

# 苏云金芽孢杆菌芽孢萌发相关基因 *gerM* 的克隆及功能研究

严晓华<sup>1,2</sup>, 刘 钢<sup>1\*</sup>, 谭华荣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 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 100080)

(<sup>2</sup> 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘 要:** 依照蜡状芽孢杆菌 *gerM* 基因的保守序列设计引物, 从苏云金芽孢杆菌中扩增出 640bp 的 DNA 片段。以此为探针, 从苏云金芽孢杆菌部分基因组酶切文库中成功地克隆到了一个 4.5kb 的 DNA 片段。序列分析表明, 该片段包含一个完整的开放阅读框, 其预测的编码产物与枯草芽孢杆菌 GerM 蛋白具有很高的同源性, 将该基因命名为 *gerM*。RT-PCR 分析表明, *gerM* 基因仅在芽孢形成的过程中表达。通过同源重组的策略构建了 *gerM* 基因的阻断突变株。研究表明, *gerM* 基因的破坏影响苏云金芽孢杆菌芽孢萌发的速率和比例。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌 部分基因组酶切文库 *gerM* 基因 RT-PCR 芽孢萌发

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0017-05

在特定的营养压力条件下, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的细菌会经历形态分化并形成芽孢 (spore), 这个过程称为芽孢形成 (sporulation)<sup>[1]</sup>。芽孢通常是没有代谢活性的休眠体, 对热、辐射、干燥、极端的 pH 以及有毒化学物质等都具有极强的抗性, 在不利的环境条件下能存活几年、几十年甚至更长的时间<sup>[2]</sup>。当环境条件对生长有利时, 芽孢能经历萌发 (germination) 和生长 (outgrowth), 最终转变为具有代谢活性的营养体细胞<sup>[3]</sup>。以枯草芽孢杆菌为模式菌, 对芽孢的形成过程已经进行了大量的研究, 有了比较详尽的了解<sup>[4-6]</sup>。芽孢的形成过程涉及 3 种细胞类型: 前分裂细胞 (predivisional cell)、母细胞 (mother cell) 和前芽孢 (forespore), 还有 6 个关键蛋白 Spo0A,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^G$  和  $\sigma^K$ , 它们组成不同的调控网络, 调节 504 个不同基因的表达。其中 383 个在母细胞中表达, 129 个在前芽孢中表达。在 6 个调节子中, 最大的  $\sigma^E$  调控网络由 253 个基因组成 (包括 *gerM*)。在这些基因中, 也包含与芽孢萌发相关的基因, 它们表达的蛋白在芽孢形成时被装配到芽孢中。尽管通过基因芯片技术已经能很方便地发现大量相关的基因, 但它们在芽孢形成或萌发中的具体作用仍需要进一步的研究。

苏云金芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌同属于蜡状芽孢杆菌群, 亲缘关系极近且都是致

病菌<sup>[7]</sup>。其中, 苏云金芽孢杆菌在芽孢形成过程中产生的伴孢晶体能杀死一些昆虫的幼虫, 因而作为天然的生物杀虫剂得到广泛的应用<sup>[8]</sup>。在土壤中, 苏云金芽孢杆菌芽孢的萌发和生长受到营养的控制, 在大部分的土壤和水环境中, 它都不能繁殖<sup>[9-11]</sup>。经研究发现, 苏云金芽孢杆菌芽孢最外层的孢外壁和伴孢晶体的形成具有一定的联系<sup>[12]</sup>, 而且它对炭疽芽孢杆菌的萌发也是必需的<sup>[13]</sup>。通过对苏云金芽孢杆菌芽孢萌发相关基因的研究, 将有助于进一步阐明芽孢萌发的机制, 为间接了解这些致病菌及筛选一些合适的抗性药物提供理论依据; 同时, 也可以为改造苏云金芽孢杆菌提供一些有益的启示。

在枯草芽孢杆菌中, 曾利用转座子插入突变克隆到一个 630bp 的与芽孢形成和萌发相关的基因 *gerM*, 破坏该基因可导致多种效性, 其中芽孢的形成和萌发都受到了一定影响<sup>[14,15]</sup>。然而基因组测序完成后发现, *gerM* 全长 1101bp, 在芽孢细菌中比较保守。为了进一步阐明 *gerM* 基因的结构和功能, 我们通过构建部分基因组酶切文库, 从苏云金芽孢杆菌中克隆到一个约 4.5kb 的片段, 序列分析表明它包含完整的 *gerM* 基因。通过同源重组对 *gerM* 基因进行了破坏, 实验结果显示 *gerM* 基因破坏株芽孢的萌发速率低于野生株。

基金项目: 国家重大基础研究 (973) 资助项目 (2002CB513207)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-62636851; Fax: 86-10-62654083; E-mail: liug@sun.im.ac.cn

作者简介: 严晓华 (1980-) 男, 四川德阳人, 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: yanxh21@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-05-12; 接受日期: 2006-06-13; 修回日期: 2006-09-12

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养基** 苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kustaki* 1.175) 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC), 通常于 30℃ 在 Luria-Bertani (LB) 培养基中培养。CCY 培养基用于苏云金芽孢杆菌芽孢的培养和收集<sup>[16]</sup>。在基因克隆实验中, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  于 37℃ 在 LB 培养基中培养, 需要时加入不同的抗生素。质粒 pBluescript KS<sup>+</sup> (Stratagene Corp.) 用于基因克隆实验。pKSV7 和 pHT3101 都是 *E. coli*-*Bacillus* 穿梭载体, 其中 pKSV7 有芽孢杆菌温度敏感型的复制子, 在非允许的温度下不能复制, pHT3101 质粒中含有红霉素抗性基因, 本文用于基因破坏实验<sup>[17,18]</sup>。

**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使用终浓度分别为 100 $\mu$ g/mL 和 50 $\mu$ g/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 $\mu$ g/mL 和 5 $\mu$ g/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** 本研究中的引物在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。

### 1.2 DNA 操作和转化

大肠杆菌质粒提取及转化, DNA 片段纯化, Southern 杂交和菌落杂交参考文献 [19]。苏云金芽孢杆菌总 DNA 提取和电击转化参考文献 [20]。序列比对和搜索使用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的基本工具 PSI-BLAST 及 BLASTX 开放阅读框 (ORF) 的分析使用 DNASIS 2.0 软件 (Hitachi Software)。通过在 NCBI 上进行 *gerM* 同源基因的比对和分析, 利用保守序列设计引物 P1: 5'-CGGCAGTCATTGATTCTCA-3' 和 P2: 5'-TCTGGACGATCTACAGGTTT-3', 以苏云金芽孢杆菌总 DNA 为模板扩增出 *gerM* 基因的一个片段, 并将它插入质粒 pBluescript KS<sup>+</sup> 得到 pTGM1。以这个片段为探针, 通过构建部分基因组酶切文库克隆到一个约 4.5kb 的片段, 将其插入质粒 pBluescript KS<sup>+</sup> 获得 pTGM2。

### 1.3 *gerM* 基因阻断突变株的构建

为了构建 *gerM* 基因阻断突变株, 以 *Hind* III 酶切 pTGM2 获得约 1.7kb 的下臂并将它插入 pBluescript KS<sup>+</sup> *Hind* III 位点获得 pTGM3。以质粒 pHT3101 为模板, 利用引物 P3: 5'-TGTGGAGTTCCCCTTAGAAGCAAAC-3' 和 P4: 5'-ATAGGATCCAATAAGGGCCGACACG-3' 扩增出约 1.2kb 的红霉素抗性基因<sup>[18]</sup>, 并将它插入 pTGM3 的 *Eco*RV 位点得到 pTGM4。以 *Sma* I 和 *Xho* I 对质粒 pTGM4 进行双酶切, 得到约 2.9kb 的含有红霉素抗性基因与 *gerM* 基因下臂的片段; 同时以 *Hind* III 切 pTGM2 得到约 5.6kb 的含有 pBluescript KS<sup>+</sup> 以及 *gerM* 基因上臂的片段, 然后利用 T4 DNA 聚合酶同时将上述两个片段补平并连接, 挑选 *gerM* 基因上臂与红霉素抗性基因相连的连接产物, 即质粒 pTGM5 (pBluescript KS<sup>+</sup> :: *gerM* :: Em<sup>R</sup>)。最后以 *Kpn* I 和 *Bam*HI 对 pTGM5 进行双酶切, 获得约 5.8kb 的片段并将它插入 pKSV7 相应的位点得到破坏质粒 pTGM6 (pKSV7 :: *gerM* :: Em<sup>R</sup>)。利用电击转化将 pTGM6 导入苏云金芽孢杆菌, 以添加红霉素的 LB 板进行筛选, 并通过质粒提取和酶切进一步验证转化子。此后, 将液体培养的正确转化子稀释合适倍数后涂添加红霉素的 LB 板 42℃ 过夜培养后, 将菌落同时转接到添加红霉素的 LB 板和添加氯霉素的 LB 板, 30℃ 培养过夜并挑选红霉素抗性和氯霉素敏感 (Em<sup>r</sup> Cm<sup>s</sup>) 的菌株。因为质粒 pKSV7 在 42℃ 时不能复制, 故具有 Em<sup>r</sup> Cm<sup>s</sup> 表型的菌株应该是发生同源双交换, 且 *gerM* 基因得到破坏的菌株。进一步提取总 DNA 进行 PCR 验证。

### 1.4 萌发检测

苏云金芽孢杆菌芽孢的培养和收集方法参考文献 [21]。芽孢萌发的方法参考文献 [22]。芽孢于 70℃ 热击 30min 后, 重悬于 900 $\mu$ L 萌发缓冲液中 (10mmol/L Tris-Cl, 10mmol/L NaCl, pH7.0), 然后加入 100 $\mu$ L 1mol/L 的 L-丙氨酸或 50mmol/L 的次黄嘌呤核苷 (终浓度分别为 100mmol/L 和 5mmol/L) 进行萌发实验。通过跟踪 OD<sub>600</sub> 值的下降检测萌发, 同时利用相差显微镜观察芽孢萌发时折光性的变化。萌发的数据均经过多次重复并取平均值。

### 1.5 RNA 提取和转录分析

接种苏云金芽孢杆菌于 LB 培养基生长 3h 以及 CCY 培养基生长不同时间, 分别收集菌体并进行总 RNA 的提取。RNA 的提取方法参照 TRIzol reagent 使用说明。以 *gerM* 基因内部序列设计引物 P5: 5'

GTTGTGGTGCTACTGTGAG-3' 和 P6: 5'-TTAATGTAA GGTTCCTCT-3' 进行 RT-PCR。同时,根据已经全基因组测序完成的 *Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27* 在 16S rDNA 内部设计引物 P7: 5'-GGTAACCTGCCATAAGAC-3' 和 P8: 5'-ATTCCCTACTGCTGCCTC-3', 并进行 RT-PCR 作为阳性对照。本研究克隆的 *gerM* 基因的核酸序列已经提交到 GenBank 数据库, Accession number 为 DQ537381。

## 2 结果

### 2.1 *gerM* 基因的克隆和结构分析

苏云金芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌同属于蜡状芽孢杆菌组,三者亲缘关系很近<sup>[7]</sup>。分析已经完成的芽孢杆菌全基因组序列,发现 *gerM* 同源基因相当保守。依照蜡状芽孢杆菌 *gerM* 基因的保守序列设计引物,通过 PCR 扩增出一个 640bp 的 DNA 片段。以地高辛标记该片段作为探针,与经不同限制性酶切的苏云金芽孢杆菌总 DNA 进行杂交。Southern 杂交结果显示, *EcoR* I 酶切的总 DNA 在 4.5kb 处得到唯一的一条阳性信号带。因为 *gerM* 同源基因约 1kb, 故 4.5kb 的阳性信号适合用于构建部分基因组酶切文库。回收此 4.5kb 的混合片段并插入 pBluescript KS<sup>+</sup> 的 *EcoR* I 位点,将重组质粒转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  构建部分基因组酶切文库。通过菌落杂交,成功地克隆到了包含 *gerM* 基因的 DNA 片段。

对该 4.5kb 的 DNA 片段进行了序列测定。序列分析表明该片段内部含有一个 1050bp 的开放阅读框,推测编码 349 个氨基酸的蛋白。经 NCBI 蛋白序列比对分析,该产物与蜡状芽孢杆菌和炭疽芽孢

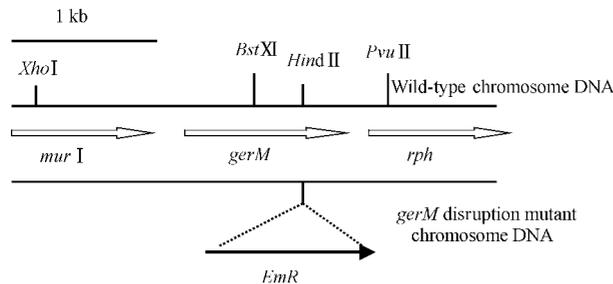


图1 苏云金芽孢杆菌染色体上 *gerM* 基因的位置及 *gerM* 基因阻断突变株的构建

Fig.1 The organization of the *gerM* gene in *B. thuringiensis*. The arrow shows *gerM* and its orientation. Drawing is to scale. The *gerM* gene was interrupted by an erythromycin-resistant cassette (*EmR*) in *gerM* disruption mutant chromosome DNA.

杆菌 *GerM* 同源蛋白的一致性高达 90% 以上,与枯草芽孢杆菌同源蛋白的一致性为 51%。将该基因命名为 *gerM*。*gerM* 基因距离它的上下游开放阅读框分别为 182bp 和 132bp (图 1)。推测它的上下游基因分别编码谷氨酸消旋酶 (*MurI*) 和核糖核酸酶 PH (*Rph*)。

### 2.2 *gerM* 基因在苏云金芽孢杆菌中的表达分析

因为芽孢在形成过程中折光性会改变,可通过相差显微镜进行观察。接种苏云金芽孢杆菌于 CCY 生孢培养基, 30°C 培养,可以观察到 8h 时营养细胞中间折光性开始有变化, 12h 时大部分细胞内可以看到暗的芽孢, 14h 时大部分细胞内的芽孢因为折光性增强而显得明亮(数据未显示)。为了分析 *gerM* 基因的表达情况,我们将苏云金芽孢杆菌野生株分别接种到 LB 培养基和 CCY 产孢培养基中于 30°C 进行培养, LB 培养基中生长 3h, CCY 培养基中生长 8h, 10h, 12h 和 14h 后分别提取总 RNA。使用引物 P5 和 P6 进行 RT-PCR,结果仅在 10h, 12h 和 14h 时扩增出 817bp 的目的带(图 2),其中 10h 时扩增出的带较弱。同时,以 16S rDNA 内部引物 P7 和 P8 进行 RT-PCR 作为阳性对照,结果在所有时间点均扩增出清晰的条带。以上结果表明, *gerM* 基因仅在芽孢形成的过程中表达。

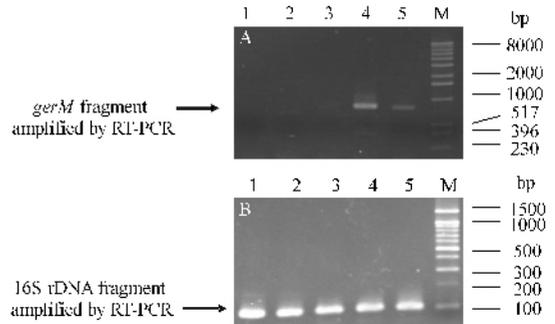


图2 苏云金芽孢杆菌 *gerM* 基因表达的 RT-PCR 电泳图

Fig.2 RT-PCR analysis of *gerM* expression in *B. thuringiensis*. The RT-PCR products of *gerM* mRNA (A) and 16S rDNA (B) with the specific primers are shown in 817bp and 249bp signal respectively. Lanes 1~5 show RNA extracted from cells grown in LB medium for 3h and in CCY medium for 8h, 10h, 12h and 14h, respectively.

### 2.3 *gerM* 基因的插入破坏对芽孢萌发的影响

为了研究 *gerM* 基因的功能,利用相差显微镜,我们对苏云金芽孢杆菌野生株和 *gerM* 基因阻断突变株的生长和产孢过程进行观察,结果表明: *gerM* 基因的破坏对苏云金芽孢杆菌的生长及芽孢的形成没有显著的影响。为了研究芽孢的萌发,我们同时检测了芽孢萌发时  $OD_{600}$  值的下降和折光性的变化。

37℃时,控制初始芽孢浓度( $OD_{600}$ 约为1.0),分别以100mmol/L L-丙氨酸和5mmol/L次黄嘌呤核苷诱导芽孢萌发。结果显示(图3),经过1h萌发,野生型芽孢 $OD_{600}$ 分别下降60%和20%左右,而 $gerM$ 基因阻断突变株芽孢的 $OD_{600}$ 分别仅下降40%和10%左右。这说明, $gerM$ 基因被破坏以后,芽孢虽然能萌发,但萌发速率降低。而且,利用相差显微镜观察也发现,萌发的比例降低。

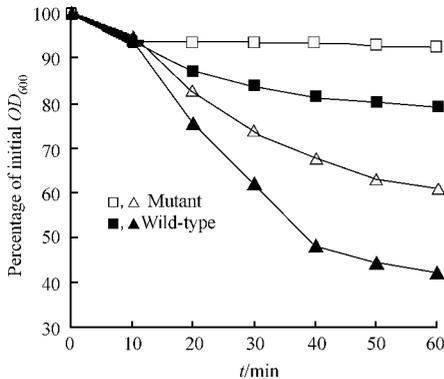


图3 100mmol/L L-丙氨酸和5mmol/L次黄嘌呤核苷分别诱导野生型及 $gerM$ 破坏株芽孢萌发

Fig. 3 100mmol/L L-alanine (■, □) and 5mmol/L inosine (▲, △) triggered germination of wild-type (closed symbol) and  $gerM$  disruption mutant (open symbol) spores.

### 3 讨论

芽孢的形成和萌发是一个受基因控制的复杂过程,是目前原核生物形态分化研究的热点之一。由于芽孢杆菌易于操作,细胞生长快且同步,群体中存在突变体,使其成为原核生物形态分化研究的最佳模式之一。经过多年的研究,尤其是近年来基因芯片技术的成熟和应用,已经发现有504个基因参与了芽孢的形成和萌发<sup>[6]</sup>,对其机制有了初步的了解。但其中很多基因的具体功能和分子作用机制均不是很清楚。

通过构建部分基因组酶切文库的方法,我们成功地从苏云金芽孢杆菌中克隆到了一个4.5kb的DNA片段,它包含完整的 $gerM$ 基因。通过NCBI的搜索分析表明, $gerM$ 基因仅存在于产芽孢的细菌中,是一个保守的基因。RT-PCR实验结果显示, $gerM$ 基因仅在芽孢形成过程中表达,同时,它的破坏影响芽孢萌发的速率和比例,但对芽孢形成的影响不大。以上结果表明: $gerM$ 基因与芽孢萌发是相关的。

通过对枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌中

$gerM$ 基因的研究,对其功能已经有了初步的了解。但利用转座子对枯草芽孢杆菌中的 $gerM$ 基因进行插入破坏后,发现它除了影响芽孢的萌发外,对芽孢的形成也有一定影响。出现这两种实验结果的差异,一种可能是芽孢杆菌种间的差异;另外,我们也不排除转座子插入后产生其它效应的可能性。关于 $gerM$ 基因对芽孢的作用方式和分子作用机制,还有待于更深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev*, 1993, **57** (1): 1-33.
- [2] Setlow P. Resistance of bacterial spores. In: *Bacterial Stress Responses*. Edited by Storz G, Hengge-Aronis R. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2000, 217-230.
- [3] Paidhungat M, Setlow P. Spore germination and outgrowth. In *Bacillus subtilis and its Relatives: From Genes to Cells*. Edited by Hoch JA, Losick R, Sonenshein AL. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2002, 537-548.
- [4] Patrick JP, David WH. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*, **7**(6): 579-586.
- [5] Setlow P. Spore germination. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6**(6): 550-556.
- [6] Stephanie TW, Barbara S, Erin MC, et al. The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biology*, 2006, **358** (1): 16-37.
- [7] 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.
- [8] Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62** (3): 775-806.
- [9] Thomas DJ, Morga JA, Whipp JM, et al. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (1): 330-338.
- [10] Thomas DJ, Morgan JA, Whipp JM, et al. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (1): 118-124.
- [11] Vilas-Boas LA, Vilas-Boas GF, Saridakis HO, et al. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, **31**(3): 255-259.
- [12] Somerville HJ, James CR. Association of the crystalline inclusion of *Bacillus thuringiensis* with the exosporium. *J Bacteriol*, 1970, **102** (2): 580-583.
- [13] Steichen CT, Kearney JF, Tumbough CL. Characterization of the exosporium basal layer protein BxpB of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*, 2005, **187** (17): 5868-5876.
- [14] Sammons RL, Slynn GM, Smith DA. Genetical and molecular studies on  $gerM$ , a new developmental locus of *Bacillus subtilis*.

- [ 15 ] Slynn GM , Sammons RL , Smith DA , *et al.* . Molecular genetical and phenotypical analysis of the *gerM* spore germination gene of *Bacillus subtilis* 168. *FEMS Microbiology Letters* , 1994 , **121** ( 3 ) : 315 – 320.
- [ 16 ] Stewart BT , Halvorson HO. Studies of the spores of aerobic bacteria. I. The occurrence of alanine racemase. *J Bacteriol* , 1953 , **65** ( 2 ) : 160 – 166.
- [ 17 ] Smith K , Youngman P. Use of new integrational vector to investigate compartment specific expression of the *Bacillus subtilis* SpoIIM gene. *Biochimie* , 1992 , **74** ( 7 – 8 ) : 705 – 711.
- [ 18 ] Yu J , Zhang Y , Pang Y , *et al.* . A replication origin of *Bacillus thuringiensis* . *Curr Microbiol* , 2000 , **40** ( 2 ) : 123 – 127.
- [ 19 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor , 1989.
- [ 20 ] Kim HS , Sherman D , Johnson F , *et al.* . Characterization of a major *Bacillus anthracis* spore coat protein and its role in spore inactivation. *J Bacteriol* , 2004 , **186** ( 8 ) : 2413 – 2417.
- [ 21 ] Clements MO , Moir A. The role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. *J Bacteriol* , 1998 , **180** ( 24 ) : 6729 – 6735.
- [ 22 ] Barlass PJ , Houston CW , Moir A. Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine : the roles of *gerL* and *gerQ* operons. *Microbiology* , 2002 , **148** ( 7 ) : 2089 – 2095.

## Cloning and characterization of *gerM* gene involved in germination in *Bacillus thuringiensis*

YAN Xiao-hua<sup>1,2</sup> , LIU Gang<sup>1\*</sup> , TAN Hua-rong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Center for Microbial Genetics and Metabolic Engineering , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

(<sup>2</sup> Graduate School of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China )

**Abstract** : In *Bacilli* , *gerM* is a very conservative gene. Primers were designed according to the *gerM* gene sequence of *Bacillus cereus* , and a 640bp DNA fragment was obtained from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kustaki* 1.175 by PCR. Using this fragment as a probe , a 4.5kb DNA fragment was cloned from the partial DNA library of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kustaki* 1.175. Sequence analysis showed that the fragment contains one complete open reading frame ( ORF ) that encodes a 349-amino acid ( aa ) protein , which has high homology with GerM protein from *Bacillus subtilis* . This gene was designated *gerM* ( GenBank Accession No. DQ537381 ). RT-PCR analysis showed that *gerM* gene was only expressed in the process of sporulation , suggesting *gerM* is not required for the vegetative growth. The function of the *gerM* gene was studied by a strategy of gene disruption , and the resulting *gerM* disruption mutant did show normal growth and sporulation. However , *gerM* disruption mutant spores germinate slower than wild-type spores when triggered by L-alanine or inosine , indicating that *gerM* is required for the spore normal germination initiated by L-alanine or inosine in *Bacillus thuringiensis* .

**Keywords** : *Bacillus thuringiensis* ; Partial DNA library ; *gerM* gene ; RT-PCR ; Spore germination

Foundation item : National Basic Research Program of China ( 2002CB513207 )

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62636851 ; Fax : 86-10-62654083 ; E-mail : liug@sun.im.ac.cn

Received : 12 May 2006 / Accepted : 13 June 2006 / Revised : 12 September 2006 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>