH。鉴定正确后, 转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株, 获得表达菌株 BL21(pETRocR-HTH)。RocR-HTH 蛋白的表达与纯化见文献[25]。以 Bt HD73 基因组为模板, 用带有羧基荧光素(FAM)标记的引物(表 2), PCR 扩增 *ProcE* 片段(297 bp)。通过凝胶阻滞实验(EMSA, electrophoresis mobility shift assays), 确定 *ProcE* 与 RocR-HTH 蛋白的结合, 方法见文献[25]。

1.6 $\Delta rocR$ 互补菌株构建

以 Bt HD73 基因组为模板, *rocR-1* 和 *rocR-2* 为引物, PCR 扩增含有自身启动子片段的 *rocR* 基因(1717 bp), 应用无缝克隆试剂盒, 将纯化后的 PCR 产物连接到 *E. coli*-Bt 穿梭表达载体 pHT1618 的 *Pst I* 和 *Sal I* 酶切产物上, 转化至 *E. coli* TG1 菌株, 重组质粒 pHTCrocR 鉴定正确后转入 *E. coli* ET 菌株中去甲基化, 之后通过电击转入 $\Delta rocR$ (*ProcE*) 菌株中, 转化方法见文献[22],

获得菌株 *CrocR* (*ProcE*), 该菌株中含有表达 *RocR* 蛋白的质粒 *pHTCrocR*, 同时含有可测定 *ProcE* 转录活性的质粒 *pHTrocE*。

1.7 β -半乳糖苷酶活性测定

Bt 菌株在 SSM 培养基中 30 °C、220 r/min 振荡培养, 从 T_1 开始取样, 之后每小时取样 1 次, 取到 T_8 , 每次取样 2 mL, 样品离心后, 沉淀用于测定 β -半乳糖苷酶活性, 方法见参考文献[26]。Bt 菌株在 LB 培养基中 30 °C、220 r/min 振荡培养至对数生长期 ($OD_{600}=2.0$), 取 1% 菌液接入 M9 培养基 (含有终浓度为 17 mmol/L 的葡萄糖和 1.15 mmol/L 精氨酸), 继续振荡培养 (30 °C、220 r/min), 2 h 后开始取样 (记为 A_1), 之后每小时取样 1 次, 共取 7 个点 (A_2-A_8), 每次取样 10 mL, 离心收集菌体, 沉淀用于 β -半乳糖苷酶活性测定。每组数据 3 次独立重复取平均值并计算标准差。

2 结果和分析

2.1 *rocE* 基因簇转录单元确定

对 Bt HD73 基因组序列进行分析, *rocE* 基因编号为 HD73_0562, 编码精氨酸通透酶。与 Bs 168 菌株中的同源基因 BSU40330 相似性为 60%。对 *rocE* 基因上下游序列重测序发现, 其上游 HD73_0560 和 HD73_0561 实际为一个 *orf*, 编码未知功能蛋白; *rocE* 下游基因 HD73_0563 编码乙酰鸟氨酸脱乙酰酶 (acetylornitine deacetylase); HD73_0560 基因上游是一个反向基因: *rocR* (HD73_0559) 编码依赖于 Sigma54 的转录调控因子 (Sigma54-dependent transcriptional activator) (图 1)。根据 HD73 菌株基因组序列信息, 在 *rocE* 基因及其上下游基因内部以及基因之间设计了对引物, 将 SSM 培养基中 T_5 时期提取并纯化

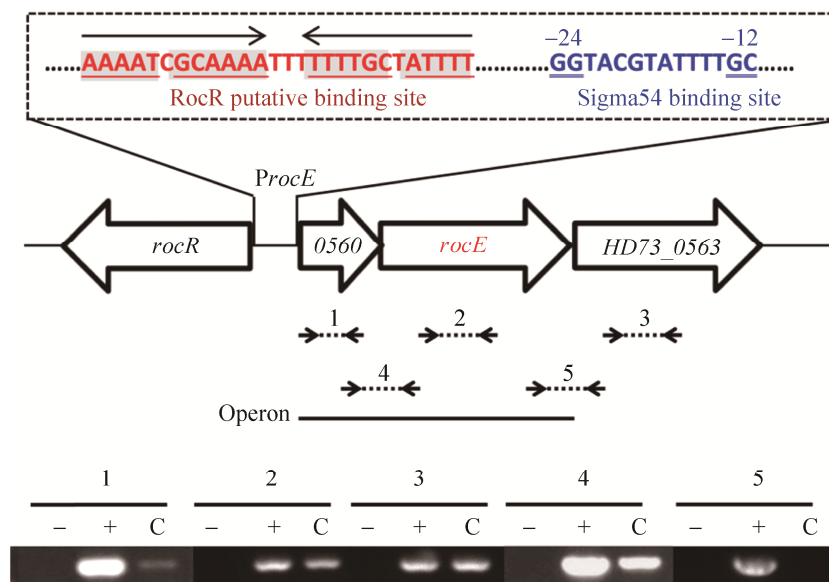


图 1. Bt HD73 中 *rocE* 基因簇基因组织及序列分析

Figure 1. Organization and sequence of the *rocE* cluster in Bt HD73. C: indicated the product amplified with cDNA as template; +: the positive controls (PCR with genomic DNA); -: the negative controls (RT-PCR with RNA).

的总 RNA 反转录成 cDNA,再分别扩增 1-5 个片段(片段 1、2、3 是基因内部片段;片段 4 和 5 是基因间片段)。结果表明(图 1),除了片段 5 得不到扩增产物外,其余均能得到扩增产物,说明 *rocE* 与下游的 HD73_0563 不共转录,而 *rocE* 基因与其上游 HD73_0560 组成一个转录单元,该转录单元的启动子位于 HD73_0560 基因的上游。

对 *rocE* 基因启动子(*ProcE*)序列进行分析,通过 DBTBS 数据库(<http://dbtbs.hgc.jp/>)中检索 *ProcE* 序列上转录调控因子结合位点,发现了 Sigma54 的结合位点(图 1),具有典型的-12/-24 保守序列(BYGGCMYRNNYYGCW)特征^[27],在该序列上游有一段近似回文序列,可能是 RocR 的结合位点。

2.2 *rocE* 基因转录调控分析

为了研究 *rocE* 基因的转录活性,构建了 *rocE* 的启动子 *ProcE* 融合 *lacZ* 基因的表达载体 pHT*ProcE*,分别转入 Bt HD73 菌株、 $\Delta sigL$ 突变体和 $\Delta rocR$ 突变体,获得菌株 HD (*ProcE*)、 $\Delta sigL$ (*ProcE*)和 $\Delta rocR$ (*ProcE*),通过 β -半乳糖苷酶活性测定分析 *ProcE* 在不同菌株中的转录情况。结果表明(图 2-A),SSM 培养基中,在 T_1 - T_8 时期(T_0 为对数生

长期结束的时间, T_n 为 T_0 之后的 n 小时), *ProcE* 在 HD73 菌株中的转录活性基本平稳,在 T_2 时期最高,之后缓慢下降;与出发菌株 HD73 相比, *ProcE* 在 $\Delta sigL$ 和 $\Delta rocR$ 菌株中的转录活性显著降低,而在 $\Delta rocR$ 互补菌株 [*CrocR* (*ProcE*)] 中, *ProcE* 的活性明显升高。在营养成分贫瘠的 M9 培养基中对 *ProcE* 的诱导转录活性进行分析, β -半乳糖苷酶活性测定结果表明(图 2-B),与无精氨酸的培养基相比,在含有 1.15 mmol/L 精氨酸的培养基中,HD73 出发菌株中的 *ProcE* 转录活性明显升高,说明 *ProcE* 的转录受精氨酸的诱导;而 *ProcE* 在 $\Delta rocR$ 菌株中的诱导转录活性几乎丧失,在 $\Delta rocR$ 互补菌株中恢复了比野生型更高的活性。这些结果说明 *rocE* 的转录受精氨酸的诱导,其转录活性受 Sigma 54 因子控制,并受到 RocR 的正调控。

2.3 RocR 对 *rocE* 的转录调控作用

通过对 RocR 氨基酸保守结构域的分析发现,它是一个依赖于 Sigma 54 的转录调控因子,具有 3 个典型的保守结构域(图 3-A):与信号识别相关的 PAS 结构域、与 Sigma 54 互作的 AAA⁺ 结构域、与 DNA 结合的 HTH 结构域。为了进一步明确 RocR 对 *rocE* 的转录调控作用,表达纯化

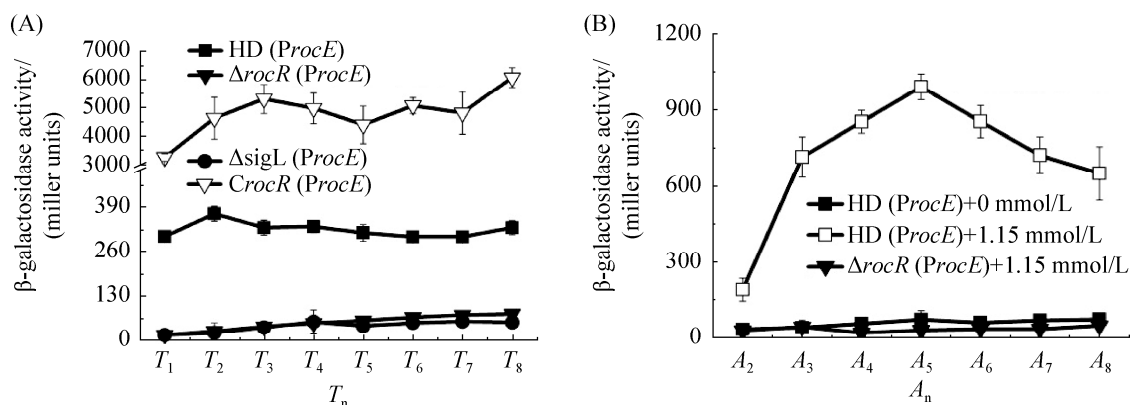


图 2. *ProcE* 的转录活性

Figure 2. Transcriptional activity of *ProcE*. The standard deviation reflects the degree of dispersion of the value relative to the mean. A: SSM medium; B: M9 medium.

了 RocR-HTH 蛋白, 通过 EMSA 实验确定了 *ProcE* 与 RocR-HTH 蛋白的结合。结果表明(图 3-B), 凝胶底部为 15.7 ng 带标记的自由 DNA 条带, 上层为 DNA 与蛋白结合的条带, 随着 RocR-HTH 蛋白浓度由 14 ng 增加到 112 ng (图 3-B, lane 2-5), 底部未与蛋白结合的 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 *ProcE* 与 RocR-HTH 蛋白有结合作用; 而加入 200 倍浓度未标记的 DNA 可以与标记的 DNA 产生竞争作用(图 3-B, lane 6)。以上结果说明 *ProcE* 与 RocR-HTH 具有特异性的结合作用, 表明 *ProcE* 的转录受 RocR 的直接调控。根据 *rocE* 启动子序列特征, 将预测的 RocR 结合位点的 T 碱基替换成 C 碱基(图 3-C: UAS 序列, UAS: upstream activating sequence)。PCR 扩增突变片段 *ProcEMR*, 将其连接至含有 *lacZ* 报告基因的 pHT304-18Z 载体上, 并转入 Bt HD73, 获得菌株

HD (*ProcEMR*)(图 3-C)。β-半乳糖苷酶活性测定结果表明(图 3-C), SSM 培养基中, 在 T_1 - T_8 时期, *ProcEMR* 的转录活性明显低于 *ProcE* 的转录活性, 说明 *rocE* 启动子区域上突变的序列可能是 RocR 的结合序列。

2.4 *rocE* 突变体的表型分析

为了明确 *rocE* 基因在 Bt 中的功能, 构建了 *rocE* 的突变体, 并进行表型分析, 比较了出发菌株和突变菌株的生长曲线、芽胞形成率和 Cry1Ac 蛋白产量, 方法参考文献[24]。生长曲线结果表明(图 4-A): 无论是在营养丰富的 LB 培养基, 还是在较贫瘠的芽胞形成培养基 SSM, *rocE* 基因的缺失对菌体生长均无明显影响。芽胞形成率实验表明(图 4-B), 出发菌株 HD73 的芽胞形成率为 85.7(±2.1)%; 而 $\Delta rocE$ 突变体的芽胞形成率为 65.5(±4.7)%, 显著性分析结果显示 P -value < 0.05, 差异显著, 说明 *rocE* 基因的缺失影响了

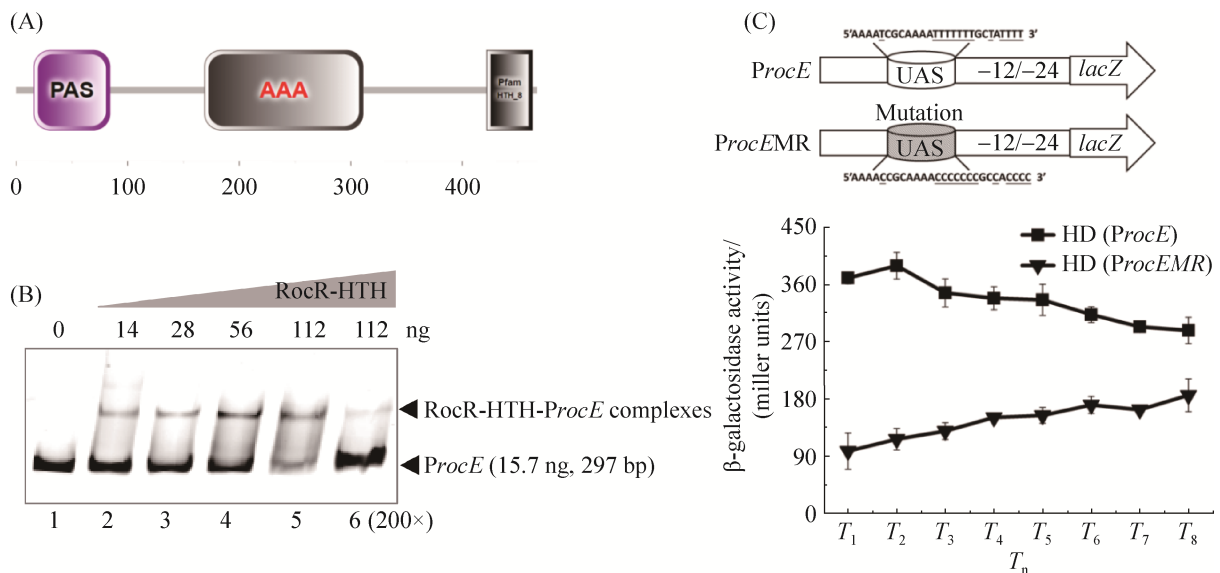


图 3. RocR 对 *rocE* 的转录调控

Figure 3. Transcription of *rocE* is regulated by RocR. A: conserved domain of RocR; B: the binding of RocR-HTH and *ProcE*; C: transcriptional activity of *ProcEMR*. The standard deviation reflects the degree of dispersion of the value relative to the mean.

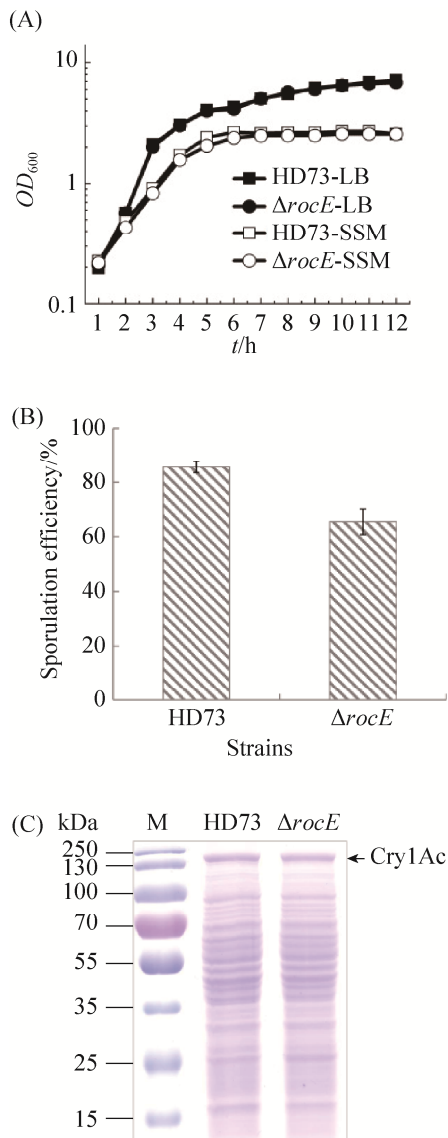


图 4. *rocE* 突变体的表型分析

Figure 4. Phenotype of *rocE* mutant. A: Growth curve; B: sporulation efficiency; C: Cry1Ac protein production. The standard deviation reflects the degree of dispersion of the value relative to the mean.

Bt 菌株的芽胞形成率。HD73 菌株含有唯一的杀虫晶体蛋白 Cry1Ac, 为了明确 *rocE* 基因的缺失对 Cry1Ac 蛋白产量的影响, 将 HD73 菌株和 $\Delta rocE$ 突变体在 SSM 培养基中培养至 T_{24} , 收集菌体, 冻干称重, 在总蛋白量相同的条件下, 与

HD73 野生型相比, $\Delta rocE$ 突变体的 Cry1Ac 蛋白产量无明显变化(图 4-C), 说明 *rocE* 基因的缺失对 Cry 蛋白产量无显著影响。

3 讨论

本研究发现, 在 Bt HD73 菌株中, 编码精氨酸通透酶的 *rocE* 基因的转录受精氨酸的诱导、受 Sigma 54 的控制, 并受 RocR 的正调控。通过 EMSA 实验, 进一步明确了纯化的 RocR-HTH 结构域可以与 *rocE* 的启动子结合, 这些结果为细菌精氨酸代谢途径的转录调控机制提供了新的证据。RocR 是依赖于 Sigma 54 的转录激活蛋白, 具有 3 个典型的结构域(图 3-A), 结合本研究得到的结果, 推测 RocR 的 N 端 PAS 结构域可能与识别精氨酸信号相关; C 端的 HTH 结构域, 可能识别 *rocE* 启动子上的回文序列并与之相结合。

在 Bs 中, 编码精氨酸分解代谢途径相关酶的基因成簇存在, 由 *roc* 基因簇中的 7 个基因组成, 形成 3 个转录单元: *rocABC-rocG-rocDEF*。这些基因的转录都依赖于 Sigma 54 因子, 并且受到 RocR 的正调控^[3,6-9]。在 Bt HD73 基因组中, 也存在 *roc* 基因簇的同源基因, 参与精氨酸分解代谢途径, 但这些基因分散排布在 Bt HD73 基因组上(图 5), 只有 *rocE* 基因与 *rocR* 基因相邻, 本研究证实 *rocE* 基因的转录受 RocR 正调控, 而其它 *roc* 基因的转录是否受到 RocR 调控, 还有待进一步研究。本研究通过 *rocE* 突变体的表型分析发现, *rocE* 基因的缺失不影响菌株的生长和 Cry1Ac 蛋白的产量, 但使芽胞形成率略有下降, 说明 *rocE* 基因参与的精氨酸代谢途径与芽胞形成有关, 但其它 *roc* 基因的缺失是否影响菌株的表型, 还有待进一步研究。

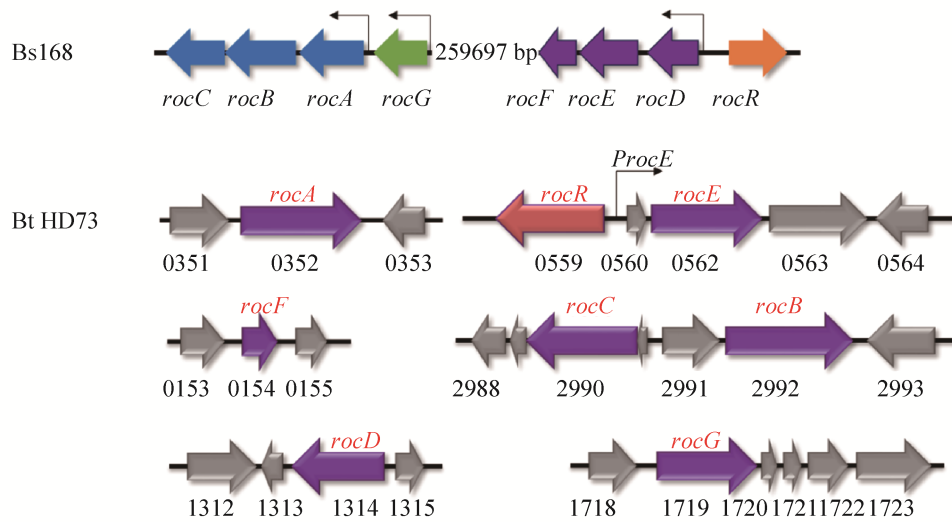


图 5. Bt 和 Bs 基因组中 *roc* 基因的比较

Figure 5. Comparison of *roc* genes in Bt and Bs genome.

参考文献

- [1] Belitsky BR, Sonenshein AL. An enhancer element located downstream of the major glutamate dehydrogenase gene of *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(18): 10290–10295.
- [2] Xiong LF, Teng JLL, Botelho MG, Lo RC, Lau SKP, Woo PCY. Arginine metabolism in bacterial pathogenesis and cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(3): 363.
- [3] Gardan R, Rapoport G, Débarbouillé M. Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 1995, 249(5): 843–856.
- [4] Lu CD. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(3): 261–272.
- [5] Fulde M, Willenborg J, de Greeff A, Benga L, Smith HE, Valentin-Weigand P, Goethe R. ArgR is an essential local transcriptional regulator of the *arcABC* operon in *Streptococcus suis* and is crucial for biological fitness in an acidic environment. *Microbiology*, 2011, 157(2): 572–582.
- [6] Zapras A, Hoffmann T, Wünsche G, Flórez LA, Stülke J, Bremer E. Mutational activation of the RocR activator and of a cryptic *rocDEF* promoter bypass loss of the initial steps of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(3): 701–717.
- [7] Ali NO, Jussset J, Larquet E, Le Cam E, Belitsky B, Sonenshein AL, Msadek T, Débarbouillé M. Specificity of the interaction of RocR with the *rocG-rocA* intergenic region in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 2003, 149(3): 739–750.
- [8] Gardan R, Rapoport G, Débarbouillé M. Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 1997, 24(4): 825–837.
- [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] 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*, 1998, 62(3): 775–806.
- [11] Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and

- tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(7): 2691–2711.
- [12] Heckel DG. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2020, 104(2): e21673.
- [13] Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 2010, 18(5): 189–194.
- [14] Danson AE, Jovanovic M, Buck M, Zhang XD. Mechanisms of σ^{54} -dependent transcription initiation and regulation. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(20): 3960–3974.
- [15] Peng Q, Wang GN, Liu GM, Zhang J, Song FP. Identification of metabolism pathways directly regulated by sigma⁵⁴ factor in *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 407.
- [16] Zhu L, Peng Q, Song FP, Jiang YN, Sun CP, Zhang J, Huang DF. Structure and regulation of the *gab* gene cluster, involved in the γ -aminobutyric acid shunt, are controlled by a σ^{54} factor in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(1): 346–355.
- [17] Peng Q, Yang M, Wang W, Han LL, Wang GN, Wang PY, Zhang J, Song FP. Activation of *gab* cluster transcription in *Bacillus thuringiensis* by γ -aminobutyric acid or succinic semialdehyde is mediated by the sigma 54-dependent transcriptional activator GabR. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1): 306.
- [18] 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.
- [19] Peng Q, Liu CX, Wang B, Yang M, Wu JB, Zhang J, Song FP. Sox transcription in sarcosine utilization is controlled by sigma⁵⁴ and SoxR in *Bacillus thuringiensis* HD73. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 29141.
- [20] Peng Q, Zhao X, Wen JL, Huang MZ, Zhang J, Song FP. Transcription in the acetoin catabolic pathway is regulated by AcoR and CcpA in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Research*, 2020, 235: 126438.
- [21] 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): e00080–13.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Li N, Wen JL, Song FP, Zhang J, Duan JY, Peng Q. Transcription of *dxr1* is controlled by SigH in *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(1): 200–210. (in Chinese)
李娜, 温继龙, 宋福平, 张杰, 段江燕, 彭琦. 苏云金芽胞杆菌 *dxr1* 基因的转录受 SigH 控制. *微生物学报*, 2020, 60(1): 200–210.
- [25] 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.
- [26] Lv J, Zhang X, Gao TT, Cui TT, Peng Q, Zhang J, Song FP. Effect of the *spoIIID* mutation on mother cell lysis in *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(10): 4103–4112.
- [27] Francke C, Groot Kormelink T, Hagemeyer Y, Overmars L, Sluijter V, Moezelaar R, Siezen RJ. Comparative analyses imply that the enigmatic Sigma factor 54 is a central controller of the bacterial exterior. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 385.

Transcription and regulation of *rocE* in *Bacillus thuringiensis*

Xin Zhao^{1,2}, Liangwei Zhang², Fuping Song², Jie Zhang², Jing Li^{1*}, Qi Peng^{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] *rocE* encodes arginine permease in arginine degradation pathway. To determine the mechanism of transcriptional regulation of *rocE*, we analyzed the transcriptional activity of *rocE* in *Bacillus thuringiensis* (Bt). [Methods] Transcriptional units of *rocE* gene cluster were analyzed by RT-PCR. Transcriptional activity of *rocE* promoter (*ProcE*) was analyzed by β -galactosidase assay. *rocE* mutant of Bt HD73 strain was constructed by homologous recombination. The HTH domain of RocR with His fusion protein was purified by HiTrap chelating column. The binding of *rocE* promoter with RocR-HTH protein was verified by electrophoresis mobility shift assays. [Results] Transcriptional activity of *ProcE* was induced by arginine in M9 medium. The transcriptional activity of *ProcE* was sharply decreased in *sigL* (encodes Sigma 54) and *rocR* mutants compared with that in HD73 wild-type in Schaeffer's sporulation medium (SSM) and arginine induced medium. *ProcE* could bind to RocR-HTH protein. Mutation of *rocE* had no significant differences on growth and Cry1Ac protein production. However, the sporulation efficiency of the *rocE* mutant was 65.5%, and that of the HD73 strain was 85.7%. The results of significance analysis show that the difference was significant ($P < 0.05$). [Conclusion] Transcriptional activation of *rocE* is controlled by Sigma 54, and positive regulated by RocR. *rocE* gene is related to sporulation efficiency.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, arginine metabolism, *rocE*, transcriptional regulation

(本文责编: 张晓丽)

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

*Corresponding authors. E-mail: Jing Li, lijing@neau.edu.cn; Qi Peng, qpeng@ippcaas.cn

Received: 28 May 2020; Revised: 21 October 2020; Published online: 13 November 2020