

苏云金芽孢杆菌 *gerA* 操纵子在芽孢萌发中的作用

梁亮^{1,2}, 盖玉玲¹, 胡坤¹, 刘钢^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所, 微生物遗传与代谢工程研究中心, 北京 100101)

(² 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 芽孢萌发的营养诱导剂通过与特异的萌发受体结合激活下游的萌发过程, 从而使芽孢经过一系列的遗传变化及生化反应恢复营养生长。从苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)中克隆到一个与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)*gerA* 操纵子和蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)*gerR* 操纵子同源的 *gerA* 操纵子。苏云金芽孢杆菌 *gerA* 操纵子含有 3 个开放读码框: *gerAA*、*gerAC* 和 *gerAB*, 该操纵子在产孢起始 3 个小时后开始转录。*gerA* 的破坏阻断了 L-丙氨酸诱导的芽孢萌发并且延迟了肌苷诱导的萌发。在 L-丙氨酸诱导芽孢萌发的过程中 D-环丝氨酸能够提高芽孢的萌发率。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 部分基因组酶切文库; *gerA* 操纵子; RT-PCR; 芽孢萌发
中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0281-06

芽孢杆菌属(*Bacillus*)和梭菌属(*Clostridium*)芽孢的萌发要经历一系列的遗传变化和生化反应, 这些反应通常是由特定的营养诱导剂或非营养诱导剂诱导发生的。营养诱导剂 L-丙氨酸或者 AGFK (L-asparagine、D-glucose、D-fructose、potassium ions) 都可以诱导枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)芽孢的萌发^[1]。这些营养诱导剂通过与特异的三顺反子操纵子(*ger* 操纵子)编码的萌发受体相结合来起始下游萌发相关的遗传变化及生化反应^[2,3]。枯草芽孢杆菌有 5 个三顺反子操纵子, 其中 GerA 是 L-丙氨酸的受体, GerB 和 GerK 是 AGFK 和葡萄糖的受体。枯草芽孢杆菌的 *gerA* 编码 3 个蛋白, 其中 GerAA 可能不仅参与疏水结构域还参与亲水结构域的组成, GerAB 可能是单组分 amino acid/polyamine/organocation(APC) 转运超家族的膜整合蛋白, GerAC 可能是含有前脂蛋白信号序列的脂蛋白^[6]。由 *gerA* 操纵子编码的这 3 个蛋白在芽孢中相互作用并且形成一个受体复合物, 任何一个组分的失活都会影响整个受体的功能。在受体复合物中, GerAA 与 GerAB 相互作用, GerBA 与

GerBB 相互作用, 而 GerAC 和 GerBC 分别与 GerA 和 GerB 受体复合物中相应的 A 和 B 蛋白相互作用^[7-9]。*gerA* 的转录起始于产孢开始后 2.5~3h^[4]。 σ^G 可以正调控 *gerA* 的转录, 而 SpoVT 会起到抑制作用^[5]。虽然对芽孢萌发受体有了一定的了解, 但是对 *gerA* 编码的 3 个蛋白的功能, GerA 复合物感受环境中营养诱导剂的机理以及下游遗传变化和生化反应的起始还有待进一步研究。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)与蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)在宿主范围以及对农业和人类健康的影响方面有很大差异, 但是它们在遗传上是十分相近的^[15]。蜡状芽孢杆菌的萌发受体也是由 *ger* 操纵子编码的。蜡状芽孢杆菌 ATCC 14579 的基因组包含 7 个可能的 *ger* 操纵子, 它们分别为 *gerG*、*gerI*、*gerK*、*gerL*、*gerS*、*gerQ* 和 *gerR*^[10], 其中 GerL 受体参与 L-丙氨酸诱导的萌发, GerQ 受体参与肌苷诱导的萌发, 而 GerI 和 GerR 受体既参与 L-丙氨酸诱导的萌发也参与肌苷诱导的萌发^[11, 12]。在 L-丙氨酸诱导芽孢萌发的过程中, 孢外壁中的丙氨酸消旋酶会把 L-丙

基金项目: 国家自然科学基金(30430010)

*通讯作者。Tel: +86-10-64807467; Fax: +86-10-64807461; E-mail: liug@sun.im.ac.cn

作者简介: 梁亮(1981-), 男, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事苏云金芽孢杆菌芽孢萌发相关的研究。E-mail: bdliangliang@gmail.com

收稿日期: 2007-08-08; 修回日期: 2007-09-06

氨酸转化为 L-丙氨酸诱导萌发的抑制剂 D-丙氨酸从而降低萌发率, 而 D-环丝氨酸可以不可逆的抑制丙氨酸消旋酶的活性^[13]。

即使在同源性很高的芽孢杆菌之间甚至同种不同菌株之间, *ger* 操纵子在数量和功能上也存在很大差异^[10]。尽管目前对蜡状芽孢杆菌组的蜡状芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌芽孢的萌发过程和调控机理进行了深入研究, 但对苏云金芽孢杆菌芽孢萌发的研究还很少。对苏云金芽孢杆菌芽孢萌发受体的研究有利于深入研究蜡状芽孢杆菌组菌株的芽孢萌发, 致病机理及其调控机制。基因组序列分析表明苏云金芽孢杆菌有七个可能的 *ger* 操纵子, 但目前还没有相关研究报道。本文对苏云金芽孢杆菌 *gerA* 所进行的遗传互补实验表明, *gerA* 在苏云金芽孢杆菌芽孢萌发的起始中起到重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件: 苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CGMCC 1.175)购于中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)。该菌通常在 Luria-Bertani (LB)培养基中 30 °C 培养。产孢培养基为 Casein hydrolysate/Yeast-containing medium (CCY)培养基。pKSV7 和 pHT3101 都是 *E. coli*-*Bacillus* 穿梭载体, 其中 pHT3101 中含有红霉素抗性基因, pKSV7 含有在非允许的温度下不能复制的芽孢杆菌温度敏感型复制子。pKSV7 由中国科学院微生物研究所连栋研究员惠赠; pHT3101 由中国农业科学院生物技术研究所黄大昉研究员惠赠。在实验过程中 pHT3101 用于提供红霉素抗性基因, 而 pKSV7 用于基因破坏和互补实验。

1.1.2 抗生素、酶及试剂: 筛选大肠杆菌时, 氨苄青霉素和红霉素的终浓度分别为 100 µg/mL, 50 µg/mL。筛选苏云金芽孢杆菌时, 红霉素和氯霉素的终浓度分别为 20 µg/mL 和 5 µg/mL。实验中用到的各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, T4 DNA 聚合酶, *Taq* DNA 聚合酶和 Pfu DNA 聚合酶及 RT-PCR 试剂盒 (mRNA Selective PCR Ver.1.1 Kit)购自 TaKaRa 公司。RNA 提取实验中的 Trizol reagent 购自 Invitrogen 公司。探针标记试剂盒 DIG labeling and detection kits 购自 Boehringer Mannheim。

1.1.3 引物合成及序列测定: 本研究中所用引物由三博远志生物公司合成; 序列测定由上海生工生物工

程技术服务有限公司完成。用 DNASIS 2.0 软件(Hitachi Software)来分析 Open Reading Frames (ORFs), 用 PSI-BLAST 程序来进行数据库搜索。

1.2 DNA 操作及转化

苏云金芽孢杆菌总 DNA 的提取参考文献[13]。Southern 杂交使用的探针按照地高辛标记试剂盒 (Roche Biochemicals)的说明进行标记。聚合酶链式反应(PCR)是以苏云金芽孢杆菌总 DNA 为模板用 pfu DNA 聚合酶来完成的。苏云金芽孢杆菌的转化按以下条件完成: 在 80 µL(悬浮于 40% PEG 中)对数生长期菌体中加入 1 µL 质粒(约 1 µg DNA), 电击转化(11 kV/cm、1000 Ω、25 µF)。

1.3 *gerA* 基因的克隆、阻断突变株的构建以及互补

根据蜡状芽孢杆菌的同源序列设计引物 P1(5'-CATTTCATTCTCACCATCA-3')和 P2(5'-TTATCATC-TAAAAAATCAAAA-3'), 从苏云金芽孢杆菌基因组 DNA 中扩增得到一个 1.5 kb 的 DNA 片段, 该 DNA 片段用地高辛标记后作为 Southern 杂交的探针。分别用 *Bgl*、*EcoR*、*Hind*、*Hinc* 和 *Xba* 酶切苏云金芽孢杆菌基因组 DNA, 酶切片段经过琼脂糖电泳后转到尼龙膜上。用地高辛标记的探针杂交得到一个 *Hind* 酶切的 6.5 kb 的杂交信号。将分离和纯化后的 6.5 kb *Hind* DNA 片段构建部分基因组文库。通过菌落杂交筛选到的包含 *gerA* 操纵子的质粒被命名为 pGA。

通过 PCR 从 pGA 上扩增得到一个含有完整 *gerAA* 基因的 1.5 kb DNA 片段, 将它连接到 pBluescript KS 上的 *EcoRV* 位点。*EcoR* 和 *Hind* 酶切这个质粒后, 将得到的含有 *gerAA* 基因的 1.5 kb 片段连接到 pKSV7 上相应的位点。用 *Nde* 酶切这个质粒并用 Klenow nuclease 补平, 与 PCR 得到的含有红霉素抗性基因的 1.3 kb DNA 片段连接得到 pGAD, 在 pGAD 中红霉素基因插入了 *gerAA* 基因的中间。将 pGAD 电击转化到苏云金芽孢杆菌, 并在含氯霉素的 LB 平板上 30 °C 培养 2 天, 通过质粒的提取和酶切验证筛选出含 pGAD 的转化子。随机选取一个验证后的转化子在不加抗生素的 LB 液体培养基中过夜培养, 稀释后涂布到含红霉素的 LB 平板上 42 °C 培养约 10h, 长出的菌落影印接种到含氯霉素的 LB 平板上, 影印后的平板和原来的含红霉素平板一起 30 °C 过夜培养。挑选红霉素抗性和氯霉素敏感(*Em^rCm^s*)的菌株。因为质粒 pKSV7 在 42 °C 不能复制, 故具有 *Em^rCm^s* 表型的菌株应

该是发生了同源双交换, 且 *gerAA* 基因得到破坏的菌株。Southern 杂交验证表明构建正确。

为了互补阻断突变株, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切 pGA 得到一个 4.2 kb 含有完整 *gerA* 操纵子(约 3.9kb)的 DNA 片段, 将它连接到 pKSV7 上相应的位点得到 pGAC。通过电击转化将 pGAC 转到 *gerA* 阻断突变株中, 获得了互补株。

1.4 芽孢萌发的检测

苏云金芽孢杆菌在 CCY 液体培养基中 30 °C 培养 48 h, 得到成熟的芽孢。成熟的芽孢用冷蒸馏水洗 5~10 次得到无营养菌体以及产孢菌体的纯净芽孢 (> 99%)。热激后的芽孢用萌发缓冲液(10mmol/L NaCl、10mmol/L Tris-HCl、pH 7.4)稀释。将含有 100mmol/L L-丙氨酸或者 3mmol/L 肌苷同芽孢 ($OD_{600} \approx 1$)混合, 并在 37 °C 温育。每隔 10 分钟取样测 OD_{600} 吸光度, 同时通过相差显微镜检测芽孢萌发过程中折光性质的变化。为了分析 D-环丝氨酸对 L-丙氨酸诱导芽孢萌发的影响, 纯化后的芽孢加入到含有 0.1mmol/L D-环丝氨酸的萌发缓冲液中热激, 热激后的芽孢用蒸馏水洗两次然后再加入含 1mmol/L L-丙氨酸的萌发缓冲液进行芽孢萌发的检测。

1.5 RNA 的提取和转录分析

用在 CCY 中培养不同时间的苏云金芽孢杆菌菌体来提取总 RNA。收集不同时间点的细胞并用液氮迅速冷冻后保存在 -70 °C 冰箱。把所有时间点的菌体在液氮冷却下研磨成粉末, 接着按照 Trizol reagent (Invitrogen Corp.) 的使用说明抽提 RNA。每个时间点取 0.5 μ g RNA 按照使用说明(Promega Corp.)进行 RT-PCR。在 RT-PCR 中用到的引物有: *gerA* 特异性引物 P3(5'-AAACCCGCTTGAGATAG-3')和 P4(5'-AGCAAAAACGTGATGG-3'), *spo* G 特异性引物 P5(5'-TACATATGTTGACGAGAAACAAAGTA-3')和 P6(5'-ACCTCGAGTCCTTGAATCGTTTT-3')以及 16S RNA 特异性引物 P7(5'-GGTAACCTGCCATAAGAC-3')和 P8(5'-ATTCCCTACTGCTGCCTC-3')。本文中 *gerA* 操纵子(编码序列 3723bp 与两侧序列共 4356bp)的核酸序列已经提交到 GenBank 数据库, 注册号为 EF469731。

2 结果

2.1 苏云金芽孢杆菌 *gerA* 操纵子的克隆和序列分析

从苏云金芽孢杆菌基因组 DNA 中 PCR 扩增得到

一个 1.5 kb DNA 片段。用该 DNA 片段做探针与苏云金芽孢杆菌部分基因组文库进行 Southern 杂交, 筛选得到一个可能含有 *gerA* 操纵子的 6.5 kb *Hind* III DNA 片段。序列分析表明该片段含有 3 个开放读码框 (ORFs), 它们的长度分别为 1518bp、1083bp 和 1110bp (图 1) (GenBank 注册号: EF469731)。这是在苏云金芽孢杆菌中最先克隆的 *gerA* 操纵子, 所以将它命名为 *gerA*。*gerA* 操纵子 3 个基因的氨基酸序列与蜡状芽孢杆菌 ATCC 14579 中的同源基因 *gerRA*、*gerRC* 和 *gerRB* 的氨基酸序列的一致性分别为 99%、96%和 96%。所以这 3 个基因分别命名为 *gerAA*、*gerAC* 和 *gerAB* 而它们编码的蛋白分别命名为 GerAA、GerAC 和 GerAB。

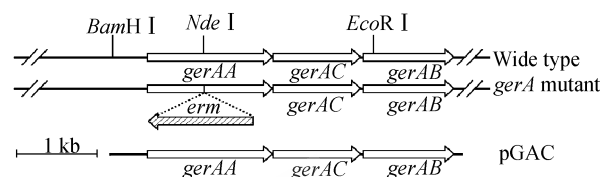


图 1 苏云金芽孢杆菌染色体上 *gerA* 操纵子的位置及 *gerA* 阻断突变株的构建

Fig. 1 The organization of the *gerA* operon in *B. thuringiensis*. The arrows show the *gerA* operon and its orientation. Drawing is to scale. The *gerA* gene was interrupted by an erythromycin-resistant cassette (*erm*) in *gerA* mutant. The entire *gerA* operon with its promoter was inserted into pKSV7 to generate pGAC.

2.2 *gerA* 操纵子在产孢过程中开始转录

在 *gerAA* 转录起始位点前有一个可能的 σ^G 依赖的启动子序列 5'-AGAAATA-n16-CATTATA-3', 而在 *gerAC* 和 *gerAB* 中既没有与启动子相似的序列也没有与终止子相似的序列。我们通过逆转录 PCR 来分析 *gerA* 的转录。使用位于 *gerAB* 内部的引物 P7 和位于 *gerAA* 内部的引物 P8 进行 RT-PCR 扩增得到 2.1kb 的转录信号(图 2), 从而证明这 3 个基因是共转录的。在产孢起始 3 小时后检测到 *gerA* 的 mRNA, 而 *spoIIIIG*(编码一个产孢特异性 σ^G) 的 mRNA 比 *gerA* mRNA 早一个小时检测到 (图 2)。在枯草芽孢杆菌中 *Spo* G 调控 *gerA* 的转录^[16], 在苏云金芽孢杆菌中检测到的 *gerA* 和 *spo* G 的转录时间顺序也暗示在苏云金芽孢杆菌中 *gerA* 的转录可能和枯草芽孢杆菌一样受到 *Spo* G 的调控。

2.3 *gerA* 的阻断突变对芽孢萌发的影响

为了确定 *gerA* 在芽孢萌发中的作用, 我们通过基因阻断的方式破坏了 *gerA* 基因并且测定了阻断突变株在 L-丙氨酸和肌苷作为萌发剂时的萌发特性。在

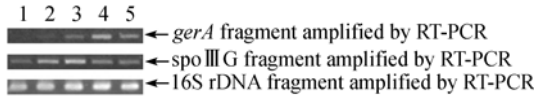


图2 苏云金芽孢杆菌 *gerA* 操纵子转录的 RT-PCR 电泳图
 Fig. 2 RT-PCR analysis of *gerA* transcription in *B. thuringiensis*. The RT-PCR products of *gerA* and *spoIII G* with their specific primers are shown. Lanes 1-5 show RNA extracted from cells grown in CCY medium for 10 h, 11 h, 12 h, 13 h and 14 h, respectively. The signal of 16S rRNA is used as control.

100mmol/L L-丙氨酸的诱导下经过 1 小时温育, *gerA* 阻断突变株的芽孢没有明显的萌发(图 3-A), 在同时进行的相差显微镜检测中 *gerA* 阻断突变株的芽孢没有变黑, 说明 *gerA* 阻断突变株在 L-丙氨酸诱导下没有起始萌发(图 4)。萌发实验还表明在肌苷诱导下阻断突变株的萌发延迟(图 5)。所以 *gerA* 主要影响 L-丙氨酸诱导的芽孢萌发, 同时也参与了肌苷诱导的萌发。

为了确定 *gerA* 的失活是阻断突变株表型变化的唯一原因, 我们构建了含有完整 *gerA* 操纵子的 pGAC。由于 pKSV7 是多拷贝的(约 5 个拷贝), 转化到阻断突变株中的 *gerA* 是过表达的, 转入的 pGAC 恢复了阻断突变株的表型(图 4)。而且互补株芽孢 OD_{600} 降低了约 45%(图 3-A), 这说明互补株芽孢的萌发率要高于野生株芽孢的萌发率。而 D-环丝氨酸处

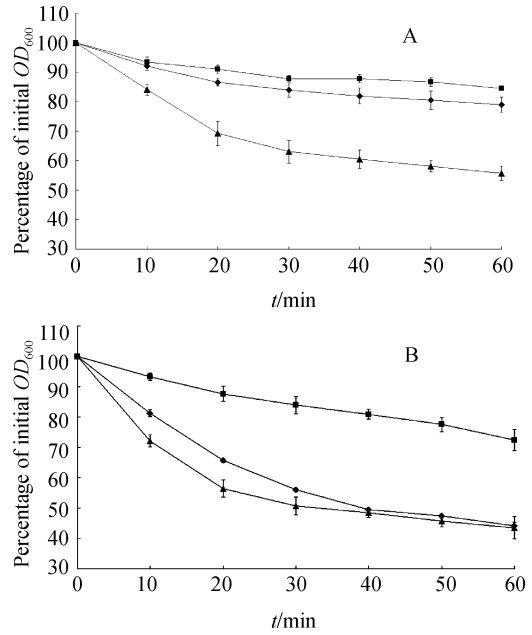


图3 不同浓度 L-丙氨酸诱导 D-环丝氨酸处理及未处理芽孢的萌发

Fig. 3 The role of the *gerA* operon on the germination initiated by L-alanine in *B. thuringiensis*. Spores from wild-type strain (◆), *gerA* disruption mutant (■), the complementary strain with the plasmid pGAC(▲) were heat activated and subsequently incubated in 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.4) buffer supplemented with 100 mmol/L L-alanine (A) and 1mmol/L L-alanine (B) (spore were pretreated with 0.1mmol/L D-cycloserine), then the fall of OD_{600} of each sample were measured periodically and plotted as a fraction of the initial OD_{600} versus time.

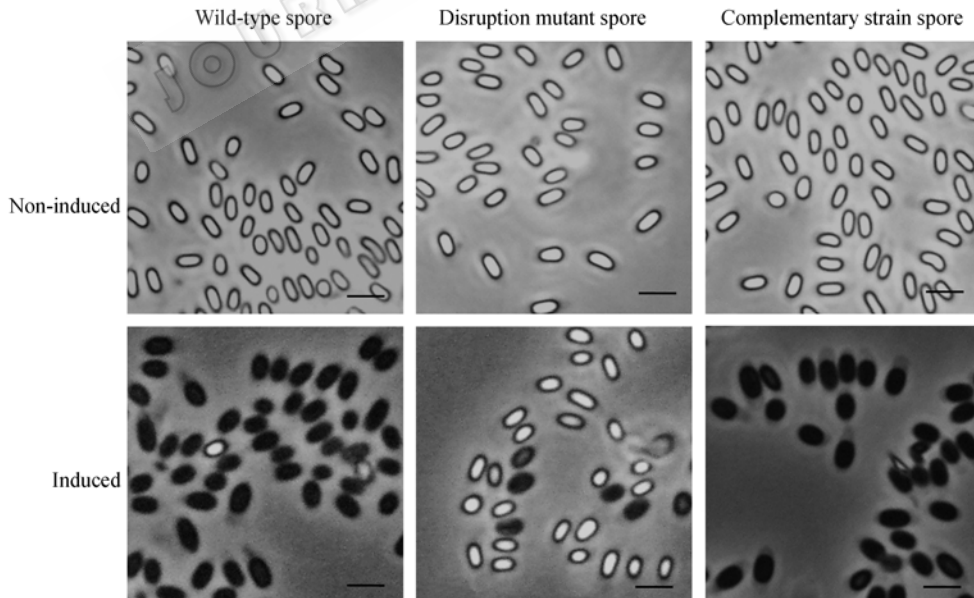


图4 相差显微镜观察 D-环丝氨酸处理芽孢的萌发

Fig. 4 Germination of *B. thuringiensis* spores observed by phase-contrast microscopy. All spores were pretreated with 0.1mmol/L D-cycloserine, and germination was initiated by addition of 1mmol/L L-alanine. Wild-type and complementary spores became phase-darkening during germination, but most spores of the *gerA* disruption mutant still showed phase-bright after 60 min incubation. Bar: 2µm.

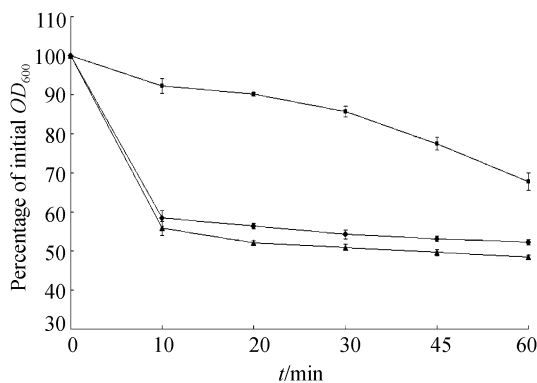


图 5 3 mmol/L 肌苷诱导芽孢萌发

Fig. 5 The role of the *gerA* operon on the germination initiated by inosine in *B. thuringiensis*. Spores from wild-type strain (◆), *gerA* disruption mutant (■), the complementary strain with the plasmid pGAC(▲) were heat activated and subsequently incubated in 10 mmol/L Tris-HCl buffer (pH7.4) supplemented with 3 mmol/L inosine and the fall of OD_{600} of each sample were measured periodically and plotted as a fraction of the initial OD_{600} versus time.

理后, 野生株、突变株、互补株芽孢的萌发率都提高了。尤其是野生株, 它的 OD_{600} 变化由处理前的降低约 20% 变成了处理后的降低约 55%, 突变株和互补株的芽孢 OD_{600} 变化分别由降低 10% 和 45% 变为了降低 25% 和 55% (图 3)。

3 讨论

要诱导芽孢萌发, 营养诱导剂必须先透过芽孢衣和皮层并与相应的受体结合。*B. thuringiensis* serovar *konkukian* str 97-27 基因组含有 7 个与枯草芽孢杆菌 *gerA* 操纵子同源的三顺反子操纵子 (www.jgi.doe.gov), 而与这些操纵子相对应的营养诱导剂还没有确定。在本文中, 我们证明了 GerA 在苏云金芽孢杆菌中是 L-丙氨酸的受体。苏云金芽孢杆菌阻断突变株菌体的生长以及产孢没有受到影响, *gerA* 的破坏阻断了 L-丙氨酸诱导的芽孢萌发并延迟了肌苷诱导的萌发。在实验过程中 *gerA* 阻断突变株也有很小比例的萌发 (图 3-A), 这说明 *gerA* 的破坏没有完全阻断 L-丙氨酸诱导的芽孢萌发, 可能其它的萌发受体或者芽孢中的其它组分在 L-丙氨酸诱导的芽孢萌发中也能发挥部分替代作用。肌苷诱导的萌发在阻断突变株的芽孢中也受到了延迟, 因此除了作为 L-丙氨酸的萌发受体外, GerA 还参与肌苷诱导萌发的调控。上述结果表明在芽孢萌发过程中, 不同的 GerA 同源受体可能在感受其它萌发剂时能够相互作用。

不经过 D-环丝氨酸处理的野生型芽孢在萌发过

程中 OD_{600} 仅降低约 20%, 这一比率与突变株的降低约 10% 差别不是很大 (图 3)。为了进一步确定突变株芽孢萌发性质的变化, 我们检测了不同的 D-环丝氨酸浓度与 L-丙氨酸浓度的组合的诱导下, 野生株、突变株以及互补株芽孢的萌发。最终经 0.1 mmol/L D-环丝氨酸处理后, 1 mmol/L L-丙氨酸诱导野生型芽孢完全萌发。在 D-环丝氨酸处理后突变株与互补株的芽孢的萌发率也有小幅提高 (图 3-B), 而单独加入 D-环丝氨酸即使浓度达到 10 mmol/L 也仅能使野生型芽孢产生很小比例的萌发^[17]。这一结果说明 D-环丝氨酸本身对萌发的促进作用很小, 除了通过抑制丙氨酸消旋酶来促进芽孢萌发外, 仅能够通过 L-丙氨酸相互作用对芽孢萌发起较小的促进作用。

研究表明 *gerA* 的转录水平能够影响芽孢的萌发性质。在枯草芽孢杆菌中过表达 *gerA* 会增加 GerA 受体蛋白的量, 进而促进 L-丙氨酸诱导的芽孢萌发^[18]。在我们的研究中, 含有 pGAC 的互补株芽孢萌发率要高于野生株。说明在苏云金芽孢杆菌中, 过量的 GerA 受体蛋白也促进了 L-丙氨酸诱导的芽孢萌发。而且不经 D-环丝氨酸处理的互补株芽孢的萌发率与经过处理的野生型芽孢的萌发率差别很小, 基本上都能完全萌发 (图 3)。说明萌发受体蛋白量的增加能够增加芽孢对 L-丙氨酸的敏感性。在互补株芽孢萌发过程中, 虽然不经 D-环丝氨酸处理丙氨酸消旋酶会降解很大一部分 L-丙氨酸, 透过孢外壁的少量 L-丙氨酸仍然能够有效的诱导芽孢萌发 (图 4)。

参 考 文 献

- [1] Setlow P. Spore germination. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(6): 550-556.
- [2] Feavers IM, Miles JS, Moir A. The nucleotide sequence of a spore germination gene (*gerA*) of *Bacillus subtilis* 168. *Gene*, 1985, 38(1-3): 95-102.
- [3] Zuberi AR, Feavers IM, Moir A. Identification of three complementation units in the *gerA* spore germination locus of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1985, 162(2): 756-762.
- [4] Feavers IM, Foulkes J, Setlow B, et al. The regulation of transcription of the *gerA* spore germination operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 1990, 4(2): 275-282.
- [5] Wang ST, Setlow B, Conlon EM, et al. The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, 2006, 358(1): 16-37.
- [6] Zuberi AR, Moir A, Feavers IM. The nucleotide sequence and gene organization of the *gerA* spore germination operon of *Ba-*

- cillus subtilis* 168. *Gene*, 1987, 51(1): 1–11.
- [7] Paidhungat M, Setlow P. Isolation and characterization of mutations in *Bacillus subtilis* that allow spore germination in the novel germinant D-alanine. *J Bacteriol*, 1999, 181(11): 3341–3350.
- [8] Igarashi T, Setlow B, Paidhungat M, *et al.* Effects of a *gerF* (lgt) mutation on the germination of spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2004, 186(10): 2984–2991.
- [9] Igarashi T, Setlow P. Interaction between individual protein components of the GerA and GerB nutrient receptors that trigger germination of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*, 2005, 187(7): 2513–2518.
- [10] Hornstra LM, de Vries YP, Wells-Bennik MH, *et al.* Characterization of germination receptors of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(1): 44–53.
- [11] Barlass PJ, Houston CW, Clements MO, *et al.* Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of *gerL* and *gerQ* operons. *Microbiology*, 2002, 148: 2089–2095.
- [12] Hornstra LM, de Vries YP, de Vos WM, *et al.* *gerR*, a novel *ger* operon involved in L-alanine- and inosine-initiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(2): 774–781.
- [13] Yan X, Gai Y, Liang L, *et al.* A gene encoding alanine racemase is involved in spore germination in *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol*, 2007, 187(5): 371–378.
- [14] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(3): 775–806.
- [15] Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, *et al.* *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(6): 2627–2630.
- [16] Nicholson WL, Sun DX, Setlow B, *et al.* Promoter specificity of sigma G-containing RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*: identification of a group of forespore-specific promoters. *J Bacteriol*, 1989, 171(5): 2708–2718.
- [17] Preston RA DH. Germination of *Bacillus cereus* spores: critical control by DL-alanine racemase. *J Gen Microbiol*, 1984, 130: 3123–3133.
- [18] Cabrera-Martinez RM, Tovar-Rojo F, Vepachedu VR, *et al.* Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2003, 185(8): 2457–2464.

The *gerA* operon is required for spore germination in *Bacillus thuringiensis*

Liang Liang^{1,2}, Yuling Gai¹, Kun Hu¹, Gang Liu^{1*}

¹ Center for Microbial Genetics and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Spore germination of *Bacillus* could be triggered by germinants like L-alanine which is thought to bind to and stimulate specific receptors. The GerA receptor responds to L-alanine in *Bacillus subtilis*. A homologous *gerA* operon of *B. subtilis* was isolated from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. RT-PCR showed that the transcription of the *gerA* operon was switched on 3 hours after the initiation of sporulation and this operon was cotranscribed. Disruption of the *gerA* operon led to blockage of the L-alanine-initiated germination pathway and showed a delayed inosine-induced germination response. The germination rate of the *gerA* complementary strain spore deriving from introducing *gerA* operon into the disruption mutant was even faster than that of the wild type strain spore. This is caused by overdose GerA receptors which could enhance the sensibility of complementary spore to L-alanine. The overdose GerA receptors came from introducing multicopy plasmid- pKSV7 (about five copies) which could increase the amount of GerA receptors. After treatment of D-cycloserine which could inactivate alanine racemase irreversibly, L-alanine-induced spore could germinate faster than untreated spore. The combination of 0.1 mmol/L D-cycloserine and 1 mmol/L L-alanine could trigger spore germination induced by L-alanine effectively.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; partial DNA library; *gerA* gene; RT-PCR; spore germination

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30430010)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807467; Fax: +86-10-64807461; E-mail: liug@sun.im.ac.cn

Received: 8 August 2007/ Revised: 6 September 2007