



苏云金杆菌 Bt4.0718 不同时期比较转录组揭示芽胞和杀虫伴胞晶体形成机制

谢俊雁^{1,2}, 罗斯思¹, 朱梓榕¹, 陈文慧¹, 周客轩¹, 夏立秋¹, 丁学知^{1*}

1 湖南师范大学生命科学学院 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410081

2 中国科学院亚热带农业生态研究所 畜禽养殖污染控制与资源化技术国家工程实验室, 湖南 长沙 410125

谢俊雁, 罗斯思, 朱梓榕, 陈文慧, 周客轩, 夏立秋, 丁学知. 苏云金杆菌 Bt4.0718 不同时期比较转录组揭示芽胞和杀虫伴胞晶体形成机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 108-129.

XIE Junyan, LUO Sisi, ZHU Zirong, CHEN Wenhui, ZHOU Kexuan, XIA Liqiu, DING Xuezhi. Comparative transcriptomics of *Bacillus thuringiensis* Bt4.0718 reveals the mechanisms of sporulation and parasporal crystal formation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 108-129.

摘要: 【目的】苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)在形成芽胞的过程中产生大量杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs),是目前应用最广泛、最安全的微生物杀虫剂的主要菌株资源。本研究旨在比较 Bt 3 个重要时期的转录组,进一步探究芽胞和杀虫伴胞晶体的形成机制,为高效工程菌的构建奠定理论基础。【方法】选取高毒力 Bt4.0718 菌株营养生长中期(T1-10 h)、芽胞形成前期(T2-20 h)、芽胞形成后期(T3-32 h)进行比较转录组分析,对代表性差异基因进行实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)验证、特定功能基因的敲除和表型分析验证。【结果】差异表达基因数量分别为 2 147 个(T2/T1)、1 861 个(T3/T1)、1 708 个(T3/T2)。T1 时期,培养基中营养相对丰富,主要为芽胞和杀虫伴胞晶体形成做准备。芽胞形成重要调控基因 *kinA/D*、*spo0A/F*、*sigE* 高水平转录对菌体的生长发育具有重要作用,Cry1Ac、碳源、能源贮藏物聚-羟基丁酸(poly-hydroxybutyric acid, PHB)和羟基丁酮(acetoin)也已开始转录。芽胞和 ICPs 的大量形成在 T2 和 T3 时期,相关基因的转录水平 T2 比 T3 时期高。T2 对比 T3 时期,芽胞核/衣/皮质(spore core/coat/cortex)、芽胞萌发受体蛋白(germination protein)和芽胞形成的 II–VI 阶段相关基因(*spoII–spoVI*)在 T2 时才开始大量转录,为 3 个时期的最高水平;相应的糖类、氨基酸、脂质代谢,能量、核酸、多肽代谢、次级产物生成和环境适应系统等复杂网络均表现出差异;另外,

资助项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201201); 国家自然科学基金(31370116)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0201201) and the National Natural Science Foundation of China (31370116).

*Corresponding author. E-mail: dingxuezhi@hunnu.edu.cn

Received: 2023-03-30; Accepted: 2023-09-27; Published online: 2023-10-25

作为营养信号刺激性生理过程, 双组分信号转导系统(two-component signal transduction system, TCS)和 ABC 转运系统在芽胞形成和 ICPs 的转录表达过程中发挥重要作用, 转录水平具有显著差异。【结论】随着芽胞和杀虫伴胞晶体的形成, 营养成分逐渐匮乏, *sigB*、*sigW* 和 *sigM* 的高效表达有助维持细胞壁的稳定和对环境变化的抗性; 小热激蛋白 Hsp20 和 Hsp20B 作为分子伴侣蛋白对维持胞内稳态也十分重要, T2、T3 时期高水平转录可能有助于芽胞形成和 ICPs 表达。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 比较转录组; 芽胞; 杀虫伴胞晶体

Comparative transcriptomics of *Bacillus thuringiensis* Bt4.0718 reveals the mechanisms of sporulation and parasporal crystal formation

XIE Junyan^{1,2}, LUO Sisi¹, ZHU Zirong¹, CHEN Wenhui¹, ZHOU Kexuan¹, XIA Liqui¹, DING Xuezhi^{1*}

1 Hunan Provincial Key Laboratory of Microbial Molecular Biology, State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China
2 National Engineering Laboratory for Pollution Control and Waste Utilization in Livestock and Poultry Production, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, Hunan, China

Abstract: [Objective] *Bacillus thuringiensis* (Bt), characterized by the massive production of insecticidal crystal proteins (ICPs) during sporulation, serves as the main strain resource for the commonly used and safe microbial insecticides. To further explore the mechanisms of sporulation and parasporal crystal formation and lay a theoretical foundation for the construction of efficient strains, we compared the transcriptomes of Bt at three important stages. [Methods] The transcriptomes of the hypervirulent strain Bt4.0718 at the middle vegetative growth stage (T1-10 h), the early sporulation stage (T2-20 h), and the late sporulation stage (T3-32 h) were compared. The representative differentially expressed genes (DEGs) were verified by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and the phenotypes of the mutant strains with the knockout of specific functional genes were examined. [Results] The number of DEGs was 2 147 (T2/T1), 1 861 (T3/T1), and 1 708 (T3/T2), respectively. At T1, the medium was rich in nutrients, which served the sporulation and parasporal crystal formation. The high transcription levels of *kinA/D*, *spo0A/F*, and *sigE* regulating sporulation played a role in the growth and development of the cells. The transcription of Cry1Ac, poly-hydroxybutyric acid (PHB), and hydroxybutanone (acetoin) were started at this time. The substantial formation of ICPs and spores occurred at T2 and T3, and the transcript levels of the regulatory genes were higher at T2 than those at T3. The genes associated with spore core/coat/cortex, germination protein, and *spoII-spoVI* began to be transcribed in large amounts at T2, with the highest levels among the three stages. The corresponding complex networks of carbohydrate, amino acid, and lipid metabolism, energy,

nucleic acid, and peptide metabolism, secondary metabolite production, and environmental adaptation showed differences. In addition, as the physiological processes stimulated by nutrient signals, the two-component signal transduction system (TCS) and ABC transport system played an essential role in the process of sporulation and ICP transcription and expression, and their transcription levels were significantly different. **[Conclusion]** With the production of ICPs and sporulation, nutrients are gradually consumed, and the high expression of *sigB*, *sigW*, and *sigM* contributed to the stability of cell wall and the resistance to environmental changes. Meanwhile, the small heat shock proteins Hsp20 and Hsp20B, as molecular chaperones, were also important for maintaining intracellular homeostasis and may facilitate the sporulation and ICP production.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; comparative transcriptomics; sporulation; insecticidal parasporal crystals

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是革兰氏阳性细菌,也是最安全的微生物农药菌剂之一,已在全球范围内害虫防治应用数十年^[1]。高通量筛选的 B4F11 菌株中鉴定出一种新的杀虫蛋白 Cry78Ba1,在稻飞虱的高效、安全防控方面具有巨大的应用潜力^[2]。除了在农业害虫防治方面的应用外,Bt还能够促进植物生长^[3]、生物修复重金属污染、生物合成金属纳米颗粒^[1]、产生黑色素^[4],甚至杀死癌细胞^[5],所产的伴胞活性素对人类结肠癌细胞具有很好的杀伤活性,且没有溶血活性^[6-7]。在能源应用方面,糖工业废水和食品工业废水产氢菌株鉴定中也发现有 Bt 菌株的存在^[8]。

Bt 的芽胞形成机制大都来自模式菌株枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 的相关研究。目前,利用转录组学方法对 Bt 中杀虫伴胞晶体和芽胞形成机制的研究很少,2013 年 Wang 等对 Bt CT-43 菌株芽胞形成的 4 个不同阶段进行转录组学和定量蛋白质组学的比较分析,较全面地绘制了芽胞形成调控网络,代谢方面主要包括氨基酸、碳源和能量的供应^[9]。Bt4.0718 与 Bt CT-43 相比,所含的内生质粒数量、杀虫毒力基因和基因组大小及杀虫晶体形成机制方面也可能存在一定的差异。因此,根据芽胞和伴胞晶体形成的

时间调控特征,选取 Bt4.0718 的 3 个关键时期进行比较转录组分析,以期能够补充或完善芽胞和伴胞晶体形成机制,挖掘到一些功能基因,为进一步改良和构建工程菌奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本实验室筛选的高毒力野生型 Bt4.0718 菌株, LB 液体培养基(g/L): 酵母提取物(yeast extract) 5, 氯化钠(NaCl) 10, 胰蛋白胨(tryptone) 10; 牛肉膏发酵培养基(g/L): 牛肉膏 5, 葡萄糖 3, 蛋白胨 10, NaCl 2, K₂HPO₄ 0.3, MnSO₄·H₂O 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.3。培养条件: 20 mL 发酵培养基/250 mL 摇瓶, 30 °C、120 r/min 培养。

1.2 RNA 提取和质量检测

采用 TRIzol 结合液氮研磨方法,按试剂盒操作说明提取总 RNA [生工生物工程(上海)股份有限公司]。经 Agilent 2100 Bioanalyzer、Agilent RNA 6000 Nano Kit (安捷伦)等仪器检测 RNA 样品质量(深圳华大基因科技服务有限公司)。

1.3 转录组文库构建及测序

取 1 μg 质检合格的总 RNA,按标准操作手册去除 rRNA。合成 cDNA,末端修复加“A”碱基,接头连接,3 步处理均按照测序公司标准体

系进行操作(深圳华大基因科技服务有限公司)。

1.4 参考基因组比对及新转录本预测

使用 HISAT 将过滤后的 clean reads 比对到参考基因组 - 模式菌株 Bt-HD73, 利用 Rockhopper 软件把所有样品的重构信息进行整合的转录本与参考注释信息进行比较, 把 IGR 类型的转录本定义为新转录本, 使用 coding potential calculator (CPC)软件对每个新转录本进行蛋白编码能力预测, 分为具有蛋白编码能力的转录本(coding)和不具有蛋白编码能力的转录本(non-coding)。

1.5 参考基因组集比对及定量

用 Bowtie2 软件将 clean reads 比对到参考基因, 使用 RSEM 计算每个基因的 reads count, 将 reads count 换算为每百万个映射读取的外显子模型每千碱基读取数(reads per kilobase of exon model per million mapped reads, FPKM), 即每 1 百万个映射上的 reads 中映射到外显子的每 1 000 个碱基上的 reads 个数, 计算方法: $1\ 000 \text{ (reads 个数)} / 1 \text{ (百万)} \times n \text{ (K)} = \text{FPKM}$, FPKM 的值反映出这个基因的表达水平。

1.6 差异表达基因筛选

使用 DESeq2 算法进行差异表达基因检测。DESeq2 采用负二项分布模型, 对估算的基因表达量进行差异显著性检验, 并对统计学中的 P value 进行校正。当组间存在共有基因时, 用 Venn 图分析对重叠情况进行展示。

1.7 生物信息学分析

主成分分析(principal component analysis, PCA), 用 R 软件中的 ade4 软件包将数据间大部分的方差降到相同的维度或坐标轴, 实现对大数据整体差异的比较观察和简化。

时间序列分析, 在不同时间阶段一些基因会有相似的表达模式, 根据基因的表达量信息, 可以聚类成与时间相关联的基因簇, 表达模式一致

的基因会被聚到同一个簇(cluster), 从而直观反应时间对基因表达的影响, 有助于找到功能相似的基因; 同时表达趋势一致的基因可能参与同一个生物过程。使用时间序列分析软件 Mfuzz (v2.34.0)基于宽松聚类算法根据相似的表达谱将基因归为多个簇(深圳华大基因科技服务有限公司)。

通路(pathway)、基因本体(gene ontology, GO)富集分析, 两者的条目显著性分析按照公式(1)计算。

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}} \quad (1)$$

式中 N 为所有基因中具有注释的基因数目; n 为 N 中显著差异表达基因的数目; M 为所有基因中注释为某特定条目(term)的基因数目; m 为注释为某特定条目的显著差异表达基因数目。计算得到的 P value 通过校正之后, 以 $P \text{ value} \leq 0.05$ 为标准, 来定义显著差异表达基因中富集的 term。

1.8 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)验证

取 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 用 DNase I 消化残留的基因组 DNA, 按照逆转录试剂盒 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher)操作说明将 RNA 反转录为 cDNA。参照 ABI 公司的 Power UPTM SYBRTM Green Master Mix 手册, 按 $20 \mu\text{L}$ 体系添加引物、模板, 进行 qRT-PCR 分析, 以 16S rRNA 基因作为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法分析不同基因 mRNA 表达水平变化。所用引物见表 1。

1.9 三亲本接合转移及 *hsp20* 无痕敲除菌株的构建

利用 I-Sce I 介导的无痕敲除技术体系^[10]构建敲除突变株。三亲本结合转移操作: (1) Bt 4.0718 菌株、pRP1028-*hsp20*UD/DH5 α 、pSS1827/

表 1 qRT-PCR 验证引物

Table 1 primers for qRT-PCR

Primers	Sequence (5'→3')
<i>cryIAc</i> -qF	ATATTCCTTGTCGCTAACGCA
<i>cryIAc</i> -qR	TGTACAAGAAATGCGTCCCATT
<i>cry2Aa</i> -qF	CCCTTGCTCGTGAAATGCA
<i>cry2Aa</i> -qR	AGGAACAGGGTTTTGAGTAGGG
<i>cwlD</i> -qF	TATCAGGGAAAGTAATTGTATTAGATGC
<i>cwlD</i> -qR	GCACCTTGTTCTTGAAAATAGTCTTGT
<i>sigK</i> -qF	ATCGGGCAAGATAAAGAGGGTA
<i>sigK</i> -qR	CTCCTTATCTAGCCCAAGTCCAA
<i>groEL</i> -qF	GATCAATTTGGTCATGCTGGTG
<i>groEL</i> -qR	CGGAGCATTGGATCACGAC
<i>glnA</i> -qF	ACTTCAATCTTGACCAGAGCC
<i>glnA</i> -qR	CGAAGTATCCACCGTTATCGTTTAG
<i>glyA</i> -qF	AGGCAGAACTAGGAAGACAGCG
<i>glyA</i> -qR	ACAGAACCTTGTGCCTCCATTAC
<i>guaB</i> -qF	TGATATGCGCTTCATCCAAGAC
<i>guaB</i> -qR	ACCGTTATTATCAACAAGAGGGAGT
<i>hemE</i> -qF	CAATATAACGTAGACGCGCAATTCT
<i>hemE</i> -qR	CATCTTCTGGATTGATTTCCCTA
<i>hsp20</i> -qF	TGCTTTCTTGAAGCCACTGAAC
<i>hsp20</i> -qR	AACCTGGTAAATCTGCTTTCACAGT
<i>hsp20B</i> -qF	TCTTCGCAATGTAATCGCTGAT
<i>hsp20B</i> -qR	CAACGAGTTCTTACCAACTTCAT
<i>hslV</i> -qF	ATCCGGTTCAATTACTTCTCCTG
<i>hslV</i> -qR	CAGTTGCTGACGCATTTACTCTTT
<i>leuB</i> -qF	ACCCAAATGTGGAAGTAGAACACA
<i>leuB</i> -qR	CGTGAATAGGCTCGTATAATGAAGG
<i>lysA</i> -qF	GAAATAGTGATGGCTCTTCAGGC
<i>lysA</i> -qR	GAATCATCTTGGCCTGTCGTAAT
<i>odhB</i> -qF	GGTTACCAAATACAAACCGTCCTA
<i>odhB</i> -qR	CGTCCAAGTGGGTCTGTGCTA
<i>phoR</i> -qF	CATGCGGTGTTTCGTTCAAGA
<i>phoR</i> -qR	CAACTACGAGACAAGCAATGACAA
<i>pyrG</i> -qF	AGATGATGGCGCAGAACTGAC
<i>pyrG</i> -qR	CCTAAATATTCACCGCGACGC
<i>pgk</i> -qF	GCACTGTCTAATGCTTGTCTACT
<i>pgk</i> -qR	TCTAACTGGGAAGGCGTGGA
<i>spo0A</i> -qF	CGTCCACTACCATCATTCCGA
<i>spo0A</i> -qR	AGCGGGTACACCAATTTTCATG
16S-qF	AGAGTTTGATCTTGGCTCAG
16S-qR	ACGGCTACCTTGTACGACTT

DH5 α 进行接合转移(1:1:1), 将敲除载体 pRP1028-*hsp20UD* 导入 Bt 4.0718, 经过第一次同源单交换 pRP1028-*hsp20UD* 整合到 Bt 4.0718 基因组上; (2) 同样用三亲本结合转移的方法在整合有 pRP1028-*hsp20UD* 的 Bt 4.0718 菌株中导入表达归巢内切酶 I-*Sce* I 的 pSS4332 质粒; (3) I-*Sce* I 表达, 识别并剪切同向重复序列之间的 I-*Sce* I 酶切位点, 基因组断裂, 断裂的 DNA 再次进行同源单交换, *hsp20* 基因片段被敲除或者回复成野生型。

1.10 生长曲线测定和相差显微镜形态观察

活化的菌株($OD_{600}=0.6$)按 1%的比例接种到发酵培养基, 30 °C、120 r/min 培养。测量生长曲线至 50 h, 每组设 3 个生物学重复。每隔 2 h 取 1 次样, 分光光度计测定发酵液 OD_{600} 值(无菌发酵培养基作为空白对照), 时间为横坐标、 OD_{600} 值为纵坐标绘制生长曲线。用 100 \times 相差显微镜观察。

1.11 扫描电子显微镜样品的制备及观察

发酵样品的 10 倍稀释液(菌体或伴胞晶体和芽胞混合物)无菌超纯水洗 10–15 次(9 000 \times g, 3 min), 4 °C 条件下用 2.5%戊二醛溶液固定 12 h。纯净水洗涤 3 次, 样品分别用 30%、50%、70%、80%、90%、95%和 100%乙醇依次进行脱水 2 次, 每次 10 min。适量无水乙醇打匀, 样品涂片, 冷冻干燥后喷射镀金。扫描电子显微镜(Hitachi Su8010)成像, 放大倍数 5 000 \times –20 000 \times 。

1.12 芽胞形成计数

Bt 菌株发酵培养 60 h (30 °C), OD_{600} 稀释至 1.0。发酵液混匀后取 1 mL 细胞置 65 °C 处理 30 min; 再梯度稀释(10 \times), 稀释的 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 样品取 100 μ L 涂布在 LB 平板上, 计算每毫升的菌落形成单位(colony forming units, CFU), 每组设置 3 个生物学重复。

1.13 ICP 的提取与浓度测定

提取 ICP, Bt 菌株用 GYS 发酵培养 20–24 h, 细胞 OD_{600} 稀释至 1.0 后收集 20 mL 培养物,

8 000×g 离心 10 min, 细胞沉淀用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗涤 2 次, 加 25 mL PBS 重悬; 冰上超声破碎(380 W, 3 s, 3 s, 10 min), 离心 10 min (12 000×g, 4 °C), 沉淀用 1 mol/L NaCl 和无菌水依次洗涤 2 次; 5 mL 含 5% β-巯基乙醇的 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 10.0) 溶液重悬沉淀, 37 °C 孵育 1 h 溶解伴胞晶体蛋白再离心 10 min (12 000×g, 4 °C), 上清液经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 可视化分析, Bradford 法测量 ICPs 含量。

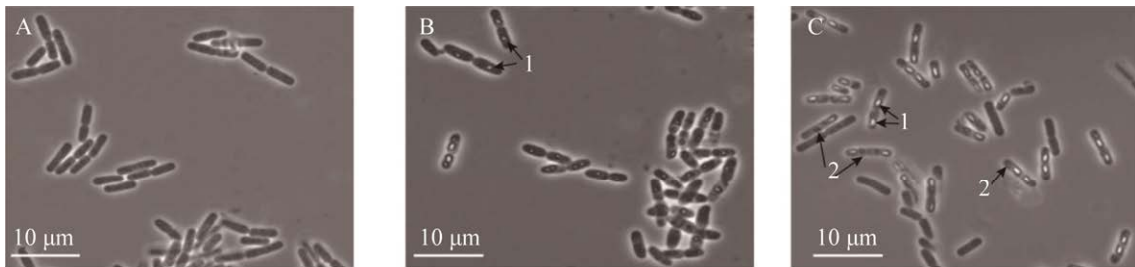


图 1 Bt4.0718 发酵培养不同时间相差显微观察

Figure 1 Phase contrast microscopic observation of Bt4.0718 at different period. A: T1, logarithmic phase. B: T2, pre-sporulation period. C: T3, late stage of sporulation. 1: Spore; 2: Parasporal crystal.

2.2 转录组测序

提取 3 个时期菌体 RNA (每个时期 3 个生物学重复), 质量均达到测序要求。测序结果与参考基因组的平均比对率为 69.52%, 完美匹配的平均比率为 55.4%, 平均的唯一匹配比率为 68.5%, 数据匹配结果良好。大部分基因的 reads 覆盖率能达到 90% 以上。共鉴定到 32 个新转录本, 均为非编码 sRNA。PCA 二维图(图 2)上, 不同时期样品的位置分散、距离较远, 生物学重复则比较聚集, 表明重复性良好, 组别间差异较大。数据差异性最大和次大 2 个主成分因子(第一主成分 PC1 和第二主成分 PC2)的百分比(即对总体方差的贡献率)分别为 55.6% 和 42.6%, PC1 和 PC2 可以解释总体方差(反应样本离散程度)的 98.2%, 通过数据的降维处理, 仅丢失了约 1.8% 的离散关系信息。

2 结果与分析

2.1 Bt4.0718 三个重要时期相差显微镜观察

选取不同发酵时间(T1-10 h, 营养生长期; T2-20 h, 芽胞形成前期; T3-32 h, 芽胞形成后期)相差显微镜观察。T1 时期, 菌体呈短杆状, 正常生长, 胞内无明显折光性强的物质, 无芽胞迹象; T2 时期, 胞内芽胞形成, 芽胞附近有可见的内含物, 少数发育快的个体芽胞发育完全, 芽胞旁边能够观察到菱形晶体; T3 时期, 胞内芽胞基本发育完全, 且都伴有菱形或不规则晶体(图 1)。

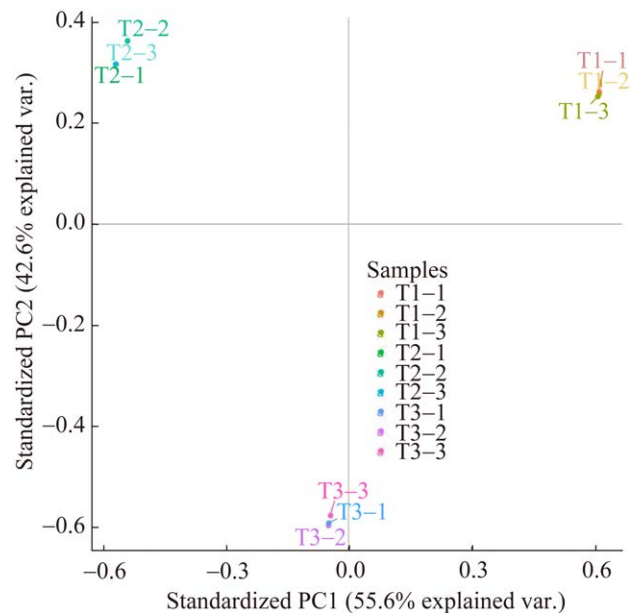


图 2 转录组不同时期样品的 PCA 分析

Figure 2 PCA analysis of transcriptome samples at different periods.

2.3 显著差异基因统计分析

T1 时期共检测到 3 785 个转录本, T2 和 T3 时期分别鉴定 3 549 个和 3 822 个。另外, T1-T2-T3 共同基因为 2 783 个; 两两相互共有的转录本为 211、353、471 个; 3 个时期特有的转录基因数分别是 320、202、215 个(图 3A)。T2 相对 T1 时期显著差异基因共有 2 147 个, 上调基因数为 1 250, 下调基因数为 897; T3 相对 T1 时期共筛选到 1 861 个显著差异基因, 其中上调 992 个, 下调 869 个; T3 对比 T2 时期, 显著差异基因共有 1 708 个, 上调 838 个, 下调 870 个(图 3B)。

2.4 芽胞结构和组分相关基因

Bt 芽胞呈椭圆或圆形, 抗逆性强, 细胞壁很厚, 含水量很低, 主要的结构包括芽胞外壁(exosporium)、芽胞衣(spore coat)、皮层(cortex)、内核(core), 吡啶二羧酸钙盐(pyridine dicarboxylic acid calcium salt, DPA)、酸溶性芽胞蛋白(acid-soluble spore protein)为重要组分。3 个时期

转录组共检测到 29 个相关基因(表 2), 其中酸溶性芽胞蛋白合成基因 10 个, 芽胞衣形成相关基因 15 个, DPA 合成基因 3 个(*dapA/B/D*), 而皮层合成基因仅鉴定到 1 个(*yabQ*)。以上基因均在 T2 和 T3 时期高效转录, 且 T3 时期的转录水平相对 T2 时期明显降低。

除上述相关基因外, 还鉴定到大量芽胞肽聚糖(细胞壁)合成相关基因, 主要涉及丙氨酸酰胺酶(alanine amidase)、细胞壁水解酶(hydrolase)、丙氨酸羧肽酶(carboxypeptidase)、细胞壁结合蛋白(penicillin-binding protein), 共 32 个(代表性基因如表 3 所示), 其中肽聚糖识别(recognition)和翻转(turnover)蛋白基因各 1 个。2 个细胞壁水解酶的转录水平 T2 时期最高, 而大多数细胞壁结合蛋白在 T2 时期转录水平相对最低。乙酰胞壁酰-丙氨酸酰胺酶在 T3 时期相对转录水平最高, *cwIA* 在 3 个时期的转录无明显变化, *cwID* 主要在 T2 时期高效转录, 而 *cwIO* 主要在 T1 和 T3 时期转录。

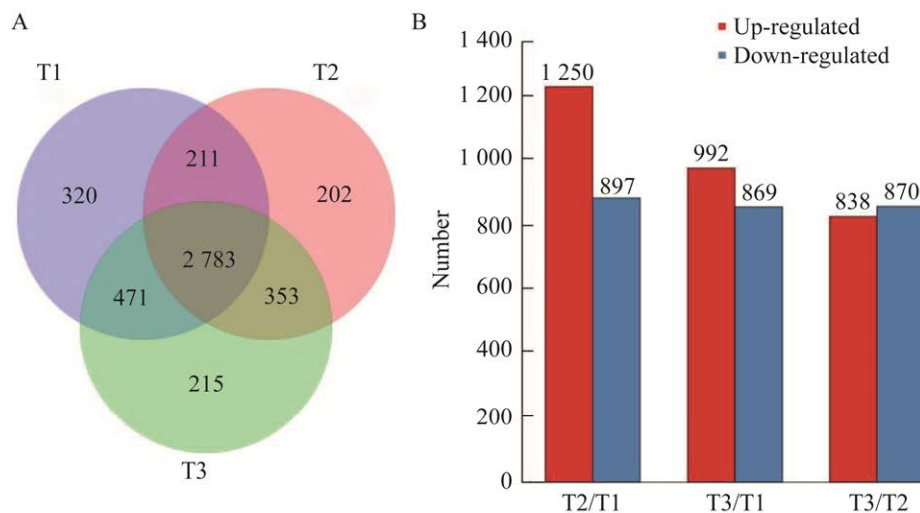


图 3 三个重要时期转录组韦恩图(A)和差异基因统计(B)

Figure 3 Venn diagrams (A) and the number of differential genes statistics (B) which compared three periods.

表 2 芽胞结构和组分相关基因转录水平

Table 2 Transcriptional levels of structure and composition of genes related to spore

Gene	FPKM			Description
	T1	T2	T3	
<i>ssp</i>	71.3	41 814.3	1 835.8	Acid-soluble spore protein
<i>sspE</i>	100.7	74 330.1	10 031.3	Acid-soluble spore protein
<i>sspI</i>	8.7	361.9	24.8	Acid-soluble spore protein
<i>sspH</i>	11.6	10.5	0.0	Acid-soluble spore protein H
<i>sspK</i>	38.7	20 149.7	876.0	Acid-soluble spore protein K
<i>sspN</i>	0.0	134.4	63.0	Acid-soluble spore protein N
<i>sspO</i>	16.6	1 613.3	75.7	Acid-soluble spore protein O
<i>sspP</i>	0.0	139.6	61.1	Acid-soluble spore protein P
<i>tlp</i>	0.0	333.6	62.1	Acid-soluble spore protein
<i>sspB</i>	11.4	3 268.8	585.4	Small acid-soluble spore protein
<i>safA</i>	0.6	89.5	39.6	Spore coat assembly factor SafA
<i>cotD</i>	200.3	252 748.9	13 549.4	Spore coat protein
<i>cotE</i>	12.9	9 788.8	630.0	Spore coat protein
<i>cotF</i>	2.8	15.7	19.1	Spore coat protein
<i>cotH</i>	3.9	39.0	20.2	Spore coat protein
<i>cotM</i>	9.1	4 936.2	5 541.8	Spore coat protein
<i>cotW</i>	0.0	16.5	254.5	Spore coat protein
<i>cotX</i>	2.6	419.3	57 082.5	Spore coat protein
<i>cotX</i>	13.7	1 236.1	96 802.6	Spore coat protein
<i>cotZ</i>	240.1	280 324.8	5 213.3	Spore coat protein
<i>cotC</i>	4.4	0.0	5.5	Spore coat protein C
<i>cotJB</i>	0.0	52.4	20.3	Spore coat protein CotJB
<i>cotS</i>	6.0	279.5	90.2	Spore coat protein CotS
<i>cotG</i>	32.2	32 818.9	10 399.0	Spore coat protein G
<i>cotZ</i>	20.4	8 640.4	451.8	Spore coat protein Z
<i>yabQ</i>	18.7	10.8	51.3	Spore cortex biosynthesis protein YabQ
<i>dapA</i>	2.8	2 222.4	110.8	Dipicolinate synthase subunit A
<i>dapB</i>	5.9	3 281.5	167.9	Dipicolinate synthase subunit B
<i>dapD</i>	256.1	64.1	353.4	Tetrahydrodipicolinate N-acetyltransferase

2.5 Sigma 转录调控基因

芽胞和 ICPs 的形成过程中主要受到 sigma 转录因子的时序调控。共鉴定到 16 个 sigma 因子及其相关基因(表 4), 主要是 sigma70 家族基因, 包括 *rpoD/E*、*sig54* 和 *sigE-H*。 *sigK* 相关基因有 2 个,

bofA 和 *bofC*, 主要对 *sigK* 转录水平进行调控。另外还检测到低转录水平的 *sigW*、*sigX* 和 *sigM* 负效应子。*sigE*、*sigG* 和 *bofC* 主要在 T2 和 T3 时期高效转录, *sig54* 和 *sigF* 在 3 个时期都能高效转录, 而 *sigH* 在 T1 时期的转录效率最高。

表 3 芽胞肽聚糖相关基因转录水平

Table 3 The transcription levels of peptidoglycan related genes of spore

Gene	FPKM			Description
	T1	T2	T3	
<i>ampC</i>	106.9	9.5	18.8	6-aminohexanoate-oligomer exohydrolase
<i>cwlA</i>	57.4	55.1	42.3	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
<i>cwlD</i>	2.3	31.9	7.6	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
<i>cwlJ</i>	9.2	598.4	272.8	Cell wall hydrolase
<i>cwlO</i>	1101.5	74.8	406.1	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
<i>dacC</i>	17.1	57.6	27.7	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
<i>dacF</i>	1.7	44.1	42.1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
<i>ftsII</i>	48.6	21.5	26.6	Penicillin-binding protein
<i>lysM</i>	2.8	6.8	7.1	Peptidoglycan-binding protein LysM
<i>mecA</i>	37.6	7.7	38.4	Beta-lactam-resistant peptidoglycan transpeptidase
<i>murI</i>	1.5	61.9	1 620.5	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
<i>pbp1A</i>	44.1	8.4	49.0	Penicillin-binding protein
<i>pbp2D</i>	8.5	23.1	24.7	Penicillin-binding protein 2D
<i>PGPR</i>	2.7	4.1	3.4	Peptidoglycan recognition proteins
<i>sleB</i>	1.1	11.8	3.4	Hydrolase, spore cortex-lytic enzyme
<i>spoVD</i>	50.7	9.2	51.2	Stage V sporulation protein D (sporulation-specific penicillin-binding protein)

表 4 转录组中 sigma 调控因子

Table 4 Sigma regulators in the transcriptome data

Gene	FPKM			Description
	T1	T2	T3	
<i>bofA</i>	7.5	0.0	0.0	Sigma-K factor-processing regulatory protein BofA
<i>bofC</i>	1.7	54.1	30.3	Forespore regulator of the sigma-K checkpoint
<i>deoR</i>	14.6	2.9	37.8	RNA polymerase sigma factor
<i>raiA</i>	42 664.3	613.9	2 058.3	Sigma-54 modulation protein
<i>rpoD</i>	1 375.8	236.4	736.5	RNA polymerase sigma factor RpoD
<i>rpoE</i>	9.2	5.0	13.2	RNA polymerase sigma factor
<i>sig54</i>	94.1	78.2	34.7	RNA polymerase subunit sigma-54
<i>sigB</i>	17.9	4.5	21.9	RNA polymerase sigma factor SigB
<i>sigE</i>	9.3	38.2	22.5	RNA polymerase sigma factor
<i>sigF</i>	509.4	182.0	372.7	RNA polymerase sigma factor
<i>sigG</i>	7.94	856.03	293.1	RNA polymerase sigma-G factor
<i>sigH</i>	588.3	21.2	50.7	RNA polymerase sigma-H factor
<i>sigJ</i>	19.4	21.4	13.9	RNA polymerase sigma factor SigJ
<i>sigMR</i>	11.6	17.6	22.1	Sigma-M negative effector
<i>sigW</i>	3.7	0.0	0.0	RNA polymerase sigma factor SigW
<i>sigX</i>	2.3	4.3	3.9	RNA polymerase sigma factor SigX

2.6 转录组中芽胞形成基因

芽胞形成相关基因共 87 个, 包括芽胞形成激酶、芽胞萌发受体蛋白, 从起始到第 VI 阶段的芽胞形成蛋白基因(*spo0*–*spoVI*), 芽胞发育成熟基因(*sbmA*、*spmB*), 以及其他芽胞形成调控

基因。其中 *spo0A/F* 和芽胞形成激酶(*kinA/B/E*) 早在 T1 时期高效转录。其他大部分基因在 T2 和 T3 时期的转录水平明显要比 T1 时期高, 趋势与表型相符。*spoIIAA*、*spoIIISA/B*、*spoVG* 比较特殊, 在 T1 时期转录水平最高(表 5)。

表 5 芽胞形成基因转录水平

Table 5 The transcription level of sporulation genes

Gene	FPKM			Description
	T1	T2	T3	
<i>spoIIAA</i>	218.5	45.6	75.4	Anti-sigma F factor antagonist
<i>ftsK</i>	3.0	49.5	7.0	Cell division protein FtsK
<i>rsfA</i>	58.6	345.7	89.9	Prespore-specific transcriptional regulator rsfA
<i>gerA</i>	2.4	20.4	12.7	Spore germination protein GerA
<i>gerD</i>	163.4	69.3	9.2	Spore germination protein GerD
<i>gerQ</i>	10.0	645.3	392.4	Spore germination protein GerQ
<i>sbmA</i>	0.0	7.1	18.9	Spore maturation protein
<i>spmB</i>	6.9	15.2	13.3	Spore maturation protein
<i>soj</i>	244.7	29.1	48.2	Sporulation initiation inhibitor Soj
<i>atoS</i>	5.3	4.1	10.0	Sporulation kinase
<i>kinA</i>	135.8	9.8	5.3	Sporulation kinase
<i>kinB</i>	283.5	50.7	43.5	Sporulation kinase
<i>kinE</i>	40.1	6.4	44.2	Sporulation kinase
<i>gerM</i>	8.8	24.0	57.5	Sporulation protein
<i>spo0B</i>	31.1	8.6	199.6	Sporulation protein
<i>spo0M</i>	13.3	43.1	46.0	Sporulation protein Spo0M
<i>ypjB</i>	0.0	4.2	8.0	Sporulation protein YpjB
<i>ytaF</i>	0.0	36.8	7.5	Sporulation protein YtaF
<i>whiA</i>	137.4	23.5	32.1	Sporulation regulator WhiA
<i>yaaT</i>	143.7	8.1	65.0	Stage 0 sporulation protein
<i>spo0A</i>	679.5	131.2	132.2	Stage 0 sporulation protein A
<i>spo0F</i>	363.3	35.1	33.7	Stage 0 sporulation protein F
<i>spoIIB</i>	1.9	1.8	4.2	Stage II sporulation protein B
<i>spoIID</i>	3.8	91.7	19.0	Stage II sporulation protein D
<i>spoIIAAB</i>	0.0	2.3	4.8	Stage III sporulation protein AB
<i>spoIIAD</i>	0.0	23.2	28.3	Stage III sporulation protein AD
<i>spoIIID</i>	0.00	740.9	111.4	Stage III sporulation protein D
<i>spoIVA</i>	15.6	428.7	222.0	Stage IV sporulation protein A
<i>spoVAA</i>	0.0	15.3	2.6	Stage V sporulation protein AA
<i>spoVD</i>	50.7	9.2	51.2	Stage V sporulation protein D
<i>spoVE/ftsW</i>	75.6	22.2	112.2	Stage V sporulation protein E
<i>spoVFB</i>	5.9	3 281.5	167.9	Stage V sporulation protein VFB
<i>spoVID</i>	0.8	48.1	31.7	Stage VI sporulation protein D
<i>hcN/YlaJ</i>	3.7	148.8	14.3	YhcN/YlaJ family sporulation lipoprotein

2.7 Cry1Ac 和分子伴侣蛋白转录变化

对分子伴侣蛋白进行检索,共鉴定到 8 个功能基因(表 6),在 3 个时期都能进行有效转录。*hsp20B* 与 *cry1Ac* 的转录变化趋势基本一致,*hsp20* 转录水平在 T2 时期最低, T3 时期最高;*dnaK*、*dnaJ*、*groEL*、*clpB* 和 *htpG* 3 个时期中在 T1 时期表现出最高转录;只有 *copZ* 表现出不断递增的趋势。

2.8 碳源、能源储藏物 PHB 和羟基丁酮的转录

phbB 和 *phaC* 与 PHB 合成相关,均在 T1 时期高效转录,在 T2 时期显著下调,到 T3 时期转录水平又逐渐回升。羟基丁酮合成相关基因有 7 个(表 7),其中 acetoin 利用蛋白基因

acuA/B/C 在 T1-T3 均有效转录。

2.9 差异基因的 qRT-PCR 验证

选取一些上下调基因和几个重要代表性基因进行转录水平的验证。以 T1 时期的转录水平作参照设为 1。杀虫晶体蛋白 Cry1Ac、Cry2Aa,芽胞和 ICPs 形成转录调控因子 sigmaK,芽胞皮层形成功能蛋白 CwID,它们均在 T2、T3 时期显著上调,而且 T2 时期倍数差异基本在 150 倍以上,比 T3 时期的更高(图 4)。整体的 qRT-PCR 结果和转录组的差异变化趋势相一致,与菌株的表型和已有的相关研究相符。

其他功能基因(图 5A),如小热激蛋白基因 *hsp20*,氨基酸合成相关基因 *leuB*、*glnA*、*lysA*,芽胞起始相关基因 *spo0A*、*phoR*,转录水平的验

表 6 *cry1Ac* 和分子伴侣的转录

Table 6 Transcription of *cry1Ac* and molecular chaperone

Gene	FPKM			Description
	T1	T2	T3	
<i>cry1Ac</i>	207.5	6 547.2	5 537.0	Pesticidal crystal protein cry1Ac
<i>hsp20</i>	213.1	63.0	702.9	Molecular chaperone small heat shock protein
<i>hsp20B</i>	31.7	11 694.1	366.6	Molecular chaperone small heat shock protein
<i>dnaK</i>	2 366.9	403.5	862.7	Molecular chaperone DnaK
<i>groEL</i>	11 932.4	3 768.1	2 919.2	Molecular chaperone GroEL
<i>copZ</i>	48.1	68.2	170.2	Copper chaperone CopZ
<i>htpG</i>	28.7	3.2	17.1	Chaperone protein HtpG
<i>dnaJ</i>	264.0	101.9	126.2	Molecular chaperone DnaJ
<i>clpB</i>	104.4	40.0	47.7	Protein disaggregation chaperone

表 7 PHB 和羟基丁酮相关基因转录

Table 7 Transcription of PHB and acetoin related genes

Gene	FPKM			Description
	T1	T2	T3	
<i>ccmA</i>	0.0	1.8	6.8	Acetoin ABC transporter ATP-binding protein
<i>acoR</i>	21.1	2.4	2.5	Acetoin dehydrogenase
<i>alsD</i>	4.0	5.47	5.3	Alpha-acetolactate decarboxylase
<i>acuB</i>	103.3	112.7	42.7	Acetoin utilization protein AcuB
<i>acuA</i>	42.7	47.7	14.8	Acetoin utilization protein AcuA
<i>gi 446390654</i>	3.8	1.9	6.8	Acetoin ABC transporter permease
<i>acuC</i>	211.8	40.9	26.1	Acetoin utilization protein AcuC
<i>phbB</i>	230.4	11.0	46.9	Acetoacetyl-CoA reductase
<i>phaC</i>	598.6	80.5	253.5	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase

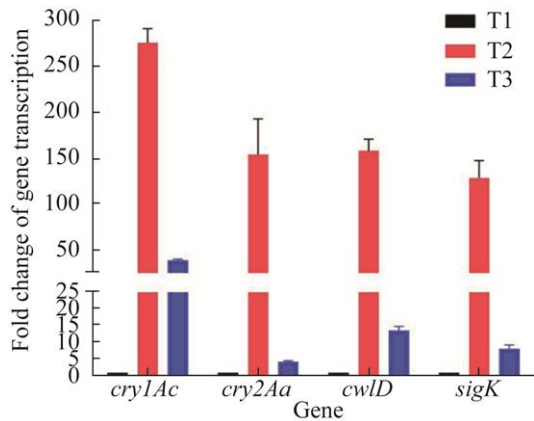


图 4 不同时期 *cry1Ac*、*cry2Aa*、*sigK*、*cwID* 基因的 qRT-PCR 结果

Figure 4 Results of qRT-PCR of *cry1Ac*, *cry2Aa*, *sigK*, and *cwID* genes at different periods. Data were shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

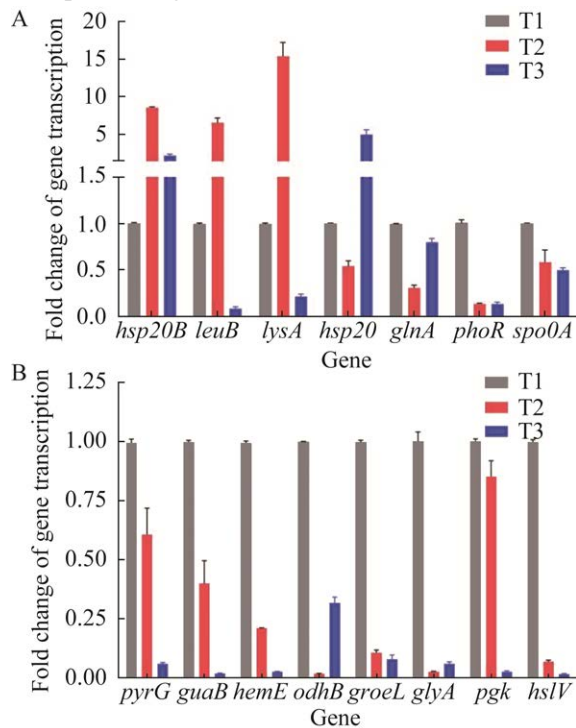


图 5 不同时期转录组中其他上下调基因的 qRT-PCR 验证结果

Figure 5 Verification results of qRT-PCR of other up-down-regulated genes in the transcriptome at different periods. A: Results of qRT-PCR of *hsp20B*, *leuB*, *lysA*, *hsp20*, *glnA*, *phoR*, and *spo0A* genes at different periods. B: Results of qRT-PCR of *pyrG*, *guaB*, *hemE*, *odhB*, *groEL*, *glyA*, *pgk*, and *hslV* genes at different periods. Data were shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

证结果与转录组的变化趋势相一致。此外, *pyrG*、*odhB*、*pgk* 和 *hslV* 等代谢相关基因的转录水平变化(图 5B)也基本与 qRT-PCR 结果相符,在 T2、T3 时期显著下调。

2.10 差异基因的生物信息学分析

T2/T1、T3/T1、T3/T2 三组差异基因所富集的通路无差异,都包含了细菌的生长,复制、转录和翻译,环境信息相关的信号转导和膜转运;代谢最显著的包括糖类、氨基酸、脂质和能量代谢,核酸、多肽代谢和次级产物生成代谢,菌体的免疫系统和环境适应系统也有所涉及。对 3 组差异基因再次进行 Venn 分区,去除一些重复性的干扰,对每组特异性的显著差异基因进行分筛,结合每个时期的特点进一步分析。根据 3 组显著差异基因的韦恩图,进行编号 I-VII (图 6), T2/T1 组的特异性差异基因为 298 个(I), T3/T1 组特异性差异基因有 243 个(II), T3/T2 组特有的差异基因数为 163 个(III)。3 组共同含有的差异基因有 576 个(VII),而 3 组间两两共同包含的差异基因数分别为 663 (IV)、346 (V)、588 (VI)。

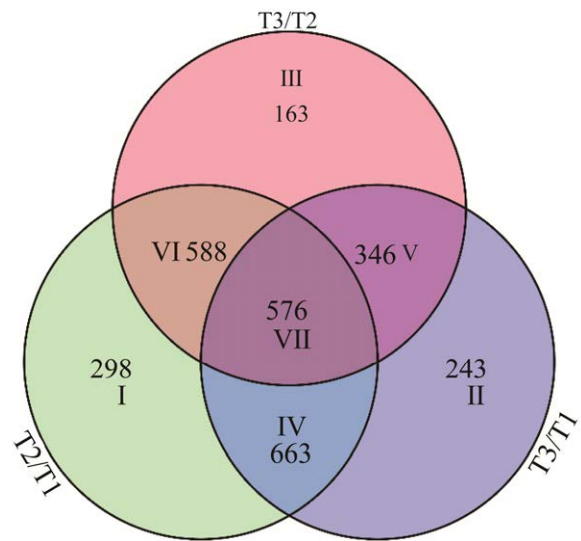


图 6 三组显著差异基因韦恩图

Figure 6 Venn diagram of significantly differential genes.

2.10.1 I–VII 号区域差异基因集的 KEGG 分析

在菌株库中选择枯草芽胞杆菌模式菌株 *Bacillus subtilis* 168 为模型, 对 I–VII 区域进行 KEGG 通路分析。I 号区域富集到的双组分系统和 ABC 转运子最为显著, 其次磷酸转移酶系统、乙醛酸和二羧酸代谢较为明显, 非核糖体肽模块 (non-ribosomal peptide structures) 也在此区域被富集到; II 号区, 双组分系统、氨基酸合成(其中支链氨基酸的合成被单独富集)富集程度最高, 而且非核糖体肽模块、淀粉和蔗糖代谢、泛酸和辅酶 A (coenzyme A, CoA) 合成途径也被富集(图 7)。

在其他区域中, III 号区未发现值得被关注的通路, 因此未展示。IV 号区除去映射到 132 个基因的最显著的代谢途径 (metabolic pathways), 脂肪酸合成与代谢、嘧啶代谢 (pyrimidine metabolism)、氧化磷酸化、丙氨酸 (Ala)、天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu) 代谢都被相对均匀涉及。V 号区主要富集到甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism) 赖氨酸降解 (lysine degradation)、支链氨基酸降解、嘌呤代谢 (purine metabolism) 和核糖体代谢, 而最后 2 个途径比较突出, 分别映射到 21 个和 25 个基因 (图 8)。

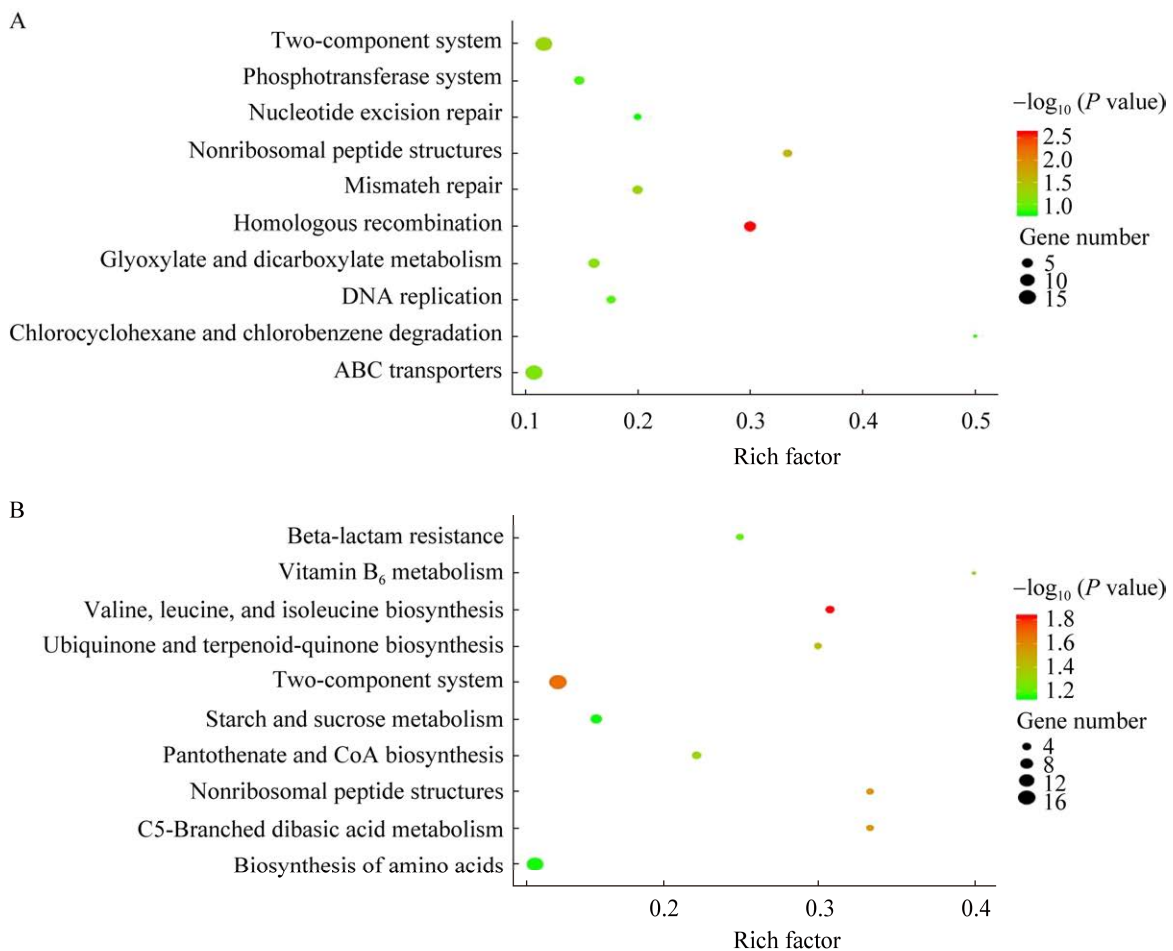


图 7 I (A) 和 II (B) 号区域差异基因 KEGG 分析结果

Figure 7 KEGG analysis result of the differential genes in regions I (A) and II (B).

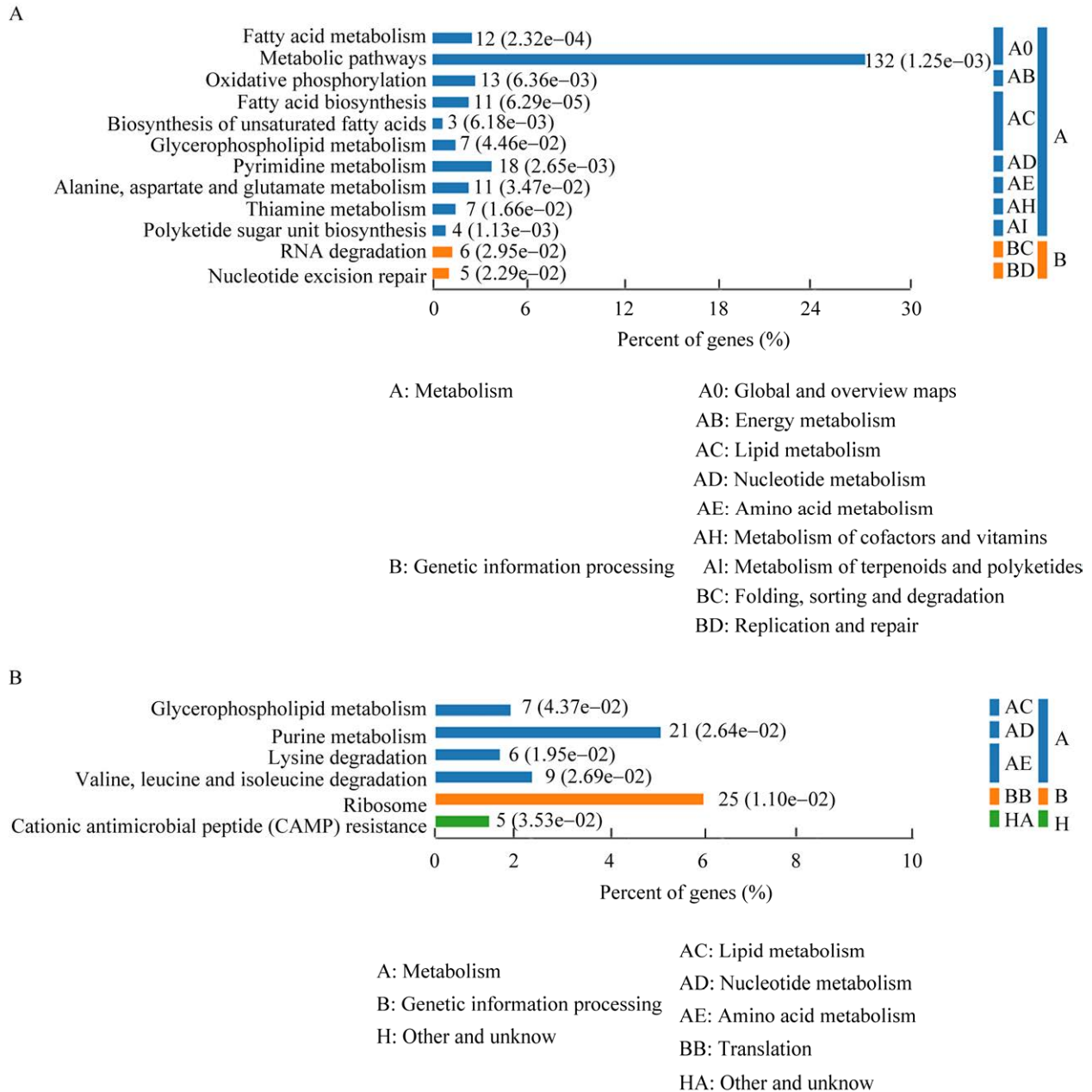


图 8 IV (A)和 V (B)号区域差异基因 KEGG 分析结果

Figure 8 KEGG analysis result of the differential genes in regions IV (A) and V (B).

针对 VI 和 VII 号区的 KEGG 分析(图 9), VI 号区差异基因映射最多的是次级代谢物合成, 其次是氨基酸合成, 另外与细胞壁合成相关的 D 型丙氨酸(D-alanine)代谢、肽聚糖合成通路富集 9 个差异基

因; VII 号区, 124 个基因映射到代谢途径, 氨基酸合成映射到差异基因 29 个, 嘧啶代谢映射到 15 个, 赖氨酸生成映射到 6 个, 精氨酸合成映射到 7 个, 硫胺素合成和硫传递系统分别映射到 8 个和 6 个。

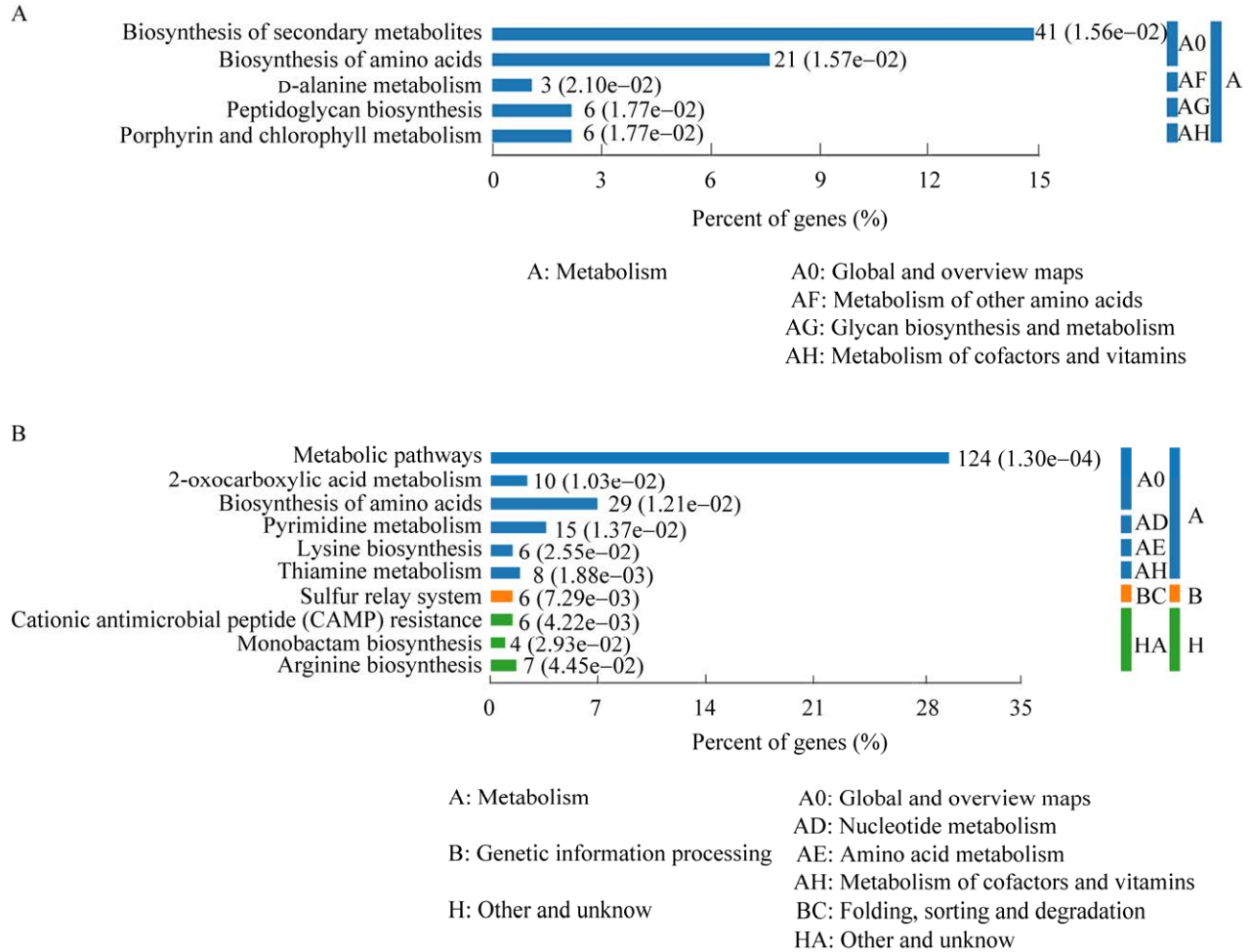


图 9 VI (A)和 VII (B)号区域差异基因 KEGG 分析结果

Figure 9 KEGG analysis result of the differential genes in regions VI (A) and VII (B).

2.10.2 时间序列聚类

芽胞和杀虫伴胞晶体的形成与培养时间有关, 根据所选 3 个时期, 时间表达模式共得到 9 类基因簇(cluster 1-9, 图 10)。qRT-PCR 验证和转录测序结果表明, 杀虫晶体蛋白的表达模式归类到 cluster 2, 同时, 对各类基因簇的分析发现, 在 cluster 7 集中了大量与芽胞和 ICPs 相关的功能基因。Cluster 2 和 cluster 7 所包含的基因个数分别为 732 和 866。Cluster 2 中主要包含了基础代谢、碳源和能源代谢, 以及部分的氨基酸

修饰(图 11), 其中, 发挥催化和氧化还原活性的功能基因占主导地位, 分别聚集到 273 个和 83 个基因, 而第三大类富集在物质转运, 主要是糖类和特异性底物的转膜、转运。

Cluster 7 基因簇富集最显著的通路是双组分系统、ABC 转运系统(橙色条目), 加上非核糖体肽, 这 3 类条目与之前显著差异基因韦恩图中 I 和 II 号区的分析结果相重合。除此以外, 甘油磷脂代谢和细菌趋化性通路也被匹配到, 而这两者在之前并未显著富集(图 12)。

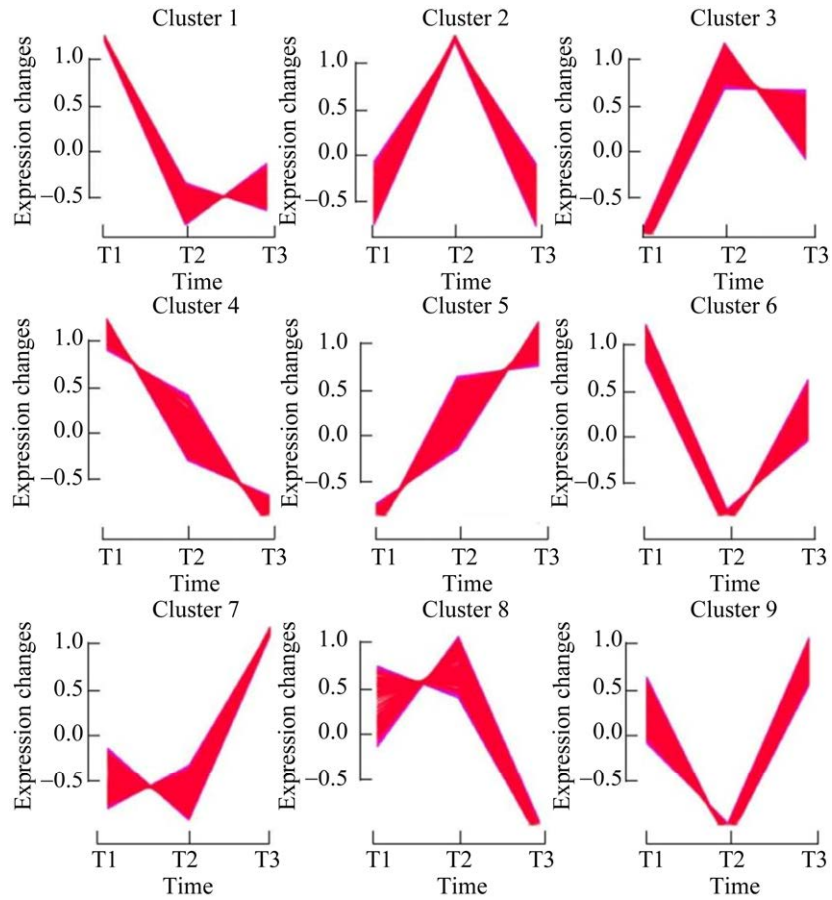


图 10 时间序列分析结果

Figure 10 Time cluster analysis results.

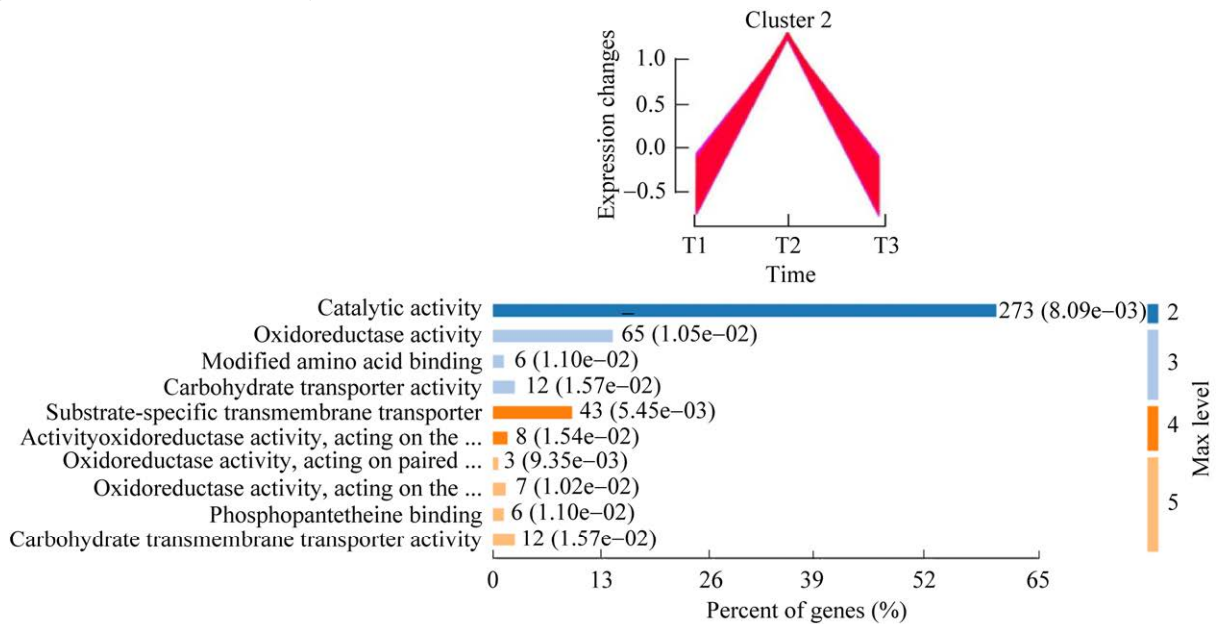


图 11 Cluster 2 基因簇 KEGG 分析结果

Figure 11 KEGG analysis result of cluster 2.

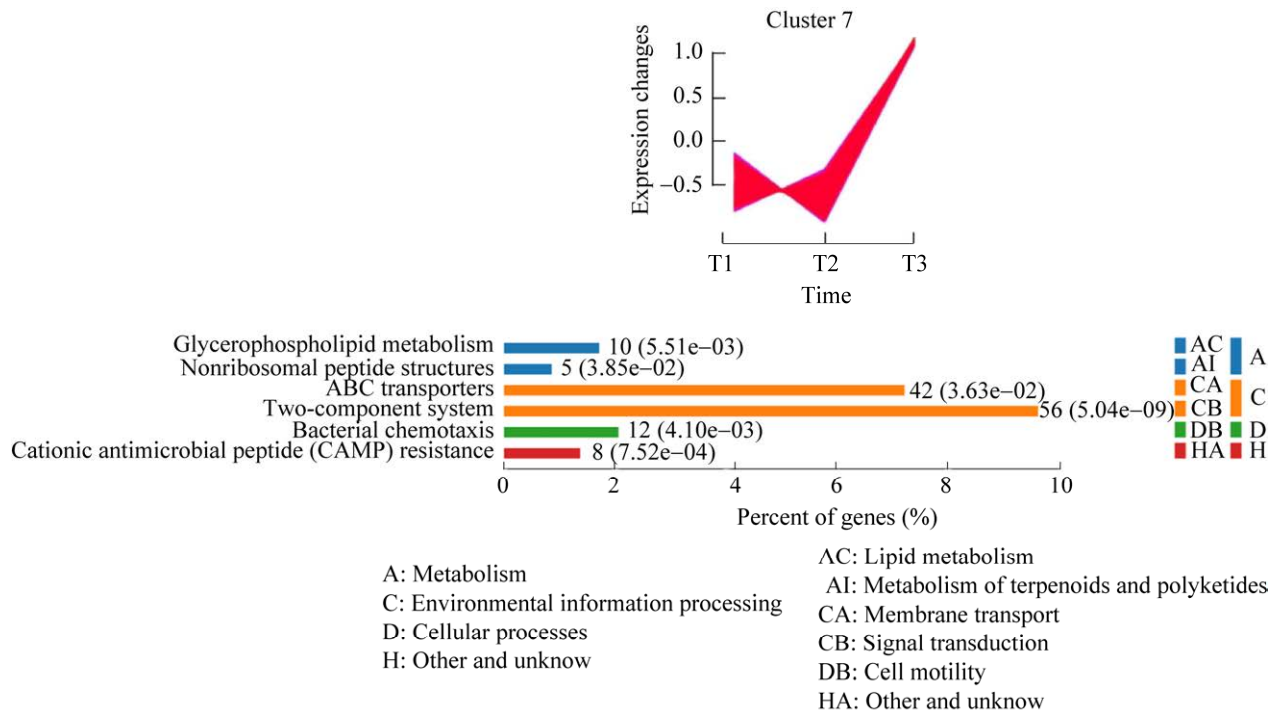


图 12 Cluster 7 基因簇 KEGG 分析

Figure 12 KEGG analysis results of cluster 7.

2.11 *hsp20* 基因的功能研究

根据以上 3 个时期的转录组比较分析,对芽胞和 ICPs 形成时期高效转录的小热激蛋白基因 *hsp20* 的功能研究。利用 I-Sec I 无痕敲除体系构建 Bt4- Δ *hsp20* 突变株(图 13), 相比原始菌株

Bt4.0718, 敲除菌株的生长稳定期缩短了大约 2 h, 生长量略微减少, 芽胞形成量约为原始菌的 10%, ICP 产量为原始菌的 1/2 (图 14, 图 15), 表明小热激蛋白基因 *hsp20* 对芽胞和 ICPs 的形成具有显著的影响。

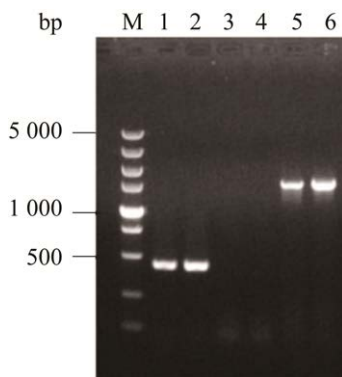


图 13 *hsp20* 基因敲除鉴定

Figure 13 Identification of *hsp20* knockout. Identification of PCR amplifies. Lane 1: Wild type strain; Lane 2: Complemented strain; Lanes 3–4: Knockout strain; Lanes 5–6: 16S rRNA gene sequence of wild type and knockout strain.

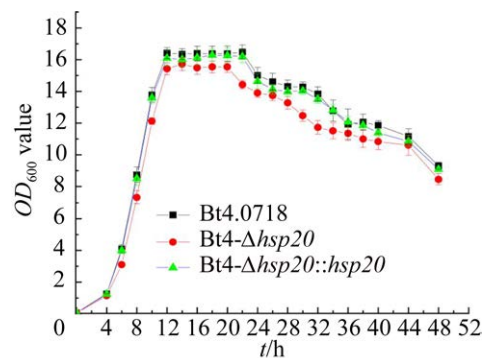


图 14 Bt4.0718 原始菌株及其 *hsp20* 敲除和回复菌株发酵培养基的生长曲线

Figure 14 Growth curves of the Bt 4.0718, Bt4- Δ *hsp20*, and Bt4- Δ *hsp20*::*hsp20* strains in fermentation medium. Data were shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

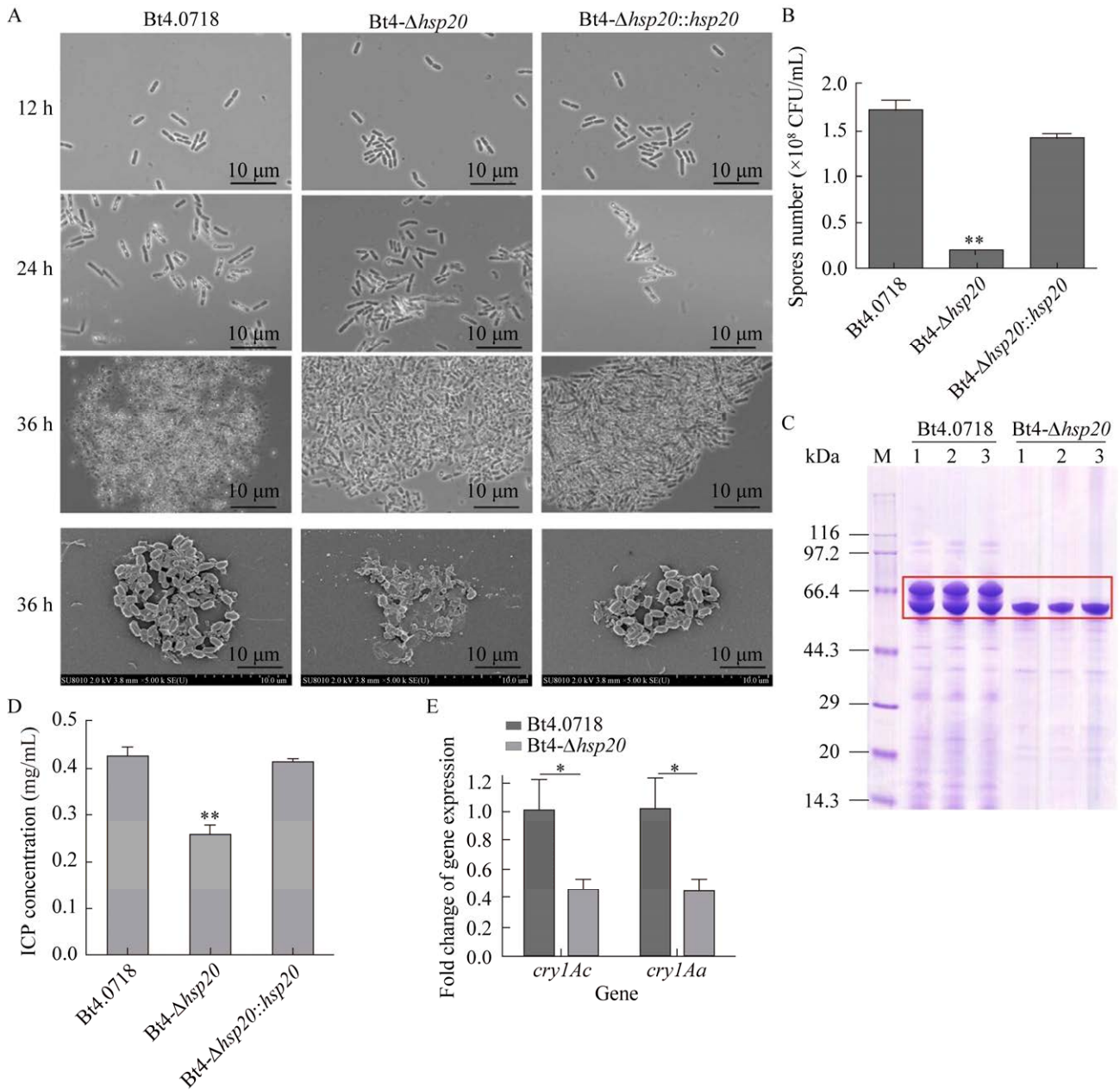


图 15 Bt4-Δhsp20 菌株显微观察及芽孢和伴胞晶体形成能力分析

Figure 15 Analysis of sporulation and parasporal crystal formation in Bt4-Δhsp20. A: Phase contrast microscopy of the strains at 12 h, 24 h, and 36 h, and the scanning electron microscopy of the spores and parasporal crystals (10 000 \times) at 36 h. B: Sporulation of the Bt4-Δhsp20 compared to Bt4.0718, and Bt4-Δhsp20::hsp20 strains in LB at 60 h (CFU/mL), and each experiment was carried out in triplicate, significances of differences by Student's *t*-test was indicated. **: $P \leq 0.01$. C: ICPs in Bt4.0718 and Bt4-Δhsp20 strains at 20 h analyzed by SDS-PAGE. D: Concentrations of ICPs at 20 h determined by Bradford method in Bt4-Δhsp20 compared to Bt4.0718, and Bt4-Δhsp20::hsp20 strains, the significances of differences by Student's *t*-test was indicated. **: $P \leq 0.01$. E: qRT-PCR analysis the fold change of *cryIAc* and *cryIAa* in Bt4-Δhsp20 strain which compared to Bt4.0718 after fermentation for 28 h, the significances of differences by Student's *t*-test were indicated. *: $P \leq 0.05$. Data were shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

3 讨论

3.1 Bt 芽胞形成不同时期转录特征

在 T1 时期, Bt 主要是自身的生长发育, 尽管芽胞形成起始激活的各个重要基因都已开始高水平转录, 为芽胞形成的起始做好充足准备, 在后续营养进一步匮乏时, 芽胞形成的代谢网络会被陆续激活。与表型相符, WhiA 主要影响细胞分裂^[11], 在 T1 时高水平转录。Anti-sigma F 因子 *spoIIAA*, *soj* 芽胞形成起始抑制子, 芽胞形成激酶基因 *kinA/B/E*, 芽胞形成早期重要调控基因 *spo0A/F*、*yaaT* 转录水平 T1 最高。Soj 作为染色质分配蛋白, 控制着 DNA 的复制, 细胞的分裂, 在 T1 时期高效转录有利菌体正常的生长、发育和增殖^[12-13], Soj 也可通过抑制磷酸化 Spo0A 激活的启动子转录而负调控芽胞的形成^[14]。*kinA/B/E* 在对数生长阶段调控 *spo0A* 和 *spo0F* 的磷酸化, 同时在生长稳定期早期转录表达^[15]。*yaaT* 在芽胞起始的磷酸化信号转导和菌体的生长发育都具有重要作用^[16]。另外, 前芽胞特异转录调控基因 *rsfA* 在 T1 时期已开始进行有效的转录, 芽胞萌发受体蛋白基因 *gerD*、*gerIA* 和 *gerQ* 与 *rsfA* 转录情况相同, 为芽胞形成做好准备。

T2 时期大量形成芽胞和 ICPs, 从芽胞形成的起始到发育成熟, 相关基因均在此阶段进行高效转录。到 T3 时期, 芽胞形成相关基因大都保持一定转录水平, 但相对 T2 时期有不同程度的降低, 直到芽胞发育成熟, 杀虫伴胞晶体已大量成型。T3 时期, 菌体处于稳定中后期, 培养基中的营养成分相对 T2 时期更为匮乏, 因此芽胞形成相关基因的转录水平也会随之下调, 但对芽胞形成起关键调控作用的 *spoA/F*、*kinA/B* 的转录水平与 T2 时期无显著变化, 这对芽胞和 ICPs 形成提供了重要保证。

代谢层面, 芽胞和 ICPs 的形成得益于早期能源的储备和重要代谢通路的稳定协同。聚-3-羟基丁酸(PHB)和羟基丁酮的合成主要发生在生长对数期, T1 时期 PHB 合成相关的 *phaC* 和 *phbB* 转录水平最高, T2 和 T3 时期都相应下调, T2 时期最低。与羟基丁酮合成相关的 *acoR* 同样在 T1 时的转录最高(*alsD3* 个时期无变化), 作为乙酰辅酶 A 的重要来源, 它的利用可能在 T1 时就开始, 且主要消耗在 T1 和 T2 时期, 因为羟基丁酮利用操纵子 *acu* (*acuA/B/C*) 在 T1 和 T2 时期高转录, 在 T3 时期显著下调。T2 和 T3 时期相比 T1 共有的差异代谢途径包括脂肪酸代谢与合成、氧化磷酸化、2-氧代羧酸代谢、嘧啶代谢甘油磷脂代谢氨基酸(丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸)代谢硫胺素代谢和氨基酸合成。除上述的差异代谢途径, 时间序列分析中的 *cluste 2* 与杀虫晶体蛋白(Cry1Ac)的转录趋势相似; *cluster 7* 的聚类结果是在 T3 时期上调的基因集, 其中的一些上调基因很有可能有利杀虫晶体蛋白的表达。*Cluster 2* 中的基因主要与催化和转运相关, 其中较为突出的是物质的氧化还原, 糖或其他底物的转膜、转运。与 *cluster 2* 不同, *cluster 7* 以甘油磷脂代谢, 双组分系统, ABC 转运体为主, 在后期作用显著, PhoP-PhoR 双组分系统, 主要介导磷酸盐缺乏反应, 引发芽胞形成所需的 Spo0 蛋白的磷酸转移, 且枯草芽胞杆菌中的 Pho 调节子受 Res、Pho 和 Spo 信号转导系统整体作用的调控^[17]。LiaRS 双组分系统在芽胞杆菌中主要维持细胞膜的完整性, 对胞膜的扰动有所反应^[18], 在 T2 时期上调, 表明此时细胞膜上的活动增强。LytST 能够调控丙酮酸的利用, 细胞外丙酮酸充当 LytST 双组分系统的信号分子, 进而诱导后续 PftAB 转运蛋白的表达, 当丙酮酸大量流入时, LytST 活性被大大地抑制^[19]。T2 与 T1 时期相比, 大部分的 ABC

转运子 ATP 结合蛋白和通透酶基因的转录水平显著上调; 葡萄糖转运子亚基、甲硫氨酸(Met)支链氨基酸、谷氨酰胺(glutamine)、半胱氨酸(cysteine)、甘氨酸(glycine)和甘油-3-磷酸(glycerol-3-phosphate)相关的 ABC 转运子转录上调, 均有利于 ICP 的合成。而大部分肽段(peptide)和铁离子 ABC 转运子转录水平下调, 其原因值得进一步研究。

3.2 芽胞和 ICPs 形成转录调控因子

转录调控因子 sigma E/F/G/H/K 与芽胞和 ICPs 形成的关系已研究和报道, 各因子(表 4)的转录趋势与已知研究结果相一致。其他调控基因如表 4 中 *bofA*, 仅在 T1 时低水平转录, 在 T2 和 T3 时期无转录, 而 *bofC* 在 T1 时低转录, 在 T2 和 T3 时水平分别提高 29 倍和 16 倍, 正好增强 SigK 的转化, 将有利于芽胞和 ICPs 的形成。芽胞杆菌自身生长和应激反应相关调控因子 SigB 属一般性应激转录因子, 与生物膜形成相关, 营养有限时触发扩散至关重要, 可提高对环境的适应性^[20]。SigW 在细胞膜上表达, 正常情况下与抗-SigW 因子紧密结合, 当受到不同应激条件时, SigW 解离出来激活其调控因子的转录^[21], 应对环境变化; SigM 负责调节细胞壁合成相关基因, 在压力条件下维持细胞壁的稳态起关键作用^[22]; SigX 和 SigM 同属胞质外功能(extracytoplasmic function, ECF)的 sigma 因子, 在对数生长期和早期稳定生长期与下游基因 *ypuN* 共转录, 能够增强高温、高盐的耐受性, 同时能够改变细胞表面特性^[23-24]。而 Sig54 主要调节对氮源和碳源的利用, 调控一些代谢通路^[25], 例如 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)和羟基丁酮(acetoin)的代谢, *aco* 操纵子的转录由羟基丁酮诱导, 受 Sig54 控制, 由 AcoR 正向调控^[26]。以上的调控因子可以很好地维持菌体的正常生长, 应对环境条件的变化, 对芽胞

和 ICPs 的形成均有很好的辅助作用。

3.3 Bt 中分子伴侣蛋白

常见分子伴侣蛋白 ClpB、DnaK、DnaJ 和 GroEL 见表 6, 在 T1-T3 时期始终能良好地转录表达, 辅助蛋白的折叠, 解聚变性或未折叠的蛋白, 但在 T1 时期水平最高, 可能此时菌体的新陈代谢最活跃。CopZ 作为铜伴侣蛋白与 p 型 ATP 酶转运蛋白 CopA 共同构成枯草芽胞杆菌中的铜解毒系统, 维持胞内的铜稳态, 还参与了重金属银离子和镉离子的解毒, 解毒能力大小与它们之间的亲和力有关, Ag(+)的结合亲和力与 Cu(+)非常相似, 而 Cd(2+)的结合明显较弱^[27-28]。*copZ* 的 T1-T3 转录水平呈递增趋势(FPKM 值从 48 上升至 170), 可能对胞内物质运输和稳态具有重要作用。根据比较转录组的研究结果, 鉴定到的 2 个 Hsp20 家族基因, 其中 *hsp20B* 转录水平变化与 *cryIAc* 的相似, 而 *hsp20* 却在 T3 时期的转录水平最高, 研究结果表明 *hsp20* 对 Bt 芽胞和伴胞晶体的形成发挥重要作用^[29]。

综上所述, Bt4.0718 杀虫晶体蛋白在对数生长中后期已开始转录表达, 与芽胞形成不同步; 芽胞形成的起始在营养逐渐匮乏时被诱导, 但在早期对数中后期会被抑制。SigB/M/W/X 和分子伴侣蛋白的表达上调能够很好地维持细胞壁的稳定和胞内稳态, 为芽胞和 ICPs 的形成提供保障。芽胞和 ICPs 形成依赖基础代谢网络的协同, 包括脂肪酸代谢、氧化磷酸化、嘧啶代谢、甘油磷脂代谢和氨基酸代谢等。参与底物特异性运输的 ABC 转运子表达上调, 例如葡萄糖、支链氨基酸、半胱氨酸、甘油磷酸和磷酸盐等 ABC 转运子, 能够促进芽胞和 ICPs 的形成。本研究对揭示 Bt 芽胞和 ICPs 形成机制具有一定科学指导意义, 为挖掘更多相关功能基因, 从调控、菌体代谢和稳态等层面进行修饰改造, 构建高毒力、高效表达杀虫晶体蛋白 Bt 工程菌株提供理论依据。

参考文献

- [1] JOUZANI GS, VALIJANIAN E, SHARAFI R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(7): 2691-2711.
- [2] CAO BB, SHU CL, GENG LL, SONG FP, ZHANG J. Cry78Ba1, one novel crystal protein from *Bacillus thuringiensis* with high insecticidal activity against rice planthopper[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2539-2546.
- [3] ARMADA E, LEITE MFA, MEDINA A, AZCÓN R, KURAMAE EE. Native bacteria promote plant growth under drought stress condition without impacting the rhizomicrobiome[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94(7): fiy092.
- [4] CAO ZL, TAN TT, JIANG K, MEI SQ, HOU XY, CAI J. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* L-7601, a wild strain with high production of melanin[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 275: 40-43.
- [5] MOAZAMIAN E, BAHADOR N, AZARPIRA N, RASOULI M. Anti-cancer parasporin toxins of new *Bacillus thuringiensis* against human colon (HCT-116) and blood (CCRF-CEM) cancer cell lines[J]. *Current Microbiology*, 2018, 75(8): 1090-1098.
- [6] GRACE JJ, RAMANI G, SHENBAGARATHAI R. Enhancement of purified human colon cancer-specific parasporal toxin from *Bacillus thuringiensis*-LDC-501[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(1): 104-114.
- [7] POORNIMA K, SARANYA V, ABIRAMI P, BINURAMESH C, SUGUNA P, SELVANAYAGAM P, SHENBAGARATHAI R. Phenotypic and genotypic characterization of B.t.LDC-391 strain that produce cytotoxic proteins against human cancer cells[J]. *Bioinformatics*, 2012, 8(10): 461-465.
- [8] RAMU SM, THULASINATHAN B, HARI DG, BORA A, JAYABALAN T, MOHAMMED SN, DOBLE M, ARIVALAGAN P, ALAGARSAMY A. Fermentative hydrogen production and bioelectricity generation from food based industrial waste: an integrative approach[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 310: 123447.
- [9] WANG JP, MEI H, ZHENG C, QIAN HL, CUI C, FU Y, SU JM, LIU ZD, YU ZN, HE J. The metabolic regulation of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* revealed by transcriptomics and proteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(5): 1363-1376.
- [10] ZHENG C, MA Y, WANG X, XIE YQ, ALI MK, HE J. Functional analysis of the sporulation-specific diadenylate cyclase CdaS in *Bacillus thuringiensis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 908.
- [11] BOHORQUEZ LC, SURDOVA K, JONKER MJ, HAMOEN LW. The conserved DNA binding protein WhiA influences chromosome segregation in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(8): e00633-17.
- [12] MURRAY H, ERRINGTON J. Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA[J]. *Cell*, 2008, 135(1): 74-84.
- [13] QUISEL JD, GROSSMAN AD. Control of sporulation gene expression in *Bacillus subtilis* by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB)[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(12): 3446-3451.
- [14] MCLEOD BN, SPIEGELMAN GB. Soj antagonizes Spo0A activation of transcription in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(7): 2532-2536.
- [15] JIANG M, SHAO WL, PEREGO M, HOCH JA. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(3): 535-542.
- [16] HOSOYA S, ASAI K, OGASAWARA N, TAKEUCHI M, SATO T. Mutation in *yaaT* leads to significant inhibition of phosphorelay during sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(20): 5545-5553.
- [17] HULETT FM. The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 19(5): 933-939.
- [18] JORDAN S, RIETKÖTTER E, STRAUCH MA, KALAMORZ F, BUTCHER BG, HELMANN JD, MASCHER T. LiaRS-dependent gene expression is embedded in transition state regulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiology*, 2007, 153(8): 2530-2540.
- [19] CHARBONNIER T, Le COQ D, McGOVERN S, CALABRE M, DELUMEAU O, AYMERICH S, JULES M. Molecular and physiological logics of the pyruvate-induced response of a novel transporter in *Bacillus subtilis*[J]. *mBio*, 2017, 8(5): e00976-17.
- [20] BARTOLINI M, COGLIATI S, VILETA D, BAUMAN C, RATENI L, LEÑINI C, ARGANARAZ F, FRANCISCO M, VILLALBA JM, STEIL L, VÖLKER U, GRAU R. Regulation of biofilm aging and dispersal in *Bacillus subtilis* by the alternative sigma factor SigB[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 201(2): e00473-18.

- [21] DEVKOTA SR, KWON E, HA SC, CHANG HW, KIM DY. Structural insights into the regulation of *Bacillus subtilis* SigW activity by anti-sigma RsiW[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0174284.
- [22] ZHAO H, ROISTACHER DM, HELMANN JD. Deciphering the essentiality and function of the anti- σ^M factors in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2019, 112(2): 482-497.
- [23] HUANG X, DECATUR A, SOROKIN A, HELMANN JD. The *Bacillus subtilis* σ^X protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival at high temperature[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(9): 2915-2921.
- [24] CAO M, HELMANN JD. The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function σ^X factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4): 1136-1146.
- [25] PENG Q, WANG GN, LIU GM, ZHANG J, SONG FP. Identification of metabolism pathways directly regulated by sigma54 factor in *Bacillus thuringiensis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 407.
- [26] 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*[J]. Microbiological Research, 2020, 235: 126438.
- [27] KIHLEN MA, SINGLETON C, Le BRUN NE. Distinct characteristics of Ag^+ and Cd^{2+} binding to CopZ from *Bacillus subtilis*[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2008, 13(6): 1011-1023.
- [28] KIHLEN MA, LEECH AP, Le BRUN NE. Copper-mediated dimerization of CopZ, a predicted copper chaperone from *Bacillus subtilis*[J]. Biochemical Journal, 2002, 368(3): 729-739.
- [29] XIE JY, PENG JL, YI ZX, ZHAO XL, LI SM, ZHANG T, QUAN MF, YANG SQ, LU JY, ZHOU PJ, XIA LQ, DING XZ. Role of hsp20 in the production of spores and insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2059.