



枯草芽胞杆菌异戊二烯酶 ComQ 的生物信息学分析及对生物膜形态的影响

李伟¹, 吴静¹, 冯静静¹, 汪剑¹, 周梦洁¹, 胡汶松¹, Sokhna mbacke Gningue¹, 薛正莲^{1,2}, 赵世光^{1,2}, 钱森和^{1,2}, 王洲^{1,2}, 刘艳^{1,2*}

1 安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000

2 安徽省工业微生物分子育种工程实验室, 安徽 芜湖 241000

李伟, 吴静, 冯静静, 汪剑, 周梦洁, 胡汶松, Sokhna mbacke Gningue, 薛正莲, 赵世光, 钱森和, 王洲, 刘艳. 枯草芽胞杆菌异戊二烯酶 ComQ 的生物信息学分析及对生物膜形态的影响. *微生物学报*, 2022, 62(2): 533–542.

Li Wei, Wu Jing, Feng Jingjing, Wang Jian, Zhou Mengjie, Hu Wensong, Gningue Sokhna Mbacke, Xue Zhenglian, Zhao Shiguang, Qian Senhe, Wang Zhou, Liu Yan. Bioinformatics analysis of *Bacillus subtilis* isoprene enzyme ComQ and its effect on biofilm morphology. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 533–542.

摘要: 【目的】枯草芽胞杆菌 ComQ 是一种类异戊二烯生物合成酶。利用生物信息学预测分析了 ComQ 的生物学特性, 对 *comQ* 基因进行过表达和敲除, 构建突变菌, 孔板发酵培养验证生物膜形态变化。【方法】运用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 网站里的 Protein 数据库获取 ComQ 蛋白氨基酸序列, 通过在线生物信息学软件预测分析其生物学特征, 包括其理化性质、信号肽、结构域、空间结构等。构建枯草芽胞杆菌 BS168 的 *comQ* 过表达及敲除菌株, 利用孔板发酵培养验证生物膜生长性状。【结果】ComQ 蛋白由 299 个氨基酸组成, 理论相对分子质量约 34 204.08 Da, 无信号肽, 无跨膜区, 为稳定胞内蛋白。通过菌落 PCR, 验证枯草芽胞杆菌 BS168 突变菌构建成功。利用孔板发酵培养枯草芽胞杆菌 BS168 及突变菌株, 验证 ComQ 蛋

基金项目: 国家自然科学基金(31871781, 31772081); 安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2018A0106); 芜湖市科技计划重点项目(2020yf62); 国家级大学生创新创业项目(201910363042, 201810363046); 安徽省大学生创新创业计划项目(201710363178)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31871781, 31772081), by the Key Project of Natural Science Research in Universities of Anhui (KJ2018A0106), by the Key Projects of Wuhu Science and Technology Plan (2020yf62), by the National College Students Innovation and Entrepreneurship Project (201910363042, 201810363046) and by the Anhui College Students innovation and Entrepreneurship Project (201710363178)

*Corresponding author. E-mail: liuyan@ahpu.edu.cn

Received: 27 March 2021; Revised: 20 May 2021; Published online: 1 June 2021

白对枯草芽胞杆菌生物膜的形态形成存在影响。两种突变菌株生物膜形态均与原始菌株存在差异。【结论】通过对 ComQ 蛋白的基本性质、关键氨基酸位点及蛋白结构预测分析, 构建突变菌株, 验证生物膜形态变化, 为后续探究 ComQ 对枯草芽胞杆菌的生长代谢变化奠定了基础。

关键词: 枯草芽胞杆菌; 生物信息学分析; 生物膜; 过表达; 敲除

Bioinformatics analysis of *Bacillus subtilis* isoprene enzyme ComQ and its effect on biofilm morphology

LI Wei¹, WU Jing¹, FENG Jingjing¹, WANG Jian¹, ZHOU Mengjie¹, HU Wensong¹, Sokhna mbacke Gningue¹, XUE Zhenglian^{1,2}, ZHAO Shiguang^{1,2}, QIAN Senhe^{1,2}, WANG Zhou^{1,2}, LIU Yan^{1,2*}

1 College of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

2 Anhui Provincial Engineering Laboratory for Molecular Breeding of Industrial Microbial, Wuhu 241000, Anhui, China

Abstract: [Objective] *Bacillus subtilis* ComQ is a kind of isoprene biosynthesis enzyme. We used bioinformatics to predict and analyze the biological characteristics of ComQ. In addition, we also constructed *comQ* overexpression and knockout mutants to verify their effect on biofilm morphology. [Methods] Firstly, we obtained the amino acid sequence of ComQ protein from the Protein database in the NCBI website. Secondly, we predicted and analyzed the biological characteristics including physical and chemical properties, signal peptide, domain and spatial structure of ComQ by online bioinformatics software. Thirdly, we constructed *comQ* overexpression and knockout strain of *Bacillus subtilis*, and observe their growth characteristics of biofilm by plate fermentation. [Results] ComQ protein was composed of 299 amino acids with a theoretical molecular weight of about 34 204.08 Da. It was a stable intracellular protein without signal peptide and transmembrane region. Colony PCR verified that *Bacillus subtilis* BS168 mutants were constructed successfully. The biofilm morphology of the two mutants was different from that of the original strain BS168. [Conclusion] Through the prediction and analysis of the basic properties, key amino acid sites and protein structure of ComQ protein, the mutant strain was constructed to verify the morphological changes of biofilm, which laid a foundation for the subsequent study of ComQ on the growth and metabolism of *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis*; bioinformatics analysis; biofilm; overexpression; knockout

生物膜(biofilm)是微生物为了适应外部环境, 固定在外界介质表面并被分泌到细胞外的基质所包裹而形成的多细胞群落^[1]。生物膜的形成, 可以帮助微生物抵抗外部恶劣环境压力, 对高温高盐高酸碱环境和抗菌剂均有较高的耐受性^[2-3]。吴静等^[4]通过敲除 *sinR* 基因增强了枯

草芽胞杆菌 BS168 生物膜的形成并且影响了维生素 K₂ 的生成, 表明生物膜对细菌的生长代谢具有重要意义。细菌的群体感应系统(quorum sensing, QS)是细菌根据特定的信号分子浓度监测环境变化, 并调控相关基因表达来适应环境变化的一种现象^[5], 也是调节生物膜形成以及

生物膜生物量变化的重要方式。枯草芽胞杆菌作为革兰氏阳性菌的模式菌,广泛存在于泥土等自然环境中,属于好氧益生菌,被美国认定是公认的安全菌株^[6],并作为工程菌广泛使用在化妆品、保健品及生防抗生素等发酵工业中。研究其群体感应规律,对于研究其他革兰氏阳性菌具有重要的借鉴意义。在枯草芽胞杆菌中,感受态调节系统(competent regulatory system)即 ComXQPA 是重要的群体感应系统,其通过信号分子调控细菌感受态细胞的形成、芽孢的产生、生物膜的形成以及抗生素的产生等。首先 ComQ 蛋白催化合成异戊烯链后修饰给 ComX 前体,产生类异戊二烯类多肽信息素 ComX 信号分子并被分泌到细胞外;当信号浓度在细胞外累积达到某一阈值时,会和膜蛋白组氨酸激酶 ComP 结合,使 ComP 发生磷酸化^[7];磷酸化的 ComP 将磷酸基团转移给转录调控因子 ComA,被磷酸化的 ComA 一方面会激活 *srfA* 操纵子的转录,影响表面活性肽的合成并会让细菌分化进入感受态;另一方面会激活 *degQ* 基因的表达,影响 γ -聚谷氨酸的生成^[8-9]。

异戊烯基合成酶可以合成异戊烯基二磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)的长链产物或香叶酰/法尼酰二磷酸(GPP/FPP),或以香叶酰(C10)-、法尼酰(C15)-或香叶酰香叶酰(C20)-二磷酸为底物进行催化合成反应。这些酶产生大量的前体,用于生成类固醇、胆固醇、倍半萜烯、血红素、类胡萝卜素、类视黄醇和二萜^[10-11]等代谢产物,在古细菌、细菌和真核生物中广泛分布。该超家族中的酶具有相同的“异戊二烯合酶折叠”,并包含几个亚组。根据反应机理,将酶分为 I 类和 II 类,ComQ 属于 isoprenoid biosynthesis enzymes, Class 1。在枯草芽胞杆菌 BS168 中可以催化合成 15 个碳的

异戊二烯链,并修饰 ComX 前体,合成 ComX 信息素。

生物信息学对人们研究蛋白质结构性性质起到重要的预测模拟作用,让科学研究少走很多弯路。童金蓉等^[12]利用生物信息学对副溶血性弧菌脂蛋白定位系统(localization of lipoprotein system, Lol)转运蛋白 LolA-E 及 LolCD2E 是否存在跨膜结构进行了计算分析。丁秀敏等^[13]对纳豆芽胞杆菌 1,4-二羟基-2-萘甲酸聚异戊二烯转移酶 MenA 进行了生物信息学分析,成功预测 MenA 具有跨膜结构,并利用异源表达实验在激光共聚焦显微镜的观测下验证 MenA 属于膜蛋白。异戊烯基合成酶 ComQ 在胞内 Pre-comX 转化为胞外 ComX 信息素的过程中起着重要的修饰作用,该信息素的胞外积累又会启动枯草芽胞杆菌群体感应系统,最终影响枯草芽胞杆菌的外部形态以及内部代谢合成。然而该酶的具体理化特性,以及在枯草芽胞杆菌中的结构信息尚未见报道。因此本文利用生物信息学技术预测了 ComQ 的理化性质、空间结构以及催化位点等信息,在确定了该酶在基因水平上易操作性后,构建了 *comQ* 基因突变株,验证了 *comQ* 过表达及敲除对生物膜形成存在的影响,为后面深入研究 ComQ 对枯草芽胞杆菌群体感应系统和萜类代谢产物的影响奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 JM109、枯草芽胞杆菌 BS168、P7C6 质粒、PDG-CRE 质粒均为本实验室保存。

1.2 ComQ 的基本性质分析

在线分析软件 ProtParam^[14]分析 ComQ 分子结构式、相对分子质量、不稳定系数、脂肪系数、理论等电点、疏水性平均值等一系列理

化性质。利用在线分析软件 TMHMM Server^[15] 预测分析 ComQ 是否存在跨膜结构。利用在线分析软件 SignalP Server^[16] 预测分析 ComQ 蛋白是否存在信号肽。利用在线分析软件 Psortb 3.0 对 ComQ 蛋白在细胞中的定位进行预测。

1.3 ComQ 保守结构域分析及蛋白空间结构预测

利用 NCBI 里的 Conserved Domain Search 分析 ComQ 蛋白超家族的类别、特征氨基酸位点、底物结合口袋等。利用在线分析软件 phyre² 网站进行在线预测分析并构建了 ComQ 的三级结构^[17]。通过 Phyre² 获得 PDB (Protein Data Bank) 格式的 ComQ 模型蛋白质, 再通过 DoGSiteScorer 网站^[18] 在线预测构建了 ComQ 蛋白 FARM (first aspartate rich motif) 及 SARM (second aspartate rich motif) 所在位置及催化口袋。

1.4 ComQ 蛋白调控作用关系网络分析

运用 STRING 数据库对 ComQ 蛋白的调控作用关系网络进行分析。

1.5 构建枯草芽胞杆菌 BS168 *comQ* 过表达及敲除突变菌

根据枯草芽胞杆菌全基因组图谱利用

snapgene 软件设计 3 对引物(表 1), 分别是左同源臂上下游引物、中间部分上下游引物、右同源臂上下游引物。利用融合 PCR 技术将 3 个片段进行连接, 构建方法如图 1, 再使用 spizizen 转化法^[19], 将纯化后的 PCR 产物转化到枯草芽胞杆菌 BS168 感受态细胞中, 涂布培养筛选, 并利用菌液 PCR 验证阳性克隆是否筛选成功, 最后使用 cre/lox 系统^[20] 去除宿主细胞的抗性标记, 最终得到目的菌株。将目的菌株保存备用。

1.6 孔板培养生物膜

将目的菌株在 Luria-Bertani 固体培养基上划线培养, 再挑单菌落进入种子液活化后, 按 2% 的菌液量加入每孔含 2.5 mL 的生物膜生长培养基的孔板中, 放入恒温培养箱进行培养, 测定 72 h 形成的生物膜, 每组样做 3 组平行。

2 结果与分析

2.1 ComQ 基本性质分析

ProtParam 软件显示 ComQ 有 299 个氨基酸, 蛋白质等电点为 5.07, 略偏酸性, 分子量为 34 204.08 Da, 分子式为 C₂₈₃₁H₄₇₆₄N₉₀₀O₁₁₈₉S₁₁₆, 不稳定系数为 35.58, 脂肪系数为 37.67, 疏水性平均值为 0.706。SignalP 软件计算分析发现

表 1 用于基因过表达和敲除的扩增引物

Table 1 Amplified primers for gene overexpression and knockout

Primers	Sequences (5'→3')
L-comQ-F	TGTTTATCAGACTGTTTCGGCT
L-comQ-R	AAATTGTTATCCGCTCTTTCTCCTTGATCCGGACAGAA
comQ-P43C-F	CGGATCAAGGAGAAAGAGCGGATAACAATTTACACAG
comQ-P43C-R	CCACAATCTCCTTCATGTGTACATTCCTCTTTACCTATAATG
R-comQ-F	TAAGAGAGGAATGTACACATGAAGGAGATTGTGGAGCAAA
R-comQ-R	CAGTTTCTTGCACATCAAAACCTA
L-ΔcomQ-F	GAATAAACGAATGCTCAGCATATTTAT
L-ΔcomQ-R	ATCCCCGGGTTTAACTACTTTTAAATTATCCTGAGGCT
ΔcomQ-P43-F	CCTCAGGATAATTTAAAAAGTAGTTAAACCCGGGGATCCTC
ΔcomQ-P43-R	CGGATCAAGGAGAAAGTTCAAGCGAAAACATACCAC
R-ΔcomQ-F	TTTCGCTTGAACCTTTCTCCTTGATCCGGACAG
R-ΔcomQ-R	CTTATAGTTTGTATCAGACTGTTTCGG

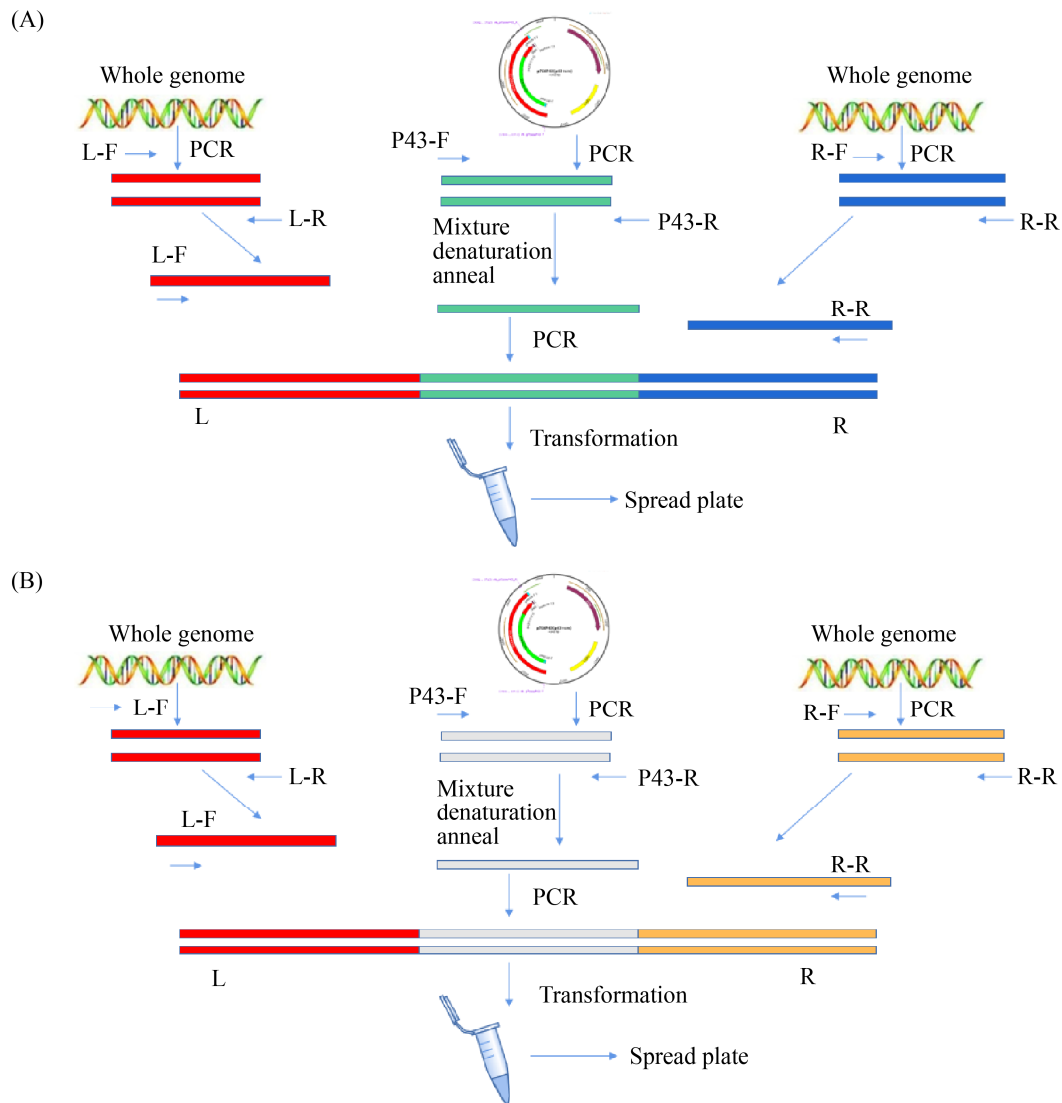


图 1 构建枯草芽胞杆菌 BS168 突变菌步骤图

Figure 1 Construction of *Bacillus subtilis* BS168 mutant. A: the step diagram of constructing *comQ* knockout strain. Red fragment: upstream fragment of *comQ*, green fragment: P7C6P43 truncated fragment, blue fragment: downstream fragment of *comQ*. B: the step diagram of *comQ* overexpressing strain. Red fragment: upstream fragment of *comQ*, gray fragment: P7C6P43 gene, yellow fragment: *comQ* and downstream fragment of *comQ*.

ComQ 不存在信号肽^[21], 故不属于分泌型蛋白。TMHMM 软件预测显示该蛋白无跨膜结构。Psortb 3.0 软件结果显示 ComQ 的亚细胞定位分布于细胞质中。综上, 初步确定 ComQ 为疏水性蛋白质, 且非膜蛋白^[22]。

2.2 ComQ 保守结构域及三级结构预测

结构域^[23] (domain) 是位于超二级结构和三级结构间的一个层次。利用 NCBI 中的 CDD (conserved domain database) 数据库分析, ComQ 蛋白具有 2 个特征性天冬氨酸富集区 (图 2)。

其中氨基酸序列在 67–71 aa 处存在 DDxxD 的高度保守结构，为天冬氨酸富集区 1 (aspartate-rich region 1)，又被称为 FARM (first aspartate rich motif)。氨基酸序列在 186–189 aa 和 194–198 aa 处为天冬氨酸富集区 2 (aspartate-rich region 2)，又被称为 SARM (second aspartate rich motif)。这些残基通过桥接 Mg^{2+} 来介导磷酸戊烯基的结合，诱导了可能的构象变化，使活性位点接近溶剂，稳定了活性碳正离子中间体^[24]。Substrat- Mg^{2+} 结合位点 (substrate- Mg^{2+} binding site) 由天门冬氨酸富集区 1 和 2 组成。Asp-rich 区域 1 的第 1 和第 3 Asp 配位 2 个 Mg^{2+} ，第 3 个 Mg^{2+} 由萜类环化酶富含 asp 区 2 的保守残基 [ND]XXX[ST]XXXE 进行配位。通过 Mg^{2+} 结合底物的二磷酸部分，促进焦磷酸释放。

枯草芽胞杆菌 ComQ 蛋白晶体结构是以荚膜红杆菌的一种十烯基二磷酸合酶(图 3A)的晶体结构(PDB ID 为 3MZV)作为模板在线模拟分

析。ComQ 有 289 个氨基酸，单个最高评分模板以 100% 的置信度建模，覆盖率达到 97%。由模拟结果可知，ComQ 具有 10 个 α 螺旋(图 3B)。ComQ 是一种类异戊二烯生物合成酶^[25]，一般来说，这个家族的酶都表现为全反式反应途径，只有顺反式萜环化酶、三聚二烯合成酶例外^[26]。利用 DoGSiteScorer 在线分析软件，模拟出 2 个天冬氨酸富集区在 ComQ 三级结构的位置(图 4A)。其催化部位由一个大的中心腔组成，该中心腔主要由反平行的 α 螺旋形成(图 4B)。

2.3 comQ 相互作用网络

通过 STRING 构建了 *comQ* 基因相互作用网络(图 5)，发现其不仅与 *com* 其他基因组成 ComXQPA 群体感应系统，还和 *spo0A* 基因及 *degQ* 双组分调控基因存在相互作用。而 *spo0A* 基因对于调控枯草芽胞杆菌体内萜类代谢产物合成、*degQ* 双组分调控基因对于调控聚谷氨酸生产都具有重要作用^[27]。基因之间关系网络线条越多，表明调控作用越紧密。

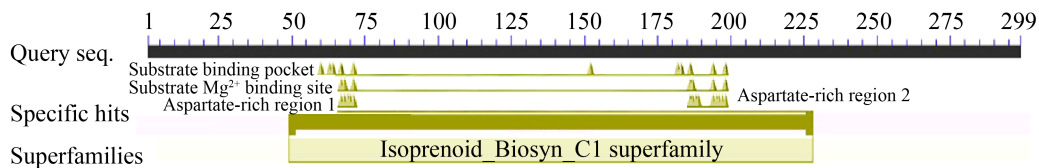


图 2 ComQ 保守结构域示意图

Figure 2 Schematic diagram of conservative domain of ComQ.

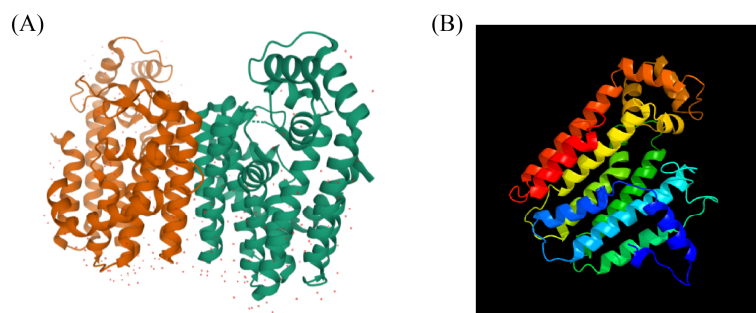


图 3 ComQ 模板和 ComQ 结构示意图

Figure 3 ComQ template and ComQ structure diagram. A: the tertiary structure of ten alkenyl diphosphate synthase in *E. perfringens*. B: the tertiary structure of ComQ in *B. subtilis*.

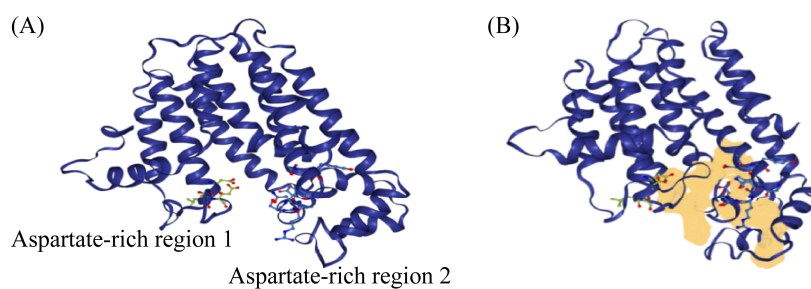


图 4 天冬氨酸富集区和底物催化口袋示意图

Figure 4 Schematic diagram of aspartic acid enrichment area and substrate catalytic pocket. A: aspartic acid enrichment region; B: substrate catalytic pocket.

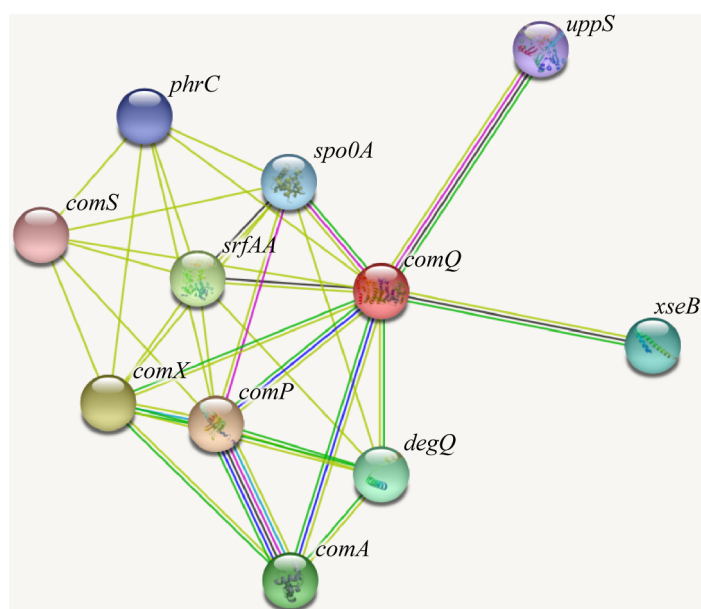


图 5 *comQ* 与其他基因的相互作用网络

Figure 5 Interaction network between *comQ* and other genes.

2.4 突变菌的构建

为验证 *comQ* 基因改造对生物膜形成的影响, 按照 1.5 中所设计的引物及实验方法, 构建 *comQ* 敲除及过表达菌株。采用 spizizen 转化法将融合 PCR 得到的目的基因转化到枯草芽胞杆菌中。再将得到的阳性克隆用抗性平板验证, 挑取单菌落进行菌落 PCR^[28]验证(图 6), 得到的阳性克隆去除抗性。将得到的菌株经过测序, 用软件 DNAMAN 比对, 显示 *comQ* 基因过表达和敲除菌株均成功构建。

2.5 相同条件下 BS168、BS168-*comQ* 及 BS168-*ΔcomQ* 生物膜形态对照

3 株菌株生物膜形态差异明显。相比原始菌枯草芽胞杆菌 BS168 的生物膜(图 7A), *comQ* 过表达突变菌株褶皱程度最深, 褶皱最细(图 7B)。意外的是, *comQ* 基因敲除之后, 枯草芽胞杆菌也能形成生物膜, 但褶皱程度最浅, 褶皱最宽(图 7C)。原因可能是生物膜由胞外蛋白、胞外多糖、胞外 DNA 组成, 3 株菌生物膜中 3 种组成物质的含量引起了生物膜形态结构

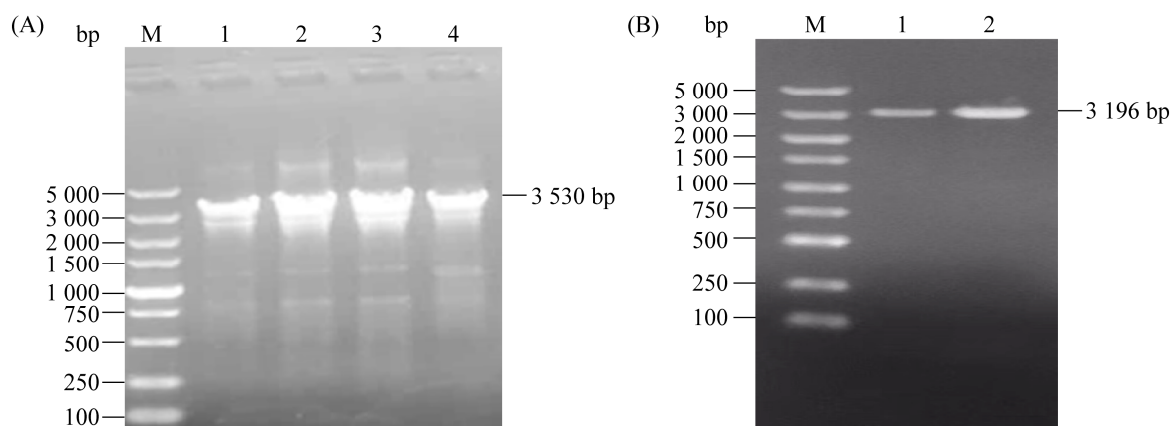


图 6 菌落 PCR

Figure 6 Colony PCR. A: fusion PCR fragments of *comQ* overexpression; B: fusion PCR fragment of *comQ* knocking out.

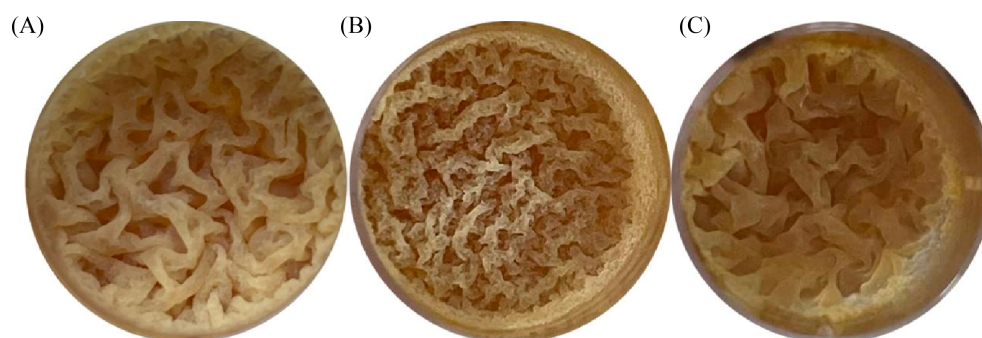


图 7 枯草芽胞杆菌原始菌及突变菌的不同生物膜形态

Figure 7 The biofilm morphology of *Bacillus subtilis* BS168 (A), *comQ* overexpression strain (B), and *comQ* knock out strain (C).

发生变化；也有可能是一些次级代谢产物的产生，影响了生物膜的形态。有文献报道，生物膜褶皱的程度与毒素产生有关，特别是 SKF (sporulation killing factor)，会促进细胞外基质的增加^[29]，导致褶皱变多。

3 结论与展望

根据生物膜形态实验的分析验证，说明 ComQ 蛋白对枯草芽胞杆菌生物膜的形成存在明显作用。结合枯草芽胞杆菌突变菌生物膜形态的区别，可以看出 *comQ* 基因的改造影响了

枯草芽胞杆菌群体感应系统的调控。大胆推测，ComQ 蛋白与枯草芽胞杆菌胞外代谢产品的生产存在一定作用。后期可从 γ -聚谷氨酸、纳豆激酶及胞外抗生素的生产变化来验证 *comQ* 对群体感应系统的具体影响；结合生物信息学分析，还可以从改变底物-Mg²⁺结合位点、天冬氨酸富集区等特征氨基酸位点对 ComQ 进行定向改造优化从而提高 ComQ 的表达量，为后期获得大量纯品 ComQ 以及晶体结构的研究奠定基础，更为研究这种类异戊二烯合成酶超家族蛋白酶提供有用数据。

参考文献

- [1] Kocot AM, Olszewska MA. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *LWT*, 2017, 84: 47–57.
- [2] Han N, Mizan MFR, Jahid IK, Ha SD. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. *Food Control*, 2016, 70: 161–166.
- [3] 冯静静, 杨自名, 吴静, 李伟, Sokhna Mbacke Gningue, 赵礼军, 周文豪, 薛正莲, 王洲, 刘艳. 培养条件及表面活性剂的添加对纳豆芽孢杆菌生物膜形成的影响. *食品与发酵工业*, 2020, 46(3): 90–96. Feng JJ, Yang ZM, Wu J, Li W, Gningue S, Zhao LJ, Zhou WH, Xue ZL, Wang Z, Liu Y. The effects of culture conditions and surfactants on the biofilm formation of *Bacillus subtilis natto*. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(3): 90–96. (in Chinese)
- [4] 吴静, 李伟, 冯静静, 周梦洁, 胡汶松, 汪剑, Sokhnambacke Gningue, 吴佳雯, 赵礼军, 徐文瀚, 薛正莲, 王洲, 刘艳. 不同培养条件对枯草芽孢杆菌 BS168- Δ sinR 生物膜形成及维生素 K₂ 产量的影响. *食品与发酵工业*, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1802.TS.20210207.0914.002.html> Wu J, Li W, Feng JJ, Zhou MJ, Hu WS, Wang J, Gningue S, Wu JW, Zhao LJ, Xu WH, Xue ZL, Wang Z, Liu Y. Effect of different cultivated conditions on biofilm formation and menaquinone synthesis of *Bacillus subtilis* BS168- Δ sinR. *Food and Fermentation Industries*, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1802.TS.20210207.0914.002.html> (in Chinese)
- [5] Yi L, Dong X, Grenier D, Wang KC, Wang Y. Research progress of bacterial quorum sensing receptors: classification, structure, function and characteristics. *Science of the Total Environment*, 2021, 763: 143031.
- [6] Wu YM, Chen XH, Wang L, Wu LJ, Lin L, Ding WW, Che ZM, Wang JF, Li JZ, Liu Y, Sun WF. Safe preparation of beefy meaty peptide with *Bacillus subtilis*. *International Journal of Food Science & Technology*, 2020, 55(4): 1825–1832.
- [7] 孙锋, 严慧聪, 汪美贞. 细菌群体感应调控多样性及群体感应淬灭. *微生物学报*, 2019, 59(3): 454–467. Sun F, Yan HC, Wang MZ. Advance of the diversity of bacterial quorum sensing and quorum quenching. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(3): 454–467. (in Chinese)
- [8] Hirooka K, Shioda S, Okada M. Identification of critical residues for the catalytic activity of ComQ, a *Bacillus* prenylation enzyme for quorum sensing, by using a simple bioassay system. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2020, 84(2): 347–357.
- [9] 王培培, 郭庆港, 李社增, 鹿秀云, 张晓云, 马平. 群体感应调控因子 ComA 对枯草芽孢杆菌 NCD-2 抑菌物质产生和生物膜形成的影响. *植物保护学报*, 2016, 43(2): 193–200. Wang PP, Guo QG, Li SZ, Lu XY, Zhang XY, Ma P. Functional analysis of quorum sensing regulator ComA on the production of antifungal active compounds and biofilm formation in *Bacillus subtilis* NCD-2. *Journal of Plant Protection*, 2016, 43(2): 193–200. (in Chinese)
- [10] Chen CC, Zhang LL, Yu XJ, Ma LX, Ko TP, Guo RT. Versatile cis-isoprenyl diphosphate synthase superfamily members in catalyzing carbon-carbon bond formation. *ACS Catalysis*, 2020, 10(8): 4717–4725.
- [11] Wallrapp FH, Pan JJ, Ramamoorthy G, Almonacid DE, Hillerich BS, Seidel R, Patskovsky Y, Babbitt PC, Almo SC, Jacobson MP, Poulter CD. Prediction of function for the polyprenyl transferase subgroup in the isoprenoid synthase superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(13): E1196–E1202.
- [12] 童金蓉, 张昭寰, 黄振华, 刘海泉, 潘迎捷, 赵勇. 副溶血性弧菌脂蛋白定位系统转运蛋白结构与功能的生物信息学分析. *微生物学报*, 2020, 60(10): 2242–2252. Tong JR, Zhang ZH, Huang ZH, Liu HQ, Pan YJ, Zhao Y. Bioinformatics analysis for structure and function of localization of lipoprotein system transporters in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(10): 2242–2252. (in Chinese)
- [13] 丁秀敏, 薛正莲, 王洲, 杨自名, 冯静静, 吴佳雯, 胡润, 章宁娟, 刘艳. 纳豆芽孢杆菌 MenA 的生物信息学分析及亚细胞定位. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(10): 4604–4613. Ding XM, Xue ZL, Wang Z, Yang ZM, Feng JJ, Wu JW, Hu R, Zhang NJ, Liu Y. Bioinformatics analysis and subcellular localization of MenA in *Bacillus subtilis natto*. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(10): 4604–4613. (in Chinese)
- [14] Garg VK, Avashthi H, Tiwari A, Jain PA, Ramkete PWR, Kayastha AM, Singh VK. MFPPi-multi FASTA ProtParam interface. *Bioinformatics*, 2016, 12(2): 74–77.

- [15] Darabi M, Seddigh S. Structural, functional, and phylogenetic characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in C4 and CAM plants. *Caryologia*, 2018, 71(3): 272–288.
- [16] Yarabbi H, Mortazavi SA, Yavarmanesh M, Javadmanesh A. *In silico* study of different signal peptides to express recombinant glutamate decarboxylase in the outer membrane of *Escherichia coli*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2020, 26(4): 1879–1891.
- [17] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre² web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845–858.
- [18] Volkamer A, Kuhn D, Rippmann F, Rarey M. DoGSiteScorer: a web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment. *Bioinformatics*, 2012, 28(15): 2074–2075.
- [19] Akamatsu T, Taguchi H. Plasmid transformation of competent *Bacillus subtilis* by lysed protoplast DNA. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 114(2): 138–143.
- [20] 龙定沛, 谭兵, 赵爱春, 许龙霞, 向仲怀. Cre/lox 位点特异性重组系统在高等真核生物中的研究进展. *遗传*, 2012, 34(2): 177–189.
Long DP, Tan B, Zhao AC, Xu LX, Xiang ZH. Progress in Cre/lox site-specific recombination system in higher eukaryotes. *Hereditas*, 2012, 34(2): 177–189. (in Chinese)
- [21] Khadye VS, Sawant S, Shaikh K, Srivastava R, Chandrayan S, Odaneth AA. Optimal secretion of thermostable beta-glucosidase in *Bacillus subtilis* by signal peptide optimization. *Protein Expression and Purification*, 2021, 182: 105843.
- [22] Wagner S, Bader ML, Drew D, de Gier JW. Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(8): 364–371.
- [23] Janke C, Gaida S, Jennewein S. The production of isoprene from cellulose using recombinant *Clostridium cellulolyticum* strains expressing isoprene synthase. *Microbiology Open*, 2020, 9(4): e1008.
- [24] Josts I, Stubenrauch CJ, Vadlamani G, Mosbahi K, Walker D, Lithgow T, Grinter R. The structure of a conserved domain of TamB reveals a hydrophobic β taco fold. *Structure*, 2017, 25(12): 1898–1906. e5.
- [25] Malico AA, Calzini MA, Gayen AK, Williams GJ. Synthetic biology, combinatorial biosynthesis, and chemo-enzymatic synthesis of isoprenoids. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(9/10): 675–702.
- [26] Chen CC, Zhang LL, Yu XJ, Ma LX, Ko TP, Guo RT. Versatile cis-isoprenyl diphosphate synthase superfamily members in catalyzing carbon-carbon bond formation. *ACS Catalysis*, 2020, 10(8): 4717–4725.
- [27] Hong LTT, Hachiya T, Hase S, Shiwa Y, Yoshikawa H, Sakakibara Y, Nguyen SLT, Kimura K. Poly- γ -glutamic acid production of *Bacillus subtilis* (natto) in the absence of DegQ: a gain-of-function mutation in *yabJ* gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(6): 690–696.
- [28] 陈书霞, 王晓武, 房玉林. 单菌落 PCR 法直接快速鉴定重组克隆. *微生物学通报*, 2006, 33(3): 52–56.
Chen SX, Wang XW, Fang YL. Rapid characterization of recombination clone by PCR screening of individual bacterial colonies. *Microbiology China*, 2006, 33(3): 52–56. (in Chinese)
- [29] López D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(3): 609–618.

(本文责编 张晓丽)