

# *yhcZ* 基因在苏云金芽胞杆菌生长中的功能研究

家琳达<sup>1,2</sup>, 高坦坦<sup>2</sup>, 彭琦<sup>2</sup>, 吕静<sup>2</sup>, 张杰<sup>2</sup>, 陈敏<sup>1</sup>, 宋福平<sup>2</sup>

1. 北京林业大学林木有害生物防治北京市重点实验室, 北京 100083

2. 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:** 在枯草芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌中, *yhcZ* 基因和 *yhcY* 基因组成双组分系统调控细菌生长, 但 *yhcZ* 基因在苏云金芽胞杆菌中发挥的生物学功能尚未明确。本研究通过基因功能注释、上下游基因排列分析和氨基酸序列比对, 证实苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种 HD73 中 *HD73\_5824* 基因为 *yhcZ* 基因, 推测其与 *HD73\_5825* 基因(*yhcY* 基因)共同组成双组分系统调控细菌生长。利用同源重组技术敲除 HD73 菌株中的 *yhcZ* 基因获得缺失突变体 HD ( $\Delta yhcZ$ ), 其在 LB 和 SSM 培养基中生长均慢于野生型 HD73, 而互补菌株 HD( $\Delta yhcZ::yhcZ$ )菌株则能够部分恢复生长, 表明 *yhcZ* 基因的缺失影响了该菌株细胞的生长。在以 0.4% 葡萄糖为唯一碳源的 M9 培养基中, HD ( $\Delta yhcZ$ )生长速度快于 HD73, 表明 *yhcZ* 基因在该菌株吸收利用葡萄糖的过程中发挥重要作用。Biolog 实验显示 HD ( $\Delta yhcZ$ )的单孔颜色变化率低于 HD73, 且对 D/L-丝氨酸、甲酸、D-葡萄糖酸、L-组胺, D-乳酸甲酯以及柠檬酸等的吸收利用能力低于 HD73, 表明 *yhcZ* 基因能显著影响 HD73 菌株对碳源的利用。同时, HD( $\Delta yhcZ$ )对 8% NaCl 的耐受能力弱于 HD73, 表明该基因可能参与细菌细胞应力响应相关基因的表达与调控。以上结果表明 *yhcZ* 基因在 HD73 菌株生长过程中对葡萄糖及其他碳源的利用具有重要的促进作用。本研究结果为解析 *yhcZ* 基因调控葡萄糖及碳源利用的分子机制奠定基础, 且为进一步研究细菌生长及发酵提供参考。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌; 双组分系统; *yhcZ* 基因; 葡萄糖利用; 碳源利用

## The functions of *yhcZ* gene during *Bacillus thuringiensis* growth

Linda Jia<sup>1,2</sup>, Tantan Gao<sup>2</sup>, Qi Peng<sup>2</sup>, Jing Lv<sup>2</sup>, Jie Zhang<sup>2</sup>, Min Chen<sup>1</sup>, Fuping Song<sup>2</sup>

1. Beijing Key Laboratory for Forest Pest Control, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2. State Key Laboratory of Biology for Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** *yhcZ* and *yhcY* genes constitute a two-component system in *Bacillus subtilis* and *B. cereus* that regulates bacterial growth. However, the exact biological function of *yhcZ* gene in *B. thuringiensis* has not been fully elucidated. In this study, we proved that *HD73\_5824* is an *yhcZ* gene in *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 strain by combining gene functional annotation, analysis of upstream and downstream genes arrangement, and amino acid sequence alignment. This *yhcZ*

收稿日期: 2018-03-07; 修回日期: 2018-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31530095)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31530095)]

作者简介: 家琳达, 硕士研究生, 专业方向: 森林保护(昆虫方向)。E-mail: jialinda9419@163.com

通讯作者: 陈敏, 博士, 副教授, 研究方向: 森林昆虫学。E-mail: minch@bjfu.edu.cn

宋福平, 博士, 研究员, 研究方向: 芽胞杆菌群代谢, 生防微生物的分子生物学。E-mail: fpsong@ippcaas.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-061

网络出版时间: 2018/4/28 16:10:57

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180428.1610.003.html>

gene may co-regulate bacterial growth with *HD73\_5825* gene (*yhcY* gene) by constituting a two-component system. Homologous recombination technology was employed to knock out *yhcZ* gene of HD73, resulting in a mutant strain HD ( $\Delta yhcZ$ ). The HD ( $\Delta yhcZ$ ) strain grew slower than wild-type strain HD73 in both LB and SSM medium. Re-introduction of *yhcZ* gene in HD ( $\Delta yhcZ$ ) strain can partially restore the growth, indicating that the deletion of *yhcZ* gene impacts the cell growth of HD73 strain. HD ( $\Delta yhcZ$ ) strain grew faster than HD73 strain in M9 medium with 0.4% glucose as the sole carbon source, implying that the *yhcZ* gene plays an important role in glucose utilization by HD73 strain. The results of biology assay showed that HD ( $\Delta yhcZ$ ) exhibits a lower average well color development compared to HD73. HD( $\Delta yhcZ$ ) cells also demonstrated a decreased capacity for absorbing and utilizing D/L-serine, formic acid, D-gluconic acid, L-histamine, D-methyl lactate, and citric acid, indicating that *yhcZ* gene could dramatically influence carbon source utilization of HD73 strains. Additionally, HD ( $\Delta yhcZ$ ) was less resistant to 8% NaCl, suggesting that *yhcZ* gene may be involved in the expression and regulation of genes related to high-salt stress response in bacterial cells. The results above show that the *yhcZ* gene significantly promotes glucose and other carbon sources utilization of HD73 strain during growth. Our findings will lay a foundation not only for analyzing the regulatory mechanisms of glucose and carbon sources utilization by *yhcZ* gene, but also providing a reference for the further research on bacterial growth and fermentation.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; two-component system; *yhcZ* gene; glucose utilization; carbon source utilization

细菌通过细胞内的双组分系统(two-component system, TCS)感应外界环境信号,进而调控基因表达,及时应答环境和生理的变化。典型的 TCS 由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和应答调控蛋白(response regulator, RR)两部分组成<sup>[1]</sup>。HK 包含跨膜结构,分为膜外信号感应结构域和膜内催化结构域。RR 的 N-端结构域用于接收 HK 传递的磷酸基团, C-端结构域包含螺旋-转角-螺旋(HTH)序列,可与靶 DNA 或 RNA 特异性结合,通过激活或抑制靶基因的转录,进而调控相关基因的表达<sup>[2,3]</sup>。TCS 广泛存在于细菌中,调控细菌的生长繁殖、营养代谢、趋化性、运动性、生物膜形成<sup>[4]</sup>、芽胞形成<sup>[5]</sup>、毒力表达及耐药性<sup>[6,7]</sup>等生理过程。

广义的蜡样芽胞杆菌组(*B. cereus* group)包含 6 种芽胞杆菌,除了狭义的 3 种,即苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*)、炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis*)及蜡样芽胞杆菌(*B. cereus*)外,还包括蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*)、假蕈状芽胞杆菌(*B. pseudomycoides*)和韦氏芽胞杆菌(*B. weihenstephanensis*)<sup>[8]</sup>。在 *B. cereus* 组中,大部分对 TCS 的研究集中于细胞压力应答、毒力表达调控和芽胞的形成起始等方面。例如,目前已经证实 CasKR 参与 *B. cereus* 菌株低温适应性,通过提高脂肪酸脱氢酶 DesA 的活性适应低温环境,

维持细胞生长和存活<sup>[9,10]</sup>; ResDE 响应细胞内的氧化还原变化,进而通过激活溶血素基因 *hbl* 和肠毒素基因 *nde* 的转录调控 *B. cereus* 的毒性<sup>[11]</sup>; YvfTU 参与毒力调控因子 PlcR 的表达,主要调控 *B. cereus* 菌株的毒性<sup>[12]</sup>; WalRK(YycFC)响应温度和抗生素压力,调控 *B. anthracis* 的细胞分离及芽胞形成等生理过程<sup>[13]</sup>; LytSR 调控 *B. thuringiensis* 中 *spoIIP* 基因的表达,参与芽胞的形成过程<sup>[14]</sup>。然而,在 *B. cereus* 组细菌中仍存在许多参与细胞壁压力应答、药物抵抗性、生长调控的 TCSs 有待深入研究,如 PhoRP、YycGF、YufLM、LiaSR、YbdKJ、YvcQP、YxdKJ 等<sup>[15]</sup>。

苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*, Bt)在芽胞形成过程中,细胞内能够产生伴胞晶体,其主要成分是杀虫晶体蛋白。这些晶体蛋白对鳞翅目、鞘翅目、双翅目、半翅目、等翅目、直翅目、缨翅目等昆虫具有特异杀虫活性<sup>[16]</sup>。Bt 产生的晶体和芽胞混合物作为生物杀虫剂也已成功应用于害虫的生物防治,并且成为目前农业上应用最广和产量最大的微生物杀虫剂<sup>[17]</sup>。在 *B. subtilis* 168 菌株中, YhcZ 和上游 YhcY 组成双组分系统参与磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)通路,调控菌株对葡萄糖的利用<sup>[18]</sup>; 在 *B. cereus* 模式菌株 ATCC 14579 中,仅推测 YhcYZ 双组分系统参与细胞壁压力响应<sup>[15]</sup>。然

而在 Bt 菌株中，尚无 *yhcZ* 相关基因的功能报道。本研究通过比较基因在基因组上的排列模式，结合氨基酸序列比对和保守结构域分析，证明在 Bt HD73 基因组中存在 *yhcZ* 基因，对应的基因编号为 HD73\_5824。然而 YhcZ 在 Bt 菌株中对生长发挥的调控作用仍不清楚。通过测定 Bt 菌株的生长曲线及对不同碳源的利用情况，明确该基因对 Bt 菌株的生长代谢有促进作用。该研究为阐明 YhcZ 在 Bt 菌株中的生物学功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

本研究所用的菌株和质粒如表 1 所示。

### 1.2 培养基及配比

LB 培养基：1% Tryptone，1% NaCl，0.5% Yeast extract；SSM 培养基：营养肉汤 8 g，0.12% MgSO<sub>4</sub>，0.1% KCl，0.01% NaOH，121℃高温灭菌 20 min 后加入经 0.22 μm 滤膜过滤除菌的 0.01 mmol/L MnCl<sub>2</sub>，1 mmol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>，0.001 mmol/L FeSO<sub>4</sub>；M9 基础培养基：33.9 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，15 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，5 g/L NH<sub>4</sub>Cl，2.5 g/L NaCl，使用之前补充 0.4% 的葡萄糖。

### 1.3 酶及试剂

*Taq* DNA 聚合酶购自于北京博迈德生物技术公

司；PCR 产物回收试剂盒购自北京 AXYGEN 公司；Prime STAR HS DNA 聚合酶、相关的内切酶及 T4 DNA 连接酶均购自大连生物工程(TaKaRa)公司。Biolog GeIII 微孔板和 IF-B 接种液均购自北京华粤企业集团有限公司。其他生化试剂和抗生素均为进口分析纯级试剂(Sigma, 美国)。

### 1.4 引物合成及序列测定

根据 Bt HD73 菌株的基因组序列设计引物，具体名称及序列见表 2。引物合成和序列测定由上海生工生物工程股份有限公司完成。

### 1.5 培养条件

苏云金芽胞杆菌常规培养温度为 30℃，摇床转速为 220 r/min；筛选突变体过程中苏云金芽胞杆菌的培养温度为 38℃，摇床转速为 150 r/min；大肠杆菌(*Escherichia coli*)的培养温度为 37℃，摇床转速为 220 r/min；必要时加入相应抗生素：苏云金芽胞杆菌中，红霉素工作浓度为 5 μg/mL，卡那霉素工作浓度为 100 μg/mL；大肠杆菌中，氨苄青霉素工作浓度为 100 μg/mL。

### 1.6 遗传操作

大肠杆菌质粒提取及 DNA 片段纯化按照试剂盒说明书进行；大肠杆菌转化方法参考分子克隆实验指南；Bt 基因组 DNA 提取和电击转化参考之前发表的实验方法<sup>[19,20]</sup>。

表 1 本研究所用的菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	特性	来源
SCS110	大肠杆菌菌株，用于对质粒进行去甲基化修饰	本实验室
HD73	苏云金芽胞杆菌野生型菌株，产生 Cry1Ac 晶体蛋白	本实验室
HD ( $\Delta yhcZ$ )	苏云金芽胞杆菌野生型菌株 HD73 中敲除 <i>yhcZ</i> 基因，Kan <sup>r</sup>	本研究
HD ( $\Delta yhcZ::yhcZ$ )	HD ( $\Delta yhcZ$ ) 菌株中转入互补质粒 pHTHFyhcZ, Erm <sup>r</sup>	本研究
pMAD	温敏型质粒，用于在芽胞杆菌中进行基因敲除，9.7 kb, Amp <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	本实验室
pRN5105 $\Delta cwlC$	同源重组质粒，用于在 HD73 菌株中敲除 <i>cwlC</i> 基因，Amp <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	本实验室
pMAD $\Delta yhcZ$	同源重组质粒，用于在 HD73 菌株中敲除 <i>yhcZ</i> 基因，Amp <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	本研究
pHT315	大肠杆菌和芽胞杆菌穿梭载体，6.5 kb, Amp <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	本实验室
pHTHFyhcZ	互补质粒，在 pHT315 中插入 <i>yhcZ</i> 基因的启动子和开放阅读框，Erm <sup>r</sup>	本研究

Amp<sup>r</sup>：氨苄青霉素抗性；Erm<sup>r</sup>：红霉素抗性；Kan<sup>r</sup>：卡那霉素抗性。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')	酶切位点
yhcZ-A-F	GCTCGAATTCCTTAATGTACTACCTGAAAAA	<i>EcoR</i> I
yhcZ-A-R	TGAAATGGTTCGCTGAACTAACAATACTTTTATTT	
yhcZ-B-F	GCCTACGAGGAATTTGCAGTGAAAAATGGAATTGT	
yhcZ-B-R	TATCGGATCCTCATCTTTTATATGTATTAA	<i>Bam</i> H I
yhcZ-Kan-F	AAAGTATGTAGTTTCAGCGAACCATTTGAGGTGA	
yhcZ-Kan-R	TCCATTTTTCAGTGCATAATTCCTCGTAGGCGCTCG	
5823-F	ATGGGAAGCCGAAAAAC	
5825-R	TTGTGCGAATGGAAGA	
yhcZHF-F	CGGAATTCGCCAAGAGGGCGTTAGAACAAGAT	<i>EcoR</i> I
yhcZHF-R	GCGTCGACTTCCTCCTAGTACTCACTCTTATG	<i>Sal</i> I

下划线部分表示限制性酶切位点。

### 1.7 yhcZ 基因生物信息学分析

根据 *B. subtilis* 168 (NCBI accession No. NZ\_CP010052.1)和 *B. cereus* ATCC 14579 (NCBI accession No. NC\_004722.1)菌株中 *yhcZ* 基因序列,在 Bt HD73 菌株的基因组 (NCBI accession No. NC\_020238.1)中进行 BLAST 比对,鉴定 *yhcZ* 同源基因;利用 DNAMAN 比对相应蛋白氨基酸序列的相似性;利用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)进行 YhcZ 蛋白保守结构域的分析。

### 1.8 yhcZ 基因缺失菌株和互补菌株的构建

以野生型 HD73 的基因组为模板, *yhcZ*-A-F/*yhcZ*-A-R 和 *yhcZ*-B-F/*yhcZ*-B-R 为引物,PCR 分别扩增出 *yhcZ* 基因的上游片段(*yhcZ*-A, 1024 bp)和下游片段(*yhcZ*-B, 1024 bp)。以 pRN5105Δ*cwlC* 质粒为模板, *yhcZ*-Kan-F/*yhcZ*-Kan-R 为引物扩增出卡那霉素抗性基因片段(Kan, 1476 bp)。以 *yhcZ*-A、Kan 和 *yhcZ*-B 为模板, *yhcZ*-A-F/*yhcZ*-B-R 为引物,PCR 扩增出同源重组长片段 *yhcZ*-A-Kan-*yhcZ*-B (3524 bp)。利用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 对该片段进行双酶切,胶回收后插入 pMAD 载体的相应酶切位点,获得同源重组质粒,命名为 pMADΔ*yhcZ*。该质粒经电击转入 HD73 菌株中,在红霉素和卡那霉素双抗性平板上筛选阳性转化子。经 38℃高温诱导,筛选出对红霉素敏感但对卡那霉素抵抗的菌落。利用重组片段外侧引物 5823-F 和 5825-R 进行 PCR 鉴定,并对 PCR 片

段进行测序确认,获得 *yhcZ* 基因缺失突变菌株 HD (Δ*yhcZ*)。

以 HD73 的基因组为模板, *yhcZHF*-F 和 *yhcZHF*-R 为引物,PCR 扩增得到 *yhcZ* 基因全序列片段(包含 *yhcZ* 启动子和 ORF, 1687 bp),利用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切并连接到相同酶切处理的穿梭载体 pHT315 上,热激转化到大肠杆菌 SCS110 中,获得互补质粒 pHTHF*yhcZ*,并进行测序确认序列正确性。进一步将重组质粒经电击转化到 HD (Δ*yhcZ*)菌株中,得到互补菌株 HD (Δ*yhcZ*::*yhcZ*)。

### 1.9 生长曲线的测定

挑取 Bt 单菌落接种于 5 mL 新鲜 LB 培养基中,30 、220 r/min 振荡过夜培养。母液按照 1%的接种量转接于 100 mL 新鲜 LB 液体培养基中,30 、220 r/min 振荡培养,每间隔 1 h 进行取样,测定其在 600 nm 波长处的吸光值( $OD_{600}$ ),并绘制各菌株的生长曲线,每组数据独立重复 3 次。

### 1.10 Bt 菌株对葡萄糖的吸收利用测定

挑取 Bt 单菌落接种于 5 mL 新鲜 LB 培养基中,30 、220 r/min 振荡过夜培养。母液以 1%的接种量转接于 100 mL 新鲜 M9 液体培养基(加入 0.4%葡萄糖作为唯一碳源)中,30 、220 r/min 振荡培养,每间隔 1 h 进行取样,测定其  $OD_{600}$ ,并绘制各菌株的生长曲线。每组数据独立重复 3 次。

### 1.11 Biolog 实验方法及数据分析

将 Bt 菌株接种至 LB 固体培养基上,置于 30 过夜培养;使用 Inoculatorz 棉签从平板上挑取长势良好的单菌落,接种于 Inoculating Fluid B 接种液中,并使用浊度仪调整接种液初始浓度,使其细胞浓度处于 90%~98% T,形成均匀的菌悬液;将菌悬液倒入 V 型上样槽中,使用多孔道移液器将菌悬液加入 Biolog GenIII 微孔板的 96 孔中,每孔 100  $\mu$ L;将微孔板置于 30 培养箱中培养;根据菌株特性,选取特定的时间点(本实验选取 22 h 和 32 h)将微孔板置于 Plate Reader 中进行读数,Biolog 实验独立重复 3 次。

Biolog GenIII 微孔板的单孔颜色平均值(average well color development, AWCD)计算方法参考文献<sup>[21]</sup>,即  $AWCD = \sum(C_i - R) / 95$ 。其中,  $C_i$  表示 95 个实验孔在 590 nm 处的吸光值,  $R$  表示对照孔在 590 nm 处的吸光值, 95 为 Biolog GenIII 微孔板包含的碳源和化学物质的种类。若  $C_i - R$  数值小于 0, 则按照 0 计算。数值取 3 次独立实验中数据的平均值。

Biolog GenIII 微孔板中,所有必要的营养物质以及生化试剂都预先填充、干化在 96 孔中。在微生物可以生长的孔中,增强的呼吸作用导致四唑氧化还

原染料被还原,变成紫色;而在阴性孔中,由于无可供微生物利用的碳源,因此保持呈现无色。孵育后,通过显紫色孔所产生的表型指纹同 Biolog 数据库中的数据进行比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 苏云金芽胞杆菌 HD73 中 *yhcZ* 基因的鉴定

根据基因在基因组上的排列,结合 *yhcZ* 基因的核苷酸序列比对,在 Bt HD73 菌株中发现一个编号为 HD73\_5824 的基因,编码应答调控蛋白,其上游基因 HD73\_5825 编码组氨酸激酶,下游基因 HD73\_5823 编码偶氮还原酶,三者排列模式与菌株 *B. subtilis* 168 和 *B. cereus* ATCC 14579 中的基因排列模式相同(图 1)。氨基酸比对结果显示,HD73\_5824 与 *B. subtilis* 168 和 *B. cereus* ATCC 14579 菌株中调控蛋白 YhcZ 相似性分别为 51.2% 和 97.8%;HD73\_5825 与 *B. subtilis* 168 和 *B. cereus* ATCC 14579 菌株中组氨酸激酶 YhcY 相似性分别为 34.7% 和 98.3% (图 1)。NCBI 在线分析 HD73\_5824 的保守结构域表明:HD73\_5824 蛋白的 N-端包含 Response\_reg 结构域,

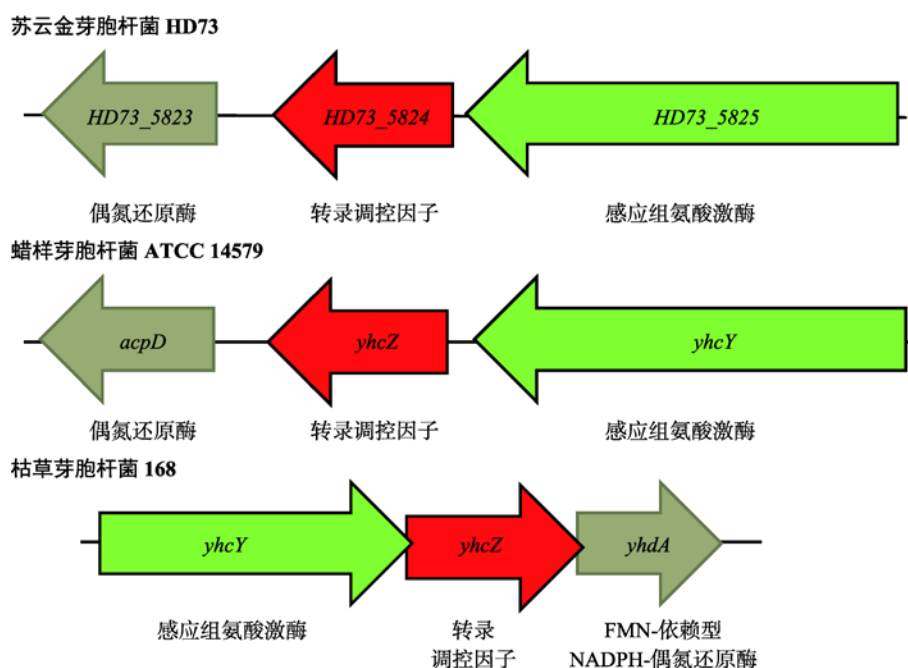


图 1 不同芽胞杆菌中 *yhcZ* 基因分析

Fig. 1 Analysis of *yhcZ* gene from different *Bacillus* strains



用于接收其同源组氨酸激酶传递的磷酸信号；C-端为 HTH 结构域，可结合目的基因 DNA 序列。以上分析表明在 *B. thuringiensis* HD73 基因组中，包含 *B. subtilis* 和 *B. cereus* 菌株中的 *yhcZ* 和上游 *yhcY* 的同源基因，对应基因编号分别为 HD73\_5824 和 HD73\_5825，推测两者共同组成双组分信号系统 YhcY-YhcZ，参与细菌细胞生长。

## 2.2 *yhcZ* 基因缺失突变体及互补菌株的构建

为研究 *yhcZ* 基因的生物学功能，首先构建 *yhcZ* 基因缺失突变体及互补菌株。将同源重组质粒 pMAD $\Delta$ *yhcZ* (图 2A)电击转入 HD73 菌株中，经过诱导突变筛选，得到卡那霉素抗性单菌落。利用重组片段外侧引物 5823-F 和 5825-R 进行 PCR 鉴定，结果如图 2C 所示。以 HD73 基因组为模板扩增片段大小为 1.7 kb，突变株基因组为模板扩增片段大小

为 2.5 kb。通过对 PCR 片段进行测序，测序结果与设计序列一致，证明 *yhcZ* 基因缺失突变株构建正确，命名为 HD ( $\Delta$ *yhcZ*)。

同样将 *yhcZ* 基因互补质粒 pHTHFyhcZ (图 2B)电击转入 HD ( $\Delta$ *yhcZ*)菌株中，经过抗性筛选得到阳性转化子。提取单菌落的基因组，进行 PCR 鉴定，其结果如图 2D 所示，扩增片段大小约为 1.7 kb，该结果与所设计的序列大小一致，表明互补菌株构建成功，命名为 HD( $\Delta$ *yhcZ*::*yhcZ*)。

## 2.3 *yhcZ* 基因缺失对菌株生长的影响

从 0 时开始每隔 1 h 测定  $OD_{600}$  值最后绘制生长曲线。无论在丰富培养基 LB 中(图 3A)，或是在贫瘠营养诱导产胞培养基 SSM 中(图 3B)，缺失突变体 HD ( $\Delta$ *yhcZ*)生长均明显慢于野生型 HD73，且互补菌株 HD ( $\Delta$ *yhcZ*::*yhcZ*)生长均得到了部分恢复。结果表

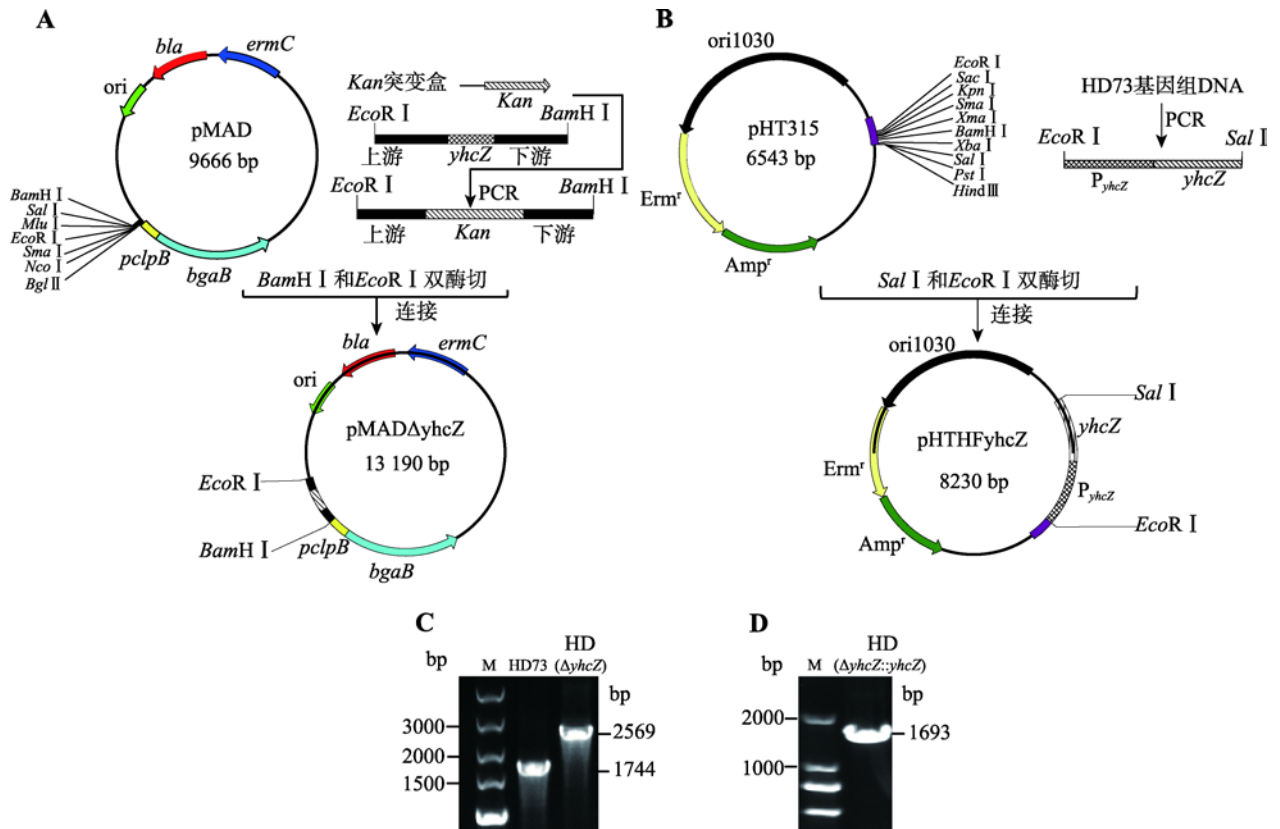


图 2 质粒构建与菌株鉴定

Fig. 2 Construction of plasmids and identification of strains by PCR

A: 同源重组质粒 pMAD $\Delta$ *yhcZ* 的构建; B: *yhcZ* 基因互补质粒 pHTHFyhcZ 的构建; C: 缺失突变菌株 HD ( $\Delta$ *yhcZ*) 的 PCR 鉴定; D: *yhcZ* 互补菌株 HD ( $\Delta$ *yhcZ*::*yhcZ*) 的 PCR 鉴定。

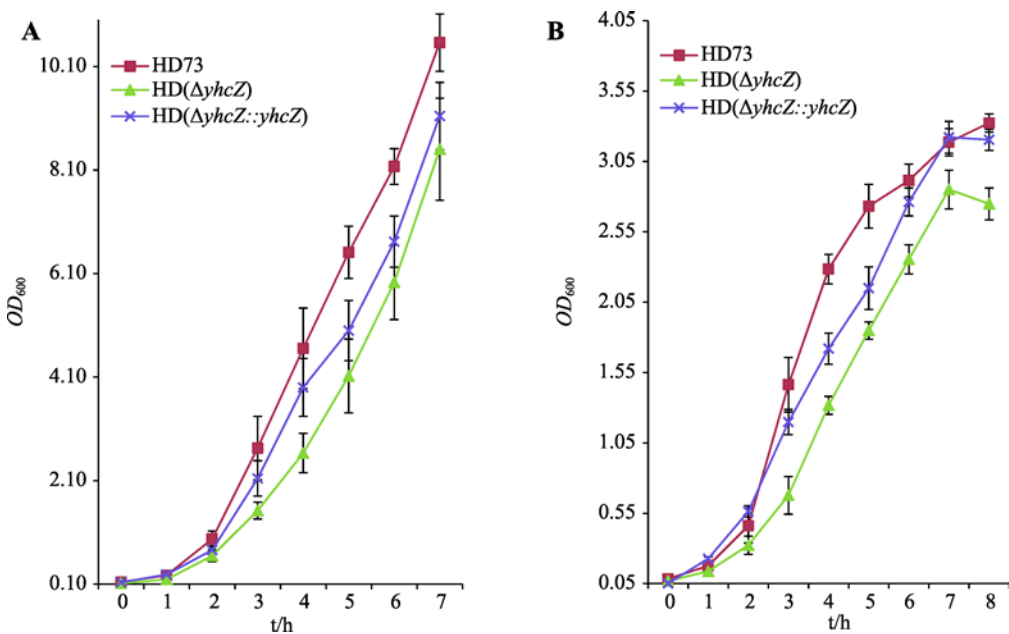


图 3 野生菌株、*yhcZ* 缺失菌株及 *yhcZ* 互补菌株在不同培养基中的生长曲线  
Fig. 3 Growth curves of wild-type stain, *yhcZ* deletion mutant, and *yhcZ*-complementation strain in different mediums  
A : LB 培养基 ; B : SSM 培养基。

明 *yhcZ* 基因的缺失影响了菌株的生长, 证明 *yhcZ* 基因在 Bt 菌株营养利用及生长代谢过程中发挥重要的促进作用。

2.4 *yhcZ* 基因缺失对葡萄糖利用的影响

为评价 Bt 菌株对葡萄糖的利用效率, 选用 M9 基础培养基并添加 0.4% 葡萄糖作为唯一碳源测定 Bt 菌株的生长曲线。在整个生长过程中, 突变体 HD ( $\Delta yhcZ$ ) 的生长速度大于野生型 HD73 表明 *yhcZ* 基因缺失后, 菌株可以提高对葡萄糖的利用效率(图 4)。菌株在 M9 培养基中, 前期进行对数生长至最大值, 后期开始下降。推测可能的原因是前期培养基中营养丰富, 满足菌株快速生长; 后期随着培养基中营养的消耗, Bt 菌株生长速度下降, 而且培养基中积累的有毒代谢产物造成细胞的裂解, 使得  $OD_{600}$  快速下降。本实验结果表明 *yhcZ* 基因在一定程度上负调控 Bt 菌株对葡萄糖的利用。

2.5 Biolog 分析 Bt 菌株的碳源利用率和化学敏感性

在 Biolog 评价系统中 单孔颜色变化率(AWCD)

反映出微生物对单一碳源的利用能力, 以此评价微生物的代谢活性。突变菌株 HD ( $\Delta yhcZ$ ) 的 AWCD 值

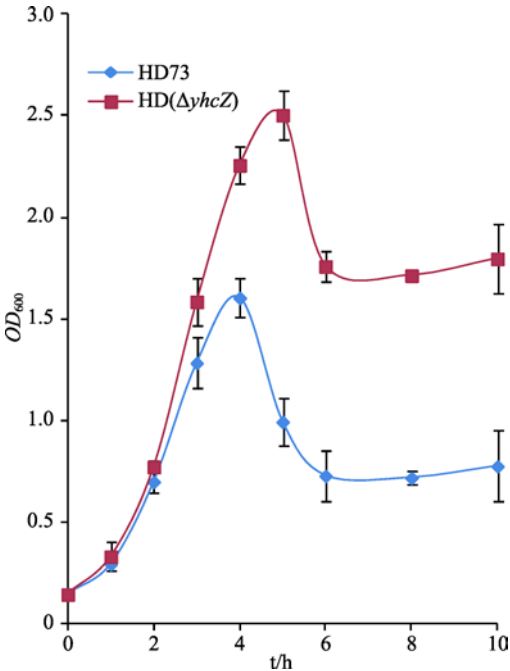


图 4 *yhcZ* 基因的缺失提高 Bt 菌株对葡萄糖的利用  
Fig. 4 Deletion of the *yhcZ* gene promotes glucose utilization of Bt strain

明显小于野生型 HD73 的 AWCD 值(图 5), 说明 *yhcZ* 基因的缺失导致 Bt 菌株利用碳源的能力降低。

Biolog GenIII 微孔板可以对微生物进行 94 种表型测试, 其中包括 71 种碳源利用测试(图 6, 1~9 列)以及 23 种化学敏感性测试(图 6, 10~12 列)。由于 Biolog 系统在检测微生物对碳源的利用中可能存在较大的波动性, 为最大可能地排除实验误差, 本研究中的 Biolog 实验进行了 6 次独立的生物学重复, 选取了 3 次实验结果中野生型菌株 HD73 和 *yhcZ* 缺失突变体之间差异相同的样孔表型指纹图谱分析(图 6)。两个菌株均可利用糊精(A2)、D-麦芽糖(A3)、D-海藻糖(A4)、 $\beta$ -甲酰-D-葡萄糖(B4)、N-乙酰-D-葡萄糖胺(B6)、 $\alpha$ -D-葡萄糖(C1)、D-果糖(C3)、肌苷(C9)、甘油(D5)、D-葡萄糖-6-磷酸(D6)、D-果糖-6-磷酸(D7)、明胶(E1)、丙酮酸甲酯(G2)、L-乳酸(G4)、L-苹果酸(G8), 且对这些碳源利用能力较强, 对应碳源孔呈现紫色。HD73 和 HD( $\Delta yhcZ$ )同样均可利用 D-纤维二糖(A5)、D-水杨苷(B5)、N-乙酰- $\beta$ -D-甘露糖胺(B7)、L-岩藻糖(C7)、肌醇(D4)、 $\epsilon$ -氨基乙酰-L-脯氨酸(E2)、L-丙氨酸(E3)、L-精氨酸(E4)、L-组胺(E7)、L-天冬氨酸(E5)、L-谷氨酸(E6)、L-焦谷氨酸(E8)、D-半乳糖醛酸(F2)、D-葡萄糖醛酸(F5)、葡萄糖醛酰胺(F6)、粘酸(F7)、糖质酸(F9)、吐温 40(H1)、 $\alpha$ -酮-戊二酸(G6)、

溴-丁二酸(G9)、乙酰乙酸(H6)、乙酸(H8), 但对这些碳源利用能力相对较弱, 对应碳源孔呈现蓝色。

HD73 和 HD( $\Delta yhcZ$ )均不可利用蔗糖(A7)、D-松二糖(A8)、水苏糖(A9)、蜜三糖(B1)、 $\alpha$ -D-乳糖(B2)、蜜二糖(B3)、N-乙酰-D-半乳糖胺(B6)、N-乙酰神经氨酸(B9)、D-甘露糖(C2)、D-岩藻糖(C6)、L-鼠李糖(C8)、D-山梨醇(D1)、D-甘露醇(D2)、D-阿拉伯醇(D3)、D-天冬氨酸(D8)、果胶(F1)、L-半乳糖醛酸内酯(F3)、奎宁酸(F8)、p-羟基-苯乙酸(G1)、D-苹果酸(G7)、 $\gamma$ -氨基-丁酸(H2)、 $\alpha$ -羟基-丁酸(H3)、 $\beta$ -羟基-D,L 丁酸(H4)、 $\alpha$ -酮-丁酸(H5), 对应碳源孔表现出无色, 同阴性对照孔(A1)。

培养 22 h 后发现, HD73 (图 6, A1)对 L-丝氨酸(E9)、甲酸(H9)、D-葡萄糖(F4)的利用能力及对 8% NaCl(B12)的耐受性强于 HD( $\Delta yhcZ$ ) (图 6, B1), 且 HD73 可利用 D-乳酸甲酯(G3), HD( $\Delta yhcZ$ )则无法利用; 继续培养 32 h 后发现, HD73 (图 6, A2)利用 L-组胺(E7)和 D-丝氨酸(D9)的能力强于 HD( $\Delta yhcZ$ ) (图 6, B2), 且 HD73 可以利用柠檬酸(G5), 而 HD ( $\Delta yhcZ$ )则无法利用。

### 3 讨 论

通过 BLAST 搜寻、基因排列模式比较、氨基酸序列比对以及保守结构域分析明确了 Bt 菌株中的 *yhcZ* 的基因, 推测其与上游基因 *yhcY* 共同组成双组份信号系统, 调控细菌的生理过程。在 *B. cereus* 组细菌中, YhcYZ 功能尚不明确。本研究在实验室条件下测定菌株的生长曲线, 发现 *yhcZ* 缺失后显著影响 Bt 菌株的生长(图 3), 证明 YhcZ 对 Bt 菌株的生长具有促进作用。前期研究报道, 在模式菌株枯草芽胞杆菌中, *yhcZ* 抑制 *yjdD* 的表达<sup>[18]</sup>。*yjdD* 基因编码 PTS 酶同系物, 通过调控多种糖的运输与磷酸化, 参与脂多糖和细胞膜核心成分的合成<sup>[22]</sup>。在 Bt 菌株中, YhcZ 参与葡萄糖的吸收与利用, *yhcZ* 缺失后, Bt 菌株对葡萄糖的利用能力提高(图 4), 推测 Bt 中 *yhcZ* 基因的功能可能与 *B. subtilis* 中相似, 抑制 PTS 相关基因的表达, 进而调控细胞对葡萄糖的利用。

采用 Biolog 系统分析 Bt HD73 菌株对碳源的利用率及化学物的敏感性, 发现 *yhcZ* 基因缺失后, 利

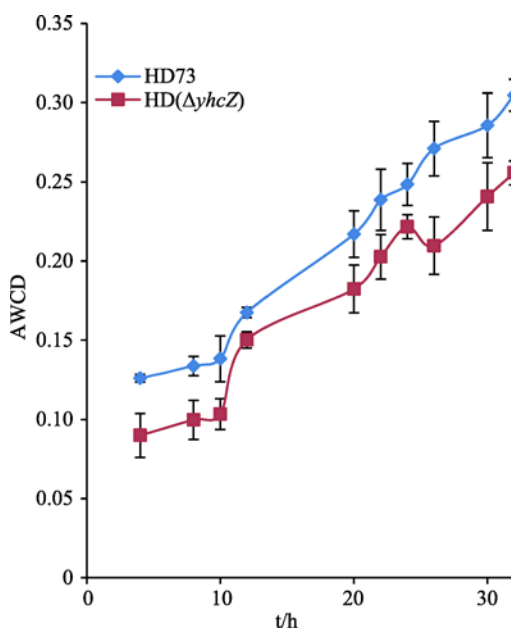


图 5 *yhcZ* 基因缺失影响 Bt 菌株对碳源的利用

Fig. 5 The effect of *yhcZ* deletion on carbon utilization



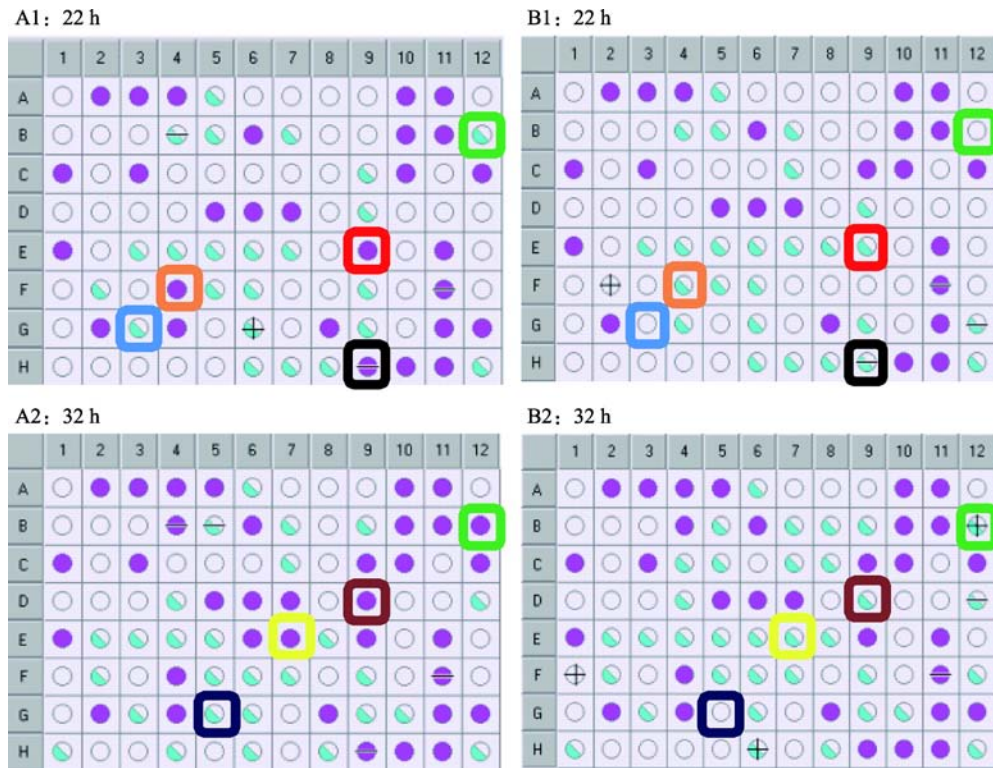


图 6 *HD73* 和 *HD (ΔyhcZ)* 菌株表型指纹图谱

Fig. 6 Phenotypic microarray analysis of *HD73* and *HD (ΔyhcZ)* strains

A1 表示 *HD73* 菌株培养 22 h, A2 表示 *HD73* 菌株培养 32 h; B1 表示 *HD (ΔyhcZ)* 菌株培养 22 h, B2 表示 *HD (ΔyhcZ)* 菌株培养 32 h。紫色和蓝色表示细菌能够生长的样品孔, 紫色表示长势强, 蓝色表示长势弱, 无色表示细菌无法生长的样品孔; 方框表示 *HD73* 与 *HD (ΔyhcZ)* 存在差异的样品孔; Biolog GenIII 微孔板中的 A1 孔为碳源利用测试的阴性对照孔, A10 孔为化学敏感性测试的阳性对照孔。

用 L-丝氨酸、D-葡萄糖酸、L-组胺、D-丝氨酸、D-乳酸甲酯、柠檬酸、甲酸的能力明显降低, 耐受 NaCl 的能力显著低于野生型 *HD73* (图 6, B12 样品孔)。结果表明 *yhcZ* 基因不仅参与 *Bt* 菌株对不同碳源的利用, 同时参与调控细胞膜应激反应, 应答盐胁迫。在前期报道中, 仅推测 *YhcYZ* 参与 *B. cereus* 对细胞壁压力的应答和杀菌剂的抵抗活性<sup>[15]</sup>。推测在高盐条件下, 细胞壁的完整性受到改变, 激活 *YhcYZ* 系统, *YhcZ* 从而调控相关基因的表达。在 *B. cereus* 组细菌中, 其他的 TCSs, 如 *YbdKJ*、*YvcQP*、*YxdKJ* 及 *LiaSR* 也具有响应细胞壁压力的功能<sup>[15]</sup>, 因此推测面对外界刺激, 细菌启动多个 TCSs 共同调控细胞的生长及代谢。

分析 Biolog 结果, 发现 *yhcZ* 基因缺失后, 影响 *Bt* 菌株对多种碳源的利用效率。LB 和 SSM 均为营养成分复杂的培养基, 推测由于 *HD(ΔyhcZ)* 对多种碳源的利用效率降低, 以及对化学物质敏感性增强,

导致细胞生长减慢。*YhcZ* 影响 *Bt* 菌株对碳源的利用及对外界压力的抵抗能力, 由此推测 *Bt* 菌株在适应复杂多变的自然环境过程中, *YhcZ* 可能发挥不可缺少的作用。然而 *YhcY* 感应到葡萄糖及盐压力信号后, *YhcZ* 如何发挥调控作用的具体分子机制仍待深入研究。本研究重点证明了 *YhcZ* 在 *Bt* 菌株生长过程中发挥显著的促进作用, 研究结果对提高菌株的发酵密度和发酵水平具有重要意义。根据生物信息学分析, 推测在 *Bt HD73* 菌株中 *YhcY* 和 *YhcZ* 组成双组分系统, 后续研究将会涉及遗传学和表型实验以验证 *YhcYZ* 是否为双组分系统。同时, 根据 Biolog 结果分析验证 *yhcZ* 的调控途径亦是今后的重点研究方向。

## 参考文献(References):

- [1] Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT.

- Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol*, 2005, 3(10): e334. [DOI]
- [2] Li L, Wei KK, Jiang WH, Lu YH. Diversity of regulatory strategies for two-component system response regulators in bacteria. *Sci Sin Vitae*, 2017, 47(5): 462–469. 李雷, 卫科科, 姜卫红, 芦银华. 细菌双组分系统应答调控蛋白调控策略的多样性. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47(5): 462–469. [DOI]
- [3] Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jiménez H, Guazzaroni ME, Ramos JL. Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64(1): 539–559. [DOI]
- [4] Li YH, Lau PCY, Tang N, Svensäter G, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 2002, 184(22): 6333–6342. [DOI]
- [5] Hoch JA. A life in *Bacillus subtilis* signal transduction. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71: 1–19. [DOI]
- [6] Beier D, Gross R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(2): 143–152. [DOI]
- [7] Worthington RJ, Blackledge MS, Melander C. Small-molecule inhibition of bacterial two-component systems to combat antibiotic resistance and virulence. *Future Med Chem*, 2013, 5(11): 1265–1284. [DOI]
- [8] Vilas-Bôas GT, Peruca APS, Arantes OMN. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol*, 2007, 53(6): 673–687. [DOI]
- [9] Diomandé SE, Chamot S, Antolinos V, Vasai F, Guinebretière MH, Bornard I, Nguyen-the C, Broussolle V, Brillard J. The CasKR two-component system is required for the growth of mesophilic and psychrotolerant *Bacillus cereus* strains at low temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(8): 2493–2503. [DOI]
- [10] Diomandé SE, Doublet B, Vasai F, Guinebretière MH, Broussolle V, Brillard J. Expression of the genes encoding the CasK/R two-component system and the DesA desaturase during *Bacillus cereus* cold adaptation. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(16): fnw174. [DOI]
- [11] Esbelin J, Armengaud J, Zigha A, Dupont C. ResDE-Dependent regulation of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus*: evidence for multiple modes of binding for ResD and interaction with Fnr. *J Bacteriol*, 2009, 191(13): 4419–4426. [DOI]
- [12] Brillard J, Susanna K, Michaud C, Dargaignaratz C, Gohar M, Nielsen-Leroux C, Ramarao N, Kolstø AB, Nguyen-the C, Lereclus D, Broussolle V. The YvFTU two-component system is involved in *plcR* expression in *Bacillus cereus*. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 183. [DOI]
- [13] Dhiman A, Bhatnagar S, Kulshreshtha P, Bhatnagar R. Functional characterization of WalRK: a two-component signal transduction system from *Bacillus anthracis*. *FEBS Open Bio*, 2014, 4: 65–76. [DOI]
- [14] Peng Q, Wu JB, Chen XM, Qiu LL, Zhang J, Tian HT, Song FP. Disruption of two-component system LytSR affects forespore engulfment in *Bacillus thuringiensis*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 468. [DOI]
- [15] De Been M, Francke C, Moezelaar R, Abee T, Siezen RJ. Comparative analysis of two-component signal transduction systems of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis*. *Microbiology*, 2006, 152(10): 3035–3048. [DOI]
- [16] Schünemann R, Knaak N, Fiuza LM. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *ISRN Microbiol*, 2014, 2014: 135675. [DOI]
- [17] Bravo A, Likitvatanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol*, 2011, 41(7): 423–431. [DOI]
- [18] Ogura M, Tanaka T. Recent progress in *Bacillus subtilis* two-component regulation. *Front Biosci*, 2002, 7: d1815–d1824. [DOI]
- [19] Stobdan T, Kaur S, Singh A. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(14): 1153–1156. [DOI]
- [20] Lereclus D, Arantès O, Chaufaux J, Lecadet M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, 51(1): 211–217. [DOI]
- [21] Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(8): 2351–2359. [DOI]
- [22] Van Tilbeurgh H, Le Coq D, Declerck N. Crystal structure of an activated form of the PTS regulation domain from the LicT transcriptional antiterminator. *EMBO J*, 2001, 20(14): 3789–3799. [DOI]