

## 苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigL* 基因突变体的特性分析

彭琦<sup>1,2</sup>, 朱莉<sup>2</sup>, 宋福平<sup>2\*</sup>, 张杰<sup>2</sup>, 高继国<sup>1</sup>, 黄大昉<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

(<sup>2</sup>中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

(<sup>3</sup>中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

**摘要:**【目的】通过分析苏云金芽胞杆菌 *sigL* 基因突变体的特征, 进一步明确 *sigL* 基因在苏云金芽胞杆菌中的功能。【方法】测定了苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株, *sigL* 基因缺失突变菌株和互补菌株在不同营养成分的培养基中的生长曲线以及在不同氮源条件下的生长情况。分别将调控 *aco* 操纵子(编码 3-羟基丁酮脱氢酶系统)的转录调节基因 *acoR* 和调控 *bkd* 操纵子(编码催化支链脂肪酸合成的酶系统)的转录调节基因 *bkdR* 的启动子与 *lacZ* 基因融合, 并转入出发菌株和 *sigL* 突变体中, 测定 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性。【结果】*sigL* 突变体不能利用精氨酸、脯氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸为唯一的氮源;  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性分析表明: 在 *sigL* 突变体中 *acoR* 基因和 *bkdR* 基因的启动子活性降低。序列比对分析表明: Bt 中的 AcoR 和 BkdR 的蛋白结构域与依赖于 $\sigma^L$ 的转录调节因子的保守序列相似。【结论】苏云金芽胞杆菌中 *sigL* 基因的缺失可能阻碍了某些重要碳、氮源参与的代谢途径。在 Bt 中 AcoR 和 BkdR 是依赖于 $\sigma^L$ 的转录调节因子。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌; *sigL* 基因突变体; 代谢途径; 转录调节因子 AcoR、BkdR

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1147-07

*sigL* 基因编码的产物 $\sigma^L$ 是细菌中许多重要代谢途径的转录因子。 $\sigma^L$ 属于 $\sigma^{54}$ 家族<sup>[1]</sup>, Reitzer 等<sup>[2]</sup>发现在大肠杆菌中 $\sigma^L$ 调控许多基因的表达, 尤其是与氮代谢相关的基因。Arous 等<sup>[3]</sup>利用基因芯片技术发现, 在单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)中, $\sigma^L$ 调控 77 个基因的表达, 其中 16 个与碳水化合物代谢有关, 10 个与氨基酸的代谢有关, 51 个涉及了其它的生理功能。在枯草芽胞杆菌中, 已经鉴定出 5 种依赖于 $\sigma^L$ 的转录调节因子, 分别是: 调控果聚糖酶操纵子的转录调节因子(LevR)、调控精氨酸代谢途径的转录调节因子(RocR)、调控 3-羟基丁酮分解代谢途径的转录调节因子(AcoR)、调控支链脂肪酸合成途径的转录调节因子(BkdR)和调控与细胞抵御冷刺激相关途径的转录调节因子(YpIP), 这些

转录调节因子在许多生理代谢途径中起着重要作用<sup>[4-8]</sup>, 其中 AcoR 和 BkdR 两个转录调节因子分别正调控 *aco* 操纵子和 *bkd* 操纵子, 这两个操纵子同时受 $\sigma^L$ 的正调控。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)区别于其它芽胞杆菌的显著特征是能在芽胞形成期产生具有杀虫作用的蛋白晶体<sup>[9]</sup>, Cry 蛋白从开始表达达到晶体和芽胞的最终成熟涉及很多的物质和能量代谢, 包括氨基酸代谢、多糖和脂类的代谢等等; 与枯草芽胞杆菌相比, 在苏云金芽胞杆菌晶体和芽胞形成过程中, 与代谢相关的酶的合成和活性调节可能存在更为精细的方式<sup>[10]</sup>。Bt 菌株在形成芽胞的同时合成大量的晶体蛋白, 跟碳、氮代谢调节有密切关系, Yousten 等<sup>[10]</sup>报道 Bt 在葡萄糖培养基中产生的乙酸等

基金项目: 国家“973 项目”(2003CB114201); 国家“863 计划”(2006AA10A212, 2006AA02Z189)

\*通讯作者。Tel: +86-10-62896634; Fax: +86-10-62812642; E-mail: songfjp@hotmail.com

作者简介: 彭琦(1981-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 主要从事苏云金芽胞杆菌功能基因组学的研究。E-mail: pengqip@tom.com

收稿日期: 2008-03-04; 修回日期: 2008-05-12

次级代谢产物在芽胞形成早期可以被再利用；Nickerson<sup>[11]</sup>等报道脂类的代谢在 Bt 的生长、芽胞的形成和萌发过程中有重要的作用；而 SigL 在 Bt 中的功能及其调控的代谢途径至今未见正式报道。因此研究 SigL 的功能有助于了解苏云金芽胞杆菌的发育中能量和物质代谢调节机制，揭示该因子在晶体形成等生理生化过程中的功能和作用。

本研究在获得苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigL* 基因缺失突变菌株（插入失活突变体，具有卡那霉素抗性）和互补菌株（含有 *sigL* 基因及其自身启动子的穿梭载体在 *sigL* 突变体中过表达）的基础上（另文发表），测定了突变菌株和互补菌株在不同营养成分的

培养基中的生长曲线以及对不同氮源的利用情况；进一步分析了 *acoR* 和 *BkdR* 两个转录调节因子在突变体中的活性。为深入研究 *sigL* 调控的代谢途径奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养基：**表 1 为本研究所用菌株和质粒。大肠杆菌（*Escherichia coli*）的培养采用 LB 培养基；苏云金芽胞杆菌的培养分别采用牛肉膏蛋白胨培养基（3%牛肉膏，5%蛋白胨，pH 7.2）、SM 培养基<sup>[12]</sup>、BM 培养基<sup>[13]</sup>。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant characteristic	Resource
<b>Strains</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> JM110	<i>RpsI thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	This lab
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rpsL(str<sup>r</sup>), thr, leu, thi- v1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lac<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	This lab
<i>Bacillus thuringiensis</i>		
<i>B. thuringiensis</i> HD-73	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki, carrying <i>cryIAC</i> gene	This lab
HDIsigL	HD-73 Mutant type, $\Delta sigL$	This lab
HDHfsigL	Complementary strain	This lab
HDPa	HD-73 strain containing plasmid pHT304Pa	This study
sigLPa	HDIsigL strain containing plasmid pHT304Pa	This study
HDPb	HD-73 strain containing plasmid pHT304Pb	This study
sigLPb	HDIsigL strain containing plasmid pHT304Pb	This study
<b>Plasmids</b>		
pHT304-BZ	Promoterless <i>lacZ</i> vector, Ery <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Dr. Didier Lereclus
pHT304Pa	Amp <sup>R</sup> , Erm <sup>R</sup> , pHT304-BZ carrying <i>PacoR</i>	This study
pHT304Pb	Amp <sup>R</sup> , Erm <sup>R</sup> , pHT304-BZ carrying <i>PbkdR</i>	This study

**1.1.2 主要试剂和仪器：***Taq* DNA 聚合酶购自鼎国生物技术公司；KOD DNA 聚合酶购自东洋纺生物技术有限公司；引物由上海生工生物工程公司合成；DNA 回收试剂盒购自 Axygen 公司；相关的内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程有限公司。

### 1.2 细菌的培养条件

苏云金芽胞杆菌在 30℃ 培养，摇床转速为 220 r/min，红霉素使用浓度为 5 μg/mL。大肠杆菌在 37℃ 培养，摇床转速为 230 r/min，氨苄青霉素使用浓度为 100 μg/mL。

### 1.3 DNA 操作和转化

大肠杆菌质粒提取及转化，DNA 片段纯化参见试剂盒说明。苏云金芽胞杆菌总 DNA 提取和电击转化参考文献<sup>[14, 15]</sup>。序列比对和搜索使用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的 PSI-BLAST 及 BLASTX。

### 1.4 不同培养基中生长曲线的测定

将出发菌株 HD-73、突变菌株 HDIsigL、互补菌株

HDHfsigL 按 1% 接种量分别接入牛肉膏蛋白胨培养基、SM 培养基和 BM 培养基，30℃、220 r/min 培养，每隔 2 h 取样，稀释 10 倍测 *OD*<sub>600</sub> 值，绘制生长曲线。

### 1.5 不同氮源条件下生长曲线的测定

将出发菌株 HD-73 和突变菌株 HDIsigL 按 1% 接种量接入含有 2% (M/V) 的氨基酸为唯一氮源的 BM 培养基[加入的氨基酸分别为：精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Iso)、谷氨酰胺(Gln)、苯丙氨酸(Phe)、苏氨酸(Thr)、蛋氨酸(Met)、色氨酸(Trp)、天冬酰胺(Asn)、丙氨酸(Ala)、组氨酸(His)、亮氨酸(Leu)、谷氨酸(Glu)]，30℃、220 r/min 培养，每隔 2 h 取样，测 *OD*<sub>600</sub> 值，取菌体在每种培养基中的 *OD*<sub>600</sub> 的最大值，重复 3 次，分析显著性差异<sup>[16]</sup>。

### 1.6 *acoR*、*bkdR* 基因的启动子与 *lacZ* 融合表达载体的构建

**1.6.1 PCR 扩增：**根据已公布的苏云金芽胞杆菌 97~27 菌株<sup>[17]</sup>的全基因组序列，在 *aco* 操纵子上游及 *bkd*

操纵子下游找到了 *acoR* 和 *bkdR* 两个基因,根据基因注释 (Sigma-54-dependent transcriptional activator, Uncharacterized protein), 设计了两对引物 (表 2)。以 HD-73 菌株的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增的

DNA 片段为 *acoR* 基因的启动子片段和 *bkdR* 基因的启动子片段,长度分别为 531 bp 和 579 bp。PCR 反应采用 50  $\mu$ L 体系,反应条件: 94 4 min; 94 1 min, 54 1 min, 68 2 min, 30 个循环; 68 10 min。

表 2 本研究中使用的引物  
Table 2 Primer in this study

Primer name	Sequence(5'→3')	Restriction site
A1	CC <u>AAGCTT</u> GGATGAAAGATAATAAGAATGG	Hind
A2	CGGGATCCGTATCATCTCCCTTTTAATTG	BamH
B1	CC <u>AAGCTT</u> GATGCTATTGCCGAACCTAACG	Hind
B2	CGGGATCCATATTACACTTCTCTCGAAG	BamH

**1.6.2 表达载体的构建:** 将 PCR 扩增的 HD-73 菌株中 *acoR* 和 *bkdR* 的启动子片段分别经 BamH 和 Hind 双酶切插入到含有 *lacZ* 基因的载体 pHT304BZ 的 BamH 和 Hind 位点之间,转入 *E. coli* JM110 获得重组质粒 pHT304Pa 和 pHT304Pb (大小分别为: 10.23 kb 和 10.28 kb)。将重组质粒转入 *E. coli* SCS110,使质粒去甲基化,提取重组质粒分别转入 HD-73 出发菌株和 *sigL* 突变菌株中,获得的转化子被分别命名为: HDPa、sigLPa (pHT304Pa); HDPb、sigLPb (pHT304Pb)。

**1.7  $\beta$ -半乳糖苷酶活分析**

将 Bt 菌株按 1% 接种量接种于 50 mL 含红霉素的液体 SM 培养基中; 30  $^{\circ}$ C, 220 r/min 振荡培养。从 T<sub>-4</sub> 期 (T<sub>0</sub> 期为菌体结束对数生长期的时间) 开始,每隔 2 h 取样一次,每次取样 1 mL,同时测定样品 OD<sub>600</sub> 的值,立即将样品置于 -20  $^{\circ}$ C 保存。 $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定参考文献 [18]。

**2 结果和分析**

**2.1 sigL 突变对菌株生长的影响**

在固体 LB 培养基中,挑单菌落将出发菌株 HD-73、突变菌株 HDIsigL、互补菌株 HDHFsigL 同时培养, 30

培养 96 h 后,3 个菌株的单菌落大小不一致 (图 1), 出发菌株的菌落直径为 45 mm, 突变菌株的菌落直径为 15 mm, 互补菌株的菌落直径为 22 mm, 这种差距可能是由于 *sigL* 基因的缺失影响了菌体对培养基中的营养利用,表现出生长迟缓的现象,而互补菌株由于恢复了 *sigL* 基因的部分功能,所以生长的速度要比突变菌株快,但还没有完全达到出发菌株的生长速度。

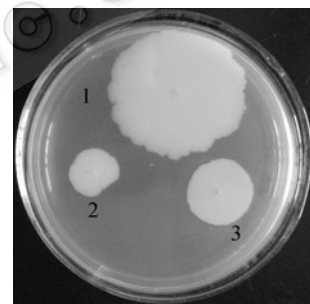


图 1 出发菌株、突变菌株、互补菌株单菌落的生长速度比较  
Fig. 1 Comparison of the growth velocity of colony in host strain, mutant and complementary strain. 1. HD-73(45 mm); 2. HDIsigL(15 mm); 3. HDHFsigL(22 mm).

生长曲线的结果表明 (图 2), 在牛肉膏蛋白胨

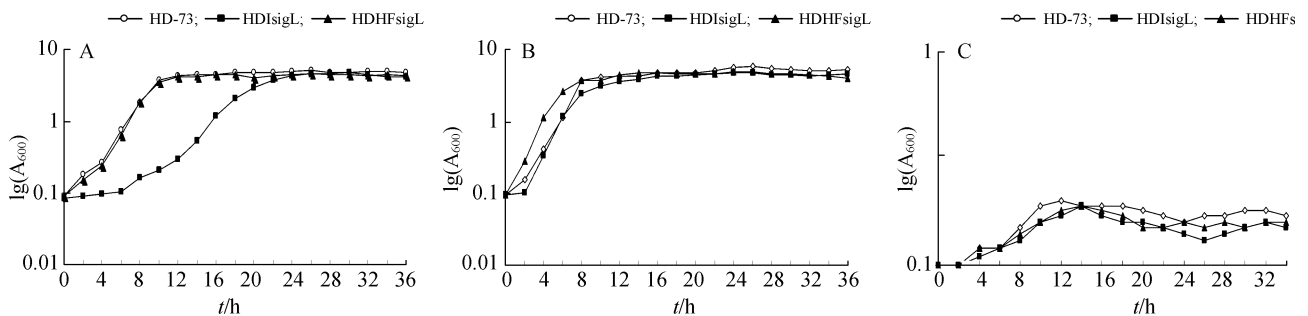


图 2 出发菌株、突变菌株、互补菌株生长曲线的比较

Fig. 2 Comparison of the growth curve of host strain, mutant and complementary strain. A: PB Medium; B: Sporulation Medium; C: Basic Medium.

培养基中, 出发菌株与突变菌株的生长速度差异很大, 出发菌株与互补菌株在 10 h 时结束对数生长期, 进入平稳期, 而突变菌株在 24 h 时进入平稳期; 在 SM 培养基和 BM 培养基中, 3 个菌株的生长差异不大; 说明在营养成分越丰富的培养基中, 出发菌株与突变菌株生长差异越大, *sigL* 基因的缺失影响了菌体对培养基中营养成分的利用, 而本试验所用的培养基中的主要营养成分是碳、氮源, 因此, *sigL* 基因的缺失可能阻碍了某些重要碳、氮源参与的代谢途径; 并且与 LB 固体培养基相比, 由于 LB 固体培养基比牛肉膏蛋白胨培养基的营养成分丰富, 所以互补菌株与出发菌株在 LB 固体培养基中的生长差距比较明显,

而在牛肉膏蛋白胨培养基中, 互补菌株与出发菌株生长情况基本一致, 表明互补菌株部分回复了 *sigL* 基因的功能, 只有在营养成分更丰富的培养基中可以看到与出发菌株的生长差异, 这进一步说明 *sigL* 基因的缺失影响了菌体对培养基中营养成分的利用。

## 2.2 出发菌株和突变菌株在不同氮源培养基中生长情况的比较

在 BM 培养基中分别加入 2% (M/V) 的不同种氨基酸作为唯一的氮源, 将出发菌株 HD-73 和突变菌株 HDIsigL 在不同种氨基酸为唯一氮源的液体培养基中培养, 以  $OD_{600}$  的最大值作为判断菌液浓度的标准。

表 3 出发菌株、突变菌株在不同氮源培养基中差异显著性分析

Table 3 Analysis of significant difference of the growth of host strain and mutant in different nitrogen source medium

氮源	HD-73 菌株在 BM 培养基与不同氨基酸培养基中生长情况的比较		HDIsigL 菌株在 BM 培养基与不同氨基酸培养基中生长情况的比较		HD-73 与 HDIsigL 对不同氮源的利用	
	MAX <sub>OD600</sub>	F 值	MAX <sub>OD600</sub>	F 值	F 值	
Arg	0.2903 ± 0.0015	636.646**	0.1977 ± 0.0068	0.288	529.343**	
Pro	0.2393 ± 0.0015	109.01**	0.201 ± 0.001	3.658	132.502**	
Val	0.2267 ± 0.0031	38.281**	0.203 ± 0.0061	2.829	36.266**	
Iso	0.2603 ± 0.0015	273.281**	0.2 ± 0.002	2.227	1724.261**	
Gln	0.2803 ± 0.0025	448.413**	0.1993 ± 0.0021	1.618	1845.28**	
Phe	0.242 ± 0.002	120.143**	0.1963 ± 0.0057	0.052	172.192**	
Thr	0.285 ± 0.0053	326.224**	0.2243 ± 0.0067	36.215**	152.645**	
Met	0.2213 ± 0.0015	27.252**	0.1997 ± 0.0032	1.579	111.184**	
Trp	0.225 ± 0.0046	25.92**	0.204 ± 0.0036	5.878	38.912**	
Asn	0.255 ± 0.0036	172.842**	0.239 ± 0.0036	149.226**	29.538**	
Ala	0.2473 ± 0.0035	127.183**	0.228 ± 0.0026	99.01**	58**	
His	0.204 ± 0.0053	0.022	0.195 ± 0.0046	0.007	4.959	
Leu	0.2047 ± 0.0035	0.117	0.1997 ± 0.0025	1.779	4.018	
Glu	0.2013 ± 0.0012	0.346	0.199 ± 0.001	1.532	7	

\*0.05 水平: 差异显著; \*\*0.01 水平: 差异极显著

经过差异显著性分析 (表 3) 表明: 与不含氮源的 BM 培养基相比 (HD-73: Max  $OD_{600}$  = 0.203 ± 0.0058; HDIsigL: Max  $OD_{600}$  = 0.195 ± 0.005), 出发菌株可以利用精氨酸、脯氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸为唯一的氮源, 而突变菌株不能利用, 说明 *sigL* 基因的缺失直接影响了这些氨基酸所参与的代谢途径; 出发菌株和突变菌株都能利用苏氨酸、天冬酰胺、丙氨酸为唯一的氮源, 但两个菌株在这些氮源培养基中生长差异很大, 说明 *sigL* 基因的缺失可能间接影响了这些氨基酸所参与的代谢途径; 出发菌株和突变菌株都不能利用组氨酸、亮氨酸、谷氨酸为唯一的氮源。

## 2.3 *sigL* 突变株中转录调节因子 AcoR 和 BkdR 的活性分析

AcoR 和 BkdR 在枯草芽胞杆菌中是依赖于 SigL 的转录调节因子<sup>[6, 7]</sup>, 本文分析了在 Bt HD-73 *sigL* 突变菌株中 AcoR 和 BkdR 这两个转录调节因子的活性。结果表明 HDPa 在从 T<sub>-4</sub> 期开始可以检测到 β-半乳糖苷酶的活性 (图 3-A), 随着培养时间的增加, 酶活不断增强, 在 T<sub>6</sub> 期出现一个峰值, 随后活性迅速下降, 而后又逐渐上升, 至 T<sub>14</sub> 期又出现一个峰值, 说明该基因可能存在两个启动子, 分别由不同 sigma 因子控制并在不同时间表达, 突变体对 AcoR 基因的早期表达影响较小, 推测可能由 SigL 外的调控因子进行调控。

HDPb 从 T<sub>2</sub> 期开始可以检测到β-半乳糖苷酶的活性,随着培养时间的增加,酶活不断增强,在 T<sub>6</sub> 期出现一个峰值,随后活性逐渐下降(图 3-B);而 *sigLPb* 在 T<sub>2</sub> 期到 T<sub>6</sub> 期酶活较平稳,在 T<sub>6</sub> 期以后逐渐下降,但在整个过程中,酶活都低于 HDPb 中的β-半乳糖苷酶的活性。

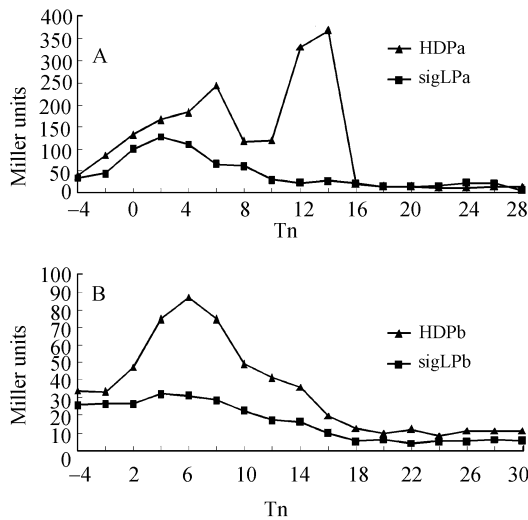


图 3 含有质粒 pHT304Pa(A)和质粒 pHT304Pb(B)的 HD-73 出发菌株和 *sigL* 突变菌株的β-半乳糖苷酶活性分析  
Fig. 3 Analysis of the β-galactosidase activity of HD-73 strain and *sigL* mutant carrying pHT304Pa (A) and carrying pHT304Pb (B).

以上结果说明, *sigL* 基因的缺失导致突变菌株 HDIsigL 中 *acoR* 和 *bkdR* 启动子活性的降低。由此推测这两个基因在 Bt 中可能也是依赖于 SigL 的转录调节因子。

### 3 讨论

通过对 Bt HD-73 出发菌株、HDIsigL 突变菌株及互补菌株在不同营养成分的培养基中的生长曲线的测定,表明 *sigL* 基因是苏云金芽胞杆菌生长代谢过程中的重要调控因子,从牛肉膏蛋白胨培养基中的生长曲线可以看到, *sigL* 缺失突变体从 Bt 的营养期生长开始直到芽胞期都表现出生长迟缓的现象,说明 *sigL* 调控的与代谢相关的基因在菌体生长的各个时期都有所表达。

对苏云金芽胞杆菌 97-27 菌株基因组中的 *acoR* 和 *bkdR* 基因编码的转录调节因子的氨基酸序列进行分析,发现它们与枯草芽胞杆菌 Bs 168 中的转录调节因子 AcoR 和 BkdR 具有相似的蛋白结构域(图 4)。在枯草芽胞杆菌中, AcoR 和 BkdR 分别正调控 *aco* 操纵子和 *bkd* 操纵子,在 Bt 97-27 菌株全基因组序列中位于 *acoR* 上游的 *aco* 操纵子的启动子序列以及 *bkdR* 下游的 *bkd* 操纵子的启动子序列与枯草芽胞杆

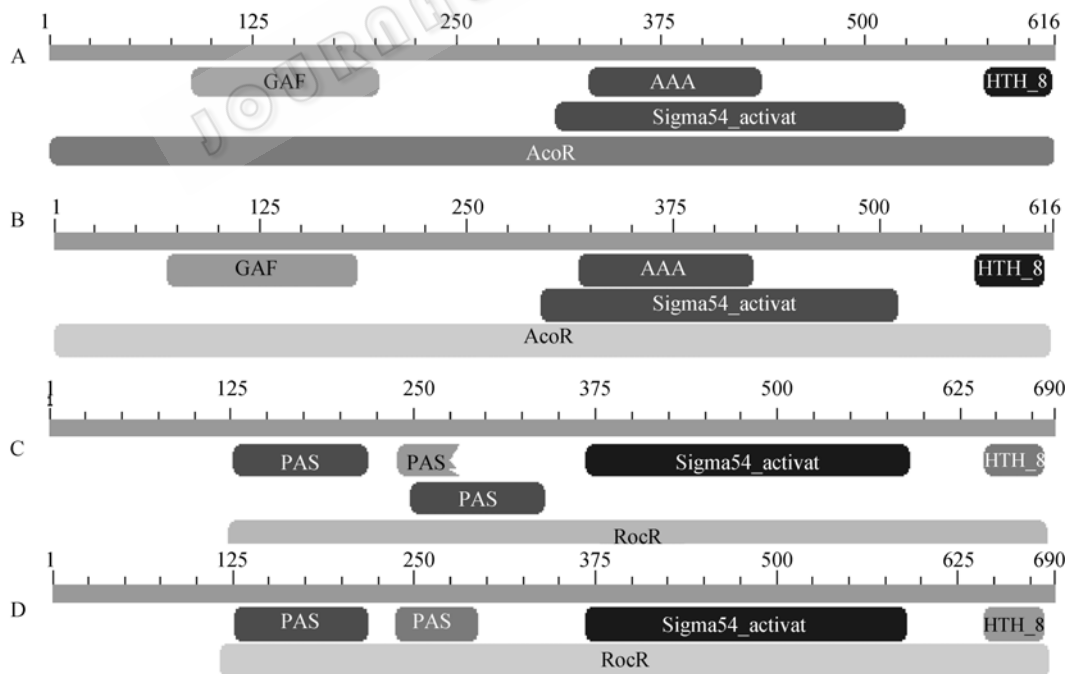


图 4 转录激活因子蛋白结构域  
Fig. 4 The Conserved Domain of Transcriptional Activator Protein. A:AcoR from Bt97-27; B:AcoR from Bs 168 ; C:BkdR from Bt97-27; D:BkdR from Bs 168.



- [11] Nickerson K, Bulla L Jr. Lipid metabolism during bacterial growth, sporulation, and germination: an obligate nutritional requirement in *Bacillus thuringiensis* for compounds that stimulate fatty acid synthesis. *Journal of Bacteriology*, 1975, 123(2): 598 – 603.
- [12] Schaeffer P, Millet J, Aubert J.P. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1965, 54(3): 704–711.
- [13] Sakharova ZV, Ignatenko IuN, Khovrychev MP, *et al*. Sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* during growth limitation via nutrient sources. *Mikrobiologiya*, 1984, 53(2): 279–284.
- [14] Stobdan T, Kaur S, Singh A. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology letters*, 2004, 26(14): 1153–1156.
- [15] Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, *et al*. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letter*, 1989, 51(1): 211–218.
- [16] Debarbouille M, Martin-Verstraete I, Kunst F, *et al*. The *Bacillus subtilis sigL* gene encodes an equivalent of  $\sigma^{54}$  from gram-negative bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(20): 9092–9096.
- [17] Han CS, Xie G, Challacombe J, *et al*. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(9): 3382–3390.
- [18] 孙长坡, 宋福平, 张杰等. 苏云金芽胞杆菌 G03 *spo F* 操纵子敲除对芽孢和晶体形成的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(4): 583–587.
- [19] Studholme, DJ, and Buck M. Novel roles of  $\sigma^N$  in small genomes. *Microbiology*, 2000, 146 (Pt1): 4–5.
- [20] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, *et al*. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, 390(6657): 249–256.

## Characteristics of *sigL* mutant in *Bacillus thuringiensis* HD-73

Qi Peng<sup>1,2</sup>, Li Zhu<sup>2</sup>, Fuping Song<sup>2\*</sup>, Jie Zhang<sup>2</sup>, Jiguo Gao<sup>1</sup>, Dafang Huang<sup>3</sup>

<sup>(1)</sup>College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

<sup>(2)</sup>State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

<sup>(3)</sup>Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** [Objective] The purpose of this study was to characterize *sigL* mutant in *Bacillus thuringiensis* (Bt) HD-73, and to determine the function of *sigL* gene of Bt. [Methods] We studied the growth speed of the *sigL* mutant and complementary strain in different nutrient medium with different amino acids as nitrogen source respectively. *lacZ* gene was fused with the promoter of the *acoR* gene and *bkdR* gene, and two recombined genes were expressed in *sigL* mutant strain and HD-73 wild strain sequentially. [Results] *sigL* mutant could not grow on arginine, proline, valine, isoleucine, glutamine, phenylalanine, methionine and tryptophane as the sole nitrogen source separately. Activity of  $\beta$ -galactosidase in *sigL* mutant strain was much lower than it in wild-type strain and sequence analysis showed that the domain of AcoR and BkdR are similar to the conserved domain of SigL-dependent transcriptional activator in Bt. [Conclusion] The deletion of *sigL* gene maybe blocked some important metabolic pathways. AcoR and BkdR are  $\sigma^L$ -dependent transcriptional activators in *Bacillus thuringiensis* strains, probably the operons which were regulated by AcoR and BkdR were also controlled by  $\sigma^L$  respectively.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; *sigL* gene mutant; metabolism pathway; transcriptional activator AcoR and BkdR

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB114201) and the Chinese National Program for High Technology Research and Development (2006AA10A212, 2006AA02Z189)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-62896634; Fax: +86-10-62812642; E-mail: songfp@hotmail.com

Received: 4 March 2008/ Revised: 12 May 2008