

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (9) :1144 - 1153; 4 September 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140618

## 苏云金芽胞杆菌 3-羟基丁酮代谢基因簇的转录调控

黄闽忠<sup>1,2</sup>, 彭琦<sup>2</sup>, 张杰<sup>2</sup>, 高继国<sup>1\*</sup>, 宋福平<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 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

**摘要:** 【目的】通过分析苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 3-羟基丁酮代谢基因簇 *aco* 的转录调控和 *acoR* 突变体的表型特征, 明确 *aco* 基因簇的转录调控机制和对芽胞产量及 Cry 蛋白产量的影响。【方法】通过生物信息学方法分析 *aco* 基因簇的结构, RT-PCR 分析基因簇的转录单元, 采用同源重组技术敲除苏云金芽胞杆菌 HD73 菌株的 *acoR* 基因, 利用启动子融合 *lacZ* 的方法分析启动子的转录活性。利用总蛋白定量确定 Cry1Ac 蛋白产量。【结果】*aco* 基因簇由 *acoABCL* 4 个基因组成, 形成一个转录单元。*aco* 基因簇的启动子 *PacoA* 转录活性在 *sigL* (编码 Sigma 54 因子) 和 *acoR* 突变体中均明显降低。*acoR* 基因的缺失对菌体生长和 Cry1Ac 蛋白产量无显著影响, 但使菌体运动能力减弱, 使芽胞产量略有下降, 并且不能利用 3-羟基丁酮。【结论】*aco* 操纵子受 Sigma 54 控制, 并由 AcoR 激活, *acoR* 基因的缺失影响菌体对 3-羟基丁酮的利用, 但对 Cry 蛋白产量无显著影响。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌, 3-羟基丁酮, *acoR*, Sigma 54

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 09-1144-10

细菌中 Sigma ( $\sigma$ ) 因子是识别启动子、与 RNA 聚合酶核心酶 (RNAP) 结合并起始转录的关键因子。通常一个细菌细胞中可能包括多种不同的  $\sigma$  因子, 根据识别位点和作用方式的不同, 主要分为两大类: 第一类是  $\sigma^{70}$  型, 主要识别启动子的 -35 / -10 区; 另一类是  $\sigma^{54}$  型, 与  $\sigma^{70}$  型的区别在于: (1) 它在不与 RNA 聚合酶核心酶结合的条件下可以直接与识别的 DNA 序列结合<sup>[1]</sup>; (2) 识别启动子上保守的 -24 / -12 区<sup>[2]</sup>; (3) 必须由增强子结合蛋白 (Enhancer Binding Proteins, EBPs) 对其激活才能起始转录<sup>[2]</sup>。EBPs 一般有 3 个典型的功能域: N 端信号感应功能域、中间 AAA + 功能域负责 ATPase 功

能及与  $\sigma^{54}$  因子结合、C 端 HTH 结构域负责与 DNA 结合<sup>[3]</sup>。 $\sigma^{54}$ -RNAP 和启动子形成闭合的转录复合物, 在一定的细胞信号作用下, EBPs 由双聚体的无活性状态变为六聚体的活化状态与  $\sigma^{54}$ -RNAP 和启动子复合物的  $\sigma^{54}$  作用, 通过 ATP 水解提供能量改变复合物构型, 从而起始转录<sup>[4]</sup>。 $\sigma^{54}$  参与微生物许多代谢途径的调控过程, 如枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的精氨酸降解途径<sup>[5]</sup>、异亮氨酸和缬氨酸降解途径<sup>[6]</sup>; 本实验室前期研究发现, 在苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 中,  $\sigma^{54}$  因子由 *sigL* 基因编码,  $\gamma$ -氨基丁酸代谢途径和赖氨酸代谢途径的转录受  $\sigma^{54}$  控制, 其中,  $\gamma$ -氨基

基金项目: 国家自然科学基金 (31270111, 31300085)

\* 通信作者。宋福平, Tel: +86-40-62896634, E-mail: fpson@ippeaas.cn; 高继国, Tel: +86-451-55190655, E-mail: gaogjguo1961@hotmail.com

作者简介: 黄闽忠 (1989 -), 男, 福建省莆田市人, 硕士研究生, 主要从事苏云金芽胞杆菌功能基因的研究。E-mail: minzhonghuang@126.com

收稿日期: 2014-12-29; 修回日期: 2015-01-30

丁酸代谢途径受 GabR 的调控<sup>[7]</sup>, 赖氨酸代谢途径受 KamR 的调控<sup>[8]</sup>。

3-羟基丁酮 (acetoin) 是许多微生物糖代谢的中间产物, 对微生物本身具有重要的生理意义: 如抵御环境的酸化、参与  $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2$  比率的调节和作为储存碳源等。微生物体内能够以丙酮酸为前体合成三羟基丁酮, 并且从 2, 3-丁二醇降解途径分解成丁二醇<sup>[9]</sup>, 但在枯草芽胞杆菌、富氧产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) 和肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 等微生物中<sup>[10-12]</sup>, 3-羟基丁酮是通过氧化裂解降解的, 即通过 *aco* 基因簇编码的 3-羟基丁酮脱氢酶系统降解成乙醛和乙酸。但是, 关于

*aco* 基因簇的转录调控报道较少, 仅在枯草芽胞杆菌<sup>[10]</sup> 和富氧产碱菌<sup>[11]</sup> 中有研究。

本文研究了苏云金芽胞杆菌 HD73 菌株中 *aco* 基因簇的组织结构及其调控方式, 发现 *aco* 基因簇的转录是由  $\sigma^{54}$  控制, 并由 AcoR 蛋白激活。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养基:** 所用菌株和质粒见表 1。 *E. coli* 的培养使用 LB 培养基, Bt 的培养分别使用 LB、SSM<sup>[13]</sup> 培养基。

表 1. 菌株与质粒

Table 1. Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
<b>Strain</b>		
<i>E. coli</i> TG1	$\Delta(lac-proAB) supE thi hsd-5 (F' traD36 proA^+ proB^+ lacI^N lacZ\Delta M15)$ , general purpose cloning host	This lab
<i>E. coli</i> ET	$F-dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202::Tn10 galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-$	This lab
HD73	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> carrying the <i>cry1Ac</i> gene	This lab
HD ( $\Delta acoR$ )	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>acoR</i> gene insertion mutant; Kan <sup>R</sup>	This study
HD ( $\Delta sigL$ )	<i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>sigL</i> gene deletion mutant; Kan <sup>R</sup>	This lab
HD ( <i>PacoA</i> )	HD73 strain containing plasmid pHTPacoA	This lab
$\Delta sigL$ ( <i>PacoA</i> )	HD ( $\Delta sigL$ ) strain containing plasmid pHTPacoA	This lab
$\Delta acoR$ ( <i>PacoA</i> )	HD ( $\Delta bkdR$ ) strain containing plasmid pHTPacoA	This lab
$\Delta acoR$ ( <i>acoR-PacoA</i> )	$\Delta acoR$ ( <i>PacoA</i> ) strain containing plasmid pHTPacoA	This study
<b>Plasmids</b>		
pMAD	Ap <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> shuttle vector, thermosensitive origin of replication	Institute Pasteur
pHT1618	Ap <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>E. coli-B. thuringiensis</i> shuttle vector	Dr. Didier Lereclus
pMAD $\Delta bkdR$	pMAD with <i>bkdR</i> insetion fragment	This study
pHTPacoR	pHT1618 with <i>acoR</i> gene and its promoter fragment	This study
pHTPacoA	pHT304-18Z carrying promoter upstream from <i>acoA</i>	This lab

**1.1.2 主要仪器和材料:** *Taq* DNA 聚合酶购自康润生物技术公司; 限制性内切酶、PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶均购自于宝生物工程 (大连) 有限公司, 质粒提取、DNA 回收和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen 公司。

**1.1.3 引物合成及序列测定:** 根据 Bt HD73 基因组<sup>[14]</sup> 序列设计引物, 引物合成由生工生物工程公司北京合成部完成, 序列测定由北京六合华大基因科技股份有限公司完成, 引物名称及序列见表 2。

### 1.2 细菌培养条件及 DNA 操作

Bt 在 30 °C、220 r/min 条件下培养, 突变体筛选条件为 38 °C、180 r/min; *E. coli* 在 37 °C、220 r/min

条件下培养, 氨苄霉素使用终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 红霉素的使用终浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 卡那霉素使用终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。大肠杆菌质粒提取, DNA 片段的纯化参见试剂盒的说明。苏云金芽胞杆菌电击转化见参考文献 [15]。

### 1.3 RT-PCR

HD73 菌株在 SSM 中培养至  $T_7$  时期 ( $T_0$  为对数期结束的时期,  $T_n$  为  $T_0$  后的  $n$  小时), 取菌液 2 mL 低温离心弃上清, 沉淀立即用预冷的 TRIzol 重悬, RNA 提取参照 Qiagen Easy RNA kit 说明。RNA 纯化后电泳检测, -70 °C 保存备用。以纯化后的 RNA 为模板合成 cDNA。RT-PCR 所用引物见表 2。

表 2. 引物序列

Table 2. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
acoRA-F	CGGGATCCATTAGAAGTGACGAGAGGCATA
acoRA-R	CACCTCAAATGGTTCGCTGTGCCACGATTCTGAAATTCT
acoRB-F	GAGCGCTACGAGGAATTTACAGCGTGATAGCATGATTG
acoRB-R	CGGAATTCACGACACTTTTTCTTTATTTCAG
Km-F	AGAATTCAGAAATCGTGGCACAGCGAACCATTGAGGTG
Km-R	CAATCATGCTATCACGCTGTAAATTCCTCGTAGGCGCTC
acoR-F	TCAATCACACGAACTTACCT
acoR-R	TGTTCCATGAGTGACTAACC
CacoR-F	AACTGCAG GGTAATCCACAAAAAGTGG
CacoR-R	ACGCGTCGAC TTATAACTTATATTTTTGTC
Paco-F	CCAAGCTTAAGCTTTCTGAAAACCGAAT
Paco-R	CGGGATCCGTTTCAGCCCTCCTATTTTCTTG
RT-1F	ACGATCCCAGTTGCTATATTCCA
RT-1R	GTTTTTCCCGTAATTCATCGAAAG
RT-2F	ATTGGCCAAATTTTACATCCG
RT-2R	TCATACATCCAACGAGCTTGTTTC
RT-3F	GCTTCAAAGTTGTGATTCTATTGCC
RT-3R	TGTTTTATATGTTTGGCGTTCACC
RT-4F	CGTAATGGTGATGGTCCAACA
RT-4R	CTTCATCCTCTGGGTATGGACT
RT-5F	AGTGAAAATAGTCCATACCCAGACGA
RT-5R	GTATCCAATATACGATTTCCGGCC
RT-6F	ACTGGGTTACCTCCGATAGCT
RT-6R	GAAGATTACCGGGTCTGTCATC
RT-7F	AATTGAAGCGCCAGCTGATG
RT-7R	GGACCTGTACCAACTAATGCCTTG
RT-8F	ACTAGACGGTGCACCAGCAG
RT-8R	CAATGTCATGCACTTCTGCAC
RT-9F	TATTGATGAAGCTGACCTTGGC
RT-9R	CACACGATGATCCGTTTCG

#### 1.4 *acoR* 突变体的构建筛选

为了研究 *AcoR* 对 *aco* 基因簇的转录调控,利用同源重组的原理,构建了 *acoR* 突变体,方法见参考文献 [16]。简述如下:根据 Bt HD73 全基因组序列中 *acoR* 基因上下游序列设计引物,以 Bt HD73 基因组为模板,用引物 *acoRA-F/acoRA-R* 扩增 *acoR* 基因上游片段 (*acoRA*),大小为 543 bp;用引物 *acoRB-F/acoRB-R* 扩增 *acoR* 基因下游片段 (*acoRB*),大小为 490 bp。以 pDG780 质粒为模板,用引物 *km-F/km-R* 扩增卡那抗性基因 (*kan*),大小为 1513 bp。以 *acoRA*、*acoRB* 和 *kan* 为模板,用引物 *acoRA-F/acoRB-R* 通过重叠 PCR 扩增含有卡那抗性基因的 *acoR* 缺失突变盒,经限制性内切酶 *BamH I* 和 *EcoR I* 双酶切后,用 T4 DNA 连接酶连接到温敏穿梭载体

pMAD,热激转化至大肠杆菌 TG1 菌株中,获得重组质粒命名为 pMAD $\Delta$ *acoR*。将重组质粒转入 ET 去甲基化,再电击转入 HD73 进行 38 °C 高温突变,筛选出有卡那霉素抗性并且没有红霉素抗性的菌株。用突变盒外侧引物 *acoR-F/acoR-R*,以野生型菌株 HD73 和有卡那霉素抗性并且无红霉素抗性的菌株进行 PCR 鉴定,获得的突变菌株命名为 HD ( $\Delta$ *acoR*)。

#### 1.5 *acoR* 突变体互补菌株的构建

以 Bt HD73 基因组为模板,用引物 *CacoR-F/CacoR-R* 扩增 *acoR* 基因及其上游启动子片段,大小为 2066 bp,经限制性内切酶 *Pst I* 和 *Sal I* 双酶切后,用 T4 DNA 连接酶连接到 *E. coli-Bt* 穿梭表达载体 pHT1618,热激转化至大肠杆菌 TG1 菌株中,获

得重组质粒命名为 pHTacoR。将重组质粒转入 ET 去甲基化,再电击转入  $\Delta$ acoR (PacoA) 菌株,筛选同时具有红霉素和四环素抗性的菌株。用载体引物进行 PCR 鉴定,获得互补菌株  $\Delta$ acoR (acoR-PacoA),该菌株的特点是在  $\Delta$ acoR 突变菌株中同时含有互补质粒 pHTacoR 和 *acoA* 启动子融合 *lacZ* 基因的质粒 pHTPacoA。

### 1.6 生长曲线测定

将 Bt 菌株分别接种于 LB 和 SSM 培养基中,30 °C、220 r/min 培养。每 1 h 取样,用分光光度计测定在 600 nm 波长下的吸光值  $OD_{600}$ ,每组数据至少独立重复 3 次。

### 1.7 运动能力测定

Bt 菌株活化过夜,1% 转接至 50 mL LB 培养基,30 °C、220 r/min 培养至  $OD_{600} = 1.0$  时,取 5  $\mu$ L 菌液点在 0.3% 固体 LB 平板中央,30 °C 培养过夜<sup>[17]</sup>。

### 1.8 芽胞形成率

Bt 菌株在芽胞形成培养基 SSM 中,30 °C、220 r/min 培养至  $T_1$  时期 ( $T_0$  为对数期结束的时期,  $T_n$  为  $T_0$  后的 n 小时),取适量菌液梯度稀释涂于 LB 固体培养基,30 °C 培养 10 h,对 LB 固体培养基上的菌落进行计数,数值记为 A。Bt 菌株继续在 SSM 中培养,镜检观察,待 90% 左右菌体释放芽胞时,取 10 mL 菌液 65 °C 热处理 25 min 后,梯度稀释涂于 LB 固体培养基,30 °C 培养 10 h,对 LB 固体培养基上的菌落进行计数,数值记为 B,芽胞形成率 = (B / A) \* 100%<sup>[18]</sup>。

### 1.9 Cry1Ac 蛋白产量测定

Bt 菌株在 LB 培养基中培养至  $T_{40}$ ,取样 2 mL,离心弃上清,沉淀中加入 50 mmol/L Tris-HCl,机械振荡破碎 100 s 后,加上样缓冲液,沸水浴 10 min,离心取上清液,利用 Pierce  $\square$ 660 nm Protein Assay Kit 试剂盒测定蛋白的浓度,取相同总蛋白量的样品进行 SDS-PAGE 电泳。

### 1.10 $\beta$ -半乳糖苷酶活分析

Bt 菌株过夜活化,1% 转接至 50 mL SSM 培养基,30 °C、220 r/min 振荡培养,从  $T_0$  取样至  $T_8$ ,每小时取样 1 次,每次取样 2 mL,离心弃上清,沉淀于 -40 °C 保存, $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定见参考文献 [7],每组数据至少独立重复 3 次。

### 1.11 三羟基丁酮含量测定

Bt 菌株过夜活化,1% 转接至 50 mL SSM 培养基,30 °C、220 r/min 振荡培养,在  $OD_{600} = 1.0$  时(记为 A0)加入三羟基丁酮,之后每 45 min 取样 1 次,每次取样 2 mL,离心收集上清,于 -20 °C 保存,三羟基丁酮含量测定见参考文献 [19],每组数据至少独立重复 3 次。

## 2 结果和分析

### 2.1 *aco* 基因簇的序列分析和 RT-PCR 分析

对 Bt HD73 基因组 (cp004069) 分析发现, *aco* 基因簇由 5 个基因组成 (HD73\_3213 - 3217),但经过对 *aco* 基因簇重新测序发现,HD73\_3213 和 HD73\_3214 实际为一个 *orf*,因此确定 *aco* 基因簇由 4 个基因组成(图 1-A),编码的蛋白产物分别是:TPP 依赖性 3-羟基丁酮脱氢酶 E1 的  $\alpha$  亚基 (TPP-dependent acetoin dehydrogenase E1 alpha-subunit, *acoA*, HD73\_3213 - 3214),TPP 依赖性 3-羟基丁酮脱氢酶 E1 的  $\beta$  亚基 (TPP-dependent acetoin dehydrogenase E1 beta-subunit, *acoB*, HD73\_3215),2-氢脂赖氨酸残基酰基转移酶 (Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of acetoin cleaving system, *acoC*, HD73\_3216),2-氢硫辛酸脱氢酶 (Dihydrolipoyl dehydrogenase, *acoL*, HD73\_3217)。

*acoA* 到 *acoL* 之间转录方向相同。*acoA* 基因起始密码子上游序列 TGGCACGGTACTTGCAA 具有 -12/-24 保守序列 (BYGGCMYRNNNYGCW) 特征<sup>[20]</sup>。*aco* 基因簇下游第 11 个 *orf* 位置,是 *acoR* 基因 (Sigma 54-dependent transcriptional regulator, HD73\_3228)。通过氨基酸保守结构域分析,发现 AcoR 蛋白含有 3 个典型的 EBPs 保守结构域:识别信号相关的 GAF 结构域、与 Sigma 54 互作的 AAA<sup>+</sup> 结构域和与 DNA 结合的 HTH 结构域。这说明 AcoR 是依赖于 Sigma 54 的转录调控蛋白。

根据 Bt 菌株 HD73 全基因组序列信息,在基因内部以及基因之间设计了多对引物,将 SSM 培养基中 HD73 菌株  $T_7$  时期提取并纯化的总 RNA 反转录成 cDNA,再分别扩增 1 - 9 个片段,核酸电泳(图 1-B)结果表明除了 6 片段得不到扩增产物外,其余均能得到扩增产物,说明 HD73\_3212 基因与下游的 *acoA* 基因不共转录,而 *acoA* 基因到 *acoL* 基因组成一个转录单元。

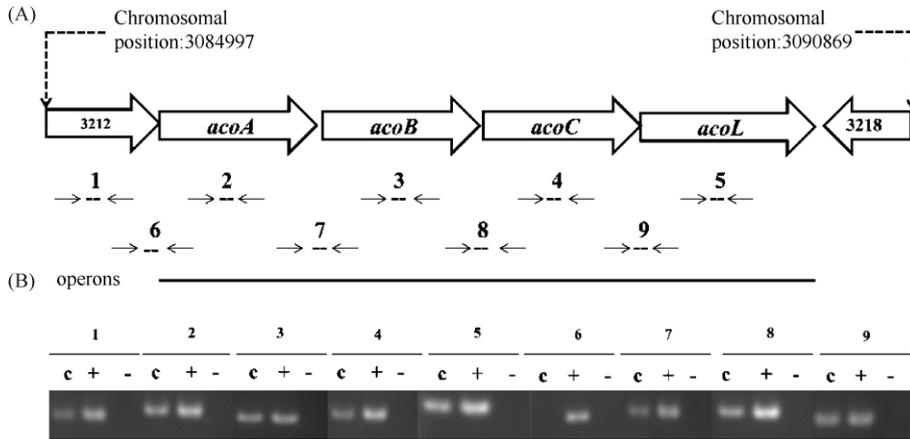


图 1. Bt HD73 中 *aco* 基因簇结构分析

Figure 1. Analysis of the *aco* cluster structure in Bt HD73. A: Organization of the *aco* locus in *B. thuringiensis* HD73. B: RT-PCR analysis of the transcription of *aco* locus in *B. thuringiensis* strain HD73. “c” were performed with RNA. The positive controls are labeled “+” (PCR with genomic DNA). The negative controls are labeled “-”. RT-PCR with 500 ng of RNA with heat-inactivated reverse transcriptase.

## 2.2 *acoR* 基因簇转录调控分析

根据 HD73 的全基因组序列,设计引物 Paco-F 和 Paco-R,PCR 扩增 *acoA* 基因上游 537 bp 片段(包含保守结合位点 -12/-24 序列),与 *lacZ* 融合,获得重组载体 pHTPaco,分别电击转入 HD73 野生型、HD( $\Delta sigL$ ) 和 HD( $\Delta acoR$ ) 菌株,获得相应菌株命名为:HD(Paco), $\Delta sigL$ (Paco) 和  $\Delta acoR$ (Paco)。 $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定结果表明(图 2),在 HD73 野生型菌株中,*acoA* 基因的启动子从  $T_2$  开始有活性,在  $T_5$  时期活性最高。而在  $\Delta sigL$  和  $\Delta acoR$  中,*acoA* 基因的启动子活性明显降低,在 *acoR* 突变体的互补菌株中,*acoA* 基因的转录得到了恢复,并明显高于 HD73 野生菌株中的活性,这说明 *acoA* 基因的转录受 Sigma 54 的控制,并受 AcoR 的激活,而 RT-PCR 结果表明:*aco* 基因簇中的 *acoA-acoL* 4 个基因共转录形成一个操纵子结构,这说明 *acoA-acoL* 操纵子的转录是受 Sigma 54 的控制,并受 AcoR 的激活。

## 2.3 *acoR* 突变体的表型分析

生长曲线测定实验表明(图 3-A):无论是在营养丰富的 LB 培养基,还是在营养贫瘠的 SSM 培养基,*acoR* 基因的缺失对菌体生长均无明显影响。运动能力分析表明(图 3-B),与 HD73 野生型 [(5.6 ± 0.6) cm] 相比,相同菌量、培养相同时间的 HD( $\Delta acoR$ ) [(2 ± 0.2) cm] 的运动能力明显下降,说明 *acoR* 基因的缺失影响了菌体的运动能力。芽胞形成率实验表明(图 3-C),HD( $\Delta acoR$ ) 芽胞形成率与野生型相比,突变体的芽胞形成率略有降低,

说明 *acoR* 基因的缺失影响了芽胞形成率。将 HD73 和 HD( $\Delta acoR$ ) 在 LB 培养基中培养至  $T_{40}$ ,收集菌体,分析蛋白产量。在总蛋白量相同的条件下,与 HD73 野生型相比,*acoR* 突变体的 Cry1Ac 蛋白产量无明显变化(图 3-D),说明 AcoR 调控的代谢途径对 Cry 蛋白产量无显著影响。3-羟基丁酮利用实验表明(图 3-E),HD73 野生型菌株中,随着菌体的生长,加入到 SSM 培养基中的 3-羟基丁酮的含量逐渐降低;而 HD( $\Delta acoR$ ) 和 HD( $\Delta sigL$ ) 菌株生长的培养基中,3-羟基丁酮的含量基本保持不变。说明 HD73 野生型菌株可以利用 3-羟基丁酮,而突变菌株不能利用,表明 3-羟基丁酮代谢途径受 AcoR 调控,并受 Sigma 54 控制。

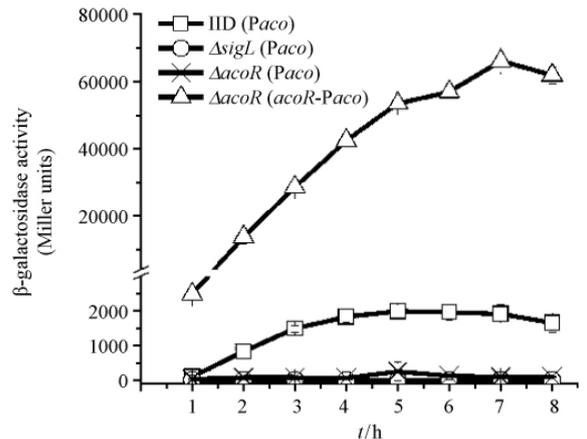


图 2. AcoR 对 *acoA* 启动子的转录调控

Figure 2. Transcriptional regulation of the *acoA* gene mediated by AcoR.

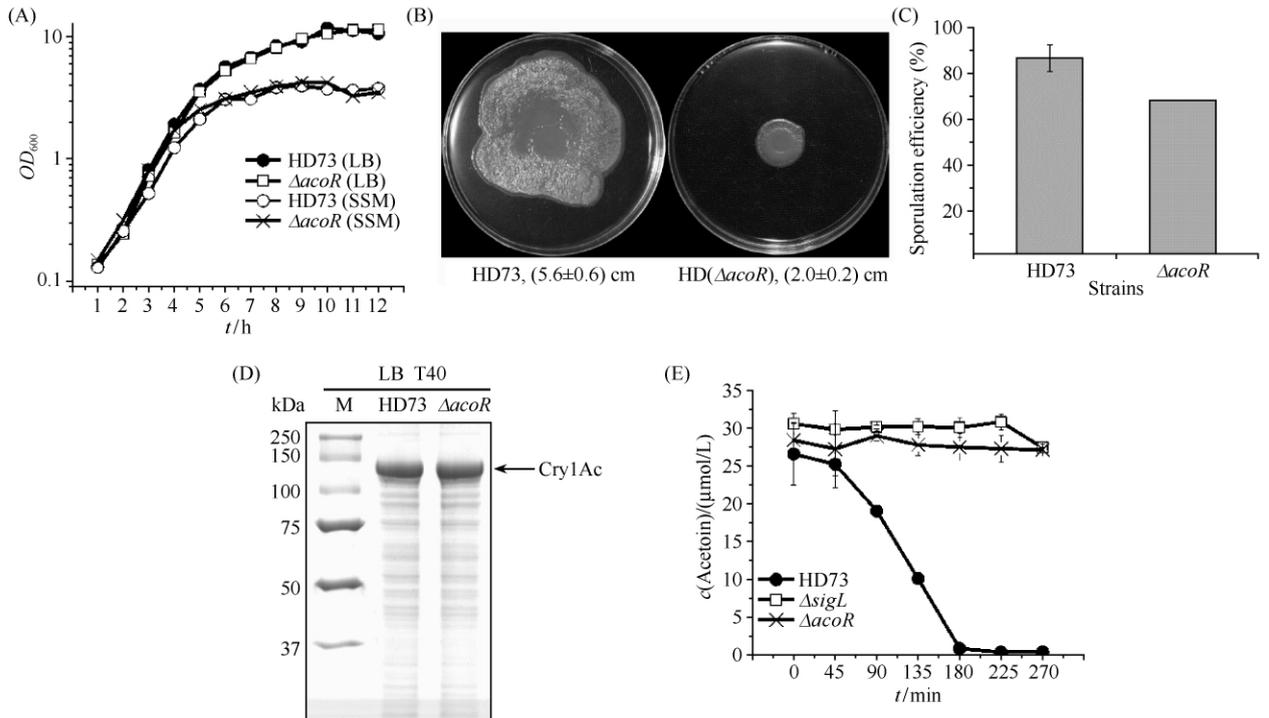


图 3. 生长曲线、运动能力、芽胞形成率、Cry1Ac 蛋白产量和 3-羟基丁酮利用分析

Figure 3. The growth curve, motility, sporulation efficiency, Cry1Ac protein production and acetoin assay. A: Grow curve of wild-type strain HD73 (●, ○) and  $\Delta acoR$  mutant (□, ×) in LB and SSM medium respectively. B: Motility analysis of wild-type strain HD73 and  $\Delta acoR$  mutant. C: Sporulation efficiency of wild-type strain HD73 and  $\Delta acoR$  mutant. D: Comparing of Cry1Ac protein production of wild-type strain HD73 and  $\Delta acoR$  mutant. The samples were collected at  $T_{40}$  in LB medium. M indicated the protein marker. E: Acetoin assay of wild-type strain HD73 (●),  $\Delta acoR$  (×) and  $\Delta sigL$  (□) mutants.

### 3 讨论

苏云金芽胞杆菌是昆虫病原菌,它与人类病原菌炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、机会致病菌蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)同属于蜡样芽胞杆菌族。本研究发现 Bt HD73 中 *aco* 基因簇是由 *acoA*、*acoB*、*acoC* 和 *acoL* 4 个基因组成,形成一个转录单元,受 Sigma 54 因子控制,并受 AcoR 的正调控。在基因组织结构上,*aco* 基因簇与 *acoR* 调控基因间隔 10 个 *orf* 的距离。这种特点与 Bc 族的其它菌株相似(图 4),如在 *Bacillus anthracis* Ames 和 *Bacillus cereus* ATCC 14579 菌株中,3-羟基丁酮脱氢酶系统都是由 *aco* 基因簇组成的,并且 *acoR* 调控基因与 *aco* 基因簇之间分别间隔了 8 个或 10 个 *orf* 的距离。*aco* 基因簇的启动子具有受 Sigma 54 控制的 -12/-24 的特点,并在 Bc 族中是十分保守的(图 5),说明 Bc 族中的 *aco* 基因簇的转录调控机制可能

是一致的,功能也可能相同。

在 *Bacillus subtilis* 168 中 3-羟基丁酮脱氢酶系统是由 *acoA*、*acoB*、*acoC* 和 *acoL* 4 个基因编码的,*aco* 基因簇和 *acoR* 调控基因是成簇排列的,这与 *B. cereus* 族中 *aco* 基因簇和 *acoR* 基因位置结构上差距较大(图 4)。但 *aco* 操纵子的调控模式在 *B. cereus* 族菌株和 *B. subtilis* 中相似,都是由 Sigma 54 控制,并由 AcoR 调控。并且 *B. thuringiensis* 中 *acoR* 的缺失使菌株丧失利用 3-羟基丁酮的能力,与 *B. subtilis* 中 *acoR* 突变体的表型相似<sup>[10]</sup>。说明 *aco* 基因簇在 *B. cereus* 族和 *B. subtilis* 中的功能相似。

Bt HD73 中 *aco* 基因簇与 *acoR* 调控基因间隔 10 个 *orf* 的距离(HD73\_3218 - 3227),根据基因组注释,其中的 5 个 *orf* 编码未知功能蛋白(HD73\_3218, 3219, 3222, 3226, 3227),2 个 *orf* 编码转录调控因子(HD73\_3220, 3223),2 个 *orf* 编码乙酰转移酶(Acetyltransferase, HD73\_3224 - 3225),1 个 *orf* 编码甲基转移酶(Methyltransferase, HD73\_3221)。

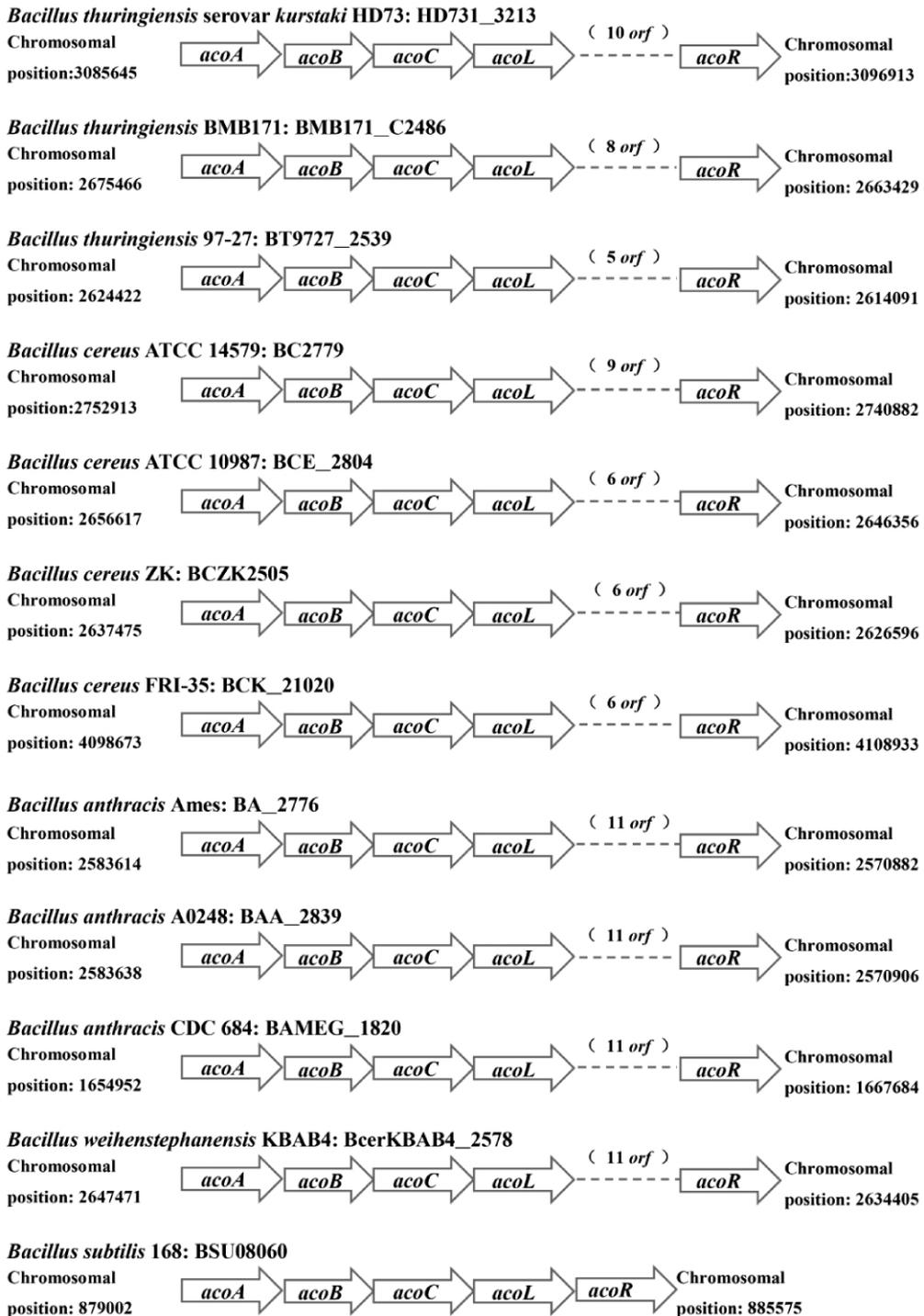


图 4. 不同菌株中 *aco* 基因簇的组成结构

Figure 4. The organization of the *aco* gene cluster in different strains.

*aco* 基因簇编码的 3-羟基丁酮脱氢酶系统 (AoDHES) 使 3-羟基丁酮降解为乙醛和乙酰辅酶 A<sup>[21]</sup>, 但 HD73\_3224-3225 和 HD73\_3221 编码的乙酰转移酶和甲基转移酶是否在该过程中起作用还有待进一步研究。

本研究发现, *acoR* 基因的缺失对 Cry 蛋白的产量均无明显影响, 而 *sigL* 基因的缺失对 Cry 蛋白的产量具有明显的影响 (未发表), 说明这种变化不是由 AcoR 调控的代谢途径而引起的。在 Bt HD73 全基因组中已经发现 8 种 EBPs, 其中 GabR 调控的  $\gamma$ -

Consensus	TTGGCACNNNNNTTGCW
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> HD73	TTGGCACGGTACTTGC
<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171	TTGGCACGGTACTTGC
<i>Bacillus thuringiensis</i> 97-27	TTGGCACGGTACTTGC
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	TTGGCACGGTACTTGC
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	TTGGCACAGTACTTGC
<i>Bacillus cereus</i> E33L	TTGGCACGGTACTTGC
<i>Bacillus cereus</i> FRI-35	TTGGCACGGTACTTGT
<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	TTGGCACAGTACTTGC
<i>Bacillus anthracis</i> A0248	TTGGCACAGTACTTGC
<i>Bacillus anthracis</i> CDC 684	TTGGCACAGTACTTGC
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	TTGGCACAGTACTTGC

图 5. 不同菌株 *acoA* 基因启动子 -12/-24 序列Figure 5. The -12/-24 sequence of *acoA* promoter in different strains.

氨基丁酸代谢途径、SoxR 调控的肌氨酸代谢途径 (未发表) 和 BkdR 调控的缬氨酸和异亮氨酸分解代谢途径的阻断对 Cry 蛋白的产量无影响<sup>[22-23]</sup>, 本研究中 AcoR 的缺失亦是如此, 这说明 Sigma 54 对 Cry 蛋白产量的影响可能不是仅通过一个 EBP 调控的代谢途径引起的, 而是通过多种代谢途径共同作用的结果。

微生物在以葡萄糖为碳源的培养基中会分泌大量的有机化合物, 如丙酮酸, 琥珀酸盐, 乙酸盐和三羟基丁酮等。在指数生长期会将丙酮酸转化为三羟基丁酮, 可以避免培养基的过度酸化, 维持培养基 pH 的稳定, 避免菌体过早死亡。同时在葡萄糖等碳源利用完之后, 三羟基丁酮可以作为碳储存化合物被重新利用<sup>[10]</sup>。苏云金芽胞杆菌在生长后期会开始形成芽胞, 本研究中发现, *acoR* 的缺失影响了芽胞产量, 可能是因为 *acoR* 的缺失阻断了 3-羟基丁酮的利用, 而使菌体在生长的后期无法利用其作为碳存储化合物, 生长受到影响从而降低了芽胞产量。本研究发现阻断了 *acoR* 基因使菌体的运动能力下降, 可能是因为 3-羟基丁酮降解途径的阻断, 影响到其合成途径中酶的功能, 引起多效反应<sup>[21]</sup>, 如 3-羟基丁酮代谢途径与细胞凋亡及细胞溶解相关<sup>[22]</sup>, 3-羟基丁酮降解途径的阻断影响到细胞壁水解酶的活性, 导致细胞膜的流动性减弱, 从而引起运动能力降低。

## 参考文献

[1] Cannon W, Claverie-Martin F, Austin S, Buck M. Core RNA polymerase assists binding of the transcription factor sigma 54 to promoter DNA. *Molecular Microbiology*,

1993, 8 (2): 287-298.

- [2] Bush M, Dixon R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of sigma54-dependent transcription. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 2012, 76 (3) : 497-529.
- [3] Shingler V. Signal sensory systems that impact sigma54 - dependent transcription. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35 (3) : 425-440.
- [4] Rappas M, Schumacher J, Beuron F, Niwa H, Bordes P, Wigneshweraraj S, Keetch CA, Robinson CV, Buck M, Zhang X. Structural insights into the activity of enhancer-binding proteins. *Science*, 2005, 307 ( 5717 ) : 1972-1975.
- [5] Calogero S, Gardan R, Glaser P, Schweizer J, Rapoport G, Debarbouille M. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176 (5) : 1234-1241.
- [6] Debarbouille M, Gardan R, Arnaud M, Rapoport G. Role of bkdR, a transcriptional activator of the *sigL*-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (7) : 2059-2066.
- [7] Zhu L, Peng Q, Song F, Jiang Y, Sun C, Zhang J, Huang D. Structure and regulation of the *gab* gene cluster, involved in the gamma-aminobutyric acid shunt, are controlled by a sigma54 factor in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (1) : 346-355.
- [8] Zhang Z, Yang M, Peng Q, Wang G, Zheng Q, Zhang J, Song F. Transcription of the *lysine-2, 3-aminomutase* gene in the *kam* locus of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 is controlled by both sigma54 and sigmaK

- Factors. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196 (16): 2934-2943.
- [9] Romano P, Suzzi G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 309-315.
- [10] Ali NO, Bignon J, Rapoport G, Debarbouille M. Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by sigma L in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (8): 2497-2504.
- [11] Kruger N, Steinbüchel A. Identification of *acoR*, a regulatory gene for the expression of genes essential for acetoin catabolism in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174 (13): 4391-4400.
- [12] Peng H, Yang Y, Deng W, Chang H. Identification and characterization of *acoK*, a regulatory gene of the *Klebsiella pneumoniae acoABCD* operon. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (5): 1497-1504.
- [13] Schaeffer P, Millet J, Aubert JP. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1965, 54 (3): 704-711.
- [14] Liu G, Song L, Shu C, Wang P, Deng C, Peng Q, Lereclus D, Wang X, Huang D, Zhang J, Song F. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. *Genome Announcements*, 2013, 1 (2): e0008013.
- [15] Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, Lecadet M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 51 (1): 211-217.
- [16] Du L, Qiu L, Peng Q, Lereclus D, Zhang J, Song F, Huang D. Identification of the promoter in the intergenic region between *orf1* and *cry8Ea1* controlled by sigma H factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (12): 4164-4168.
- [17] Calvio C, Celandroni F, Ghelardi E, Amati G, Salvetti S, Cecilian F, Galizzi A, Senesi S. Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (15): 5356-5366.
- [18] Yang J, Peng Q, Chen Z, Deng C, Shu C, Zhang J, Huang D, Song F. Transcriptional regulation and characteristics of a novel N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase gene involved in *Bacillus thuringiensis* mother cell lysis. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195 (12): 2887-2897.
- [19] Grundy FJ, Waters DA, Takova TY, Henkin TM. Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 1993, 10 (2): 259-271.
- [20] Francke C, Groot Kormelink T, Hagemeyer Y, Overmars L, Sluijter V, Moezelaar R, Siezen RJ. Comparative analyses imply that the enigmatic Sigma factor 54 is a central controller of the bacterial exterior. *BMC Genomics*, 2011, 12: 385.
- [21] Xiao Z, Xu P. Acetoin metabolism in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2007, 33 (2): 127-140.
- [22] Wang W, Gao JG, Zhu L, Peng Q, Shu CL, Zhang J, Huang DF, Song FP. Effect of GABA shunt disruption on sporulation and crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2012, 43 (7): 119-123. (in Chinese)  
王维, 高继国, 朱莉, 彭琦, 束长龙, 张杰, 黄大昉, 宋福平.  $\gamma$ -氨基丁酸代谢旁路阻断对苏云金芽胞杆菌芽胞形成和晶体蛋白产量的影响. 东北农业大学学报, 2012, 43 (7): 119-123.
- [23] Wang GN, Peng Q, Zheng QY, Li J, Zhang J, Song FP. Transcriptional regulation of *bkd* gene cluster in *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54 (10): 1129-1137. (in Chinese)  
王冠男, 彭琦, 郑庆云, 李杰, 张杰, 宋福平. 苏云金芽胞杆菌 *bkd* 基因簇的转录调控. 微生物学报, 2014, 54 (10): 1129-1137.
- [24] Yang SJ, Dunman PM, Projan SJ, Bayles KW. Characterization of the *Staphylococcus aureus* CidR regulon: elucidation of a novel role for acetoin metabolism in cell death and lysis. *Molecular Microbiology*, 2006, 60 (2): 458-468.

# Transcriptional regulation of *aco* gene cluster in *Bacillus thuringiensis*

Minzhong Huang<sup>1,2</sup>, Qi Peng<sup>2</sup>, Jie Zhang<sup>2</sup>, Jiguo Gao<sup>1\*</sup>, Fuping Song<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, 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

**Abstract:** [Objective] We analyzed the transcriptional regulation of *aco* gene cluster and the phenotype of *acoR* mutant, to determine the effect of *acoR* deletion on sporulation efficiency and Cry protein production. [Methods] Sequence of *aco* gene cluster in *Bacillus thuringiensis* was analyzed by sequence alignment. RT-PCR was carried out to reveal the transcriptional units of the *aco* gene cluster. *acoR* insertion mutant was constructed by homologous recombination. Transcriptional activity was analyzed by promoter fusions with *lacZ* gene. Comparison of the Cry1Ac protein production was determined by protein quantitation. [Results] The *aco* gene cluster was composed of four genes. The *acoABCL* formed one transcriptional unit. The transcriptional activity of *acoA* promoter sharply decreased in *sigL* and *acoR* mutants, respectively. Deletion of *acoR* had no effect on growth and Cry protein production, but decreased the motility of cells and sporulation efficiency. [Conclusion] The *aco* gene cluster is controlled by Sigma 54 and activated by AcoR. Deletion of *acoR* has no effect on Cry protein production, but decreased the motility of the cells.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, EBPs, *acoR*, Sigma 54

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270111, 31300085)

\* Corresponding author. Fuping Song, Tel: + 86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn; Jiguo Gao, Tel: + 86-451-55190655, E-mail: gaojiguo1961@hotmail.com

Received: 29 December 2014 / Revised: 30 January 2015