



# 地衣芽孢杆菌 9945a 转运蛋白 YdgF1 的功能鉴定

李舜岩, 李由然, 石贵阳\*

江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

李舜岩, 李由然, 石贵阳. 地衣芽孢杆菌 9945a 转运蛋白 YdgF1 的功能鉴定[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1618-1629.

LI Shunyan, LI Youran, SHI Guiyang. Functional characterization of the transporter YdgF1 in *Bacillus licheniformis* 9945a[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1618-1629.

**摘要:** 【目的】本研究对地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 9945a 菌株中 *ydgF1* 基因编码的转运蛋白进行功能鉴定。【方法】分别构建 *ydgF1* 基因过表达株 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 和敲除株 9945a  $\Delta$ *ydgF1*, 设计了以 D-丙氨酸为唯一氮源的磷酸盐 D-丙氨酸(phosphate D-alanine, PDA) 培养基来考察菌株的生长能力, 并进行细胞吸收实验。利用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 评价菌株 9945a 与 9945a  $\Delta$ *ydgF1* 在 LB 培养基中不同生长时期 *ydgF1* 的相对表达量, 然后对 9945a 与 9945a  $\Delta$ *ydgF1* 后期的培养基平板活菌计数, 计算菌落形成单位(colony-forming units, CFU)。【结果】在 PDA 培养基中, 9945a  $\Delta$ *ydgF1* 的比生长速率始终低于 9945a, 而 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 最大比生长速率为  $0.336 \text{ h}^{-1}$ , 是 9945a/pHY300-Shu 的 1.98 倍, 并且培养 15 h 后 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 的  $OD_{600}$  值为 3.04, 是 9945a/pHY300-Shu 的 1.73 倍。细胞吸收实验中, 9945a  $\Delta$ *ydgF1* 吸收 D-丙氨酸的浓度为  $(0.509 \pm 0.055) \text{ g/L}$ , 明显低于 9945a 吸收的  $(0.759 \pm 0.038) \text{ g/L}$ 。9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 吸收浓度为  $(0.821 \pm 0.021) \text{ g/L}$ , 略高于 9945a。实时荧光定量 PCR 的结果表明, 9945a 的 *ydgF1* 相对表达量在转换期和稳定期逐渐提高, 9945a  $\Delta$ *ydgF1* 的 *ydgF1* 相对表达量在不同生长时期几乎都为 0。9945a 与 9945a  $\Delta$ *ydgF1* 后期的 CFU 显示 *ydgF1* 的敲除减弱了地衣芽孢杆菌 9945a 后期的生存能力。【结论】YdgF1 在地衣芽孢杆菌 9945a 中参与 D-丙氨酸吸收, 有利于地衣芽孢杆菌 9945a 的长期生存。此外还发现 YdgF1 可能参与 L-天冬酰胺吸收。

**关键词:** 地衣芽孢杆菌; 氨基酸转运蛋白; 温敏质粒; D-丙氨酸

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0907704)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0907704).

\*Corresponding author. Tel: +86-510-85918235, E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-09-14; Accepted: 2022-11-14; Published online: 2022-11-22

# Functional characterization of the transporter YdgF1 in *Bacillus licheniformis* 9945a

LI Shunyan, LI Youran, SHI Guiyang\*

National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] To characterize the function of the transporter encoded by *ydgF1* in *Bacillus licheniformis* 9945a. [Methods] The strain 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* with *ydgF1* being overexpressed and the strain 9945a  $\Delta$ *ydgF1* with *ydgF1* knocked out were constructed. Phosphate D-alanine (PDA) medium with D-alanine as the sole nitrogen source was designed to observe the growth ability of strains, and cell assimilating experiments were implemented. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) evaluated the relative expression of *ydgF1* in 9945a and 9945a  $\Delta$ *ydgF1* at different growth phases in the LB medium. Colony forming units (CFU) of 9945a and 9945a  $\Delta$ *ydgF1* at the anaphase in the LB medium were determined by viable plate counting. [Results] In the PDA medium, the specific growth rate of 9945a  $\Delta$ *ydgF1* was always lower than that of 9945a, while the maximum specific growth rate of 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* was  $0.336 \text{ h}^{-1}$ , which was 1.98 times that of 9945a/pHY300-Shu.  $OD_{600}$  of 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* was 3.04 after culturing for 15 h, which was 1.73 times that of 9945a/pHY300-Shu. In cell assimilating experiments, the concentration of D-alanine assimilated by 9945a  $\Delta$ *ydgF1* was  $(0.509 \pm 0.055) \text{ g/L}$ , which was significantly lower than  $(0.759 \pm 0.038) \text{ g/L}$  assimilated by 9945a. 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* assimilated  $(0.821 \pm 0.021) \text{ g/L}$ , slightly higher than 9945a. The results of RT-qPCR showed the relative expression of *ydgF1* in 9945a increased gradually at the transition and stationary phases, and the relative expression of *ydgF1* in 9945a  $\Delta$ *ydgF1* was almost zero at all different growth phases. CFU of 9945a and 9945a  $\Delta$ *ydgF1* at the anaphase suggested that the knockout of *ydgF1* weakened the viability of *B. licheniformis* 9945a in the anaphase. [Conclusion] YdgF1 assimilates D-alanine in *B. licheniformis* 9945a, which is beneficial to the long-term survival of *B. licheniformis* 9945a. In addition, it may also assimilate L-asparagine.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*; amino acid transporter; thermosensitive plasmid; D-alanine

氨基酸转运蛋白普遍存在于原核生物中,氨基酸的分泌和吸收由氨基酸转运蛋白介导。原核生物的氨基酸转运以主动转运为主<sup>[1]</sup>,主动转运分为初级主动转运和次级主动转运,前者直接消耗 ATP 能量转运氨基酸,通常被称为 ATP 结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)<sup>[2]</sup>;后者利用离子泵消耗 ATP 能量形成的跨膜电化

学势转运氨基酸<sup>[3]</sup>。

D-丙氨酸作为肽聚糖的重要组分<sup>[4]</sup>,是革兰氏阳性菌生长所必需的氨基酸。革兰氏阳性菌主要通过 D-丙氨酸消旋酶转化 L-丙氨酸获得 D-丙氨酸<sup>[5]</sup>;也会通过氨基酸转运蛋白从胞外环境吸收 D-丙氨酸,胞外游离的 D-丙氨酸是肽聚糖交联时释放的<sup>[6-7]</sup>。Sidiq 等<sup>[8]</sup>报道了枯草芽孢杆菌

168CA 的丙氨酸代谢途径, 发现由 *ytnA* 基因编码的转运蛋白 AlaP 吸收胞外游离的 D-丙氨酸。乳酸乳球菌的 SerP2 转运蛋白被鉴定出与 AlaP 相同的功能<sup>[9]</sup>。与枯草芽孢杆菌、乳酸乳球菌同为革兰氏阳性菌的地衣芽孢杆菌尚未有转运蛋白被报道有吸收 D-丙氨酸的功能。寻找地衣芽孢杆菌中吸收 D-丙氨酸的转运蛋白并鉴定其功能可以拓展地衣芽孢杆菌的丙氨酸代谢途径, 了解该转运蛋白在地衣芽孢杆菌生理活动中的作用。

本研究使用 BLAST 在地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 9945a 的基因组中寻找 1 个转运蛋白基因 *ydgF1* (region: 615 967–617 349), 构建过表达株 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 和敲除株 9945a  $\Delta$ *ydgF1*。设置 2 个生长比较组: 敲除比较组 9945a:9945a  $\Delta$ *ydgF1* 和过表达比较组 9945a/pHY300-Shu:9945a/pHY300-Shu-*ydgF1*, 比较 2 组菌株在以 D-丙氨酸为唯一氮源的基本培养基中的生长差异。然后对 9945a、9945a  $\Delta$ *ydgF1*、9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 进行细胞吸收实验。另外采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 技术评价 9945a、9945a  $\Delta$ *ydgF1* 在 LB 培养基中不同生长时期 *ydgF1* 基因的相对表达量, 并采用平板活菌计数的方法检测后期培养基的菌落形成单位

(colony-forming units, CFU)。通过上述实验初步鉴定转运蛋白 *YdgF1* 的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109, 地衣芽孢杆菌 9945a, 穿梭质粒 pHY300PLK 和 pMA5, 温敏质粒 pNZTT 由实验室保藏。启动子  $P_{shuttle09}$ <sup>[10]</sup> 基因片段由金唯智生物科技有限公司合成。

#### 1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 (*Bam*H I、*Xho* I、*Hind* III、*Sal* I、*Pst* I、*Eco*R I) 购自赛默飞世尔科技公司; T4 DNA 连接酶购自宝日医生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、反转录试剂组、荧光定量 PCR 试剂购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 总 RNA 提取试剂盒购自杭州博日科技股份有限公司; 蛋白胨、酵母粉购自上海金畔生物科技有限公司; 其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.3 引物

本研究用于扩增的引物见表 1, 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

本研究用于实时荧光定量 PCR 的引物见表 2, 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 本研究用于扩增的引物

Table 1 Primers used for amplification in this study

Primer name	Restriction site	Primer sequence (5'→3')
Shu-F	<i>Hind</i> III	CAAGCTTGATCGTCACAATGCGCCATC
Shu-R	<i>Sal</i> I	ACGCGTCGACGGATCCCACTTTATGGACG
<i>ydgF1</i> -F	<i>Bam</i> H I	CGGGATCCATGACAGAAGATGTAAGTACAACGATATAC
<i>ydgF1</i> -R	<i>Eco</i> R I	CGGAATTCTACACTTGCTGTGACTTAGGTTTCCTCAG
$\Delta$ <i>ydgF1</i> -F	<i>Xho</i> I	GGCTCGAGCACGCTGTCCAAACAGACGGATATG
$\Delta$ <i>ydgF1</i> -R	<i>Pst</i> I	GGCTGCAGCGAGTATATCATCCGGCTCGTG
Kan-F	<i>Sal</i> I	CCGTCGACGGCCAGTTTGTGAAGATTAGATGC
Kan-R	<i>Hind</i> III	CGAAGCTTCCAACATGATTAACAATTATTAGAGGTCATCG

表 2 本研究用于实时荧光定量 PCR 的引物  
Table 2 Primers used for RT-qPCR in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
RTa-F	GCAAGTCAAACCTTGCGAAAG
RTa-R	GTAGACTGTCCCGCCTTGAA
RTb-F	GTCGGAACCGGAATGGAGTA
RTb-R	CCTTTGACTTTCTGGCCGTC
RTe-F	AACGGACACGTAGGATTCGG
RTe-R	CGTCCGATGATTTCTGTGTGG
RTf-F	TGTCAGGGACTACTTAGGCGA
RTf-R	CAGCCATTGCGGTACATCAG

#### 1.1.4 缓冲液与培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 固体平板加入琼脂粉 15。磷酸缓冲液(g/L): NaCl 10, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3。磷酸盐 D-丙氨酸 (phosphate D-alanine, PDA) 培养基 (g/L): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.232, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.000, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.000, 葡萄糖 10.000, D-丙氨酸 5。磷酸 L-天冬酰胺 (phosphate L-asparagine, PLN) 培养基 (g/L): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.232, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.000, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.000, 葡萄糖 10.000, L-天冬酰胺 5.000。在菌株构建和摇瓶培养时添加的氨苄青霉素终浓度为 100 μg/mL、卡那霉素终浓度为 30 μg/mL、四环素终浓度为 20 μg/mL。

#### 1.2 搜索 D-丙氨酸转运蛋白基因

地衣芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌生理特征相似, 使用 BLAST 的 tblastn 序列比对枯草芽孢杆菌 *ytnA* 基因编码的蛋白, 在地衣芽孢杆菌 9945a 基因组中找到高度相似的 *ydgF1* 基因 (region: 615 967–617 349), 阳性达 72%。使用 SWISS-MODEL 软件对该基因编码的蛋白进行建模, 结果显示 YdgF1 属于 APC 超家族次级转运蛋白。使用 Protparam 程序分析其基本理化性质, 该蛋白有 460 个氨基酸残基, 分子量为 51.16 kDa, 理论等电点为 9.19。TMHMM 预测 YdgF1 有 12 个跨膜片段, 与 SWISS-MODEL 的建模结果一致。

#### 1.3 *ydgF1* 过表达菌株构建

利用引物 Shu-F 和 Shu-R 扩增组成型启动子 P<sub>shuttle09</sub>, P<sub>shuttle09</sub> 片段与穿梭质粒 pHY300PLK 经 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切后用 T4 DNA 连接酶连接, 转化至大肠杆菌 JM109 感受态。菌落 PCR 筛选转化子, 培养并提取质粒 pHY300-Shu。以地衣芽孢杆菌 9945a 基因组为模板, 利用引物 *ydgF1*-F 和 *ydgF1*-R 扩增 *ydgF1* 基因, *ydgF1* 片段与质粒 pHY300-Shu 经 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切后连接、转化、筛选转化子, 培养并提取质粒 pHY300-Shu-*ydgF1*。将重组质粒 pHY300-Shu 和 pHY300-Shu-*ydgF1* 分别电转化<sup>[11]</sup>地衣芽孢杆菌 9945a 感受态。筛选转化子, 培养并提取质粒进行双酶切验证。同时, 送样测序检查序列, 若未有突变, 则 9945a/pHY300-Shu 和 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 菌株构建成功。

#### 1.4 *ydgF1* 敲除菌株构建

以地衣芽孢杆菌 9945a 基因组为模板, 用引物 Δ*ydgF1*-F 和 Δ*ydgF1*-R 扩增 Δ*ydgF1* 片段 (region: 616 393–617 633)。Δ*ydgF1* 片段与温敏质粒 pNZTT 经 *Xho* I 和 *Pst* I 双酶切后连接, 获得 pNZTT-Y。以质粒 pMA5 为模板, 用引物 Kan-F 和 Kan-R 扩增卡那霉素抗性基因片段, 经 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切连接到 pNZTT-Y 上得到 pNZTT-YK, 送样测序确认敲除质粒构建完成。将 pNZTT-YK 电转化地衣芽孢杆菌 9945a 感受态, 30 °C、200 r/min 复苏活化 2 h; 转接 300 μL 复苏后的菌液至无抗 LB 培养基, 42 °C、250 r/min 培养 16 h。温敏质粒在 42 °C 下无法复制, 敲除盒一侧的同源臂与 *ydgF1* 基因发生同源重组, 整个敲除质粒被线性重组到基因组; 然后在卡那霉素抗性平板上划线, 37 °C 培养。挑取单菌落接种至含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C、250 r/min 培养 16 h; 转接 150 μL 菌液至无抗 LB 培养基, 30 °C、200 r/min 培养 24 h, 再转接无

抗培养 1 次。30 °C 无抗培养诱导复制子滚环复制, 敲除盒另一侧的同源臂和 *ydgF1* 基因发生同源重组, 2 次同源重组使得敲除盒片段替换了原始片段<sup>[12-13]</sup>; 双蒸水稀释菌液 10<sup>5</sup> 倍, 涂布于卡那霉素抗性平板, 37 °C 培养。挑取若干单菌落到新的卡那霉素抗性平板上正筛选, 并一一对应划线接种至四环素抗性平板负筛选<sup>[14]</sup>。对筛选出的单菌落进行验证, 若卡那霉素抗性片段插入 *ydgF1* 基因中, 则 9945a  $\Delta$ ydgF1 菌株构建成功。

### 1.5 基本培养基生长比较

本研究参考先前报道<sup>[15-16]</sup>, 设计了 PDA 培养基。PDA 培养基中仅含有葡萄糖、无机盐、D-丙氨酸供菌株生长。设置 2 个生长比较组: 敲除比较组 9945a:9945a  $\Delta$ ydgF1 和过表达比较组 9945a/pHY300-Shu:9945a/pHY300-Shu-ydgF1。敲除比较组用无抗平板划线活化, 接种单菌落至 15 mL/50 mL 的 LB 培养基无抗预培养; 过表达比较组用四环素抗性平板划线活化, 添加四环素预培养。预培养至  $OD_{600}$  值达到 3 时, 用 5 mL 离心管收集细胞, 移去上清液。将收集得到的细胞接种至 30 mL/250 mL 的 PDA 培养基中, 培养条件均为 37 °C、250 r/min。每 3 h 取样 100  $\mu$ L 测定  $OD_{600}$ 。使用 Origin 2022 绘制  $OD_{600}$  的散点图, 用 Logistic 模型非线性拟合生长曲线, 对生长曲线进行求导得到比生长速率曲线。

### 1.6 细胞吸收实验

将菌株 9945a、9945a  $\Delta$ ydgF1 和 9945a/pHY300-Shu-ydgF1 接种至 30 mL/250 mL 的 LB 培养基培养, 待细胞生长达到稳定期后用 50 mL 离心管 11 500 r/min、10 min 离心收集细胞, 移去上清。用 8 mL 磷酸缓冲液重悬细胞, 37 °C、250 r/min 振荡 2 h, 离心弃上清, 称重减去离心管的空管质量, 确保细胞湿重为 (1 000 $\pm$ 50) mg。再加入 8 mL 磷酸缓冲液重悬, 用移液枪转移菌液至新的 50 mL 离心管, 并补充磷酸缓冲液至总体积

9 mL, 最后加入 1 mL 的 50 g/L D-丙氨酸, 37 °C、250 r/min 振荡 30 min。吸收实验前后各取样 100  $\mu$ L, 离心吸取上清液待测。

### 1.7 D-丙氨酸浓度表征方法

为检测样品中 D-丙氨酸的浓度, 参考先前报道<sup>[17]</sup>结合本研究需要设计了 1 种高效液相色谱表征方法。使用 Marfey 试剂 (CAS: 95712-52-3) 进行柱前衍生: 将待测样稀释 10 倍后取 100  $\mu$ L, 与 200  $\mu$ L 的 0.3% (质量体积分数) Marfey 试剂的丙酮溶液混合, 加入 40  $\mu$ L 的 1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 后 37 °C、200 r/min 振荡反应 1 h, 最后加入 20  $\mu$ L 的 2 mol/L HCl 终止反应。选择 Dikma<sup>®</sup> Spursil C<sub>18</sub> 色谱柱以 0.1% (体积分数) 甲酸和纯乙腈为流动相, 0.9 mL/min 梯度洗脱分离, 洗脱梯度见表 3。20 °C 柱温下检测波长 340 nm 处的吸收峰。液相色谱分离的结果由液相色谱系统配套的工作站软件 Thermo Scientific Chromeleon 分析。

### 1.8 实时荧光定量 PCR 评价不同生长时期基因 *ydgF1* 相对表达量

将菌株 9945a 接种至 LB 培养基培养 6 h, 取样离心收集细胞, 提取总 RNA 然后反转录获得 cDNA。选择 *rpsE*<sup>[18]</sup>、*rpoB*<sup>[19]</sup>、*mecA*<sup>[20]</sup> 作为候选内参基因, 设计引物并验证扩增效率。绘制 9945a 与 9945a  $\Delta$ ydgF1 在 LB 培养基中的生长曲线, 分别在菌株生长过程的迟缓期、对数期、转换期、稳定期取样。然后以不同时期 cDNA 的 5 倍稀释液为模版, 实时荧光定量 PCR 得到循环数阈值 (cycle threshold, Ct 值)。使用 geNorm

表 3 HPLC 洗脱梯度

Table 3 HPLC elution gradient

t/min	0.1% formic acid (%)	Acetonitrile (%)
0	100	0
14	44	56
28	100	0

软件比较 3 个基因的表达稳定性, 选出稳定性最好的为本研究的内参基因。以菌株 9945a 迟缓期为对照, 评价不同生长时期 *ydgF1* 的相对表达量。

### 1.9 平板活菌计数

为了解菌株 9945a 与 9945a  $\Delta ydgF1$  后期的生存能力, 用平板活菌计数的方法检测培养基的 CFU。分别在菌株生长 18、22、26 h 取样 100  $\mu$ L 培养基, 用 900  $\mu$ L 生理盐水稀释, 依次稀释 7 个梯度。选择  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  这 3 个梯度进行平板活菌计数, 每个梯度吸取 100  $\mu$ L 稀释液涂布 LB 平板, 37  $^{\circ}$ C 培养 14 h。培养结束后数出各平板上单菌落的个数, 计算 CFU。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ydgF1* 过表达菌株的构建

按 1.3 各步骤构建的重组质粒 pHY300-Shu (图 1A) 和 pHY300-Shu-*ydgF1* (图 1B), 均使用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切验证 (图 1C)。pHY300-Shu-*ydgF1* 酶切有 3 个条带, 与理论值 763、933、4 833 bp 相符; pHY300-Shu 酶切的

2 个条带大小与理论值 329 bp 和 4 833 bp 相符。经测序验证, 质粒序列无突变, 菌株 9945a/pHY300-Shu 与 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 构建成功。

### 2.2 *ydgF1* 敲除菌株的构建

pNZTT-YK 经 *Xho* I 和 *Pst* I 双酶切 (图 2B), 所得条带大小与理论值 5 333 bp 和 2 006 bp 相符。经测序, pNZTT-YK 敲除盒序列正确。选取的 20 个带有卡那霉素抗性的单菌落 (图 2C) 大部分未在四环素抗性平板上 (图 2D) 长出, 敲除效果符合预期。

培养抗性特征正确的单菌落并提取其基因组, 用引物 *ydgF1*-F 与 *ydgF1*-R 进行 PCR 扩增, 条带与理论值 2 140 bp 相符 (图 3A)。胶回收扩增产物, 送样测序。测序结果显示卡那霉素抗性片段已插入 *ydgF1* 基因中, 菌株 9945a  $\Delta ydgF1$  构建成功。在 NCBI 网站用 Graphics 窗口查看地衣芽孢杆菌 9945a 基因组 (图 3B), *ydgF1* 基因 (BALI\_RS03075) 与下游基因 (BALI\_RS03070) 之间相距 129 bp, 敲除 *ydgF1* 不影响下游基因的转录。

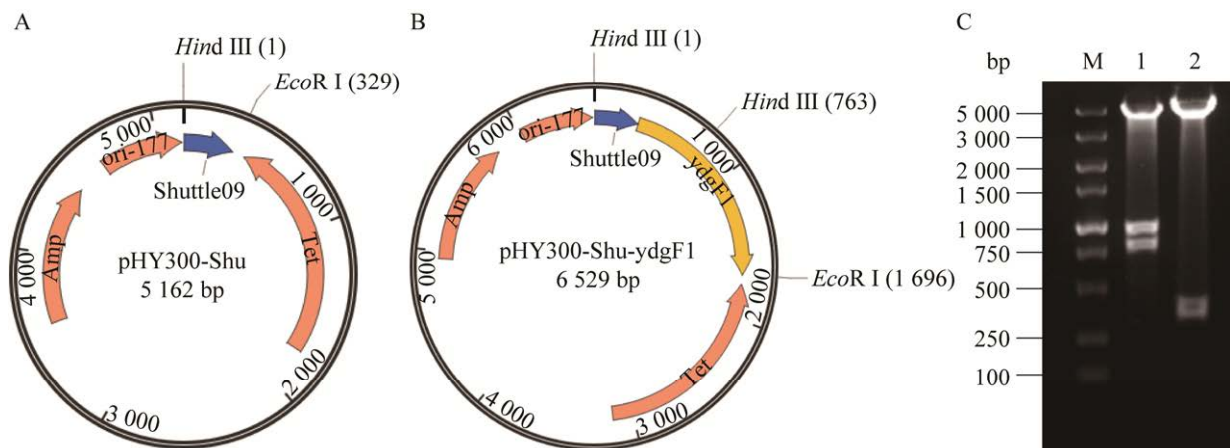


图 1 质粒 pHY300-Shu、pHY300-Shu-*ydgF1* 的双酶切验证

Figure 1 Double-digestion of pHY300-Shu and pHY300-Shu-*ydgF1*. A: Plasmid map of pHY300-Shu. B: Plasmid map of pHY300-Shu-*ydgF1*. C: Plasmids digestion validation electrophoresis. M: DL5000 DNA marker; 1: *Hind* III and *Eco*R I double-digested pHY300-Shu-*ydgF1*; 2: *Hind* III and *Eco*R I double-digested pHY300-Shu.

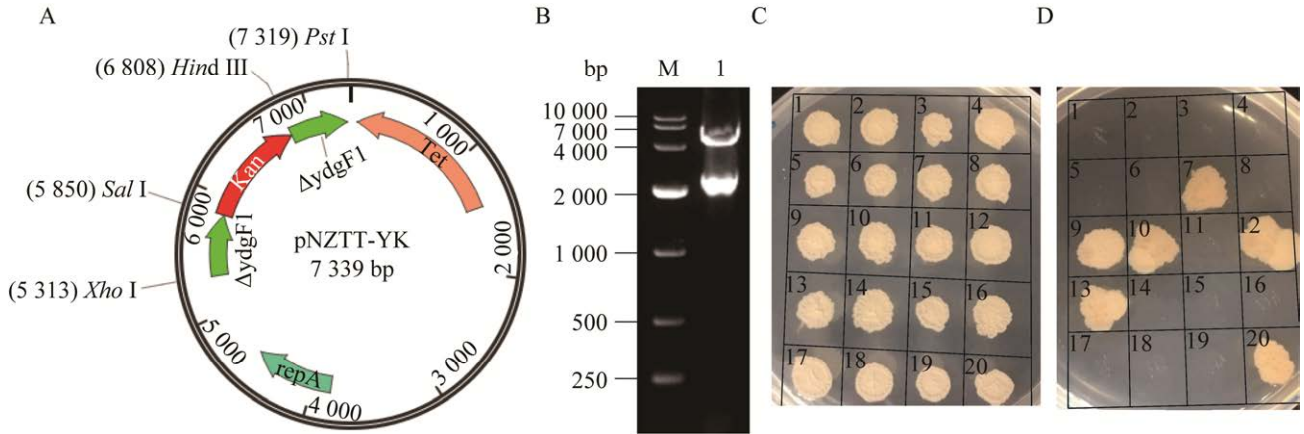


图2 pNZTT-YK 的双酶切验证与抗性正负筛选 9945a  $\Delta ydgF1$

Figure 2 Double-digestion of pNZTT-YK and positive or negative resistance screening 9945a  $\Delta ydgF1$ . A: Plasmid map of pNZTT-YK. B: Plasmid digestion validation electrophoresis. M: DL10000 DNA marker; 1: *Xho* I and *Pst* I double-digested pNZTT-YK. C: Positive screening on the plate containing kanamycin. D: Negative screening on the plate containing tetracycline.

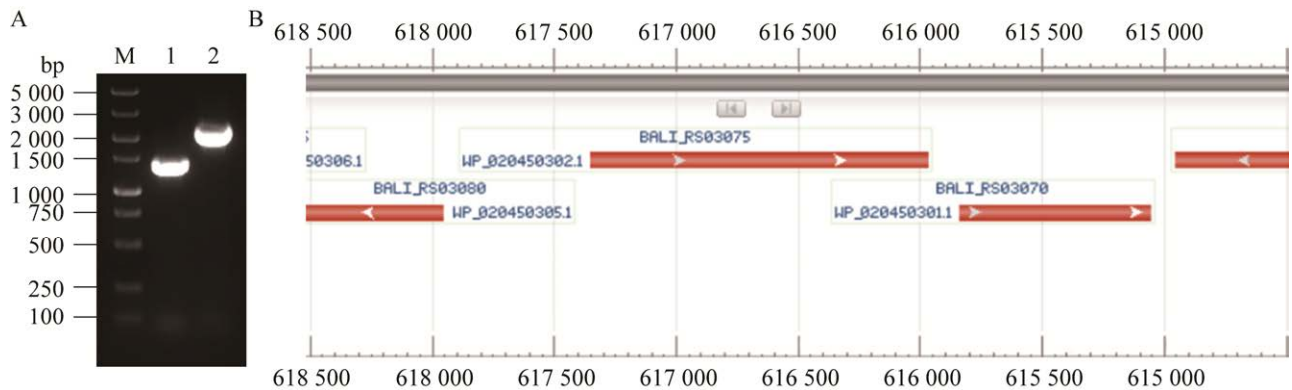


图3 *ydgF1* 敲除验证与 *ydgF1* 在地衣芽孢杆菌 9945a 基因组中的位置

Figure 3 PCR verification of *ydgF1* knocked out and position of *ydgF1* in *Bacillus licheniformis* 9945a genome. A: *ydgF1* knocked out validation electrophoresis. M: DL5000 DNA marker; 1: Amplification products of 9945a; 2: Amplification products of 9945a  $\Delta ydgF1$ . B: BALI\_RS03075: 615 967–617 349; BALI\_RS03070: 615 055–615 837.

### 2.3 PDA 培养基生长比较

在微生物生长动力学中,微生物利用营养效率越高,最大比生长速率( $\mu_m$ )越大。以 D-丙氨酸为唯一氮源的 PDA 培养基对 2 个生长比较组进行培养。敲除比较组中,菌株 9945a 的比生长速率始终大于 9945a  $\Delta ydgF1$ (图 4C), *ydgF1* 基因的敲除削弱了地衣芽孢杆菌 9945a 在 PDA 培养基

中的增殖能力。而过表达比较组的生长差异更加明显, 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 在 15 h 时的  $OD_{600}$  为 3.04, 是 9945a/pHY300-Shu 的 1.73 倍(图 4B)。并且 9945a/pHY300-Shu-*ydgF1* 的  $\mu_m=0.336 \text{ h}^{-1}$ , 是 9945a/pHY300-Shu 的 1.98 倍(图 4D)。*ydgF1* 基因的过表达增强了地衣芽孢杆菌 9945a 在 PDA 培养基中的增殖能力。

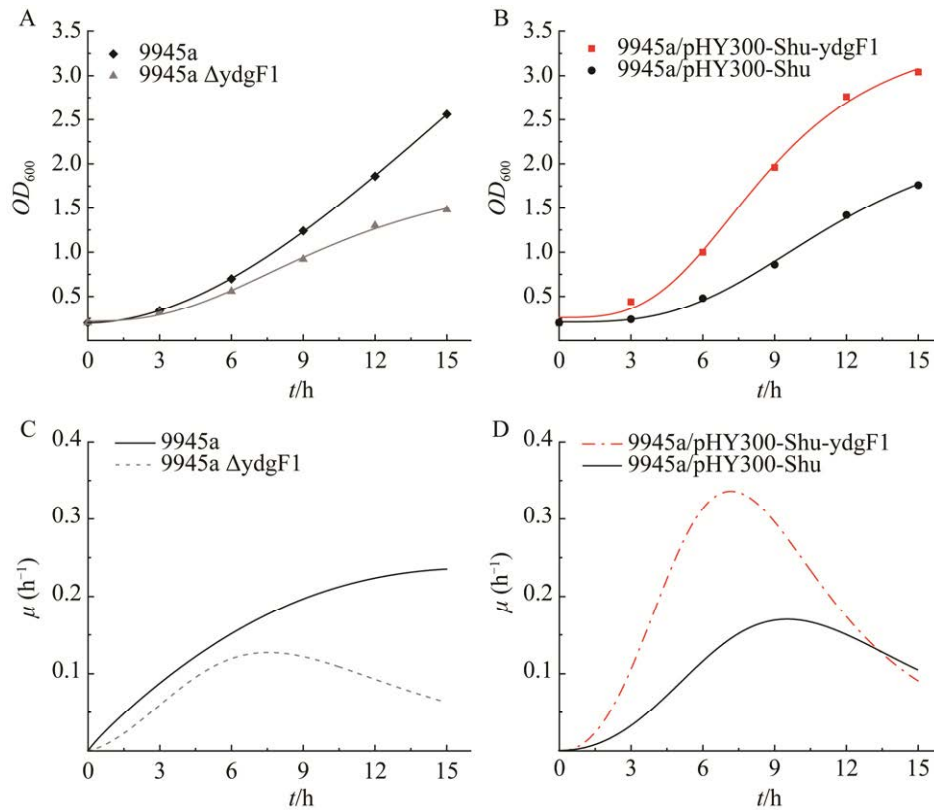


图 4 两个比较组在 PDA 培养基中的生长曲线和比生长速率

Figure 4 Growth curves and specific growth rates of two comparisons in PDA medium. A: Growth curves of the knockout comparison. B: Growth curves of the overexpression comparison. C: Specific growth rates of the knockout comparison. D: Specific growth rates of the overexpression comparison.

#### 2.4 细胞吸收实验

菌株 9945a、9945a  $\Delta ydgF1$ 、9945a/pHY300-Shu-ydgF1 各做 3 个平行,按照 1.7 中的方法检测吸收开始时 D-丙氨酸的浓度和吸收结束时 D-丙氨酸

的浓度(表 4)。9945a  $\Delta ydgF1$  吸收 D-丙氨酸的能力明显低于 9945a; 9945a/pHY300-Shu-ydgF1 吸收 D-丙氨酸的能力略高于 9945a。实验结果表明 YdgF1 在地衣芽孢杆菌 9945a 中参与 D-丙氨酸吸收。

表 4 菌株 9945a、9945a  $\Delta ydgF1$  和 9945a/pHY300-Shu-ydgF1 吸收前后的 D-丙氨酸浓度

Table 4 D-alanine concentrations before and after stains 9945a, 9945a  $\Delta ydgF1$  and 9945a/pHY300-Shu-ydgF1 assimilating

Strain	$C_{\text{before}}$ (g/L)	$C_{\text{after}}$ (g/L)	$\Delta C$ (g/L)	$\Delta C_{\delta}$ (g/L)
9945a	4.852	4.134	0.718	0.759±0.038
	4.888	4.094	0.794	
	4.811	4.046	0.765	
9945a $\Delta ydgF1$	4.893	4.448	0.445	0.509±0.055
	4.775	4.233	0.542	
	4.872	4.332	0.540	
9945a/pHY300-Shu-ydgF1	4.903	4.103	0.803	0.821±0.021
	4.824	4.008	0.816	
	4.876	4.032	0.844	



## 2.5 实时荧光定量 PCR 评价不同生长时期基因 *ydgF1* 相对表达量

菌株 9945a 经 LB 培养基培养 6 h, 收集细胞提取总 RNA 反转录获得 cDNA, 10 倍稀释 5 个梯度。根据各基因序列设计相应的 4 组引物对(表 2), 对 5 个稀释梯度的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR。将测得的 Ct 值对应稀释梯度绘制标准曲线, 用标准曲线斜率  $k$  计算扩增效率  $E=10^{-1/k}-1$ 。4 个基因的扩增效率都在 90%–110% 之间(表 5), 引物的特异性较好。

LB 培养基培养菌株 9945a 与 9945a  $\Delta ydgF1$ , 每 2 h 取样测定  $OD_{600}$  共测 7 次, 绘制生长曲线(图 5A)。分别在培养 3、6、9、12 h 取样, 对应生长过程的迟缓期、对数期、转换期、稳定期。提取不同时期细胞的总 RNA, 均稀释至约 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  后反转录。实时荧光定量 PCR 不同时期的 cDNA 测得 Ct 值(图 5B)。使用 geNorm 软件分析, 3 个候选内参基因中 *mecA* 表达稳定值  $M$  最小, 选择 *mecA* 为本研究的内参基因。以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *ydgF1* 的相对表达量, 9945a 的 *ydgF1* 相对表达量在转换期和稳定期逐渐提高。而 9945a  $\Delta ydgF1$  因为 *ydgF1* 被敲除, *ydgF1* 相对表达量在不同生长时期几乎都为 0 (图 5C)。

## 2.6 平板活菌计数

菌株 9945a 与 9945a  $\Delta ydgF1$  在 LB 培养基中生长 18、22、26 h 的平板活菌计数见表 6, 计算 CFU 选择 30–300 个单菌落的稀释梯度。2 个梯度均在 30–300 个, 分别计算 CFU。若 2 个梯度 CFU 比值  $>2$ , 取较小值; 若比值  $\leq 2$ , 取平均数。

表 5 引物扩增参数

Table 5 Amplification parameters of primers

Gene	Amplified length (bp)	$k$	$E$ (%)
<i>rpsE</i>	137	-3.214	104.7
<i>rpoB</i>	143	-3.294	101.2
<i>mecA</i>	115	-3.269	102.2
<i>ydgF1</i>	142	-3.329	99.7

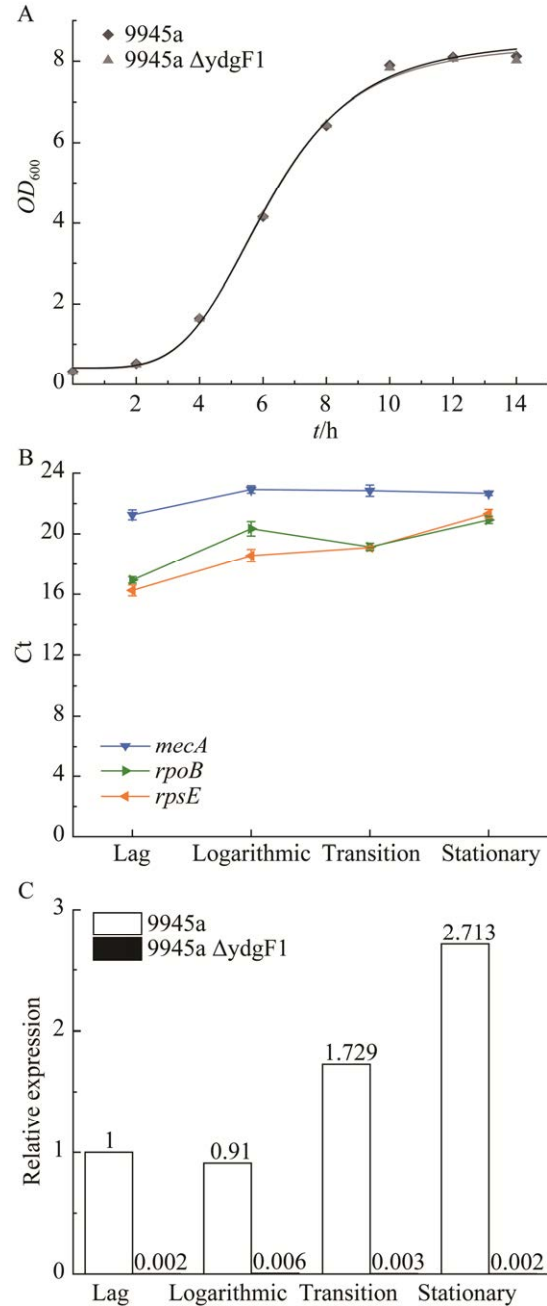


图 5 实时荧光定量 PCR 评价菌株 9945a 和 9945a  $\Delta ydgF1$  不同生长时期 *ydgF1* 的相对表达量

Figure 5 RT-qPCR evaluated the relative expression of *ydgF1* in strain 9945a and 9945a  $\Delta ydgF1$  at different growth phases. A: Growth curves of strain 9945a and 9945a  $\Delta ydgF1$  in LB medium. B: Ct values of three candidate reference genes at different growth phases. C: Relative expression of *ydgF1* in strain 9945a and 9945a  $\Delta ydgF1$  at different growth phases.

表 6 平板活菌计数

Strain	t/h	Dilution gradient			c/(CFU/mL)
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
9945a	18	>300	>300	96	9.600×10 <sup>9</sup>
	22	>300	281	34	3.105×10 <sup>9</sup>
	26	251	67	5	2.510×10 <sup>8</sup>
9945a ΔydgF1	18	>300	>300	86	8.600×10 <sup>9</sup>
	22	>300	205	9	2.050×10 <sup>9</sup>
	26	84	15	0	8.400×10 <sup>7</sup>

结果表明 9945a ΔydgF1 各时刻的 CFU 均低于 9945a。9945a 的 CFU 从 18–22 h 下降了 67.66%，从 22–26 h 下降了 91.92%。9945a ΔydgF1 的 CFU 分别下降了 76.16%、95.90%。ydgF1 的敲除减

弱了地衣芽孢杆菌 9945a 后期的生存能力。

## 2.7 YdgF1 还可能参与 L-天冬酰胺吸收

使用 NCBI 网站 CDD 程序预测了 YdgF1 的结构域。YdgF1 与结核分歧杆菌的 AnsP 结构类似，AnsP 为 L-天冬酰胺转运蛋白。以 L-天冬酰胺为唯一氮源的 PLN 培养基对 2 个生长比较组进行培养。敲除比较组中，菌株 9945a 的  $\mu_m=0.447 \text{ h}^{-1}$ ，远大于 9945a ΔydgF1 的  $\mu_m$  为  $0.237 \text{ h}^{-1}$  (图 6C)；过表达比较组中，9945a/pHY300-Shu-ydgF1 的  $\mu_m$  为  $0.322 \text{ h}^{-1}$ ，远大于 9945a/pHY300-Shu 的  $\mu_m$   $0.136 \text{ h}^{-1}$  (图 6D)。2 组菌株的生长差异表明除 D-丙氨酸外，YdgF1 还可能参与 L-天冬酰胺吸收。

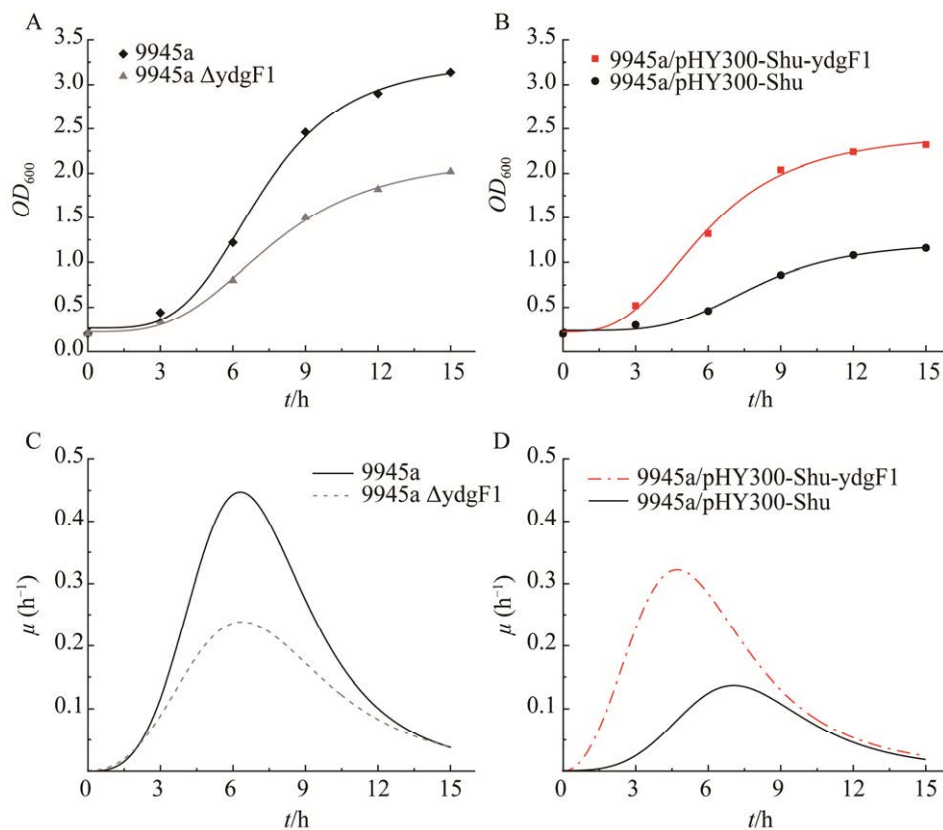


图 6 两个比较组在 PLN 培养基中的生长曲线和比生长速率

Figure 6 Growth curves and specific growth rates of two comparisons in PLN medium. A: Growth curves of the knockout comparison. B: Growth curves of the overexpression comparison. C: Specific growth rates of the knockout comparison. D: Specific growth rates of the overexpression comparison.

### 3 讨论与结论

本研究初步鉴定了地衣芽孢杆菌 9945a 转运蛋白 YdgF1 的功能。利用 PDA 培养基比较了 2 组菌株的生长能力,发现 *ydgF1* 的敲除和过表达均显著影响地衣芽孢杆菌 9945a 在 PDA 培养基中的生长。细胞吸收实验进一步验证了 YdgF1 在地衣芽孢杆菌 9945a 中参与 D-丙氨酸吸收,拓展了地衣芽孢杆菌 9945a 的丙氨酸代谢途径。

革兰氏阳性菌经过一段时间的生长进入稳定期,此时营养物质匮乏,肽聚糖循环有利于革兰氏阳性菌的长期生存<sup>[21]</sup>。YdgF1 吸收胞外游离的 D-丙氨酸,参与肽聚糖循环。9945a、9945a  $\Delta$ YdgF1 的生长曲线以及平板活菌计数的结果表明,*ydgF1* 的敲除对地衣芽孢杆菌 9945a 的前期生长没有影响,但对其后期的生存是不利的。这也解释了 9945a 的 *ydgF1* 相对表达量在转换期和稳定期逐渐上调的原因。

9945a  $\Delta$ YdgF1 能在 PDA 培养基中生长,并且 *ydgF1* 敲除后地衣芽孢杆菌 9945a 对 D-丙氨酸仍有吸收能力,说明在地衣芽孢杆菌 9945a 中除 YdgF1 以外还有其他氨基酸转运蛋白吸收 D-丙氨酸。2 组菌株在 PLN 培养基中的生长差异说明除 D-丙氨酸以外,YdgF1 还可能参与吸收 L-天冬酰胺及其他结构类似的氨基酸。

#### 参考文献

- [1] REDDY VS, SHLYKOV MA, CASTILLO R, SUN EI, SAIER MH Jr. The major facilitator superfamily (MFS) revisited[J]. *The FEBS Journal*, 2012, 279(11): 2022-2035.
- [2] JONES PM, GEORGE AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61(6): 682-699.
- [3] JUNG H, PIRCH T, HILGER D. Secondary transport of amino acids in prokaryotes[J]. *The Journal of Membrane Biology*, 2006, 213(2): 119-133.
- [4] LAM H, OH DC, CAVA F, TAKACS CN, CLARDY J, de PEDRO MA, WALDOR MK. D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria[J]. *Science*, 2009, 325(5947): 1552-1555.
- [5] HERNÁNDEZ SB, CAVA F. Environmental roles of microbial amino acid racemases[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(6): 1673-1685.
- [6] HOYLAND CN, ALDRIDGE C, CLEVERLEY RM, DUCHÊNE MC, MINASOV G, ONOPRIYENKO O, SIDIQ K, STOGIOS PJ, ANDERSON WF, DANIEL RA, SAVCHENKO A, VOLLMER W, LEWIS RJ. Structure of the LdcB LD-carboxypeptidase reveals the molecular basis of peptidoglycan recognition[J]. *Structure*, 2014, 22(7): 949-960.
- [7] EGAN AJF, ERRINGTON J, VOLLMER W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(8): 446-460.
- [8] SIDIQ KR, CHOW MW, ZHAO Z, DANIEL RA. Alanine metabolism in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2021, 115(4): 739-757.
- [9] NOENS EEE, LOLKEMA JS. Physiology and substrate specificity of two closely related amino acid transporters, SerP1 and SerP2, of *Lactococcus lactis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(5): 951-958.
- [10] YANG MM, ZHANG WW, JI SY, CAO PH, CHEN YL, ZHAO X. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56321.
- [11] 李由然, 顾正华, 张梁, 丁重阳, 石贵阳. CRISPR/Cas9 系统介导的地衣芽孢杆菌基因敲除[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(10): 4188-4196. LI YR, GU ZH, ZHANG L, DING ZY, SHI GY. Gene knockout of *Bacillus licheniformis* mediated by CRISPR/Cas9 system[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(10): 4188-4196 (in Chinese).
- [12] WANG QZ, CHEN T, ZHAO XM, CHAMU J. Metabolic engineering of thermophilic *Bacillus licheniformis* for chiral pure D-2,3-butanediol production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(7): 1610-1621.
- [13] QI GF, KANG YF, LI L, XIAO AF, ZHANG SM, WEN ZY, XU DH, CHEN SW. Deletion of meso-2,3-butanediol dehydrogenase gene *budC* for enhanced D-2,3-butanediol production in *Bacillus licheniformis*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 16.

- [14] 李宗文, 李由然, 顾正华, 丁重阳, 张梁, 徐沙, 石贵阳. 地衣芽孢杆菌 FLP/FRT 基因编辑系统的构建及验证[J]. 生物工程学报, 2019, 35(3): 458-471.  
LI ZW, LI YR, GU ZH, DING ZY, ZHANG L, XU S, SHI GY. Development and verification of an FLP/FRT system for gene editing in *Bacillus licheniformis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(3): 458-471 (in Chinese).
- [15] LORCA G, WINNEN B, SAIER MH JR. Identification of the L-aspartate transporter in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(10): 3218-3222.
- [16] SHANG XL, ZHANG Y, ZHANG GQ, CHAI X, DENG AH, LIANG Y, WEN TY. Characterization and molecular mechanism of AroP as an aromatic amino acid and histidine transporter in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(23): 5334-5342.
- [17] GÖRDES D, KOLUKISA OĞLU Ü, THUROW K. Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*[J]. Amino Acids, 2011, 40(2): 553-563.
- [18] 刘翔, 李由然, 张梁, 丁重阳, 徐沙, 顾正华, 石贵阳. 地衣芽孢杆菌中木糖操纵子受葡萄糖胁迫的转录调控特性[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(3): 695-701.  
LIU X, LI YR, ZHANG L, DING ZY, XU S, GU ZH, SHI GY. The transcriptional regulation characteristics of xylose-inducible promoter in *Bacillus licheniformis*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2019, 25(3): 695-701 (in Chinese).
- [19] SAVARD P, ROY D. Determination of differentially expressed genes involved in arabinoxylan degradation by *Bifidobacterium longum* NCC2705 using real-time RT-PCR[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2009, 1(2): 121.
- [20] 贺婷婷, 宋婷, 王超, 张长斌, 王海燕. 短小芽孢杆菌实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选[J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 99-106.  
HE TT, SONG T, WANG C, ZHANG CB, WANG HY. Screening of reference genes in *Bacillus pumilus* by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(11): 99-106 (in Chinese).
- [21] BORISOVA M, GAUPP R, DUCKWORTH A, SCHNEIDER A, DALÜGGE D, MÜHLECK M, DEUBEL D, UNSLEBER S, YU WQ, MUTH G, BISCHOFF M, GÖTZ F, MAYER C. Peptidoglycan recycling in Gram-positive bacteria is crucial for survival in stationary phase[J]. mBio, 2016, 7(5): e00923-16.