

PlcR 在炭疽芽胞杆菌 A16R 中的功能研究

贾晓琳^{1,2}, 王东澍², 高志奇², 冯尔玲², 郑继平^{1,3}, 王恒², 郭桂英¹, 刘先凯²

1. 海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228;
2. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071;
3. 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 省部共建国家重点实验培育基地; 海口 570228

摘要: 炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、蜡样芽胞杆菌(*B. cereus*)和苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*)均属于蜡样芽胞杆菌群, 在遗传学上有很高的相似性。PlcR (Phospholipase C regulator)在蜡样芽胞杆菌中是十分重要的调控因子, 但 *plcR* 基因在炭疽芽胞杆菌中发生一个无义突变导致在炭疽芽胞杆菌中产生一个截短 PlcR 蛋白。为了研究 *plcR* 基因对炭疽芽胞杆菌功能的影响, 文章以蜡样芽胞杆菌 CMCC6330 基因组为模板, 构建重组表达质粒 pBE2A-*plcR* 后导入炭疽芽胞杆菌疫苗株 A16R 中获得重组菌株, 对其进行表型分析。结果显示, 炭疽芽胞杆菌重组菌株的溶血活性基本没有恢复, 但恢复了部分神经鞘磷脂酶活性, 表明将蜡样芽胞杆菌的 *plcR* 基因导入炭疽芽胞杆菌后, 可以直接激活神经鞘磷脂酶活性。

关键词: 蜡样芽胞杆菌; *plcR*; 炭疽芽胞杆菌; 神经鞘磷脂酶; 溶血素

The function of PlcR in *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R

Xiaolin Jia^{1,2}, Dongshu Wang², Zhiqi Gao², Erling Feng², Jiping Zheng^{1,3}, Hengliang Wang², Guiying Guo¹, Xiankai Liu²

1. Ministry of Education Key Laboratory for Tropical Biological Resources, Hainan University, Haikou 570228, China;
2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China;
3. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bio-resources-State Key Laboratory Incubation Base, Haikou 570228, China

Abstract: *Bacillus anthracis*, *B. thuringiensis* and *B. cereus* are members of the *B. cereus* group. They share high genetic similarity. Whereas *plcR* (Phospholipase C regulator) usually encodes a functional pleiotropic activator protein in *B. cereus* and *B. thuringiensis* isolates, a characteristic nonsense mutation is found in all *B. anthracis* strains investigated, making the gene dysfunctional. To study the function of PlcR in *B. anthracis*, we used the *B. cereus* CMCC63301 genome as a template and constructed a recombinant expression plasmid pBE2A-*plcR*, and introduced it

收稿日期: 2015-01-19; 修回日期: 2015-03-12

基金项目: 海南省自然科学基金项目(编号: 313043)和海南大学青年基金项目(编号: qnjj1229)资助

作者简介: 贾晓琳, 硕士研究生, 专业方向: 微生物遗传学。E-mail: leibaihe.2008@163.com;

王东澍, 博士研究生, 专业方向: 微生物学。E-mail: wangdongshu@foxmail.com

贾晓琳和王东澍为并列第一作者。

通讯作者: 郭桂英, 硕士, 实验师, 研究方向: 微生物学。E-mail: 815827434@qq.com;

刘先凯, 博士, 副研究员, 研究方向: 病原微生物功能基因组学。E-mail: liuxk007@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-040

网络出版时间: 2015-3-26 10:08:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150326.1008.001.html>

into the *B. anthracis* vaccine strain A16R, and then analyzed the activity of the hemolysin and sphingomyelinase. The results showed that transformation of *B. anthracis* with plasmid pBE2A-*plcR* carrying the native *B. cereus plcR* gene active the expression of sphingomyelinase gene, but did not activate expression of hemolysin genes of *B. anthracis* A16R.

Keywords: *Bacillus cereus*; *plcR*; *Bacillus anthracis*; sphingomyelinase; hemolysin

PlcR 是广泛存在于蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌中十分重要的多功能调控因子^[1], 它可激活多种编码毒力因子的基因表达, 如神经鞘磷脂酶、蛋白酶和溶血素等。在蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌中, PlcR 蛋白受 PapR 的激活, PapR 在 *plcR* 的控制下以肽形式表达后通过 SecA 分泌机制输出到细胞外, 在胞外成为激活的五肽形式后, 再通过寡肽透性酶系统 Opp 进入细胞, 与 PlcR 结合并激活 PlcR, 从而与 PlcRbox 结合, 进而调控染色体上的几十个基因。改变 *plcR* 基因的序列可使蜡样芽胞杆菌与苏云金芽胞杆菌中的溶血素和细胞毒素的表达与活性减弱^[2,3]。在蜡样芽胞杆菌 PlcR 缺失株中, 一些蛋白质如: 神经鞘磷脂酶、溶血素、肠毒素及许多蛋白酶是不表达的^[4]。炭疽芽胞杆菌与蜡样芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌属于蜡样芽胞杆菌群, 炭疽芽胞杆菌中存在与蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌同源的 *plcR* 基因序列, 但在炭疽芽胞杆菌当中 *plcR* 基因发生了一个无义突变^[5], 导致其提前终止, 故无法发挥其正常的功能。本文将蜡样芽胞杆菌的 *plcR* 基因导入炭疽芽胞杆菌减毒疫苗株 A16R(pXO1⁺pXO2⁻) 中并对其生长状态、溶血酶活性及神经鞘磷脂酶活性进行研究。

表 1 本实验中所用到的菌株及质粒

菌株及质粒	来源
DH5 α	全式金生物技术有限公司
BL21(DE3)	全式金生物技术有限公司
A16R	实验室保存, 我国用炭疽减毒疫苗株, pXO1 ⁺ pXO2 ⁻
CMCC63301	实验室保存, 购买自中国医学菌种保藏中心
pBE2	大肠杆菌和枯草芽胞杆菌穿梭载体, Ap ^r , Kan ^r ^[6]
pBE2A	本实验室构建, 枯草芽胞杆菌的淀粉酶基因启动子插入到 pBE2 的 <i>EcoR</i> I 和 <i>Bam</i> H I 之间, 用于在炭疽芽胞杆菌中表达基因。
pBE2A- <i>plcR</i>	蜡样芽胞杆菌 CMCC63301 的 <i>plcR</i> 基因编码序列插入到淀粉酶启动子下游。
pET32a	全式金生物技术有限公司
pET32a- <i>plcR</i>	蜡样芽胞杆菌 CMCC63301 的 <i>plcR</i> 基因编码序列插入到 pET32a 的 <i>Bam</i> H I 和 <i>Hind</i> III 位点间

表 2 本实验中所用到的引物列表

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

本实验中用到的菌株及质粒见表 1。

1.2 方法

1.2.1 PlcR 在 A16R 中的表达

1.2.1.1 表达载体 pBE2A-*plcR* 构建 以 CMCC-63301 基因组为模板, 用引物 *plcR*_F/R(表 2)扩增 *plcR* 编码区片段, 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切后连接到本实验室保存的载体 pBE2A 上, 构建重组表达质粒 pBE2A-*plcR*, 在该重组质粒中, *plcR* 基因处于枯草芽胞杆菌淀粉酶基因启动子的下游并受其调控。将构建好的重组表达质粒 pBE2A-*plcR* 转化到 DH5 α 中, 测序正确后, 转入大肠杆菌 SCS110 中去甲基化, 后提质粒电击转化到炭疽芽胞杆菌中疫苗株 A16R 中构建 pBE2A-*plcR*/A16R, 同时把表达载体 pBE2A 也导入 A16R 中, 构建 pBE2A/A16R 的用作对照。

1.2.1.2 PlcR 表达、纯化及抗 PlcR 多克隆抗体制备 为了将来检测 *plcR* 基因是否在炭疽芽胞杆菌中表达, 我们制备了抗 PlcR 多克隆抗体, 具体方法是: 以 CMCC63301 基因组为模板, 用引物 pET*plcR*_F/R

引物	序列(5' 3')	用途
pBE2A_F	GCCAGATGCTACACAATTAG	<i>plcR</i> 基因插入载体 pBE2A 后 PCR 验证
pBE2A_R	CCTCTCGGTTATGAGTTAGTT	
<i>plcR</i> _F	CGGGATCCATGCACGCAGAAAAATTAGG	从 CMCC63301 基因组中扩增 <i>plcR</i> 基因片段及连接载体(pBE2A 和 pET32a)后 PCR 验证
<i>plcR</i> _R	GCGTCGACTCATTTCCTCATTTCATTTTATATA	
pET <i>plcR</i> _F	CGGGATCCATGCACGCAGAAAAATTAGG	<i>plcR</i> 基因插入载体 pET32a 后 PCR 验证
pET <i>plcR</i> _R	CCAAGCTTTCATTTTATATA	

注：下划线部分表示限制性酶切位点。

(表 2)扩增 *plcR* 片段,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切连接到 pET32a 载体上,将构建好的质粒化学转化到 DH5 α 中,测序正确后,转化到 BL21 感受态中,构建 pET32a-*plcR*/BL21,同时用相同的方法构建 pET32a/BL21。

pET32a-*plcR*/BL21 诱导表达判断蛋白的可溶性,用可溶性蛋白纯化试剂盒纯化蛋白。获得纯化好的蛋白后采用背点注射和腹腔注射免疫小鼠。一周后鼠尾取血 ELISA 测效价,效价比较高时开始眼球取全血,制备鼠多克隆抗体血清。

1.2.1.3 Western blot 分析确认 PlcR 在炭疽芽胞杆菌中表达 将构建的重组菌株 pBE2A-*plcR*/A16R 和 pBE2A/A16R 培养 13 h,各收集 1 mL 培养菌液,离心弃上清,菌体用 200 μ L 纯水重悬,加入等体积的 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,煮沸 10 min,离心取上清,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后,将蛋白转印至 PVDF 膜上,用上述制备的 PlcR 小鼠多抗进行免疫印迹分析,使用低温凝胶成像仪照相。

1.2.2 表型分析

1.2.2.1 生长曲线测定 在 LB 琼脂平板上挑取 A16R、pBE2A/A16R 和 pBE2A-*plcR*/A16R 单克隆,转接到含 5 mL LB 液体培养基试管中,在摇床中 37 、220 r/min 培养 12 h,吸取 50 μ L 转接至新鲜 5 mL LB 试管中同样条件下培养 12 h。吸取 1 mL 的菌液,转接于含 100 mL LB 的 500 mL 三角瓶中培养(37 , 220 r/min)。每隔 1 h 取出三角瓶,测定 OD₆₀₀ 并记录,绘制成生长曲线。

1.2.2.2 溶血现象观察 在平板上挑取蜡样芽胞杆菌 CMCC63301、炭疽芽胞杆菌中 A16R、pBE2A/A16R 和 pBE2A-*plcR*/A16R 单克隆,接到 5 mL LB 液体培养基试管中,37 、220 r/min 培养 13 h,将已灭菌的滤纸片贴到绵羊血平板后,吸取 5 μ L 菌液

滴到滤纸片中间待菌液晾干后放置 37 恒温培养箱中培养过夜,观察是否有溶血环及溶血环大小。

1.2.2.3 神经鞘磷脂酶活性观察 在平板上挑取蜡样芽胞杆菌 CMCC63301、炭疽芽胞杆菌中 A16R、pBE2A/A16R 和 pBE2A-*plcR*/A16R 单克隆,接种到 5 mL LB 液体培养基试管中,37 、220 r/min 培养菌株 13 h,各吸取 5 μ L 菌液滴加到配制好的卵磷脂琼脂培养基(LB 培养基+50%葡萄糖水溶液+50%卵黄盐水悬液)中待菌液晾干后放置 37 恒温培养箱中培养过夜,观察是否有乳白色神经鞘磷脂酶消化环及消化环大小。

2 结果与分析

2.1 PlcR 在炭疽芽胞杆菌的表达

2.1.1 重组 *plcR* 表达菌株构建

表达质粒 pBE2A 和测序正确的重组质粒 pBE2A-*plcR* 电击转化 DH5 α ,用引物 pBE2_F/R 进行菌落 PCR 鉴定,鉴定正确的克隆提取质粒后电转入 SCS110 去甲基化,用相同引物进行菌落 PCR 鉴定,鉴定正确的克隆提取质粒,电转 A16R,用相同引物进行菌落 PCR 鉴定。结果显示重组质粒 pBE2A-*plcR* 导入 DH5 α 、SCS110 和炭疽芽胞杆菌中 A16R 中都扩增出特异的条带,证明重组表达载体 pBE2A-*plcR* 已成功转入炭疽芽胞杆菌中 A16R 中。

2.1.2 PlcR 蛋白的表达、纯化及抗 PlcR 多克隆抗体制备

将 *plcR* 基因插入到表达载体 pET32a 中,构建成重组载体 pET32a-*plcR*,转化大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 后,用引物 pET*plcR*_F/R 进行菌落 PCR 鉴定,都扩增出特异明亮的条带,表明表达质粒成功转入到宿主菌 DH5 α 和 BL21 中。

PlcR 在 pET32a 中表达,融合蛋白大小为 51.5

kDa, pET32a-*plcR*/BL21 诱导表达, 用 His 标签抗体进行蛋白印迹, 结果显示蛋白条带大小相符, 说明 PlcR 在 BL21 成功表达(图 1)。

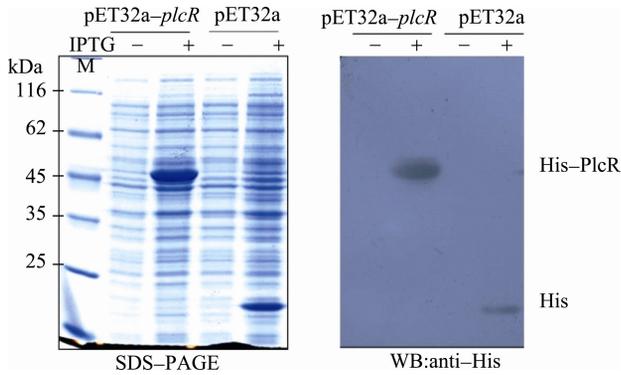


图 1 重组表达载体 pET32a-*plcR* 的构建及 PlcR 蛋白在大肠杆菌中的表达

2.1.3 Western blot 确认 PlcR 在炭疽芽胞杆菌中表达

挑取 pBE2A/A16R 和 pBE2A-*plcR*/A16R 单菌落, LB 培养基中培养 13 h 后, 取菌体 1 mL 进行 SDS-PAGE 分析(图 2A), 并使用抗 PlcR 多克隆抗体检测 PlcR 是否在炭疽芽胞杆菌中 A16R 中表达。结果显示, pBE2A-*plcR*/A16R 所在的泳道有一条明显的杂交条带, 与 PlcR 大小相符(33.5 kDa), 因而确定 PlcR 在炭疽芽胞杆菌中 A16R 中得到表达(图 2B)。

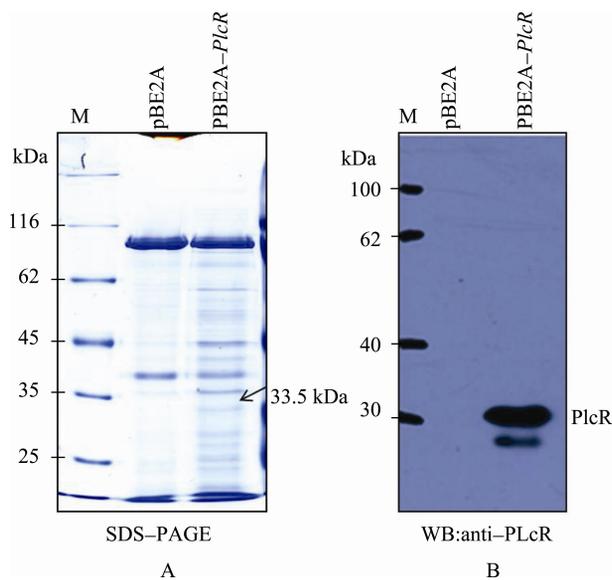


图 2 PlcR 在炭疽芽胞杆菌中 A16R 中表达

2.2 表型分析

2.2.1 生长曲线

从 0 时开始每隔 1 h 测 OD_{600} 值最后绘制生长曲线图(图 3)。在 13 h 时炭疽芽胞杆菌中 A16R 进入对数末期, 并且 A16R、pBE2A/A16R 和 pBE2A-*plcR*/A16R 3 株菌的生长曲线趋势基本相同, 差异不太明显。

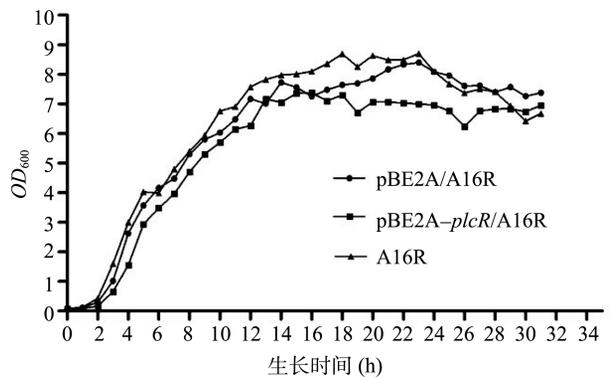


图 3 生长曲线

2.2.2 溶血验证

用蜡样芽胞杆菌 CMCC63301 做阳性对照, 同时选 A16R 做阴性对照, 检测 PlcR 蛋白表达对炭疽芽胞杆菌中 A16R 溶血能力的影响。结果显示: 37 培养过夜后, 蜡样芽胞杆菌 CMCC63301 菌苔周围形成明显的溶血环, A16R、pBE2A/A16R 和 pBE2A-*plcR*/A16R 均没有明显溶血环形成。这表明导入外源 *plcR* 基因后 A16R 的溶血活性没有恢复(图 4A)。

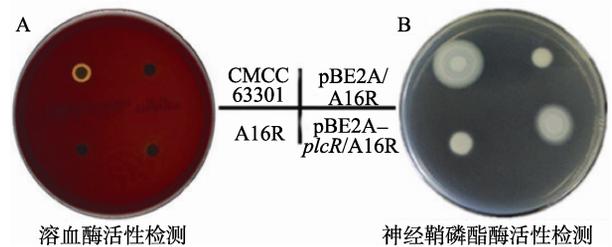


图 4 重组炭疽芽胞杆菌中溶血酶活性和神经鞘磷脂酶活性检测

2.2.3 神经鞘磷脂酶活性验证

用蜡样芽胞杆菌 CMCC63301 做阳性对照, 同时选 A16R 做阴性对照, 检测 PlcR 蛋白表达对炭疽芽胞杆菌中 A16R 神经鞘磷脂酶活性的影响, 结果显示: 37 培养过夜后, 蜡样芽胞杆菌 CMCC63301

菌苔周围形成很大的神经鞘磷脂酶消化环, A16R、pBE2A/A16R 没有明显的神经鞘磷脂酶消化环形成, pBE2A-*plcR*/A16R 菌落周围有明显的神经鞘磷脂酶消化环形成, 但没有 CMCC63301 强。这表明导入外源基因 *plcR* 后 A16R 的神经鞘磷脂酶活性得到恢复(图 4B)。

3 讨 论

在近期对炭疽芽胞杆菌 PlcR 研究报道中, 实验证明导入外源 *plcR* 基因能够使炭疽芽胞杆菌中的溶血酶及神经鞘磷脂酶的活性得到恢复^[5]。而在本研究中, 在导入外源基因 *plcR* 后重组菌株 pBE2A-*plcR*/A16R 恢复了神经鞘磷脂酶活性, 而溶血活性没有恢复, 这与文献报道的结果并不完全一致。我们猜测 *plcR* 基因在炭疽芽胞杆菌中可能具有多种功能, PlcR 蛋白单独就能够激活神经鞘磷脂酶活性, 而受 *plcR* 基因调控的溶血素基因的激活可能需要 *plcR* 与其他基因的共同作用。有研究称受 *plcR* 基因调控的毒素基因的表达还需要一个小肽 PapR 的作用, 即 PlcR 的活性依赖于 PapR^[7]。papR 位于 *plcR* 基因下游 70 bp, 编码一条 48 个氨基酸的多肽^[8,9], 其功能是细胞与细胞间的信号传递, papR 基因的突变会影响 *plcR* 基因的表达, 导致溶血素的表达量大量减少^[10], 因此, 我们推测溶血酶的活性的激活可能需要 PlcR 与 PapR 共同作用, 但 PapR 对神经鞘磷脂酶会起到什么样的作用, 仍是未知, 这需要我们做更进一步的研究。

PlcR 不仅能调控其他蛋白其自身的表达也受自身所调控, 且 N 端较为保守, 属于 DNA 结合区域, 受 PlcR 调控基因的启动子区域存在高度保守的回文序列 TATGNAN₄TNCATA, 有报道推测它可能构成了 PlcR 的识别位点即 PlcRbox^[2,7]。众所周知, 炭疽芽胞杆菌与蜡样芽胞杆菌在遗传学上有很高的相似性^[11], 而且对 *plcR* 基因的进化分析表明, 蜡样芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌中的 *plcR* 基因起源于共同的祖先^[12], 那么在炭疽芽胞杆菌中发生的无义突变是在进化过程中自身选择的原因造成的还是另有他因, 尚不明确。本实验探究了外源 *plcR* 基因对炭疽芽胞杆菌的功能影响, 另一方面, 将炭疽芽胞杆菌中突变的 *plcR* 基因重新突变回正常基因, 进而研究其对炭疽芽胞杆菌中功能的影响同样是我们值得考虑的。

因此, 我们将构建 PlcRpapR 融合蛋白及恢复炭疽芽胞杆菌中突变的 *plcR* 基因的功能, 来进一步研

究 PlcR 在 A16R 中的功能。

参考文献

- [1] 王玲, 陈亚华, Mahillon J, 喻子牛. 蜡状芽胞杆菌转录激活子 PlcR 调控多基因的表达. 微生物学报, 2001, 41(3): 304-309. [\[DOI\]](#)
- [2] 黄必旺, 邵恩斯, 蔡瑞, 苏芙蓉, 关雄. 苏云金杆菌毒素调控基因 *plcR* 的特性与表达. 激光生物学报, 2010, 19(6): 798-803. [\[DOI\]](#)
- [3] Slamti L, Perchat S, Gominet M, Vilas-Bôas G, Fouet A, Mock M, Sanchis V, Chauvaux J, Gohar M, Lereclus D. Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J Bacteriol*, 2004, 186(11): 3531-3538. [\[DOI\]](#)
- [4] Gohar M, Økstad OA, Gilois N, Sanchis V, Kolstø AB, Lereclus D. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics*, 2002, 2: 784-791. [\[DOI\]](#)
- [5] Mignot T, Mock M, Robichon D, Landier A, Lereclus D, Fouet A. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*, 2001, 42(5): 1189-1198. [\[DOI\]](#)
- [6] 郭兴华, 熊占, 周民, 贾士芳, 许怡. 枯草杆菌-大肠杆菌多功能穿梭载体的构建. 生物工程学报, 1991, 7(3): 224-229. [\[DOI\]](#)
- [7] Grenha R, Slamti L, Nicaise M, Refes Y, Lereclus D, Nessler S. Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(3): 1047-1052. [\[DOI\]](#)
- [8] Agaisse H, Gominet M, Økstad OA, Kolstø AB, Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*, 1999, 32(5): 1043-1053. [\[DOI\]](#)
- [9] Pomerantsev AP, Pomerantseva OM, Leppla SH. A spontaneous translational fusion of *Bacillus cereus* PlcR and PapR activates transcription of PlcR-dependent genes in *Bacillus anthracis* via binding with a specific palindromic sequence. *Infect Immun*, 2004, 72(10): 5814-5823. [\[DOI\]](#)
- [10] Slamti L, Lereclus D. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4550-4559. [\[DOI\]](#)
- [11] Sastalla I, Maltese LM, Pomerantseva OM, Pomerantsev AP, Keane-Myers A, Leppla SH. Activation of the latent PlcR regulon in *Bacillus anthracis*. *Microbiology*, 2010, 156(10): 2982-2993. [\[DOI\]](#)
- [12] Ko KS, Kim JW, Kim JM, Kim W, Chung SI, Kim IJ, Kook YH. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. *Infect Immun*, 2004, 72(9): 5253-5261. [\[DOI\]](#)