

研究报告

苏云金芽胞杆菌 CcpA 蛋白对几丁质酶基因 *chiA* 和 *chiB* 的表达调控作用

潘锦华¹ 姜昆¹ 汪婷婷¹ 陈月华^{1,2,3} 蔡峻^{1,2,3*}

- (1. 南开大学生命科学学院 微生物系 天津 300071)
(2. 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)
(3. 天津市微生物功能基因组学重点实验室 天津 300071)

摘要:【目的】研究苏云金芽胞杆菌 Bti75 中糖代谢蛋白 CcpA 对两种几丁质酶基因 *chiA* 和 *chiB* 的表达调控。【方法】利用 PREDetector 软件分析 Bti75 *chiA* 和 *chiB* 的基因上游区序列, EMSA 方法在体外验证 CcpA 是否能与 *chiA* 和 *chiB* 基因的启动子区域片段特异性结合。构建 *ccpA* 基因敲除载体以获得敲除突变株 $\Delta ccpA$, 运用实时荧光定量 PCR 技术和 Western blot 技术比较有无葡萄糖存在的情况下, CcpA 对 *chiA* 和 *chiB* 基因表达的影响。【结果】计算机分析显示, *chiB* 上游启动子区存在一个潜在的 CcpA 结合位点 *cre_{chiB}*, 而 *chiA* 上游启动子区未发现类似序列。体外实验表明, CcpA 蛋白在共阻遏蛋白 Hpr-Ser₄₅-P 的参与下可与 *chiB* 基因启动子区特异性结合, 而与 *chiA* 基因启动子区没有特异性结合; 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果均显示, Bti75 中 *ccpA* 基因敲除后, 同样在葡萄糖存在下 *chiB* 的表达量提高而 *chiA* 的表达量变化不明显。【结论】在葡萄糖存在的情况下, CcpA 蛋白能抑制苏云金芽胞杆菌中几丁质酶 *chiB* 的表达, 而 *chiA* 的表达不受 CcpA 调控。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, CcpA 蛋白, 几丁质酶, 表达调控

Regulation effect of CcpA on chitinase gene *chiA* and *chiB* in *Bacillus thuringiensis*

PAN Jin-Hua¹ JIANG Kun¹ WANG Ting-Ting¹ CHEN Yue-Hua^{1,2,3} CAI Jun^{1,2,3*}

- (1. Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)
(2. Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Tianjin 300071, China)
(3. Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Objective] Purpose of this work was to research the regulation effect of catabolite control protein A (CcpA) on chitinase gene *chiA* and *chiB* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 75 (Bti75). [Methods] We used the PREDetector software program to analyze the upstream regulatory region of *chiA* and *chiB* in Bti75, in addition, specific binding of CcpA protein to the promoter region

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31371979); Natural Science Foundation of Tianjin (No. 15JCYBJC30200)

*Corresponding author: Tel: 86-22-23505964; E-mail: caijun@nankai.edu.cn

Received: June 05, 2015; Accepted: July 20, 2015; Published online (www.cnki.net): September 09, 2015
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31371979); 天津市自然科学基金项目(No. 15JCYBJC30200)

*通讯作者: Tel: 86-22-23505964; E-mail: caijun@nankai.edu.cn

收稿日期: 2015-06-05; 接受日期: 2015-07-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-09-09

of *chiA* and *chiB* was determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). In order to acquire *ccpA* deletion mutant $\Delta ccpA$, we constructed a *ccpA* knockout vector. Then, the influence of CcpA to *chiA* and *chiB* in Bti75 strains with and without glucose was detected by quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and Western blot. **[Results]** PREDetector software program analysis showed that there is a potential CcpA binding site *cre_{chiB}* in the promoter region of the *chiB*, while the similar site is not found in the *chiA* promoter region. *In vitro*, CcpA could bind specifically to the *chiB* promoter with the assist of Hpr-Ser₄₅-P, but the binding of CcpA to *chiA* promoter is non-specific. The results of qRT-PCR and western blot revealed that *ccpA* deletion led to a significantly increased expression of *chiB*, however, the change of *chiA* expression was not obvious. **[Conclusion]** The expression of *chiB* not *chiA* in Bti75 was negative controlled by CcpA in the presence of glucose.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, CcpA, Chitinase, Expression regulation

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)产生的几丁质酶(Chitinase)可以水解几丁质, 具有抑制真菌生长和明显的杀虫增效作用; 而几丁质水解产生的几丁单糖(GlcNAc)以及分子大小不等的几丁寡糖[(GlcNAc)_n], 广泛参与细菌碳源和氮源的代谢。

多种微生物在进化过程中形成了严格而复杂的几丁质酶表达调控机制, 但对其基因的表达调控机制知之甚少。本实验室分离得到的 Bti75 具有 *chiA* 和 *chiB* 两种几丁质酶基因, 且它们的表达产物都是典型的诱导酶; 而在 Bti75 培养基中加入葡萄糖后, 其几丁质酶活性显著降低。因此, 我们推测几丁质酶基因的表达调控中可能涉及分解代谢物阻遏 (CCR) 效应。

CcpA 属于 LacI-GalR 转录因子家族^[1], 含 PTS 系统的低 GC 含量革兰氏阳性菌大部分以 CcpA 依赖的 CCR 效应进行碳源代谢的调控, 且这些 CcpA 蛋白具有较高的保守性^[2]。CcpA 的结合位点为 *cre*, 枯草芽胞杆菌中 *cre* 序列为 TGWAARCGYTWNCW, 与其他微生物中的 *cre* 序列相似^[3]。后续相关研究表明, 在大多数情况下 CcpA 与 *cre* 位点的结合需要共阻遏蛋白 HPr-(Ser)-P 的参与^[4-5]。Hpr (Histidine-phosphoryl protein) 是约 10 kD 的小分子量蛋白^[6], 有组氨酸残基和丝氨酸残基两个磷酸化位点, 该蛋白的组氨酸残基在负责葡萄糖转运的 PTS 系统中 EI 的催化下进行磷酸化, 并将磷传递给 PTS 系统, 丝氨酸残基

随后在 Hpr 激酶/磷酸酯酶 HPrK/P (Hpr kinase/phosphoesterase)^[7] 的催化下被磷酸化形成 HPr-(Ser)-P, 与转录调控因子 CcpA 形成复合体, 参与 CCR 效应^[8-9]。本研究拟通过 EMSA 验证 Bti75 中几丁质酶是否也受 CcpA 调控以及 HPr-(Ser)-P 是否参与这一调控, 并通过 qRT-PCR、Western blot 检测 *ccpA* 敲除株和野生株在速效碳源-葡萄糖存在下 *chiA* 和 *chiB* 表达量的变化, 来初步探究 CcpA 对几丁质酶基因的调控作用。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

苏云金芽胞杆菌科以色列亚种 75 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 Bti75), 本实验室保藏。*Escherichia coli* BL21(DE3)、*E. coli* DH5 α 、pET28a 和 pKSV7 载体均由本实验室保藏; pHT315 来自法国巴斯德所。

1.2 主要试剂

PCR 扩增试剂(*Taq plus* DNA 聚合酶, dNTPs)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR 产物纯化、DNA 胶回收纯化试剂盒、柱式质粒提取试剂盒及 Total DNA 提取试剂盒、增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒以及标准 DNA 分子 Marker II、Marker III、Marker IV、Marker VII 及蛋白 Marker 均购自天根生物公司; 限制性内切酶、T4 连接酶、RNA 提取及反转录所用试剂、Real-Time PCR 试剂: SYBR Premix Ex*Taq* (Perfect Real Time)均购自 TaKaRa (大连)公司; 生物素标记显色试剂盒购自

Thermo fisher 公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表 1。

1.3 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.2-7.4; 基本检测培养基 S (g/L): (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 18.2, KH₂PO₄ 6.0, Na-citrate 1.0, MgSO₄ 0.2, 酵母浸粉 5.0, pH 7.4; 葡萄糖培养基(G): 在 S 中加入 1%葡萄糖。Bti 菌株于 30 °C

培养, *E. coli* 于 37 °C 培养。

1.4 蛋白的表达纯化及多克隆抗体的制备

提取 Bti75 菌株的总 DNA, 将 *ccpA* (*CcpA*-F/R)、*chiA* (*ChiA*-F/R)、*chiB* (*ChiB*-F/R)、*hpr* (*Hpr*-F/R)和 *hprK* (*Hprk*-F/R)基因全长进行 PCR 扩增, 通过酶切位点插入 pET28α 质粒中, 转化感受态 *E. coli* BL21(DE3), 挑取阳性单克隆菌落扩大培养, PCR 及双酶切鉴定后, 阳性克隆送生工生物工

表 1 本研究所用的引物
Table 1 The primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')
<i>erm</i> -F	CTGGT <u>CGAC</u> GCAAACCTTAAGAGTGTGT
<i>erm</i> -R	CGCTCTAGAGACCTCTTTAGCTTCTTG
<i>CcpA</i> up-F	TCAGGTACCTTAAACGAAAGAGGTCGTCTCG
<i>CcpA</i> up-R	CGCTCTAGATTTCATCTCATCGCACACTCCTT
<i>CcpA</i> down-F	TCTGT <u>CGAC</u> CGTATCCAATTTAGAGATTCAACG
<i>CcpA</i> down-R	CCGCTGCAGAGGTAAGCTATATACTAGGGAGGATT
<i>CcpA</i> -F	TCGCCATGGTAATGAACGTAACAATCTATGATGTAG
<i>CcpA</i> -R	CGCCTCGAGTTTCGTTGAATCTCTAAATTGGAT
<i>Hpr</i> -F	CTGCCATGGTCATGGAAAAATCTTTAAAGTAACT
<i>Hpr</i> -R	CATCTCGAGTTCTCCTAATCCTTCGTTTTTTCAT
<i>Hprk</i> -F	CGGCCATGGGTATGAAATGTTTTTTTCTATT
<i>Hprk</i> -R	ATCTCGAGTATCTCCTGATCCCTAACTCAATCGC
<i>ChiA</i> -F	AACCATGGACATGTTAAACAAGTTCAAATT
<i>ChiA</i> -R	AACTCGAGTTTTTGAAGGAAAGAGTATC
<i>ChiB</i> -F	CGCGAATTCATGAGGTCTCAAAAATTCACACTG
<i>ChiB</i> -R	GA <u>ACTCGAG</u> CTAGTTTTTCGCTAATGACGGCATT
P16SrRNA-RT-F	GCCGTAACGATGAGTGCTAAGTG
P16SrRNA-RT-R	TGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTA
<i>PchiA</i> -RT-F	TAGCGGATTGGAATGGACG
<i>PchiA</i> -RT-R	CCTACAGGAAAACCATGTAAGAGCA
<i>PchiB</i> -RT-F	GCCGCTGATGAAAAGACAAGA
<i>PchiB</i> -RT-R	TTCCAGTCTAAATCTACGCCA
<i>PchiA</i> -F	TTATCCAACCTTGTACATCCC
<i>PchiA</i> -R	CCTATACAAAAAGTTGTCTAGATGTAT
<i>PchiA</i> -R(B)	CCTATACAAAAAGTTGTCTAGATGTAT (5'biotin)
<i>Pcre_{chiB}</i> -F	TTTTTCAACTTAATAAAGCGTTTACACTAAATCTTACATT
<i>Pcre_{chiB}</i> -R	AATGTAAGATTTAGTGTAACGCTTTATTAAGTTGAAAAA
<i>Pcre_{chiB}</i> -R(B)	AATGTAAGATTTAGTGTAACGCTTTATTAAGTTGAAAAA (5'biotin)

程(上海)股份有限公司测序。

重组蛋白利用蛋白C端的His标签与Ni柱亲和性, 纯化CcpA、ChiA、ChiB、Hpr及HprK蛋白, 诱导条件为: IPTG 终浓度为1.0 mmol/L, 25 °C、120 r/min诱导培养6 h。纯化条件为: 分别用20、40、60、80、500 mmol/L洗脱液进行目的蛋白的洗脱, 测定蛋白浓度, 12% SDS-PAGE电泳分析。

纯化后的ChiA和ChiB蛋白送去北京华大蛋白质有限公司制备兔抗多克隆抗体。

1.5 Hpr-Ser₄₅-P的制备

将20 μmmol/L的Hpr和1 μmmol/L的HprK一同加入反应体系中, 反应液中含有10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L二硫苏糖醇, 5%甘油, 2 mmol/L ATP, 20 mmol/L果糖-1,6-二磷酸(FBP), 37 °C反应30 min后, 于70 °C孵育5 min终止反应。

1.6 EMSA验证CcpA蛋白与*chiA*和*chiB*启动子区域的结合

EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)实验首先以Bti75菌株总DNA为模板PCR扩增270 bp的*chiA*启动子区域DNA片段*PchiA* [以*PchiA*-F、*PchiA*-R 或 *PchiA*-R(B)为引物]。引物 *Pcre_{chiB}*-F 和 *Pcre_{chiB}*-R [或 *Pcre_{chiB}*-R(B)]退火获得包含*chiB*启动子区潜在 *cre* 位点的40 bp DNA片段 *Pcre_{chiB}*, 分别与CcpA蛋白一同加入至反应体系中, 反应液中含有10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L二硫苏糖醇, 0.5 mmol/L EDTA, 5%甘油, 如需要再分别加入Hpr或Hpr-Ser₄₅-P, 混合后37 °C反应30 min, 凝胶电泳后紫外成像。在CcpA与生物素标记的启动子区域片段的特异性竞争结合实验中, 再分别加入鲑鱼精DNA(非特异性竞争)和100倍、200倍的未用生物素标记的启动子区域片段(特异性竞争), 凝胶电泳后转至尼龙膜, 利用生物素标记显色试剂盒显色。

1.7 构建*ccpA*基因敲除载体

设计引物 *erm*-F/R, 以pHT315质粒为模板PCR扩增包括启动子和终止子的红霉素抗性基因表达

框, 获得 *erm* 基因片段。以 *Bacillus thuringiensis* HD789 基因组(GenBank: CP003763.1)为模板设计引物 *ccpA*up-F/R、*ccpA*down-F/R, 以Bti75总DNA为模板PCR扩增*ccpA*基因上、下游各1 kb左右DNA片段, 将纯化后的PCR片段与pKSV7空载体通过酶切、酶连反应构建成*erm*基因在中间, *ccpA*基因上下游DNA片段位于两边的重组质粒。将重组质粒转入*E. coli* DH5α感受态, 筛选阳性克隆, 提质粒进行双酶切及测序鉴定, 鉴定正确的质粒命名为pKSV-ued。

1.8 *ccpA*基因敲除株Δ*ccpA*的构建及鉴定

通过电转化将重组质粒pKSV-ued转入Bti75菌株中, 利用同源重组原理将*ccpA*基因替换为红霉素抗性基因, 再利用pKSV7质粒温度敏感的特点, 42 °C消除质粒, 最终在红霉素抗性下生长而在含氯霉素的培养基中不生长的即为疑似Δ*ccpA*敲除株, PCR及酶切鉴定敲除株。初步鉴定正确后送上海生工有限公司测序以进一步明确。

1.9 实时荧光定量PCR检测*chiA*和*chiB*mRNA的表达量

Trizol法分别提取Bti75和Bti75Δ*ccpA*细菌的总RNA, 以其为模板, Oligo dT为引物, 逆转录制备Bti75和Bti75Δ*ccpA*的cDNA。反应条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。利用所制备的cDNA为模板, 以16S rRNA基因作为内参, 实时定量荧光PCR分别检测*chiA*、*chiB*的表达量。所使用引物序列见表1。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共40个循环。

1.10 Western blot检测ChiA和ChiB蛋白

活化后的Bti75、Bti75Δ*ccpA*菌株按1%分别接种至50 mL S和G培养基中, 于30 °C、200 r/min培养9 h, 离心收集菌体, 破碎细胞, 收集上清, 经12% SDS-PAGE分离后, 转移至PVDF膜上, 于含5%脱脂奶粉的PBST室温封闭2 h; 加入兔抗ChiA一抗(1:2 000稀释), 4 °C孵育过夜; 0.05% PBST洗膜4次, 每次15 min; 加入HRP标记的羊抗兔二抗(1:5 000稀释), 37 °C孵育45 min; 0.05%

PBST洗膜4次,每次15 min;利用增强型HRP-DAB底物显色试剂盒显色分析;ChiB蛋白的检测同上。

2 结果与分析

2.1 预测 CcpA 蛋白参与几丁质酶 *chiB* 的调控

前期研究表明, Bti75 菌株 *chiA* 和 *chiB* 的基因及启动子区域与 *Bacillus thuringiensis* HD789 菌株中的完全一致^[10-11]。据此, 利用 Fujita^[12]所收集的枯草芽胞杆菌的中的 *cre* 位点, 通过 PREDetector 软件^[13]预测发现 Bti75 菌株几丁质酶基因 *chiB* 上游启动子区存在一个潜在的 *cre* 位点 *cre_{chiB}* (5'-TGTAACGCTTTAT-3'), 与枯草芽胞杆菌中 *cre* 一致序列 TGWAARCGYTWNCW^[3]高度类似, 如图 1 所示。同时并未在 *chiA* 上游启动子区发现类似的 *cre* 位点。因此, 我们推测 *chiB* 可能受到 CcpA 的调控, 而 *chiA* 并不受到 CcpA 的调控。

2.2 EMSA 验证 CcpA 蛋白与 *chiA* 和 *chiB* 启动子片段的特异性结合

通过EMSA非特异性竞争结合实验和特异性竞争结合实验来检测CcpA能否特异性结合于*PchiA*和*Pcre_{chiB}*。CcpA (0.5 μmol/L)与生物素标记的*Pcre_{chiB}* (0.1 μmol/L)的反应中分别加入0.5 mg/L鲑鱼精DNA (非特异性竞争, 图2A)和100倍、200倍的未用生物素标记的*Pcre_{chiB}* (特异性竞争, 图2B)。如图2A

所示, 鲑鱼精DNA可以完全的解除掉CcpA单独(泳道3)以及加入Hpr后(泳道5)与*Pcre_{chiB}*的结合; 而加入了Hpr-Ser₄₅-P的反应中CcpA仍然有明显的阻滞条带(泳道4)。在特异性竞争过程中(图2B), 当加入200倍未标记的*Pcre_{chiB}*时, 加入Hpr-Ser₄₅-P的反应中的阻滞条带消失(泳道6), 而加入了Hpr的CcpA与*Pcre_{chiB}*的反应中仍有较为明显的阻滞条带(泳道3、4)。结果表明CcpA自身可以非特异性的与*Pcre_{chiB}*结合, 且在Hpr-Ser₄₅-P的辅助下CcpA可以特异性的与*Pcre_{chiB}*发生结合。

如图 2C 所示, 反应中加入了 0.5 mg/L 鲑鱼精 DNA, 结果发现在 CcpA 与 *PchiA* 的反应中无论是 CcpA (泳道 3)自身还是加入了 Hpr-Ser₄₅-P (泳道 4)或 Hpr (泳道 5), 鲑鱼精 DNA 都可以竞争掉 CcpA 与 *PchiA* 的结合, 从而证明 CcpA 与 *PchiA* 之间的反应为非特异性反应。

2.3 *ccpA* 基因缺失对 *chiA* 和 *chiB* 的 mRNA 表达量的影响

qRT-PCR 结果如图 3 所示, 无论是在基本培养基(S)还是在葡萄糖培养基(G)中, *chiA* 基因的 mRNA 表达量在野生株 Bti75 中和敲除株 $\Delta ccpA$ 中均无显著差异(图 3A)。如图 3B 显示, 就 *chiB* 的 mRNA 水平而言, 基本培养基(S)中的野生株 Bti75、

```

TTCCTCCCATACCGACCTTTCGTTTTTCATATATAGTTTTGTATTCAAGCCT 50
TTTTGTATTGAGAAAGTCTTTTTCAACTTAATAAAGCGTTTACACTAAAT 100
CTTACATTTGTTACGATTTAATCACCCCAAGCTCCCTTGTATAGACTTCG 150
TGATGTCTGATCATTTTATCTAGACGTTTCATACGTCTAGATTCATTTTG 200
ATTTATTGGCGTATGCCTTTAAATATATCTTTTATTTTGAAAGGAGAAAT 250
GGCTATGAGGTCTCAAAAATTACACTGCTATTACTATCTCTACTACTTT 300
TCTTACCTCTTTTTCTCACAAATTTTATTACTCCAAATCTCGCATTAGCA 350

```

图 1 *chiB* 上游启动子区域序列

Figure 1 Sequence of the *chiB* upstream region

注: 下划线标注的为核心启动子; 矩形框内为-10区和-35区; 粗体表示 *cre* 位点; 转录起始位点以圆点标记; 起始密码子标记粗下划线。

Note: The minimal promoter region is underlined with fine lines; Bounding box represent the -10 box and -35 box; The *cre* sequence is marked by bold; The transcription start site is in dot; The start codon is underlined with bold lines.

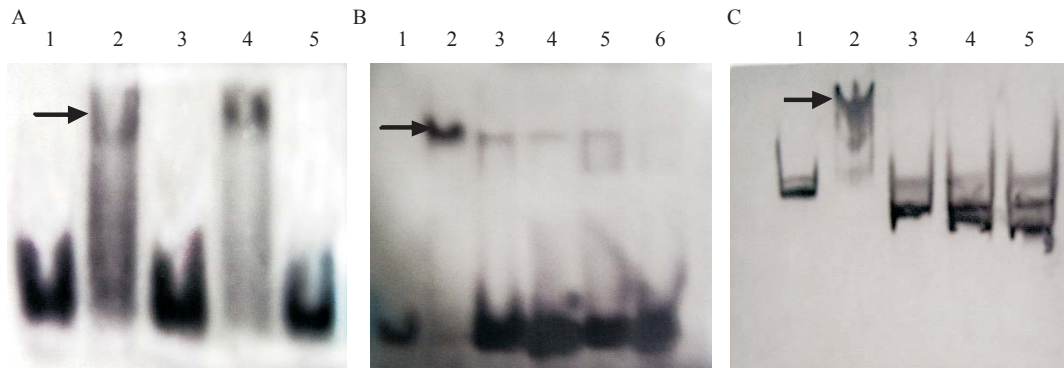


图2 EMSA验证CcpA与*chiA*和*chiB*启动子片段的结合

Figure 2 EMSA to determine the specific binding of CcpA with *cre*

注：A 和 B：CcpA (0.5 μmol/L)与 *PcrechiB* (0.1 μmol/L)的非特异性竞争结合和特异性竞争结合。A：1: *PcrechiB* (Bio); 2: *PcrechiB* (Bio)+CcpA; 3: *PcrechiB* (Bio)+CcpA+0.5 mg/L 鲑精 DNA; 4 及 5: *PcrechiB* (Bio)+CcpA+0.5 mg/L 鲑精 DNA+ 2 μmol/L Hpr-Ser₄₅-P 或 2 μmol/L Hpr。B：1: *PcrechiB* (Bio); 2: *PcrechiB* (Bio)+CcpA; 3 及 4: *PcrechiB* (Bio)+CcpA+Hpr+100 倍或 200 倍未标记 *PcrechiB*, 5 及 6: *PcrechiB* (Bio)+CcpA+ Hpr-Ser₄₅-P+100 倍或 200 倍未标记 *PcrechiB*。C：CcpA (0.5 μmol/L)和 *PchiA* (0.1 μmol/L)的非特异性竞争结合；1: *PchiA* (Bio); 2: *PchiA* (Bio)+CcpA; 3: *PchiA* (Bio)+CcpA+0.5 mg/L 鲑精 DNA; 4 和 5: *PchiA* (Bio)+CcpA+0.5 mg/L 鲑精 DNA+2 μmol/L Hpr-Ser₄₅-P 或 2 μmol/L Hpr；箭头所示为阻滞带。

Note: A and B: Non-specific and specific competition assays of CcpA (0.5 μmol/L) with *PcrechiB* (0.1 μmol/L). A: 1: *PcrechiB* (Bio); 2: *PcrechiB* (Bio) and CcpA; 3: *PcrechiB* (Bio), CcpA, and 0.5 mg/L Salmon-sperm-DNA; 4 and 5: *PcrechiB* (Bio), CcpA, and 0.5 mg/L Salmon-sperm-DNA plus 2 μmol/L Hpr-Ser₄₅-P and 2 μmol/L Hpr respectively. B: 1: *PcrechiB* (Bio); 2: *PcrechiB* (Bio) and CcpA; 3 and 4: *PcrechiB* (Bio), CcpA and Hpr plus 100- and 200-fold excess unlabeled *PcrechiB* respectively; 5 and 6: *PcrechiB* (Bio), CcpA and Hpr-Ser₄₅-P plus 100- and 200-fold excess unlabeled *PcrechiB* respectively. C: Non-specific competition assays of CcpA (0.5 μmol/L) with *PchiA* (0.1 μmol/L); 1: *PchiA* (Bio); 2: *PchiA* (Bio) and CcpA; 3: *PchiA* (Bio), CcpA, and 0.5 mg/L Salmon-sperm-DNA; 4 and 5: *PchiA* (Bio), CcpA, and 0.5 mg/L Salmon-sperm-DNA plus 2 μmol/L Hpr-Ser₄₅-P and 2 μmol/L Hpr respectively. The arrows indicate retarded bands.

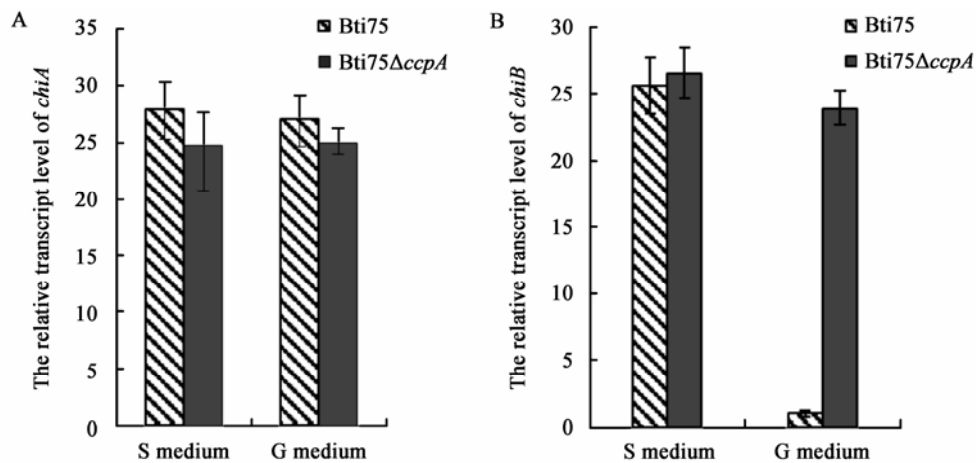


图3 Bti75和Bti75ΔccpA中*chiA* (A)和*chiB* (B)的mRNA表达量

Figure 3 qRT-PCR analysis of the relative transcript level of gene *chiA* (A) and *chiB* (B) of Bti75 and Bti75ΔccpA strains in different mediums

敲除株 $\Delta ccpA$ 以及葡萄糖培养基(G)中的敲除株 $\Delta ccpA$ 这三者均无显著差异;而葡萄糖培养基(G)中 Bti75 *chiB* 的 mRNA 水平显著低于其余三者。

2.4 Western blot 检测 ChiA 和 ChiB 蛋白含量

如图 4A 显示, Bti75 和 Bti75 $\Delta ccpA$ 在 S 和 G 培养基中, ChiA 蛋白的表达量都相差不明显。如图 4B 所示, Bti75 菌株在 G 培养基中, ChiB 蛋白的表达量极少, *ccpA* 基因敲除后, ChiB 的量明显上升, 与在 S 基本培养基中基本一致。Western blot 结果与 qRT-PCR 结果基本一致, 都显示 CcpA 对 *chiB* 基因的负调控。

3 讨论

Heravi等推测短小芽胞杆菌中几丁质酶基因是受碳分解代谢物阻遏的控制^[14], 一般来说, 在低GC含量的革兰氏阳性菌, 如枯草芽胞杆菌中, 发挥CCR作用的关键调节蛋白是CcpA。以往学者发现, CcpA与调控基因的启动子序列结合的保守序列为*cre*序列^[15], 并且在大多数情况下, CcpA与*cre*位点的结合需要共阻遏蛋白Hpr-(Ser)-p的参与^[4-5]。后续研究表明, 当葡萄糖等速效碳源存在时, 胞内ATP及FBP水平的升高激活HprK/P的激酶活性, 将Hpr丝氨酸残基磷酸化, HPr-(Ser)-P与CcpA形成复合

物, 与非速效碳源代谢基因的*cre*位点结合, 抑制其转录^[5,16]。但具体在苏云金芽胞杆菌中的CCR效应, 目前尚无研究报道。

本研究结果显示, 转录因子CcpA蛋白确实能与*chiB*基因上游启动子序列发生特异性的结合, 且Hpr-Ser₄₅-P起到辅助作用, 这说明CcpA可能对苏云金芽胞杆菌*chiB*基因具有调控作用。进一步的研究证实了这一点: 我们将*ccpA*基因敲除后, 在葡萄糖存在的情况下, *chiB*基因的mRNA表达显著升高, ChiB蛋白表达量也显著提高, 解除了葡萄糖的CCR效应。这些结果证实了CcpA对*chiB*合成的负调控作用, CcpA通过与*chiB*基因座启动子区*cre*位点结合, 抑制*chiB*基因的转录, 从而使ChiB的合成量降低。对于*chiA*而言, 研究结果显示其基因座启动子区不存在*cre*位点, CcpA蛋白与*chiA*的启动子区结合为非特异性结合, Hammar等提出转录因子特异性结合其靶序列是通过在序列上可滑动地非特异结合在其特异性的位点^[17], 这可以在某些方面解释CcpA与*chiA*启动子区的非特异性结合。后续通过qRT-PCR和Western blot实验更进一步证实*chiA*基因不受CcpA蛋白的调控。

我们实验室前期研究发现, 苏云金芽胞杆菌 Bti75中ChiA分子量大约36 kD, 为外切几丁质酶;

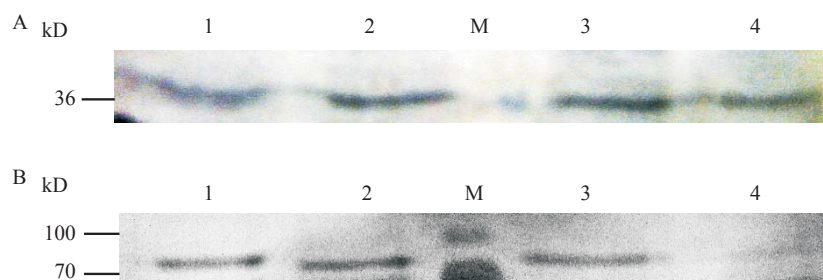


图 4 Western blot检测ChiA和ChiB的含量

Figure 4 Western blotting to show the expression level of *chiA* and *chiB* in Bti75 and Bti75 $\Delta ccpA$

注: M: Marker. A: Bti75 和 Bti75 $\Delta ccpA$ 在 S 和 G 培养基中 ChiA 的含量; 1 和 2: Bti75 $\Delta ccpA$ 和 Bti75 分别在 S 培养基中; 3 和 4: Bti75 $\Delta ccpA$ 和 Bti75 分别在 G 培养基中. B: Bti75 和 Bti75 $\Delta ccpA$ 在 S 和 G 培养基中 ChiB 的含量; 1 和 2: Bti75 $\Delta ccpA$ 和 Bti75 分别在 S 培养基中; 3: Bti75 $\Delta ccpA$ 在 G 培养基中; 4: Bti75 在 G 培养基中。

Note: M: Marker. A: The expression level of the *chiA* of Bti75 and Bti75 $\Delta ccpA$ in the S medium and G medium; 1 and 2: Bti75 $\Delta ccpA$ and Bti75 in the S medium respectively; 3 and 4: Bti75 $\Delta ccpA$ and Bti75 in the G medium respectively. B: The expression level of the *chiB* of Bti75 and Bti75 $\Delta ccpA$ in the S medium and G medium; 1 and 2: Bti75 $\Delta ccpA$ and Bti75 in the S medium respectively; 3: Bti75 $\Delta ccpA$ in the G medium; 4: Bti75 in the G medium.

ChiB分子量达70 kD, 为内切几丁质酶; 而且, ChiA和ChiB的表达均受YvoA蛋白的抑制, 而几丁质的降解产物可以解除YvoA的抑制作用^[18-20]。在环境中没有几丁质诱导的情况下, 受YvoA的抑制, *chiA*和*chiB*基因都不表达。如果同时存在几丁质和葡萄糖, YvoA的抑制被解除, 而大分子量的ChiB蛋白表达仍被CcpA抑制, 小分子量的ChiA蛋白基因被诱导激活, 产生的ChiA可发挥其外切酶活性切割几丁质为氨基糖, 可参与氮源代谢、合成细胞壁等。一旦葡萄糖缺乏时, CcpA解除对*chiB*的抑制作用, 大量合成ChiB, 与ChiA共同作用, 大量、高效地切割环境中的几丁质为各种几丁寡糖。这样, 在环境中速效碳源不足时, 有利于苏云金芽胞杆菌迅速利用几丁质, 在营养竞争中处于优势地位。我们认为CcpA对*chiB*具有抑制作用, 而不调控*chiA*的表达使得Bti75更能适应复杂多变的自然环境。

本研究从计算机预测(*In silico*)、EMSA的离体(*In vitro*)实验和基因敲除后对活体(*In vivo*)的影响(qRT-PCR和Western blot检测)三方面探索了CcpA蛋白对苏云金芽胞杆菌几丁质酶基因*chiA*和*chiB*的调控作用, 有助于苏云金芽胞杆菌几丁质酶基因表达调节机理的阐明, 为充分利用苏云金芽胞杆菌中的功能蛋白提供新的依据。

参 考 文 献

- [1] Henkin TM, Grundy FJ, Nicholson WL, et al. Catabolite repression of α -amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors[J]. *Molecular Microbiology*, 1991, 5(3): 575-584
- [2] Wu Y, Gu Y, Ren C, et al. Recent research on catabolite control protein A in microorganisms[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(9): 882-890 (in Chinese)
吴艳, 顾阳, 任聪, 等. 微生物分解代谢物控制蛋白 CcpA 的研究进展[J]. *生命科学*, 2011, 23(9): 882-890
- [3] Stülke J, Hillen W. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus species*[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 849-880
- [4] Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, et al. Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HPrK[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(22): 7826-7839
- [5] Meyer FM, Jules M, Mehne FM, et al. Malate-mediated carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis* involves the HPrK/CcpA pathway[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(24): 6939-6949
- [6] Khan SR, Deutscher J, Vishwakarma RA, et al. The *ptsH* gene from *Bacillus thuringiensis israelensis*. Characterization of a new phosphorylation site on the protein HPr[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(3): 521-530
- [7] Boël G, Mijakovic I, Mazé A, et al. Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2003, 5(4): 206-215
- [8] Schumacher MA, Seidel G, Hillen W, et al. Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1, 6-bisphosphate[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 368(4): 1042-1050
- [9] Zeng L, Burne RA. Seryl-phosphorylated HPr regulates CcpA-independent carbon catabolite repression in conjunction with PTS permeases in *Streptococcus mutans*[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(5): 1145-1158
- [10] Xie CC, Luo Y, Chen YH, et al. Construction of a promoter-probe vector for *Bacillus thuringiensis*: the identification of *cis*-acting elements of the *chiA* locus[J]. *Current Microbiology*, 2012, 64(5): 492-500
- [11] Xie CC, Shi J, Jia HY, et al. Characterization of regulatory regions involved in the inducible expression of *chiB* in *Bacillus thuringiensis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2015, 197(1): 53-63
- [12] Fujita Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(2): 245-259
- [13] Hiard S, Marée R, Colson S, et al. PREDetector: a new tool to identify regulatory elements in bacterial genomes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 357(4): 861-864
- [14] Heravi KM, Shali A, Naghibzadeh N, et al. Characterization of *cis*-acting elements residing in the chitinase promoter of *Bacillus pumilus* SG2[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(5): 1491-1499
- [15] Ishii H, Tanaka T, Ogura M. The *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is positively regulated by CcpA and by catabolite-repressed synthesis of ClpC[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(2): 193-201
- [16] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 613-624
- [17] Hammar P, Leroy P, Mahmutovic A, et al. The *lac* repressor displays facilitated diffusion in living cells[J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1595-1598
- [18] Liu D, Cai J, Xie CC, et al. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(3/4): 252-256
- [19] Liu D, Chen YH, Cai J, et al. Chitinase B from *Bacillus thuringiensis* and its antagonism and insecticidal enhancing potential[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 49(2): 180-185 (in Chinese)
刘东, 陈月华, 蔡峻, 等. 苏云金芽胞杆菌几丁质酶B特性及其杀虫抑真菌的作用[J]. *微生物学报*, 2008, 49(2): 180-185
- [20] Li LN, Zhang L, Yang XC, et al. YvoA acts as a negative transcription regulator of chitinase genes in *Bacillus thuringiensis*[Z]. <http://www.paper.edu.cn> (in Chinese)
李丽娜, 张琳, 杨晓晨, 等. YvoA 蛋白抑制苏云金杆菌 *chi* 基因的表达[Z]. 中国科技论文在线. <http://www.paper.edu.cn>