

苏云金芽胞杆菌 CT-43 内生质粒 pBMB0558 上 *virD4* 基因的功能

陈慧杰 刘晓艳 曹诗云 阮丽芳 孙明

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 苏云金芽胞杆菌 CT-43 高产苏云金素, 其内生质粒 pBMB0558 上 *virD4* 基因编码的 VirD4 蛋白与 IV 型分泌系统中结合底物的偶合蛋白(T4CPs)高度同源。本研究利用插入缺失突变方法, 构建同源双交换载体, 敲除 CT-43 中的 *virD4* 基因, 得到 1 株突变株 BMB1122。HPLC 检测结果显示, 突变株 BMB1122 发酵上清液中未检测到苏云金素特征吸收峰; 进一步通过 LCMS-IT-TOF 飞行质谱检测突变株胞内代谢物, 结果显示其含有与苏云金素合成途径中的所有前体物分子质量相符的质荷比(m/z), 这与出发菌株 CT-43 的结果一致。初步推测, *virD4* 基因与苏云金素的分泌相关, *virD4* 基因的敲除影响苏云金素的分泌。

关键词 IV 型分泌系统; 基因敲除; 高效液相色谱; 苏云金素

中图分类号 Q 754 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0404-07

IV 型分泌系统 (type IV secretion systems, T4SSs) 最初由 Salmond 提出, 与细菌接合转移复合物相关的大分子转移系统称为 IV 型分泌系统^[1]。T4SSs 广泛存在于革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌、无细胞壁细菌和古菌中, 分泌的底物从单个的蛋白, 到蛋白-蛋白、蛋白-DNA 复合物, 是具有多样性的分泌系统^[2]。T4SSs 是由多个蛋白亚基组成的跨细胞膜结构^[3-4], 在细胞膜上形成一个分泌通道^[5-6]。T4SSs 中与底物结合的亚基称为底物受体或耦合蛋白(T4CPs), 由 *virD4* 基因编码。T4CPs 广泛分布在革兰氏阴性细菌和阳性细菌中, 属于 ATP 酶家族。一般说来, T4CPs 有 3 个结构域, 分别是 N-端转膜(TM)结构域、核苷酸结合结构域(NBD)和全 α 螺旋结构域(AAD)^[7]。T4CPs 含有保守的 Walker A 和 Walker B 模体结构, 分别用于结合底物和水解 ATP^[8-9], 除了保守的区域外, 这些蛋白质的长度存在较大的变异。菌株 CT-43 是笔者所在实验室分离筛选和保藏的具有高毒力的苏云金芽胞杆菌, 高产次生代谢产物苏云金素和未知的毒性物质 toxin-x。苏云金素(thuringiensin, Thu)是由某些苏云金芽胞杆菌产生的一种杀虫非特异性的小分子核苷类物质, 被分泌到细胞外; Thu 的相对分子质量

是 701, 可以通过高效液相色谱(HPLC)分离及质谱(MS)鉴定。笔者所在课题组前期研究克隆到了 Thu 的合成基因簇, 把合成 Thu 的一些相关基因定位于 CT-43 中的 1 个内生大质粒 pBMB0558 上, 并获得了该质粒全基因序列。基因注释发现 pBMB0558 中有 1 个类 IV 型分泌系统, 其中 3 个基因编码的蛋白质与 IV 型分泌系统中 VirB4、VirB11 及 VirD4 有很高的同源性^[10]。*virD4* 基因编码的蛋白 N-端有 2 个跨膜螺旋结构域, 具有保守的 Walker A 和 Walker B 模体, 和 T4CPs 高度同源。本研究利用插入缺失突变方法, 构建同源双交换载体, 敲除 CT-43 中的 *virD4* 基因以探究其功能。

1 材料与方法

1.1 材料

LB (Luria-Bertani) 培养基^[11]; 用于大肠杆菌和苏云金芽胞杆菌的培养; 选择培养基: 在 LB 培养基中加入相应的抗生素, 用于转化子的筛选或重组菌株的培养。除特殊说明外, 各种抗生素的使用终质量浓度为氨苄青霉素(ampicillin, Amp): 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 卡那霉素(kanamycin, Kan): 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 红霉素(erythromycin, Erm): 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

收稿日期: 2010-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970037)

陈慧杰, 硕士研究生, 研究方向: 芽胞杆菌分子生物学, E-mail: chjmoon@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 孙明, 博士, 教授, 研究方向: 微生物农药、芽胞杆菌分子生物学, E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

各种 DNA 限制性内切酶、T4 连接酶、普通 *Taq* DNA 聚合酶、*ExTaq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA 分子质量标准为 TaKaRa 公司(大连)和天根生物公司产品;DNA 凝胶回收为 V-gene (杭州)公司的 DNA Gel Extraction Kit;其他常规试剂采用进口分装或国产。本试验所用的菌株和质粒见表 1。

1.2 引物设计

PCR 反应所用的引物如表 2。

1.3 DNA 的常规体外操作与转化

DNA 的酶切、连接、去磷酸化和普通的 PCR 扩增均参照 Sambrook 等^[11]方法进行。大肠杆菌 $CaCl_2$ 感受态的制备与转化按照文献^[11]的方法进行;芽胞杆菌电转化感受态细胞的制备与转化方法参照文献^[13-14]的方法进行,电转化使用 Gene-

Pulser TM 电转化仪(Bio-Rad)。

1.4 突变株 BMB1122 的高效液相色谱检测

将活化后的突变株 BMB1122 和 CT-43 转接 LB 三角瓶,培养 24 h 后离心,分离上清液和细胞。细胞用 1 mol/L 的 NaCl 溶液和去离子水各洗 3 遍,洗涤过的细胞用液氮研磨,4 000 r/min 离心 5 min,保留上清液。利用有机溶剂丙酮-乙腈萃取法^[15]提取胞外上清液和胞内上清液中苏云金素。将沉淀溶于 50 μ L 流动相,取 10 μ L 用于 HPLC 的进样。将提取的苏云金素用 WATERS 高效液相色谱仪检测。色谱柱:安捷伦 C18 柱(25.0 cm \times 4.6 mm,5 μ m),进样量 10 μ L;检测波长 260 nm;流动相为 50 mmol/L KH_2PO_4 加 5%甲醇(用磷酸调 pH 至 3.0);流速 1 mL/min。

表 1 所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

名称 Name	特性 Characteristics	来源 Source
DH5 α	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	笔者所在实验室保存 Stored in our laboratory
CT-43	苏云金芽胞杆菌中华亚种产 3 种杀虫晶体蛋白且高产苏云金素 <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>chimensis</i> , produces three kind of crystal protein and highly produce thuringiensin	笔者所在实验室保存 Stored in our laboratory
BMB1121	CT-43 菌株,含质粒 pEMB1155 CT-43 strain,including plasmid pEMB1155	本研究 This study
BMB1122	CT-43 菌株中敲除 <i>virD4</i> 基因 Gene <i>virD4</i> knockout in CT-43 strain	本研究 This study
pMD18-T Vector	T/A 克隆载体 T/A clone plasmid;Amp ^r	TaKaRa 公司产品 TaKaRa product
pHT304-Ts	大肠杆菌-苏云金芽胞杆菌穿梭载体(芽胞杆菌中复制子为温度敏感型) Shuttle plasmid in <i>Escherichia coli</i> and <i>Bacillus thuringiensis</i> ; Amp ^r , Erm ^r , temperature-sensitive replicon in <i>Bacillus</i> ,6.8 kb	由笔者所在实验室构建 Constructed by our laboratory ^[12]
pEMB1155	<i>virD4</i> Leftkan ^r <i>virD4</i> Right 片段装载在 pHT304-Ts 的 <i>Sal</i> I/ <i>Eco</i> RI 位点 Left and right fragment of <i>virD4</i> gene loaded on pHT304-Ts' <i>Sal</i> I/ <i>Eco</i> RI sites	本研究 This study

表 2 PCR 扩增所用引物¹⁾

Table 2 Primers used for amplification

引物名称 Primers	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	用途 Functions
<i>virD4</i> Left1	CGGGTTCGACAATTATAGGAGAGTGAAG(<i>Sal</i> I)	用于扩增 <i>virD4</i> 基因左臂 Used to amplify <i>virD4</i> left fragment
<i>virD4</i> Left2	GCCCTCGAGACAGTTATCAATTGATCG(<i>Xho</i> I)	
<i>virD4</i> Right1	CGAGGATCCCTGATCGTAATGATTC(<i>Bam</i> HI)	用于扩增 <i>virD4</i> 基因右臂 Used to amplify <i>virD4</i> right fragment
<i>virD4</i> Right2	GCCGAATTCGTCCTGTGAAAGTAAC(<i>Eco</i> RI)	
D1.1	GGAAAGTAGAAAAGAAGCCT	
D1.2	TAACATAGTATCGACGGAG	突变株 BMB1122 中 <i>virD4</i> 基因敲除验证 Used to verify knocked <i>virD4</i> gene in the mutant BMB1122
D2.1	GCTATTTTTTGGACTTACTGGGGATC	
D2.2	CTCATAAAATCATCTTTCCCTCAC	
Kan1	CTCGAGTTTGAGGTGATAGGTAAGATT(<i>Xho</i> I)	
Kan2	GGATCCTTAGACATCTAAATCTAGGCA(<i>Bam</i> HI)	扩增 <i>kan^r</i> 基因 Used to amplify <i>kan^r</i> gene

1)下划线代表引物标记的酶切位点。Underlining bases are restriction sites in primers.

1.5 突变株 BMB1122 细胞内代谢物的质谱检测

同本文“1.4”中的方法,液氮研磨细胞后,离心留取的上清液用 LCMS-IT-TOF 飞行质谱仪(日本岛津公司)检测。色谱柱:VP-ODS 柱(150 mm×2.0 mm,5 μm);色谱条件为 260 nm,0.2 mL/min;流动相为 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}:V_{\text{蚁酸}}=80:20:0.1$,1~5 min 2% 流动相,5~10 min 20% 流动相,10~15 min 20% 流动相,15~20 min 2% 流动相;负离子自

动模式; m/z 为 100~1 000。

2 结果与分析

2.1 *virD4* 基因敲除载体的构建

以 CT-43 总 DNA 为模板,用引物 *virD4Left1/virD4Left2*、*virD4Right1/virD4Right2* PCR 扩增得到 *virD4* 基因左、右臂;以质粒 pDG780 为模板,用引物 *kan1/kan2* PCR 扩增得到 *kan^r* 基因,3 个

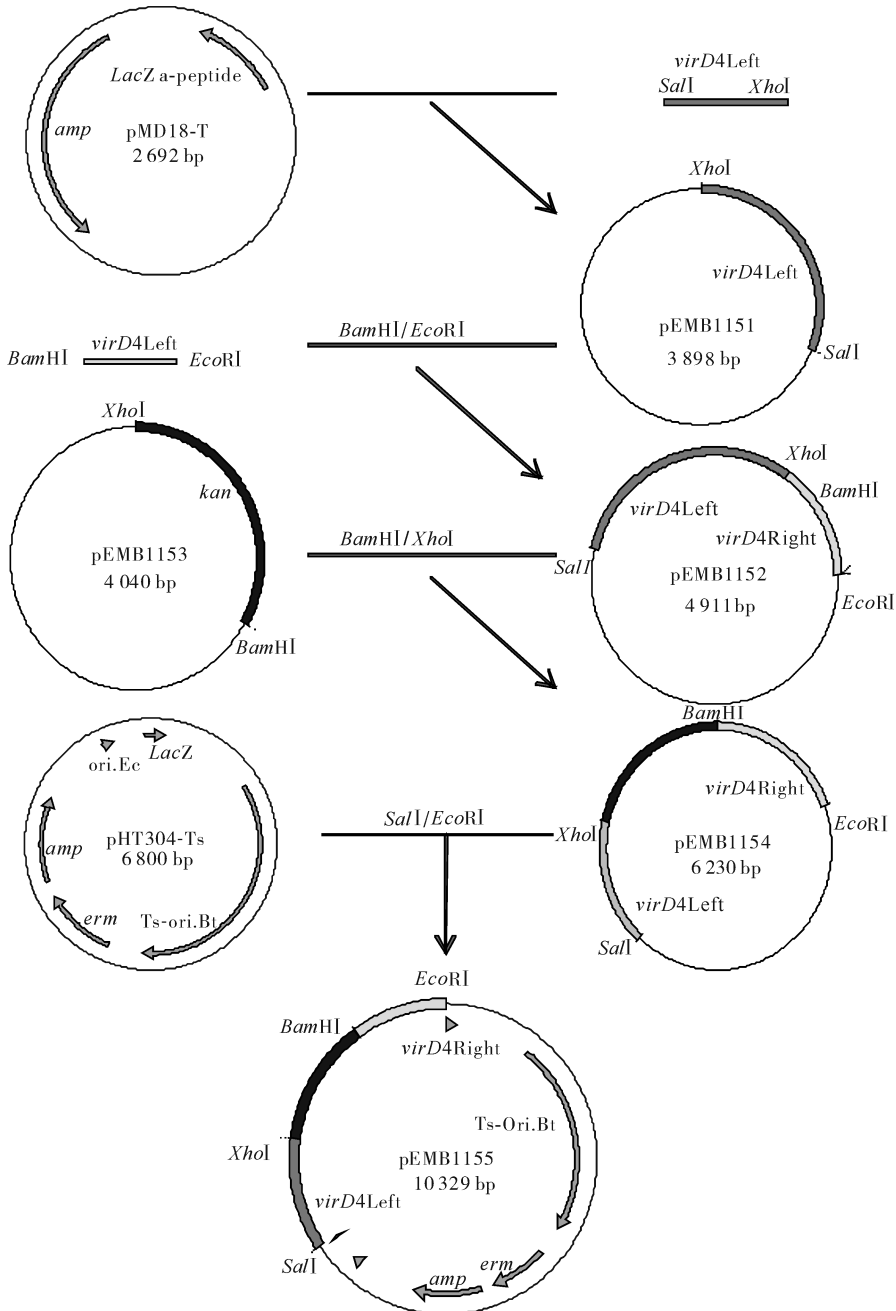
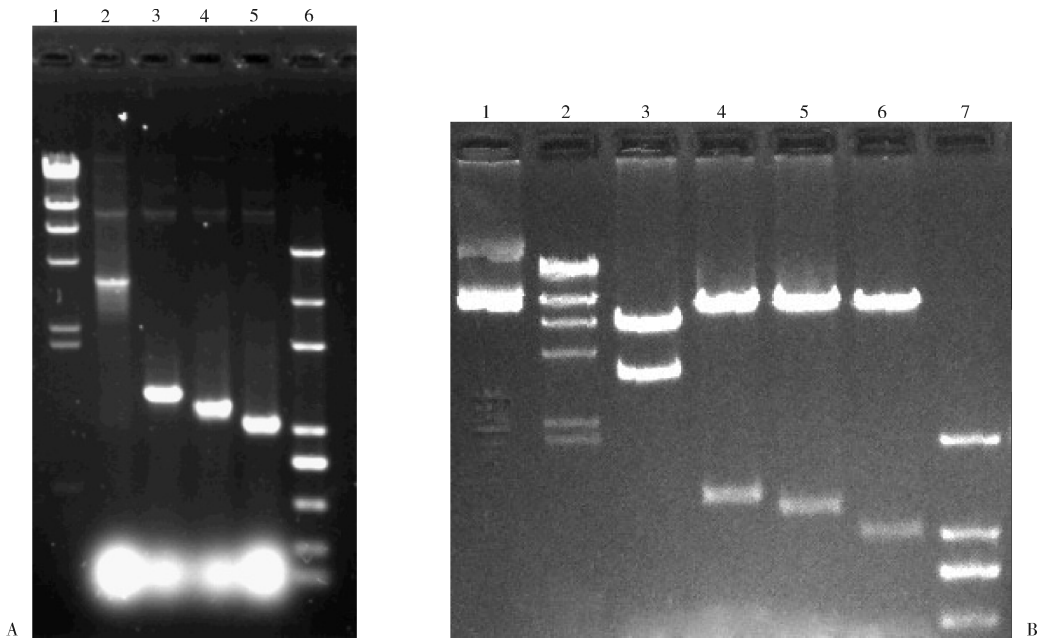


图 1 敲除载体 pEMB1155 的构建流程

Fig. 1 Flow chart of construction of the disruption vector pEMB1155

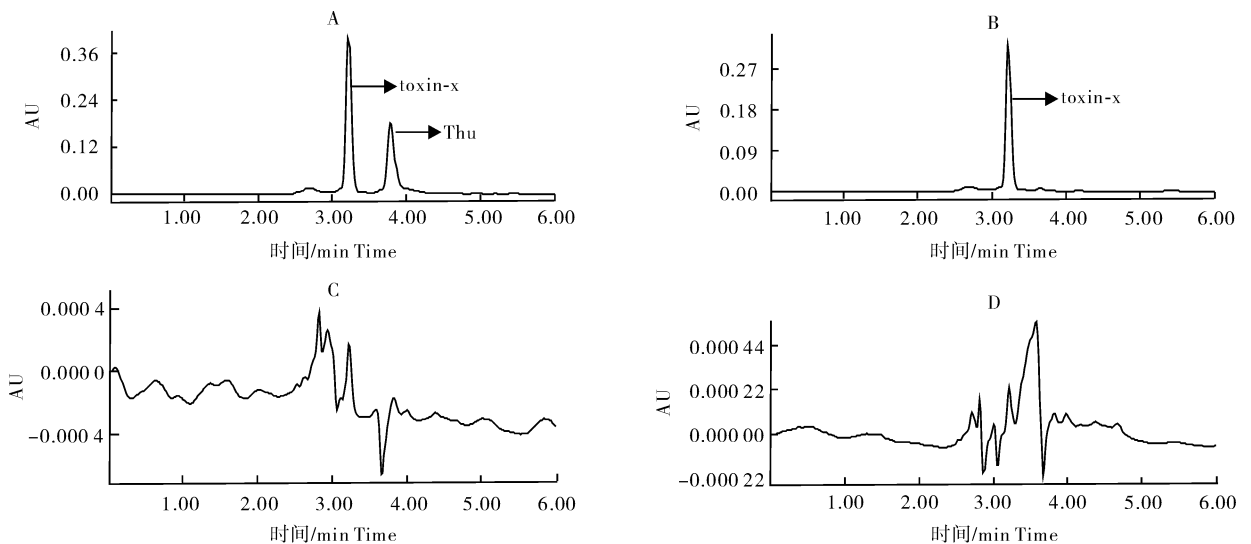


A:质粒 pEMB1155 的 PCR 验证,泳道 1: λ *Hind*III marker; 泳道 2:敲除的 *virD4* 基因; 泳道 3:*kan^r* 基因; 泳道 4:*virD4*Left 片段; 泳道 5:*virD4*Right 片段; 泳道 6:DL 2000 marker。A: The PCR results of plasmid pBMB1155; Lane 1: λ *Hind*III marker; Lane 2: Disruption *virD4* gene; Lane 3:*kan^r* gene; Lane 4:*virD4*Left fragments; Lane 5:*virD4*Right fragments; Lane 6:DL 2000 marker.

B:质粒 pEMB1155 的酶切验证,泳道 1:pEMB1155 质粒; 泳道 2: λ *Hind*III marker; 泳道 3:*Sal*I 和 *Eco*RI 双切 pEMB1155 质粒; 泳道 4:*Bam*H I 和 *Xho* I 双切 pEMB1155 质粒; 泳道 5:*Sal* I 和 *Xho* I 双切 pEMB1155 质粒; 泳道 6:*Bam*H I 和 *Eco*RI 双切 pEMB1155 质粒; 泳道 7:DL 2000 marker。B: The digestion results of plasmid pBMB1155 with restriction enzymes; Lane 1:plasmid pEMB1155; Lane 2: λ *Hind*III marker; Lane 3:Digested with *Sal* I and *Eco*RI; Lane 4:Digested with *Bam*H I and *Xho* I; Lane 5:Digested with *Sal* I and *Xho* I; Lane 6:Digested with *Bam*H I and *Eco*RI; Lane 7:DL 2000 marker.

图 2 敲除载体 pEMB1155 验证的琼脂糖凝胶电泳图谱

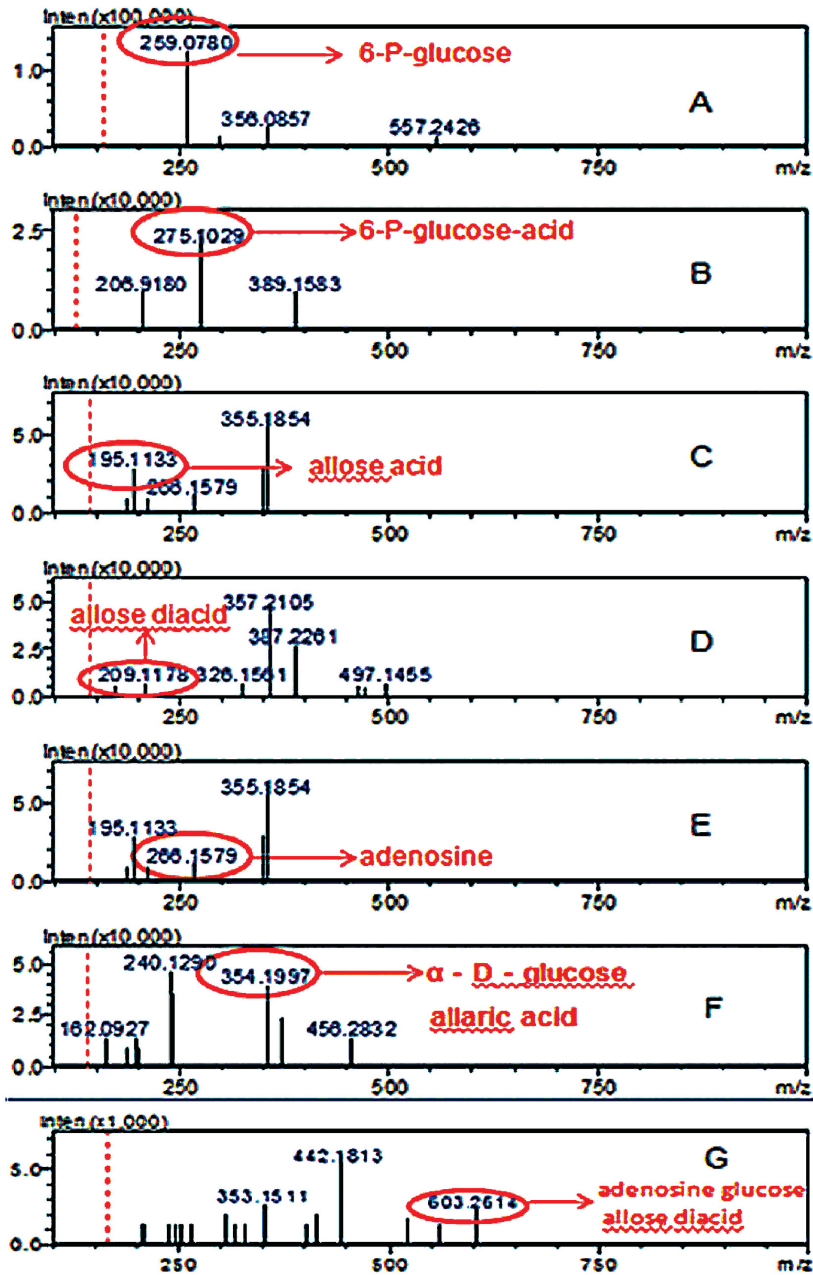
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis map of the disruption vector pBMB1155



A:CT-43 发酵上清液 Fermentation supernatant of CT-43; B:*virD4* 中断突变株胞外提取物 Fermentation supernatant of BM1122; C:CT-43 胞内代谢物 Intracellular metabolites of CT-43; D:*virD4* 中断突变株胞内代谢物 Intracellular metabolites of BMB1122.

图 3 CT-43 及突变株 BMB1122 的高效液相色谱(HPLC)图谱

Fig. 3 HPLC maps of CT-43 and BMB1122



A-G: 突变株 BMB1122 胞内代谢物找到与推测的苏云金素合成途径中的所有前体物对应的 m/z 。红色圆圈所指 m/z 值与箭头所指的代谢物的相对分子质量一致。A-G: All the precursors in the proposed biosynthesis pathway of Thu in BMB1122. The red circles indicate the m/z value identical to the molecular weight of the metabolites.

图 4 突变株 BMB1122 胞内代谢物 LCMS-IT-TOF 飞行质谱图谱

Fig. 4 The intracellular metabolites of mutant BMB1122 detected by LCMS-IT-TOF

片段先后克隆到 pMD18-T 载体上, 获得 *virD4* 敲除基因, 然后将 *virD4* 敲除基因亚克隆到载体 pHT304-Ts 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 构建过程如图 1 所示。对得到的转化子抽提质粒, 进行 PCR 和酶切验证(图 2), 得到敲除载体 pEMB1155。

2.2 *virD4* 基因插入缺失突变株的筛选

制备苏云金芽胞杆菌 CT-43 感受态细胞, 将构

建成功的敲除载体 pEMB1155 电转化 CT-43 感受态细胞, 用 *virD4* 基因左片段上游引物 *virD4*Left1 和右片段下游 *virD4*Right2 进行菌落 PCR 验证。出发菌株 CT-43 含有完整 *virD4* 基因, 可以扩增出 2.3 kb 片段; 敲除载体 pEMB1155 转化进入 CT-43 的转化子包含自身的完整 *virD4* 基因和 1 个载体上的插入卡那霉素基因的敲除基因, 可以扩增出 2.3 kb

和 3.6 kb 左右的 2 条带, 经过筛选得到 3 个正确的转化子, 其中 1 株命名为 BMB1121, 用于后续试验。

将转化子 BMB1121 于 44 °C 高温振荡培养使之发生同源重组, 培养 4 d 后, 涂卡那霉素抗性平板, 长出单菌落后, 分别对点红霉素和卡那霉素抗性平板。因为敲除载体 pEMB1155 含有芽胞杆菌温敏型复制子, 在 44 °C 的培养条件下, 质粒因不能传代复制而丢失; 而经过同源双交换后, 卡那霉素抗性基因整合到转化子的染色体上, 从而获得卡那霉素抗性。通过抗性筛选, 获得红霉素平板上不生长而对应的卡那霉素平板上生长的克隆子。

在 *virD4* 基因编码区的上下游和卡那霉素基因编码区内设计 2 对引物 D1. 1/D1. 2、D42. 1/D42. 2, PCR 验证高温筛选得到的克隆子。引物 D1. 1/D1. 2 的 PCR 产物大小为 1.9 kb, 引物 D2. 1/D2. 2 的 PCR 产物大小为 1.3 kb。最终筛选得到发生同源双交换的 2 个突变株, 其中 1 株命名为 BMB1122, 用于后续试验。

2.3 突变株 BMB1122 发酵上清液的高效液相色谱检测

对纯化后的突变株 BMB1122 和 CT-43 的发酵上清液进行 HPLC 检测(图 3), 结果表明: 出发菌株 CT-43 发酵上清液中检测到 Thu 的特征吸收峰, 而突变株 BMB1122 发酵上清液中没有检测到 Thu 的特征吸收峰。

2.4 突变株 BMB1122 胞内代谢物的检测

1) 突变株 BMB1122 胞内代谢物的 HPLC 检测。检测结果(图 3)显示: 突变株 BMB1122 和出发菌株 CT-43 胞内代谢物均没有检测到苏云金素的特征吸收峰, 这与我们前期研究的结果(CT-43 胞内没有完整的 Thu 分子存在)是一致的^[10]。

2) 突变株 BMB1122 胞内代谢物的 LCMS-IT-TOF 飞行质谱检测。检测结果(图 4)显示出与 CT-43 中苏云金素预测合成途径中的所有前体物相对分子质量相符的 m/z , 但没有与苏云金素相对分子质量相符的 m/z 。

3 讨论

苏云金素是一种非特异性的小分子腺苷酸衍生物, 被分泌到细胞外, 目前关于其机制的研究报道较少。苏云金芽胞杆菌突变株 407-1(Cry^-)(Pig^+)为 1 株不产杀虫晶体蛋白、但能产生大量 Thu 的菌株, Espinass 等^[16]构建了此菌株的突变体库, 结果发现

1 个含有 *berA* 和 *berB* 两个基因的遗传座位对苏云金素的产生很重要。BerA 氨基酸序列与 ABC 转运家族的 ATP 酶结合蛋白区域有较高的同源性^[16]; *berB* 基因编码的蛋白有 6 个假定的跨膜螺旋, 推测可能是转运子膜结构的组成成分; 由此推测 *berAB* 可能与苏云金素的分泌和免疫性相关。

本研究的 HPLC 检测结果显示 *virD4* 突变株 BMB1122 发酵上清液没有苏云金素特征吸收峰, 而其前面的 toxin-x 特征吸收峰仍然存在, 由此推测 *virD4* 基因的敲除可能只影响了苏云金素的胞外分泌, 但其具体的功能, 需进一步验证, 对于苏云金素是简单的细胞外排作用还是复杂的分泌机制还需要进一步研究。

IV 型分泌系统存在于革兰氏阴性细菌、阳性细菌和古菌中, 具有多种功能, 但报道的 IV 型分泌系统大部分是在革兰氏阴性细菌中, 对于革兰氏阳性细菌中的报道主要是接合转移系统, 作用的底物也是蛋白质和 DNA 分子。本课题组已对 CT-43 中大质粒 pBMB0558 进行了接合转移相关实验, 初步认定其不能发生接合转移, 如果这个类 IV 型分泌系统在 CT-43 中确实行使某种功能, 确定其行使的功能和作用的底物对于革兰氏阳性细菌中 IV 型分泌系统的研究将会是一个新的发现, 具有一定的理论与实用价值。

参 考 文 献

- [1] SALMOND G P C. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1994, 32:181-200.
- [2] FRONZES R, CHRISTIE P J, WAKSMAN G. The structural biology of type IV secretion systems[J]. *Microbiology*, 2009, 7:703-714.
- [3] CHRISTIE P J. Bacterial type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems[J]. *Biochem Biophys Acta*, 2004, 1694:219-234.
- [4] LAWLEY T D, KLIMKE W A, GUBBINS M J, et al. F factor conjugation is a true type IV secretion system[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 224:1-15.
- [5] GROHMAN E, MUTH G, ESPINOSA M. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67:277-301.
- [6] CASCALES E, CHRISTIE P J. The versatile bacterial type IV secretion systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2003, 1:137-150.
- [7] ALVAREZ-MARTINE A, CHRISTIE P J. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems[J]. *Mol Biol Rev*, 2009, 73:775-808.

- [8] SCHRODER G, LANKA E. TraG-like proteins of type IV secretion systems: functional dissection of the multiple activities of TraG (RP4) and TrwB (R388)[J]. *J Bacteriol*, 2003, 185: 4371-4381.
- [9] CHRISTIE P J, ATMAKURI K, KRISHNAMOORTHY V, et al. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2005, 59: 451-485.
- [10] 刘晓艳. 苏云金芽胞杆菌菌株 CT-43 中苏云金素合成基因簇 *thuABCDEF* 克隆与合成途径分析[D]. 武汉: 华中农业大学生命科学技术学院, 2008.
- [11] SAMBROO K J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [12] 纪芳. 苏云金芽胞杆菌幕虫亚种菌株 YBT-020 晶胞粘连表型相关因子的定位研究[D]. 武汉: 华中农业大学生命科学技术学院, 2009.
- [13] PENG D H, LUO Y, GUO S X, et al. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*[J]. *Appl Microbiol*, 2009, 106(6): 1849-1858.
- [14] 巫益鸣, 阮丽芳, 彭东海, 等. 苏云金芽胞杆菌菌株 YBT-1518 的插入突变体库的构建及芽胞萌发突变株的筛选[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(5): 577-581.
- [15] GOHAR M, PERCHAT S. Sample preparation for b-exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, 298: 112-117.
- [16] ESPINASSE S, GOHAR M, LERECLUS D, et al. An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for beta-exotoxin I production[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184: 5848-5854.

Function of *virD4* gene in plasmid pBMB0558 in *Bacillus thuringiensis* CT-43

CHEN Hui-jie LIU Xiao-yan CAO Shi-yun RUAN Li-fang SUN Ming

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China

Abstract *Bacillus thuringiensis* CT-43 produces thuringiensin. The VirD4 protein encoded by the *virD4* gene located on the plasmid pBMB0558 of CT-43 is highly homologous to the coupling proteins (T4CPs) of type IV secretion systems. In type IV secretion systems, T4CPs' basic function is to recruit substrates to the type IV secretion systems for secretion through the translocation channel. A homologous double - crossover vector was constructed through knocking out the *virD4* gene in CT-43 and a mutant BMB1122 was obtained. HPLC result showed that the characteristic peak of thuringiensin was not detected in the fermentation supernatant of mutant BMB1122. The LCMS-IT-TOF result showed that the corresponding *m/z* with molecular weight of proposed precursors in *Thu* biosynthesis could be detected in intracellular metabolites of mutant BMB1122, consistent with that of CT-43. The knockout of *virD4* gene interrupted the secretion of thuringiensin. Presumably, the *virD4* was a critical gene for *Thu* biosynthesis.

Key words type IV secretion systems; gene knockout; high performance liquid chromatography (HPLC); thuringiensin

(责任编辑: 张志钰)