

# 苏云金芽胞杆菌谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 的转录调控和过表达

杨帆<sup>1,2</sup>, 秦嘉欣<sup>3</sup>, 彭琦<sup>2</sup>, 张杰<sup>2</sup>, 朱延明<sup>1\*</sup>, 宋福平<sup>2\*</sup>

(1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 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; 3. 北京理工大学生命学院, 北京 100081)

**摘要:** 氮代谢对细菌生存至关重要, 谷氨酰胺和谷氨酸盐在细菌氮代谢中发挥重要作用。本文对苏云金芽胞杆菌谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 的转录调控及过表达进行了研究。通过构建 *glnR* 基因的缺失突变株及 *glnA* 基因启动子融合 *lacZ* 基因的表达载体, 测定突变株中 *glnA* 启动子活性, 发现在胞外营养充足的情况下转录因子 GlnR 负调控 *glnA* 基因。同时在 *glnR* 基因苏云金芽胞杆菌缺失突变株中过表达 *glnA* 基因。发现与野生型相比, 过表达菌株杀虫活性得到提高。

**关键词:** 氮代谢; 谷氨酰胺合成酶; 转录调控

中图分类号: S476.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2019)04-0563-07

## Transcriptional Regulation and Overexpression of *glnA* Gene in *Bacillus thuringiensis*

YANG Fan<sup>1,2</sup>, QIN Jiabin<sup>3</sup>, PENG Qi<sup>2</sup>, ZHANG Jie<sup>2</sup>, ZHU Yanming<sup>1\*</sup>, SONG Fuping<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests/Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Nitrogen metabolism is essential for bacterial survival, while glutamine and glutamate play an important role in bacterial nitrogen metabolism. The transcriptional regulation and overexpression of the glutamine synthetase gene of *Bacillus thuringiensis* was examined in this study. By constructing the *glnR* deletion strain and *glnA* promoter fusion with *lacZ* gene, the activity of *glnA* promoter was investigated in the mutant strain and wild type stain. The results showed that *glnA* gene was negatively regulated by transcriptional factor GlnR in the case of sufficient extracellular nutrition source. Overexpression of *glnA* gene in *glnR* mutant increased insecticidal activity compared to the wild type strain.

**Key words:** nitrogen metabolism; glutamine synthetase; transcriptional regulation

细菌需要吸收和同化充足的氮源来维持生存, 经过同化作用, 细菌会将不同的氮源同化成谷氨酰胺和谷氨酸两种重要的氨基酸作为氮素的来源。作为首选氮源, 细菌中同化铵的两种途径通常为谷氨酸脱氢酶 (GDH) 途径和谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶 (GS/GOGAT) 途径<sup>[1,2]</sup>。在革兰氏阳性菌模式菌株枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 中只能通过 GS/GOGAT 途径吸收铵, 没有发现谷氨酸脱氢酶活性<sup>[3]</sup>。谷氨酰胺合成酶是生物体中较古老且存在广泛的酶<sup>[3]</sup>, 参与生物体的氮代谢和碳代谢。参与谷氨酰胺代谢的基因已经在细菌、真菌以及植物体中得到了广泛的研究<sup>[4,5]</sup>。在枯草芽胞杆菌中, 谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 受全局转

收稿日期: 2019-04-03

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0200400); 国家自然科学基金 (31530095)

作者简介: 杨帆, 硕士研究生, E-mail: YYF0087@163.com; \*通信作者, 朱延明, 教授, E-mail: ymzhu2001@neau.edu.cn; 宋福平, 研究员, E-mail: fpsong@ippcaas.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.04.015

录调控蛋白 GlnR 的调控。GlnR 属于螺旋-转角-螺旋 OmpR 家族蛋白,可以间接地感应到谷氨酰胺的浓度,氮源丰富时会抑制 *glnA* 的转录<sup>[6]</sup>,从而调节谷氨酰胺合成酶活性,在乳酸球菌中也具有类似的功能<sup>[7-9]</sup>。同时, GlnR 会通过调控糖多孢红霉菌 *Saccharopolyspora erythraea*<sup>[10]</sup>、谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum*<sup>[11]</sup>等放线菌的 ABC 转运系统<sup>[12]</sup>及淀粉酶降解相关基因,帮助菌体利用营养物质<sup>[13,14]</sup>。

苏云金芽胞杆菌 (*B. thuringiensis*, Bt) 是一种革兰氏阳性菌,属蜡样芽胞杆菌族,在形成芽胞的同时产生对多种目标昆虫如鳞翅目 Lepidoptera 和鞘翅目 Coleoptera 等昆虫具有特异性毒杀作用的伴胞晶体。目前已经广泛应用于农林、储藏物及医学害虫的防治中<sup>[15]</sup>。苏云金芽胞杆菌中谷氨酰胺合成酶的调节机制以及其是否对杀虫毒性有影响未见报道,本研究通过生物信息学分析发现在 Bt 菌株 HD73 基因组中, *glnA* 基因编码谷氨酰胺合成酶,进一步试验发现, *glnR* 基因编码转录调控蛋白,与枯草芽胞杆菌中的 *glnA* 及其上游 *glnR* 是同源基因。苏云金芽胞杆菌中的 *glnA* 基因受 *glnR* 的调控,且在氮源丰富时 *glnR* 会抑制 *glnA* 的转录。同时,过表达 *glnA* 基因,可以使菌株的杀虫活性得到增加,说明在昆虫体内氮源的利用对 Bt 杀虫活性也具有一定作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本试验中所用菌株与质粒见表 1。

表 1 菌株与质粒  
Table 1 Strain and plasmid

| 菌株和质粒<br>Strains and plasmids  | 特性<br>Characterization  | 来源<br>Resource |
|--------------------------------|---|----------------|
| 菌株 Strains                     |   |                |
| 大肠杆菌 <i>E. coli</i> TG1        | $\Delta(lac-proAB) supEthi hsd-5 (F' traD36 proA^+ proB^+)$   | 实验室存菌          |
| 大肠杆菌 <i>E. coli</i> ET12567    | <i>F' dam-13 Tn9 dcm-6 hsdMhsdR recF143 zjj-202 Tn10 galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1</i> | 实验室存菌          |
| HD73                           | 含有 <i>cryIAC</i> 基因的苏云金芽胞杆菌野生型菌株  | 实验室存菌          |
| HD73 <sup>-</sup>              | HD73 菌株无晶体突变株   | 实验室存菌          |
| HD ( $\Delta sigE$ )           | 缺失 <i>sigE</i> 基因的 HD73 菌株  | 实验室存菌          |
| HD ( $\Delta glnR$ )           | 缺失 <i>glnR</i> 基因的 HD73 菌株  | 本研究            |
| HD (P <i>glnA</i> )            | 含 pHT304P <i>glnA</i> 载体的 HD73 菌株   | 本研究            |
| $\Delta glnR$ (P <i>glnA</i> ) | 含 pHT304P <i>glnA</i> 载体的 $\Delta glnR$ 菌株  | 本研究            |
| HD (O <i>glnA</i> )            | 含 pHT315- <i>glnA</i> 载体的 HD73 菌株   | 本研究            |
| $\Delta glnR$ (O <i>glnA</i> ) | 含 pHT315- <i>glnA</i> 载体的 $\Delta glnR$ 菌株  | 本研究            |
| 质粒 Plasmids                    |   |                |
| pMAD                           | 苏云金芽胞杆菌与大肠杆菌穿梭温敏载体  | 实验室存菌          |
| pHT315                         | 苏云金芽胞杆菌与大肠杆菌穿梭载体  | 实验室存菌          |
| pHT304-18Z                     | 无启动子的 <i>lacZ</i> 融合表达载体  | 实验室存菌          |
| pHT304P <i>glnA</i>            | 含 P <i>glnA</i> 启动子的 pHT304-18Z 融合表达载体  | 本研究            |
| pHT315P <i>glnA</i>            | 含 P <i>glnA</i> 启动子的 pHT315 表达载体  | 本研究            |
| pMAD- $\Delta glnR$            | 具有 <i>glnR</i> 基因缺失片段的 pMAD 载体  | 本研究            |

1.1.2 培养基和抗生素 LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, 调节 pH 达到 7.0; SSM 培养基<sup>[16]</sup>; 氨苄青霉素储存浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ , 红霉素储存浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$ , 卡那霉素储存浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ 。

1.1.3 试验试剂 2 $\times$ Taq Mix PCR SupperMix: 北京博迈德生物技术公司提供; 2 $\times$ PrimerSTAR Max Premix、限制性内切酶、T4 DNA Ligase: 宝生物工程(大连)有限公司提供; 胶回收试剂盒 AxyPrep DNA

Gel Extraction Kit、DNA 纯化试剂盒 AxyPrep PCR Cleanup Kit: 爱思进 AXYGEN 公司提供; 无缝克隆试剂盒: 中美泰和生物技术有限公司提供。

1.1.4 引物合成及序列测定 本研究所用引物见表 2。引物合成由上海生工生物工程公司完成。基因序列测序由北京诺赛基因和北京华基因科技股份有限公司完成。

表 2 本试验所用引物及序列  
Table 2 Primers and sequences used in this study

| 引物名称 Names                | 序列 Sequences (5'-3')                                     |
|---------------------------|--|
| <i>PglnA</i> -F           | CGCGGATCCCGTAAATTGTAAACGGATATACTT                        |
| <i>PglnA</i> -R           | AAGTGCAGAGTAATGATTTATGCGATTAGAA                          |
| $\Delta$ <i>glnRa</i> -F  | AGATCTATCGATGCATGCCATGGTACCCGGGAGGGCAGCATCATCACTTAATTGTA |
| $\Delta$ <i>glnRa</i> -R  | CCTCAAATGGTTCGCTGGCGCACTAAAGATAACTGATTC                  |
| $\Delta$ <i>glnRb</i> -F  | GAATCAGTTATCTTTAGTGCGCCAGCGAACCATTGAGG                   |
| $\Delta$ <i>glnRb</i> -R  | GAAGGAGGAAGTGAATAATGAAAATTCCTCGTAGGCGCTCG                |
| $\Delta$ <i>glnRk</i> -F  | GAATCAGTTATCTTTAGTGCGCCAGCGAACCATTGAGG                   |
| $\Delta$ <i>glnRk</i> -R  | GAAGGAGGAAGTGAATAATGAAAATTCCTCGTAGGCGCTCG                |
| $\Delta$ <i>glnRJD</i> -F | CCGATGAAAGAAGAYAGACGTT                                   |
| $\Delta$ <i>glnRJD</i> -R | TGTCACCTTGTGCAATG  |
| 315 <i>glnA</i> F1        | GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGTGGGTTAACTTATTCACATG            |
| 315 <i>glnA</i> R1        | ATCGCCTTCAGAATCAGTTATCATCCATAACAATACCAATAGG              |
| 315 <i>glnA</i> F2        | CCTATTGGTATTGTTATGGATGATAACTGATTCTGAAGGCGAT              |
| 315 <i>glnA</i> R2        | TGTAACGACGCGCCAGTGAATCTACGAGTTGTATCAAGGGTTC              |

注: 下划线表示酶切位点。

Note: Restriction enzyme sites are underlined.

## 1.2 *glnR* 基因缺失菌株的构建

以 Bt 菌株 HD73 基因组为模板,  $\Delta$ *glnRa*-F/ $\Delta$ *glnRa*-R 和  $\Delta$ *glnRb*-F/ $\Delta$ *glnRb*-R 为引物, PCR 分别扩增出 *glnR* 基因的上游片段 *glnR*-A 和下游片段 *glnR*-B。以 HD ( $\Delta$ *sigE*) 菌株为模板,  $\Delta$ *glnRk*-F/ $\Delta$ *glnRk*-R 为引物扩增出卡那霉素抗性基因片段 *kan*。以 *glnR*-A、*kan* 和 *glnR*-B 为模板,  $\Delta$ *glnRa*-F/ $\Delta$ *glnRb*-R 为引物, PCR 扩增出同源重组长片段 *glnR*-A-*kan*-*glnR*-B。PCR 产物纯化后, 应用无缝克隆试剂盒将该片段连接至温敏载体 pMAD, 获得同源重组质粒, 命名为 pMAD- $\Delta$ *glnR*。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 °C 高温诱导, 筛选出对红霉素敏感但对卡那霉素抵抗的菌落。利用同源重组片段外侧引物  $\Delta$ *glnRJD*-F/ $\Delta$ *glnRJD*-R 进行 PCR 鉴定, 并对 PCR 片段进行测序确认, 获得 *glnR* 基因缺失突变菌株 HD ( $\Delta$ *glnR*)。

## 1.3 生长曲线的测定

挑取 Bt 单菌落接种在 5 mL LB 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 8 h 后, 将母液 1% 转接到相应抗性的 100 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养, 从 0 时起, 每隔 1 h 取样并测定其在 600 nm 波长处的吸光值 (OD<sub>600</sub>), 绘制生长曲线。

## 1.4 *PglnA* 启动子融合 *lacZ* 基因表达载体的构建

以 Bt HD73 基因组为模板, 以 *PglnA*-F/*PglnA*-R 为引物扩增 *glnA* 基因的启动子, PCR 产物纯化后经 *Pst* I 和 *Bam*HI 双酶切并连接至含有 *lacZ* 报告基因的 pHT304-18Z 载体 *Pst* I 和 *Bam*HI 双酶切片段上, 转化 *E. coli* TG1 菌株, 获得重组质粒 pHT304*PglnA*。重组质粒经 PCR、酶切和测序鉴定, 转化至 *E. coli* ET 菌株使质粒去甲基化, 将重组质粒电击转化至 Bt HD73 和 HD ( $\Delta$ *glnR*) 菌株, 获得 HD (*PglnA*) 和  $\Delta$ *glnR* (*PglnA*) 菌株。

## 1.5 $\beta$ -半乳糖苷酶活性分析

分别取 1 mL 过夜活化的 HD (*PglnA*) 和  $\Delta$ *glnR* (*PglnA*) 菌液转接到 100 mL LB 培养基中, 30 °C,

220 r/min 培养至  $T_{-2}$  时期 ( $T_0$  为对数生长期结束时间,  $T_n$  为  $T_0$  前后第  $N$  小时), 每隔 1 h 取样 1 次,  $T_{-2}$ ,  $T_{-1}$  时期取样 8 mL,  $T_0$  以后每次取样 2 mL, 12000 r/min 离心, 弃上清, 沉淀于  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。β-半乳糖苷酶活性测定方法参考文献<sup>[17]</sup>, 试验至少重复 3 次。

### 1.6 HD73 及 HD ( $\Delta glnR$ ) 中 *glnA* 基因过表达菌株的构建

以 Bt HD ( $\Delta glnR$ ) 菌液为模板, 以 315*glnAF1* 和 315*glnAR2* 为引物扩增 *glnA* 基因及启动子序列, PCR 产物纯化后, 应用无缝克隆试剂盒, 将该片段连接至经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切的 pHT315 载体, 转化 *E. coli* TG1 菌株, 获得重组质粒 pHT315*PglnA*。重组质粒经 PCR、酶切和测序鉴定, 转化至 *E. coli* ET 菌株使质粒去甲基化, 然后将重组质粒电击转化至 HD73 和 HD ( $\Delta glnR$ ) 菌株, 获得 HD (*PglnA*) 和  $\Delta glnR$  (*PglnA*) 菌株。

### 1.7 谷氨酰胺酶活力测定

挑取 HD73、HD ( $\Delta glnR$ )、HD (*OglnA*) 和  $\Delta glnR$  (*OglnA*) 单菌落接种在 LB 液体培养基中,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 8 h 后, 将母液 1% 转接到相应抗性的 100 mL 新鲜 LB 液体培养基中,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养到  $T_7$  时期, 8000 r/min 离心 20 min, 以 M/W 1% 的 KCl 溶液洗涤 2 次后收集菌体。加入 30 mL 0.05 mol/L 咪唑-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 悬浮菌体, 超声破碎 20 min (功率: 400 W; 工作 1 s, 间歇 3 s)。8000 r/min 下低温离心 30 min, 取上清备用。按照 Spafio<sup>[18]</sup> 方法测定谷氨酰胺合成酶的  $\gamma$ -谷氨酰基转移活性, 计算谷氨酰胺合成酶活力, 数据独立重复 3 次。

### 1.8 生物活性测定

以小菜蛾 *Plutella xylostella* 为供试昆虫, 用于生物活性测定的菌株为  $\Delta glnR$  (*OglnA*)、HD ( $\Delta glnR$ )、HD (*OglnA*)、HD73 和 HD73<sup>-</sup> (菌株 HD73<sup>-</sup> 不产生 Cry1Ac 晶体蛋白)。菌株在 LB 培养基中培养至  $T_{35}$  时期, 将菌液冻干, 取相同生物量的 5 株菌的冻干粉, 用灭菌水稀释成以下浓度: 1.25、2.5、5、10、20、40  $\mu\text{g/mL}$ ; 将上述不同浓度的菌液均匀的涂抹于直径为 7 cm 的卷心菜叶上, 晾干后, 置于 9 cm 的培养皿中; 每个培养皿中接种 30 头体型相当的 2 龄小菜蛾幼虫。48 h 后计算幼虫成活率。计算  $LC_{50}$ , 数据独立重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 苏云金芽胞杆菌 HD73 中 *glnA* 基因的鉴定

根据基因在 Bt HD73 基因组上的排列, 结合枯草芽胞杆菌 168 菌株中 *glnA* 基因的核苷酸序列比对, 在 Bt HD73 菌株中发现一个编号为 HD73\_3986 的基因, 编码谷氨酰胺合成酶, 其上游基因 HD73\_3987 编码谷氨酰胺合成酶抑制子 *GlnR*, 二者在基因组上的组织结构与枯草芽胞杆菌 168 中的 *glnRA* 操纵子相同 (图 1)。氨基酸比对结果显示, HD73\_3986 和 HD73\_3987 与枯草芽胞杆菌 168 中谷氨酰胺合成酶 *GlnA* 和谷氨酰胺合成酶抑制子 *GlnR* 相似性分别为 86.50% 和 62.40%。推测 Bt HD73 中的 *glnA* 和 *glnR* 基因也可能参与谷氨酰胺代谢途径。

### 2.2 *PglnA* 启动子转录活性分析

为了研究 *glnA* 基因的转录调控, 构建了 *glnR* 基因缺失突变株及 *glnA* 的启动子融合 *lacZ* 基因的表达

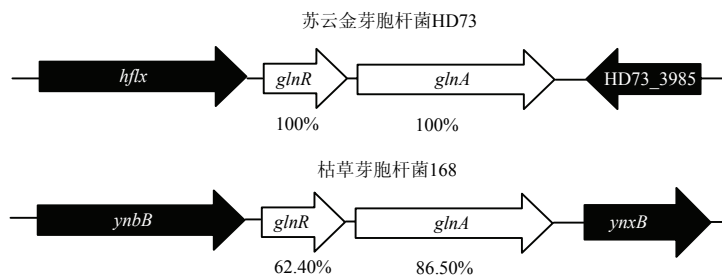
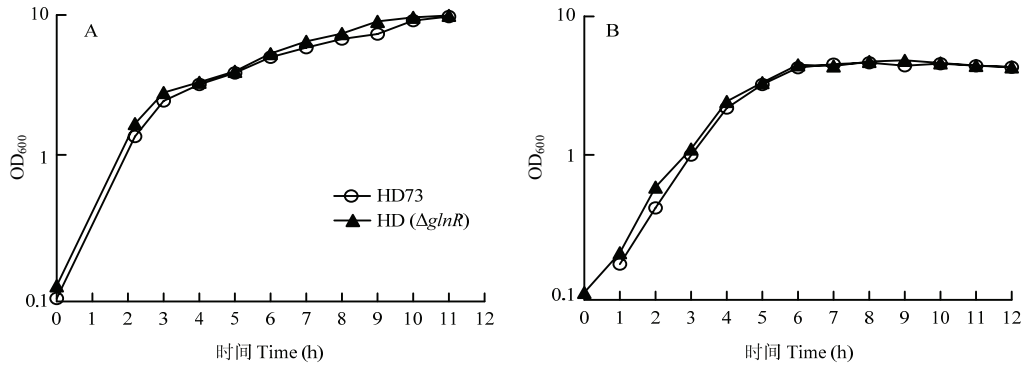


图 1 苏云金芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌中 *glnA* 基因分析

Fig. 1 Analysis of *glnA* from *B. thuringiensis* HD73 and *B. subtilis* 168

载体, 分别转入 HD73 出发菌株和  $\Delta glnR$  突变菌株, 获得菌株 HD (*PglnA*) 以及  $\Delta glnR$  (*PglnA*)。首先, 测定 HD ( $\Delta glnR$ ) 突变菌株的生长曲线, 结果如图 2, 无论在营养丰富的 LB 培养基中 (图 2A), 或是在贫瘠营养诱导产胞的 SSM 培养基中 (图 2B), 与 HD73 出发菌株相比, HD ( $\Delta glnR$ ) 突变菌株的生长均没有明显变化。证明 *glnR* 基因的缺失不会影响到菌株的正常生长。

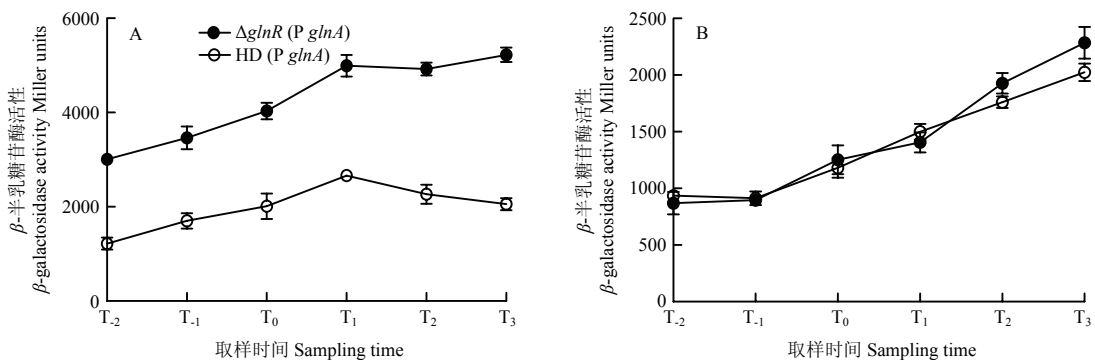
$\beta$ -半乳糖苷酶活性测定表明 (图 3A、3B),  $T_2 \sim T_3$  时期, 在营养丰富的 LB 培养基中  $\Delta glnR$  (*PglnA*) 菌株的转录活性明显高于 HD (*PglnA*) 菌株。而在营养相对贫瘠的 SSM 培养基中,  $\Delta glnR$  (*PglnA*) 菌株的转录活性与 HD (*PglnA*) 菌株相比, 没有明显差别, 说明营养丰富时 *GlnR* 负调控 *glnA* 基因转录。



A: LB 培养基 Luria-Bertani (LB) medium; B: SSM 培养基 Schaeffer's sporulation medium (SSM)

图 2 HD73 出发菌株及 *glnR* 缺失菌株在不同培养基中的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of wild-type strain and *glnR* deletion mutant strain in different mediums



A: LB 培养基 Luria-Bertani (LB) medium; B: SSM 培养基 Schaeffer's sporulation medium (SSM)

图 3 *PglnA* 转录活性分析

Fig. 3 Analysis of transcriptional activities of *PglnA*

### 2.3 *glnA* 过表达菌株谷氨酰胺合成酶活力测定

为了明确 *glnA* 的功能, 对谷氨酰胺合成酶酶活性进行了分析, 选取 LB 培养基  $T_2$  时期的菌株 HD73、HD (*OglnA*)、HD ( $\Delta glnR$ ) 和  $\Delta glnR$  (*OglnA*), 测定其谷氨酰胺合成酶酶活力。在  $T_2$  时期的 LB 培养基中, 相较于野生型 HD73 菌株, 其他菌株的谷氨酰胺合成酶酶活力均有所提高 (图 4)。表明在营养充足的情况下, *glnR* 基因的缺失导致谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 表达量上升, 与转录活性结果一致 (图 3A)。

### 2.4 *glnA* 基因过表达菌株的生物活性分析

为了研究 *glnA* 基因是否对苏云金芽胞杆菌的杀虫活性有影响, 选取相同生物量的 HD73、HD (*OglnA*)、 $\Delta glnR$ 、 $\Delta glnR$  (*OglnA*) 和 HD73<sup>-</sup> 菌株, 对小菜蛾 2 龄幼虫进行生物活性测定, 以菌株 HD73<sup>-</sup> 为阴性对照。接种幼虫 48 h 后计算死亡率, 并计算 LC<sub>50</sub>。结果表明, 与野生型菌株相比, 菌株 HD (*OglnA*)、HD ( $\Delta glnR$ ) 和  $\Delta glnR$  (*OglnA*) 的杀虫活性更高, 其中  $\Delta glnR$  (*OglnA*) 菌株尤为显著, 说明过表达 *glnA* 基因会提高菌株 HD73 的杀虫活性 (表 3)。

表 3 *glnA* 基因表达 Bt 菌株对小菜蛾的杀虫活性  
Table 3 Bioassay of Bt strains expressed *glnA* gene against *Plutella xylostella*

| 样品 Sample                             | LC <sub>50</sub> (μg/mL) | 95% 置信区间 Confidenc (μg/mL) |
|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| HD73                                  | 16.822                   | 12.794~23.688              |
| HD ( <i>OglnA</i> )                   | 12.098                   | 9.300~16.376               |
| HD ( $\Delta$ <i>glnR</i> )           | 12.469                   | 9.441~17.273               |
| $\Delta$ <i>glnR</i> ( <i>OglnA</i> ) | 9.004                    | 6.895~11.703               |
| HD73 <sup>-</sup>                     | NA                       | NA                         |

注: NA 没有活性。Note: NA was no activity.

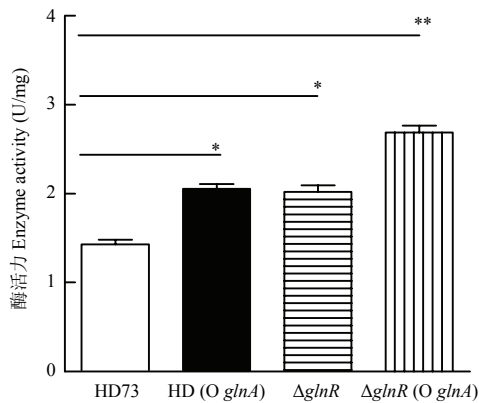


图 4 谷氨酰胺合成酶活力

Fig. 4 Glutamine synthetase enzyme activity

### 3 讨论

在枯草芽胞杆菌中,至少存在三个不同的氮代谢调控蛋白 CodY、GlnR 和 TnrA<sup>[3]</sup>, GlnR 和 TnrA 识别相同的操纵子序列 5'-TGTNAN<sub>7</sub>TNACA-3'<sup>[19,20]</sup>。其中,转录因子 *glnR* 基因直接位于谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 的上游,和 *glnA* 基因共同组成 *glnRA* 操纵子,是一个双顺反子,而谷氨酰胺合成酶活力则会受负反馈调节。在氮源丰富时, GlnR 会通过自身的一个  $\alpha$ -螺旋-转角-螺旋结构域,以二聚体的形式与操纵子 *glnRA01* 和 *glnRA02* 相结合,从而抑制 *glnRA* 的转录<sup>[8,9]</sup>。本研究通过转录活性分析发现在 Bt 菌株中谷氨酰胺合成酶基因 *glnA*

在营养丰富时受其转录因子 GlnR 负调控,该结果与模式菌株枯草芽胞杆菌相同。

Kloosterman 等<sup>[8]</sup>在革兰氏阳性致病菌肺炎链球菌的研究中发现,*glnA* 缺失突变株相较于野生型菌株表现出生长缓慢的现象,但在加入 0.5 mg/mL 的谷氨酰胺时会恢复生长。同时发现突变株的定殖粘附力受到了很大的影响,其对于 Detroit 562 人类咽喉上皮细胞的粘着性显著降低,表明谷氨酰胺合成酶 GlnA 在肺炎链球菌毒性发挥中扮演着重要的角色。本研究在 Bt 菌株 HD ( $\Delta$ *glnR*) 中过表达 *glnA* 基因后,与野生型菌株相比,杀虫活性显著增加。推测 *glnA* 基因有可能参与到苏云金芽胞杆菌在昆虫体内的定殖中,从而调控其杀虫活性。同时,Young 和 Monroe 等<sup>[19]</sup>研究表明苏云金芽胞杆菌形成的伴胞晶体 80%是在形成芽胞的过程中,由蛋白质的代谢周转(即来自培养环境中)重新合成的,只有 15%的伴胞晶体来自芽胞形成以前的细胞,这些蛋白质是由游离氨基酸合成的。因此过表达 *glnA* 基因后细胞可能会更好地利用培养基中的氮源,来保证伴胞晶体蛋白的合成,同时有利于细胞更好地生存。这也为提高 Bt 的杀虫毒力提供了新思路。

本研究发现 *glnA* 基因受其转录因子 GlnR 的调控。作为一类全局转录因子,在很多革兰氏阳性细菌的基因组中,都存在 *glnR* 基因, GlnR 最初是在天蓝链霉菌中鉴定的,它能够使谷氨酰胺营养缺陷型回复成野生型<sup>[20]</sup>。GlnR 不仅对参与到氮代谢中的一些基因有调控作用,还与磷酸代谢、抗生素合成等次级代谢途径以及细菌毒性存在交叉调控<sup>[21-23]</sup>。目前虽然有大量关于 GlnR 转录调控方面的报道,但其在 Bt 中的功能还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Reitzer A L, Schneider B L. Metabolic context and possible physiological themes of sigma (54)-dependent genes in *Escherichia coli*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(3): 422-444.
- [2] Magsanik B. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria[J]. Journal of General Microbiology, 1982, 16: 135-168.
- [3] Fisher S H. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 32(2):



- 223-232.
- [4] Kumada Y, Benson D R, Hillebrand D, *et al.* Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, 1993, 90(8): 3009-3013.
- [5] Streicher S L, Tyler B. Purification of glutamine synthetase from a variety of bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1980, 142(1): 69-78.
- [6] Sampio M J, Rowell P, Stewart W D P. Purification and some properties of glutamine synthetase from nitrogen fixing cyanobacteria *Anabaena cylindrica*[J]. Journal of General Microbiology, 1979, 111(1): 181-191.
- [7] Gutowski J C, Schreier H J. Interaction of the *Bacillus subtilis glnRA* repressor with operator and promoter sequences in vivo[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(3): 671-681.
- [8] Brown S W, Sonenshein A L. Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis GlnRA* operon[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(8): 2450-2454.
- [9] Kloosterman T G, Hendriksen W T, Bijlsma J, *et al.* Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281: 25097-25109.
- [10] Yao L L, Liao C H, Huang G, *et al.* GlnR-mediated regulation of nitrogen metabolism in the actinomycete *Saccharopolyspora erythraea*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98: 7935-7948.
- [11] Petridis M, Vickers C, Robson J, *et al.* Structure and function of AmtR in *Mycobacterium smegmatis*: implications for post-transcriptional regulation of urea metabolism through a small antisense RNA[J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(21): 4315-4329.
- [12] Ploss T N, Reilman E, Monteferrante C G, *et al.* Homogeneity and heterogeneity in amylase production by *Bacillus subtilis* under different growth conditions[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 57.
- [13] Xu Y, Liao C H, Yao L L, *et al.* GlnR and PhoP directly regulate the transcription of genes encoding starch-degrading, amylolytic enzymes in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(23): 6819-6830.
- [14] Liao C H, Yao L L, Xu Y, *et al.* Nitrogen regulator GlnR controls uptake and utilization of non-phosphotransferase-system carbon sources in actinomycetes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112: 15630-15635.
- [15] Larsen T G, Kloosterman K, Kok J, *et al.* GlnR mediated regulation of nitrogen metabolism in *Lactococcus Lactis*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188: 4978-4982.
- [16] Bravo A, Likitvivanavong S, Gill S, *et al.* *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide[J]. Insect Biochemistry Molecular Biology, 2011, 41(7): 423-431.
- [17] Schaeffer P, Millet J, Aubert J P. Catabolic repression of bacterial sporulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1965, 54(3): 704-711.
- [18] Perchat S, Dubios T, Zouhir S, *et al.* A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group[J]. Molecular Microbiology, 2011, 82(3): 619-633.
- [19] Jeanine C G, Harold J S. Interaction of the *Bacillus subtilis glnRA* repressor with operator and promoter sequences in vivo[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(3): 671-681.
- [20] Brown S W, Sonenshein A L. Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis glnRA* operon[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(8): 2450-2454.
- [21] Shapiro B M, Stadtman E R. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*)[J]. Methods in Enzymology, 1970, 17(4): 910-922.
- [22] Young I E, Fitz-James P C. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formatin in *Bacillus cereus* var. *alesti*[J]. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1959, 6: 483-498.
- [23] Wray L J, Akinson M, Fisher S. Identification and cloning of the *glnR* locus, which is required for transcription of the *glnA* gene in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(22): 7351-7360.
- [24] Wang Y, Cen X F, Zhao G P, *et al.* Characterization of a new GlnR binding box in the promoter of *amtB* in *Streptomyces coelicolor* inferred a PhoP/GlnR competitive binding mechanism for transcriptional regulation of *amtB*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(19): 5237-5244.
- [25] Wang R, Mast Y, Wang J, *et al.* Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*[J]. Molecular Microbiology, 2013, 87(1): 30-48.