

球形芽胞杆菌 C3-41 磷酸果糖激酶的克隆、表达及基本生物活性

韩蓓^{1,2}, 蔡亚君¹, 胡晓敏¹, 袁志明^{1*}

(¹中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

(²西安交通大学医学院, 西安 710061)

摘要:【目的】球形芽胞杆菌缺乏 EMP、HMP、ED 途径的关键酶, 如磷酸果糖激酶等被认为是其不能以糖类物质进行生长的主要原因。杀蚊球形芽胞杆菌 C3-41 全基因组序列分析表明, 在染色体 DNA 上存在的磷酸果糖激酶基因 *pfk*, 为了进一步分析球形芽胞杆菌糖酵解途径, 进一步确定磷酸果糖激酶在糖酵解途径中的功能。【方法】通过 *pfk* 基因在球形芽胞杆菌菌株中的 Southern-blot 拷贝数鉴定, 在 C3-41 *pfk* 基因克隆的基础上进行 *pfk* 基因在大肠杆菌中的融合表达、序列分析和序列比对等方法进行研究。【结果】证明了球形芽胞杆菌 *pfk* 基因由 960 bp 核苷酸组成, 表达 42 kDa 的 PFK 融合蛋白, 有保守的底物结合域和 ATP 结合域, 同时 *pfk* 基因重组表达质粒可以回复大肠杆菌 *pfk* 缺陷型菌株 DF1020 代谢糖的能力。【结论】杀蚊球形芽胞杆菌 C3-41 的 *pfk* 表达产物具有磷酸果糖激酶活性, 为今后深入研究球形芽胞杆菌产能代谢机理奠定了基础。

关键词: 球形芽胞杆菌; 糖酵解; 磷酸果糖激酶

中图分类号: R78, Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0602-06

磷酸果糖激酶 PFK (EC5.7.1.11) 是糖酵解 EMP 途径中的限速酶, 负责催化 6-磷酸果糖为 1, 6-二磷酸果糖: $\text{ATP} + 6\text{-磷酸果糖} \rightarrow \text{ADP} + 1, 6\text{-二磷酸果糖}$, 其 N 末端为结合 ATP 的结构单元, C 末端为结合 6-磷酸果糖的结构单元和磷酸烯醇式丙酮酸反馈调节时结合的部分^[1,2]。

球形芽胞杆菌 (*Bacillus sphaericus*, 简称 *B.s*) 是一种在自然界中广泛存在的好气芽胞杆菌^[3]。部分菌株在其营养体生长和芽孢形成期能产生杀蚊毒素蛋白 (Mosquitocidal Toxin, Mtxs) 和二元毒素蛋白, 对库蚊 (*Culex*)、伊蚊 (*Aedes*)、按蚊 (*Anopheles*)、曼蚊 (*Mansonia*)、鳞蚊 (*Psorophora*) 等具有不同程度的毒杀作用^[4,5]。因此, 球形芽胞杆菌作为一种生物杀蚊幼剂被广泛应用于城市蚊虫的综合防治, 并取得了很好的应用防治效果。

球形芽胞杆菌除能代谢 N-乙酰胺葡萄糖外, 不

能利用其它糖类物质生长, 其生长和发育所需要的能源和碳源只能从蛋白质和其他有机体中得到^[6,7]。以前的研究认为由于 *B.s* 缺少葡萄糖激酶 (glucokinase) 和己糖激酶 (hexokinase) 活性, 还缺少己糖二磷酸途径 (EMP 途径) 和己糖单磷酸途径 (HMP 途径) 的早期酶: 磷酸葡萄糖异构酶 (phosphoglucose isomerase)、磷酸果糖激酶 (phosphofrucokinase) 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose phosphate dehydrogenase), 所以 *B.s* 不能利用葡萄糖、蔗糖等糖类^[6]。2002 年 Alejandro 首次在球形芽胞杆菌 2362 菌株中发现糖酵解途径的磷酸果糖激酶, 该酶基因编码序列存在于基因组 DNA 上, 并可以正常表达有功能的磷酸果糖激酶, 其代表菌株 ATCC14577、2362、2297 与 *B.subtilis* strain 168 的细胞磷酸果糖激酶粗酶活力相当^[8]。本实验室研究结果证明 *pfk* 基因广泛存在于 *B.s* 不同血清型的野生菌株中^[9], 但该基因的存在和

基金项目: 中国科学院前沿方向性项目 (950121)

*通讯作者: Tel: +86-27-97198195; Fax: +86-27-87198120; E-mail: yzm@wh.iov.cn

作者简介: 韩蓓 (1980-), 女, 陕西渭南人, 讲师, 博士, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: tydyhan@gmail.com

收稿日期: 2007-10-30; 修回日期: 2008-01-28

编码蛋白的活性还有待于进一步证实。

本研究通过对 *B.s* C3-41 全基因组序列分析,表明在染色体基因组上存在磷酸果糖激酶单拷贝的 ORF, 并完成了 *pfk* 基因的克隆及其在大肠杆菌中的融合表达, 证明 *pfk* 基因可表达磷酸果糖激酶蛋白, 并能够回复大肠杆菌 *pfk* 缺陷型菌株 DF1020 糖代谢的能力。该研究为深入研究 *B.s* 独特的产能代谢途径和不能代谢糖的机制提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 球形芽胞杆菌 C3-41 (H5a5b) 为本实验室自行分离的高毒力杀蚊菌株, 球形芽胞杆菌 Dak614 (H4)、2317-2 (H26)、2362 (H5) 为本实验室保存的球形芽胞杆菌标准血清型菌株; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 为本实验保存菌株; 大肠杆菌磷酸果糖激酶缺陷型菌株 DF1020 [λ , *pro-82*, *glnV44(AS)*, Δ *pfkB201*, *recA1*, Δ (*rhaD-pfkA*)*200*, *thi-1*, *hsdR17*] 由耶鲁大学 *E.coli* genetic stock center 提供。安苾青霉素和卡那霉素使用浓度分别为 50 μ g/mL 和 30 μ g/mL, IPTG 使用浓度为 1 mmol/L。

1.1.2 培养基: LB 培养基 (每升含 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母粉, 10 g NaCl); 糖发酵培养基为 Macconkey 平板培养基 (每升含 20 g 蛋白胨, 10 g 葡萄糖, 5 g NaCl, 5 g 牛胆盐, 0.001 g 结晶紫, pH 7.2); 球形芽胞杆菌培养基为 MBS 培养基 (每升含 KH_2PO_4 6.8 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸提物 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.02 g, pH 7.2)。

1.1.3 主要试剂和仪器: 所用内切酶均购自 TaKaRa 公司; Southern-blot 所用膜, 地高辛标记的 dUTP 及抗地高辛的辣根过氧化物酶购自 Roche 公司; 蛋白纯化试剂盒购自 Novagen 公司。其余常规试剂均为 Sigma 进口分装。主要仪器有美国 Stovall* Hybridization Oven 杂交炉, 美国 Biotec synergy HT 全波长自动酶标仪, 美国 ABI 9800 PCR 仪, 电泳系统为美国 BioRad DNA 电泳系统和蛋白质电泳系统。

1.2 球形芽胞杆菌 *pfk* 基因的拷贝数检测

我们之前的研究结果表明 *pfk* 基因广泛存在于 *B.s* 不同血清型的菌株中^[9], 为了进一步验证 *pfk* 基因的特异性, 我们对它在基因组上的拷贝数进行了 Southern-Blot 检测。

根据 C3-41 基因组测序初步注释结果及

Alejandro 报道^[8], 设计引物 *pfk-1*: 5' -CGGGATCCAT-GAAAAAATTGCT-3' (划线部分为引入的 *Bam*HI 酶切位点), *pfk-2*: 5' CGAAGCTTTTATATTGATAG-TTC-3' (划线部分为引入的 *Hind* III 酶切位点)。50 μ l 体系中加 0.5 μ g 基因组 DNA 做 PCR 模板, 100 pmol 的引物, 1.25 U *pfu* *Taq* DNA 聚合酶 (Fermentas)。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 sec, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 加尾 7 min。在 *pfk* 基因 PCR 体系中, 分别加入 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 2.5 mmol/L, 其中 dTTP 为按 4:1 加入 dTTP: 地高辛标记的 dUTP 的混合物, 以 *B.s* C3-41 总 DNA 稀释液为模板, 进行 PCR 反应, 合成 Southern-Blot 的探针。分别选择 3 株高毒力菌株 2317-2 (H26)、C3-41 (H5a5b)、2362 (H5) 和 1 株无毒菌株 Dak614 (H4), 提取总 DNA, 经 *Hind* III 酶切, 电泳, 转膜, 杂交, 含地高辛的探针与抗地高辛的碱性磷酸酶抗体反应, 显色, 拍照记录^[10]。

1.3 球形芽胞杆菌 C3-41 中 *pfk* 的克隆及重组质粒构建
提取 C3-41 的总 DNA 作模板^[11], 引物及 PCR 扩增条件同上, 回收 PCR 扩增产物, 经过 *Bam*H 和 *Hind* III 酶切后, 亚克隆至经过相同酶切的 pUC18 质粒上, 电击转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆子, 进行测序。测序阳性质粒转化大肠杆菌 DF1020, 命名为 E-pUC-*pfk*。同样方法, 亚克隆至 pET28a 载体上, 获得重组质粒 pET-*pfk*, 转化大肠杆菌 BL21, 命名为 E-pET-*pfk* (图 1)。

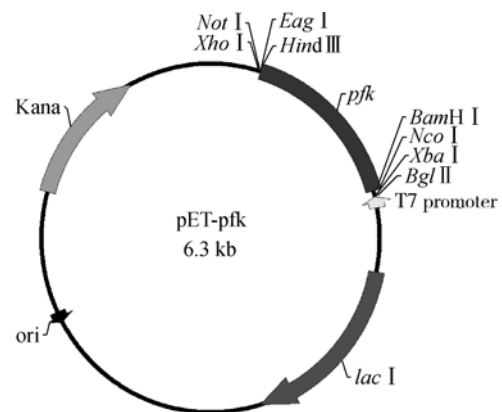


图 1 重组质粒 pET-*pfk* 示意图
Fig. 1 the recombinant plasmid pET-*pfk*.

1.4 PFK 在 *E.coli* E-pET-*pfk* 中的诱导表达

挑 E-pET-*pfk* 单菌落至 LB 液体试管内, 过夜培养。以 1:100 的比例转接至 20 mL 三角瓶中, 培养至 OD₆₀₀ = 0.6。加入终浓度 1mmol/L IPTG 进行诱导,

继续培养 3~4 h, 取样处理, 进行 SDS-PAGE 检测。

用 Novagen 公司的 Ni^{2+} 亲和和层析柱试剂盒进行表达 His-标签的融合蛋白的纯化。具体纯化方法见试剂盒说明。收集的蛋白洗脱液置于透析 buffer(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 10 mmol/L MgSO_4) 中, 4℃, 透析 48 h; 换存储 buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L MgSO_4 , 10 mmol/L 2-ME, 50%(v/v) 甘油), 继续透析 2-3 h, 50 μl 分装冻存于 -70℃。考马氏亮蓝 G250 染色法测定纯化的蛋白浓度。

1.5 *pfk* 缺陷型 DF1020 重组菌株的糖发酵回复

挑取大肠杆菌 E-pUC-*pfk*、BL21 和 DF1020 单菌落, 37℃ 试管过夜培养, 然后分别划线于大肠杆菌糖代谢检测培养基-麦康凯 (Macconkey agar plate) 平板培养基上, 37℃ 培养箱 31~5 d, 观察菌落颜色变化。其中 *E. coli* BL21 为阳性对照, DF1020 为阴性对照^[8]。

1.6 球形芽胞杆菌 *pfk* 序列的生物信息学分析

使用 EMBL(<http://www.ebi.ac.uk/embl>) 和 SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/sprot>) 中的相关生物信息学分析工具对 *B. sphaericus* C3-41 *pfk* 的序列进行分析。

从 NCBI 数据库中采集 12 个不同细菌的 PFK 序列数据, 应用 CLUSTAL X 软件, 以 *B. sphaericus* C3-41 PFK 序列为目标序列和其他 12 种细菌的 PFK 的氨基酸序列进行匹配比较, 比较其保守氨基酸位点、底物结合 domain、ATP 结合 domain 和 PEP 反馈抑制位点, 分析其进化关系及同源性, 构建 N-J 进化树。

2 结果

2.1 球形芽胞杆菌 *pfk* 基因的拷贝数检测

随机选择的 3 株球形芽胞杆菌野生菌株, 提取总 DNA, 经过 *Hind* III 酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 转膜, 并以地高辛标记的 C3-41 *pfk* 片段为探针进行 Southern blot

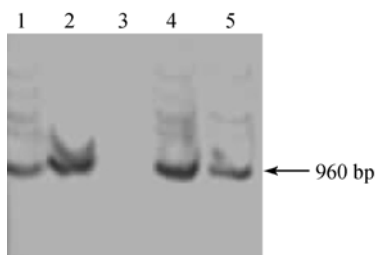


图 2 4 株 *B. sphaericus* 野生菌株的 *pfk* 基因的 Southern blot 分析, 箭头所示为 *pfk* DNA 的杂交带

Fig. 2 Southern-blot with *pfk* probe in 4 *B. sphaericus* strains. 1. Dak614; 2. 2317-2; 3. empty control; 4. C3-41; 5. 2362. Arrow shows the hybridization band of *pfk* DNA.

检测, 所有检测菌株只有一条明显的杂交带, 表明球形芽胞杆菌菌株可能只含有 1 个 *pfk* 基因拷贝(图 2)。

2.2 球形芽胞杆菌 C3-41 中 *pfk* 的克隆及重组质粒构建

经过引物 *pfk-1* 和 *pfk-2* 进行扩增, PCR 产物电泳结果显示在 960 bp 处有特异的单一的 DNA 带, 与预测结果吻合, PCR 扩增片段的序列测定和分析表明, 该片段同球形芽胞杆菌(GenBank No. AAK57729) *pfk* 序列具有 99% 同源性, 表明扩增片段为全长的 *pfk* 基因 DNA。构建重组质粒, 经过抗性筛选, 酶切验证获得重组质粒 pET-*pfk*, 重组菌株 E-pET-*pfk* 和 E-pUC-*pfk*。

2.3 PFK 在 *E. coli* E-pET-*pfk* 中的诱导表达及纯化

E-pET-*pfk* 经过 1 mmol/L IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析其在 42 kDa 处有一条很明显的诱导蛋白表达带。大量诱导培养, 利用重组蛋白的 His 标签进行 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化, 纯化后的蛋白呈单一一条带(图 3)。利用考马斯亮蓝 G250 测定纯化后的蛋白浓度为 0.36 mg/mL (50% 甘油储存缓冲液)。

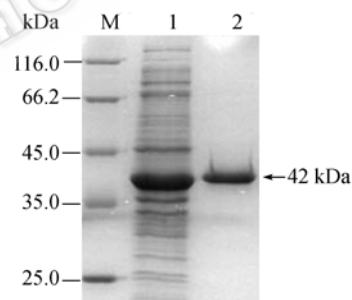


图 3 融合表达蛋白 PFK 及其纯化后产物的 SDS-PAGE 检测
Fig. 3 SDS-PAGE of the fusion expressed and purified PFK. Line M protein ladder (Fermentas); Line 1 the expressed unpurified total protein; Line 2 the purified PFK

2.4 *pfk* 缺陷型 DF1020 重组菌株的糖发酵回复

对重组菌株 E-pUC-*pfk* 进行糖酵解途径恢复检测, 在 Monconkey 平板上观察其菌落颜色变化。由于在 DF1020 缺失 *pfk* 基因, 该菌株的 EMP 途径不完整, 其无法代谢葡萄糖, 不产酸, 培养基 pH 升高, 中性红指示剂显黄色, 故在 Monconkey 平板上菌落呈黄色; 而重组菌株 E-pUC-*pfk* 可以正常表达 PFK, 使 DF1020 的 EMP 途径回复功能, 代谢葡萄糖, 并产酸, 培养基 pH 降低, 中性红指示剂显红色, 故其菌落在 Monconkey 平板上菌落呈红色; 阳性对照 BL21 在 Monconkey 平板上菌落也呈红色。

2.5 球形芽胞杆菌 *pfk* 序列的生物信息学分析
对 *B.sphaericus* C3-41 测序的基因组进行注释,分

析 *pfk* 在整个代谢途径中的地位。将 C3-41 和其他 12 种细菌的 PFK 的氨基酸序列进行比较,分析其进化关系及

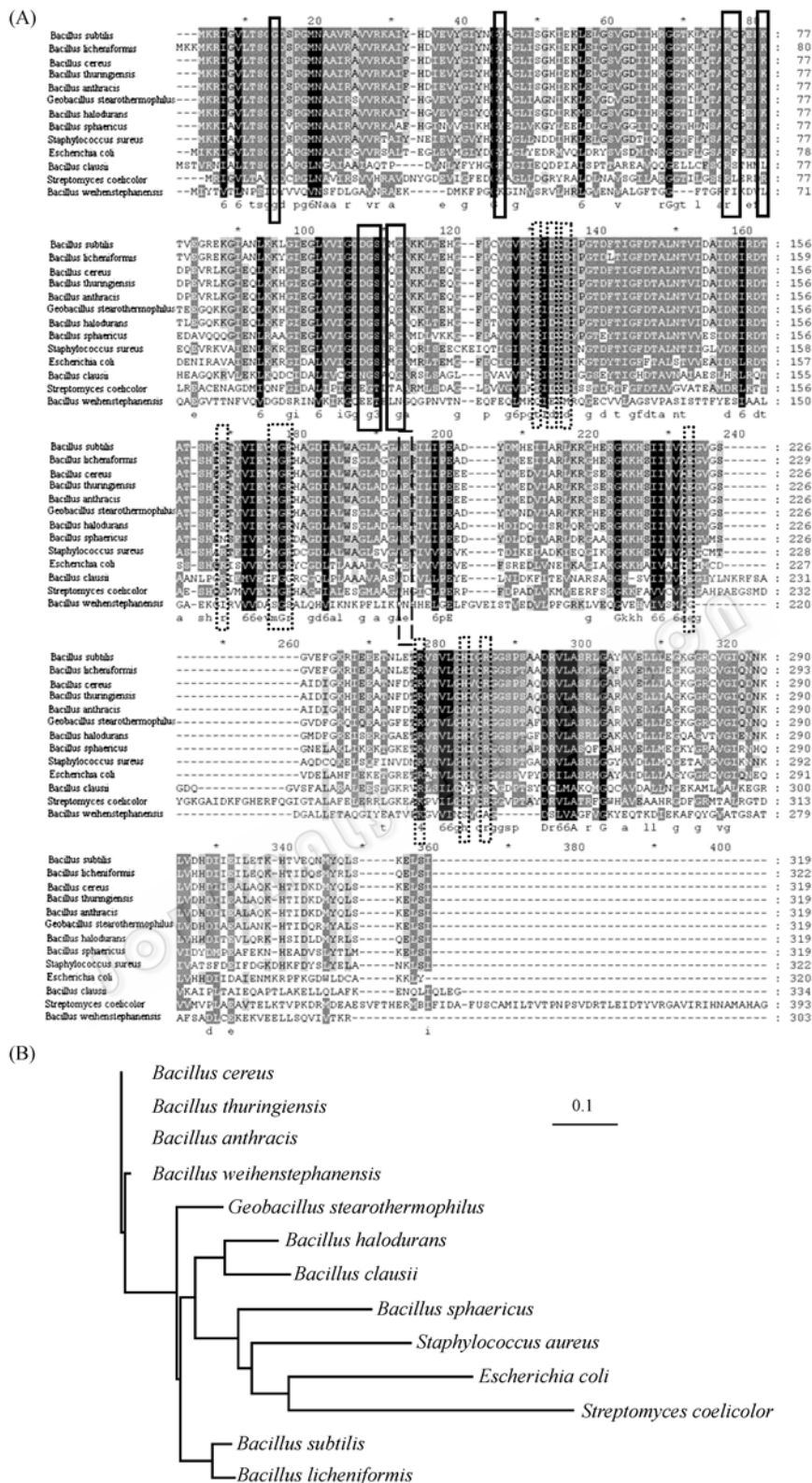


图 4 不同细菌的 PFK 序列比对结果 (A) 及进化树 (B)

Fig. 4 CLUSTAL W multiple-sequence alignment of PFK for 13 species (A) The solid boxes indicate the ATP binding sites, the dotted box indicate the 6-phosphate fructose binding sites, and the small lined box indicate the PEP binding site. (B) Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships according to the PFK sequence.

进化地位,比较其保守区域(图 4-A),并构建了进化树(图 4-B)。根据 PFK 氨基酸序列构件的进化树分析表明:*B.s* 的进化关系与 *S.aureus*, *E.coli* 的关系较近,而与其他芽孢杆菌较远。与 *E.coli* PFK 的底物结合域的 11 个保守氨基酸残基—T125, D127, D129, N162, M169, G170, R171, E222, R243, H249, R252 相比较,除了 N162 在 *B.sphaericus* C3-41 中变成了 N162 外,其余位点保持不变。ATP 结合 domain 的 10 个保守氨基酸残基在 *E.coli* 中为—G11, Y41, R72, F73, R77, D103, G104, S105, M107, G108, *B.sphaericus* PFK 相应的氨基酸残基只有 3 个发生改变:R77 变为 K77(保守型替换),F73 变为 C73, M107 变为 R107。

3 讨论

球形芽孢杆菌磷酸果糖激酶基因 *pfk* 的缺失一直被认为是其不能利用 EMP 途径代谢糖类物质的主要原因之一。本研究通过对球形芽孢杆菌全基因组序列的比较分析,证明 *pfk* 基因以单拷贝形式广泛存在于细菌的染色体 DNA 上。*pfk* 基因的克隆、表达及其对 *E.coli* 磷酸果糖激酶缺陷菌株的回复实验表明,该基因的表达产物具有典型的磷酸果糖激酶的 N 末端 ATP 结合域,以及 C 末端底物结合域,表达产物为正常的有功能的磷酸果糖激酶。研究结果与 Alejandro 等报道的实验结果一致^[8],再次证明球形芽孢杆菌野生菌株中具有 *pfk* 基因序列,能够表达形成具有活性的磷酸果糖激酶。为深入研究球形芽孢杆菌独特的产能代谢途径、不能利用糖类物质生长的机理及基因的突变与其进化提供了重要的数据。

球形芽孢杆菌是一种古老的细菌,有着较为保守的进化过程,在 2,500-4,000 万年前的琥珀化石里的蜜蜂腹部找到的芽胞,萌发后证明是球形芽孢杆菌^[12]。而其杀蚊相关蛋白 MTX 毒素基因 *mtx*、二元毒素基因 *binA*、*binB* 在不同血清型菌株中序列同源性高达 99%^[13,14],其耐热 DNA 聚合酶 I 基因 *polA* 也与一些嗜热细菌的聚合酶 I 基因有较高的亲源性^[15]。因此可以初步推测,球形芽孢杆菌由于某种原因而缺失了或者突变了糖酵解途径的个别酶基因,因而导致糖酵解途径的中断。而该途径中的其它酶基因,如 *pfk* 基因,由于其可能参与细胞生长过程中的其他活动而一直处于高度保守状态。

磷酸果糖激酶是糖酵解过程中起决定作用的催化效率最低的限速酶。在大多数细菌中,代谢产生的

磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)是磷酸果糖激酶的强烈抑制剂。磷酸果糖激酶对糖酵解的调节作用,主要表现在与 PEP 相互作用的氨基酸残基和它所处的组成型表达操纵子 *pfkpykA* 中^{[1][16][17]}。通过对 *B.s* C3-41 全基因组序列的分析,初步证实 *pfk* 与 *pykA* 位于同一个操纵子上。丙酮酸激酶催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)为丙酮酸和 ATP,一方面,ATP 为磷酸果糖激酶的变构调节物,细胞内高浓度的 ATP 会抑制磷酸果糖激酶的活性,另外 PEP 也会结合在 PFK 上,影响其与底物的结合,共同调解糖酵解代谢流^[18]。从图 4-A 的序列比对结果可以看出,球形芽孢杆菌磷酸果糖激酶的 ATP 结合位点、PEP 结合位点均保守存在。

根据 *Bacillus spp.* 16s rRNA 所构建的进化树上观察 *B.sphaericus* 所处的位置,它与常见的 *B. thuringiensis*、*B. cereus*、*B. anthracis*、*B. subtilis* 等处于不同的进化分支,它的近邻菌 *B. pasteurii*、*B. psychrophilus*、*B. globiporus* 已于 2001 年被归入了 *Sporosacrine* 属^[19],而这几种菌的糖代谢情况与 *B. sphaericus* 类似。而关于这些细菌的碳源代谢并没有太多的研究,因此,对 *B. sphaericus* PFK 的详细研究可以在为研究这些相关的细菌的糖代谢提供更多的信息。

基因复制和缺失突变是演化创新的一个关键机制,在研究酵母基因组的基因进化中,发现这种保守复制的基因可能会简化一个系统,而不是使其更复杂,其作用方式是使相关通道更为专业化和模块化^[20]。球形芽孢杆菌虽然不可以通过糖酵解途径来进行糖代谢,但它正常表达磷酸果糖激酶。分析其原因可能与保守进化有关系,即细胞为了更加经济有效低成本的生存,代谢途径中要求一些酶具有多重功能,而个别酶在进化过程中被细胞缺失突变掉,但 PFK 的表达对细胞其他生长活动的影响或者调解作用仍有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Rouwendal GJA, Zwiers LH, Wolbert EJH, et al. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding phosphofructokinase from *Bacillus macquariensis*. *Gene*, 1996, 171: 59-63.
- [2] Alves AM, Euverin GJK, Bibb MJ, et al. Identification of ATP-Dependent phosphofructokinase as a regulatory step in the glycolytic pathway of the *Actinomyces streptomycetes* coelicolor A3 (2). *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 956-961.
- [3] 张用梅. 球形芽孢杆菌及其杀蚊原理和应用, 第一版. 北京: 科学出版社, 1995.
- [4] Singer S. Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their

- toxins against mosquito larvae. *Nature*, 1973, 244: 110–111.
- [5] Thanabalu T, Hindley J, Jackson-Yap J, *et al*. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquito-toxic toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *J Bacteriol*, 1991, 173: 2776–2785.
- [6] Russell BL, Jelley SA, Yousten AA. Carbohydrate metabolism in the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus* 2362. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 294–297.
- [7] 刘娥英, 张用梅, 蔡昌建, 等. 球形芽胞杆菌 C3-41 菌株的生物学特性. 中华流行病学杂志 (*Chinese Journal of Epidemiology*), 1989, 10: 1–6.
- [8] Alejandro AF, Gaspar PM, Carmen SR. Existence of a true phosphofructokinase in *Bacillus sphaericus*: cloning and sequencing of the *pfk* gene. *Appl Environ Microbiol*. 2002, 68: 6410–6415.
- [9] Han B, Liu HZ, Hu XM, *et al*. Molecular characterization of a glucokinase of broad hexose specificity from *Bacillus sphaericus* C3-41. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 3581–3586.
- [10] Sambrook J, Russell J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [11] Bourgooin C, Delecluse A, Torre F, *et al*. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 340–344.
- [12] Cano RJ, Monica K, Borucki. Revival and identification of bacterial spores in 20-to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*, 1995, 268: 1060–1064.
- [13] 袁志明, Neilsen-LeRoux C, Pasteur N. 球形芽胞杆菌 C3-41 菌株二元毒素基因在苏云金杆菌以色列亚种中的克隆和表达. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 1999, 39: 29–35.
- [14] Yuan ZM, Rang C, Maroun RC, *et al*. Identification and molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 2751–2760.
- [15] Han B, Liu HZ, Hu XM, *et al*. Preliminary characterization of a thermostable DNA polymerase I from a mesophilic *Bacillus sphaericus* strain C3-41. *Arch Microbiol*, 2006, 186: 203–209.
- [16] Sakai H, Ohta T. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene for pyruvate kinase of *Bacillus stearothermophilus* and the production of the enzyme in *Escherichia coli*: evidence that the genes for phosphofructokinase and pyruvate kinase form and operon. *Eur J Biochem*, 1993, 211: 851–859.
- [17] Marcel E, James EB, Uwe S. Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increases activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. *Metab Eng*, 1999, 1: 117–127.
- [18] Stülke J, Hillen W. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 849–80.
- [19] Yoon JH, Lee KC, Weiss N, *et al*. *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 1079–1086.
- [20] Ilan W, Avi P, Nir F, *et al*. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature*, 2007, 449: 54–61.

Cloning, expression and elementary characterization of phosphofructokinase from *Bacillus sphaericus* C3-41

Bei Han^{1,2}, Yajun Cai¹, Xiaomin Hu¹, Zhiming Yuan^{1*}

(¹ Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

(² School of Medicine of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: [Objective] *Bacillus sphaericus* is unable to use hexose and pentoses as the sole carbon source, due to the lack of key enzymes in Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP), Hexose Monophosphate Pathway (HMP) and Entner-Doudoroff (ED) pathway, such as phosphofructokinase (PFK). Based on the genome sequence annotation results of *B. sphaericus* C3-41, the phosphofructokinase gene *pfk* was verified with a single copy on chromosome, the aim of this research is to analysis the EMP pathway in *B. sphaericus* further, and confirm the function of phosphofructokinase. [Methods] The methods of southern-blot of *pfk* gene among different *B. sphaericus* strains, *pfk* ORF cloning from C3-41 and expressing in *Escherichia coli*, the corresponding sequence analysis and alignment were used. [Results] The *pfk* ORF of *B. sphaericus* was composed of 960 bp nucleotides encoding a protein about 42 kDa, and the PFK sequence analysis showed it had the conservative amino acids-binding sites and an ATP-binding domain. The expression of *pfk* in recombinant *E. coli* strain could complement the PFK activity of a *pfk* mutated *E. coli* strain DF1020. [Conclusion] The expressed PFK had the conventional phosphofructokinase activity, and settled the foundation for the further research of catabolism of *B. sphaericus*.

Keywords: *Bacillus sphaericus*; glycolysis; phosphofructokinase

Supported by the Directional Project of Chinese Academy of Sciences (950121)

*Corresponding author. Tel: +86-27-97198195; Fax: +86-27-87198120; E-mail: yzm@wh.iov.cn

Received: 30 October 2007/ Revised: 28 January 2008