

野生型枯草芽胞杆菌超级感受态的构建及效果评价

刘功炜¹ 伍静韵¹ 金妙函¹ 王晓宇^{1,2} 杨雨鑫^{1*} 陈玉林^{1*}

1 西北农林科技大学 动物科技学院, 杨凌 712100; 2 陕西省林业科学院 秦岭大熊猫繁育研究中心, 周至 710402

*通讯作者, yangyuxin2002@126.com; chenylin@nwfau.edu.cn

摘要 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)因其安全性和良好的异源蛋白表达特性,被广泛应用于食品工业、饲料发酵及生物工程等行业,尤其以模式菌枯草芽胞杆菌 168 为宿主菌进行基因工程改造的研究越来越多。但是,来自自然环境的野生型枯草芽胞杆菌由于转化效率极低,其基因工程改造受到了很大程度的限制。本研究通过双交叉同源重组方法,将源自枯草芽胞杆菌 168 的感受态转录因子(competence transcription factor, *comK*)基因融合木糖启动子 *P_{xylA}*,并插入至野生型枯草芽胞杆菌 C6 (BS-C6)的胞外丝氨酸蛋白酶(extracellular serine protease, *eps*)基因位点,成功获得野生型枯草芽胞杆菌超级感受态菌株 C6-comks。结果表明,超级感受态 C6-comks 的质粒转化效率可达到(4117±363) CFU/μg,相对 BS-C6 提高了 8 倍($P<0.01$),转化 PCR 纯化产物效率可达到(442±52) CFU/μg,超过 BS-C6 转化效率的 73.7 倍($P<0.01$)。同时,荧光定量结果表明,C6-comks 中感受态形成关键基因 *comK*、*comGB*、*comGF*、*comFA* 和 *comFC* 的基因表达量相对 BS-C6 分别极显著升高了 77、1 654、1 180、885 和 108 倍($P<0.01$)。本研究成功构建了野生型枯草芽胞杆菌超级感受态菌株,并分析了感受态转化效率产生差异的原因,为基于野生型枯草芽胞杆菌作为表达宿主的基因工程应用提供了良好的借鉴。

关键词 枯草芽胞杆菌;超级感受态;感受态转录因子(*comK*);基因工程

中图分类号 S182; S188 文献标识码 A

Construction and Efficiency Evaluation of the Super-competence of Wild-type *Bacillus subtilis*

LIU Gong-Wei¹ WU Jing-Yun¹ JIN Miao-Han¹ WANG Xiao-Yu^{1,2} YANG Yu-Xin^{1*} CHEN Yu-Lin^{1*}

1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2 Qinling Giant Panda Breeding Research Center, Shaanxi Academy of Forestry Sciences, Zhouzhi 710402, China

* Corresponding authors, yangyuxin2002@126.com; chenylin@nwfau.edu.cn

Abstract *Bacillus subtilis* is a bacterial species widely used in food industry, feed fermentation and bioengineering. This is owing to its safety and excellent ability of heterologous protein expression. In particular, the expansion of studies proved the use of *B. subtilis* 168 as the host strain for genetic engineering. However, the transformation efficiency of *B. subtilis* from the natural environment was extremely low, which greatly limited the application and modification of genetic engineering. In this study, wild-type *B. subtilis* C6 (BS-C6) was selected as the original bacteria for genetic engineering, which was isolated from the intestinal tract of *Reticulitermes labralis* and stored in our laboratory. The engineering bacteria *B. subtilis* C6-comk (C6-comk) and *B. subtilis* C6-comks (C6-comks) were constructed via double-crossover homologous

基金项目:国家绒毛用羊产业技术体系(CARS-39-12);陕西省重点研发计划(2020ZDLNY02-07; 2021ZDLNY05-02);青海省重点研发与转化计划(2020-NK-127)

收稿日期:2021-10-26 接受日期:2021-12-20

recombination. Competence transcription factor (*comK*) is a key regulatory protein that affects genetic competence and DNA uptake in *B. subtilis*. The C6-*comK* strain was obtained by replacing the original promoter of the *comK* gene with xylose-inducible promoter (*P_{xylA}*). On the other hand, the *comK* gene was amplified from the genome of *B. subtilis* 168, and then fused with the xylose-inducible promoter (*P_{xylA}*). The overlap product was inserted into the extracellular serine protease (*epr*) site of wild-type *B. subtilis* C6 by using the homologous recombination approach. The super-competent C6-*comK* strain was successfully obtained. The results showed that the C6-*comK* strain transformed with plasmids and PCR products could not obtain positive clones, indicated that the method needs further improvement. Fortunately, the desirable phenotypes of C6-*comK* strain were observed. The results showed that the plasmid transformation efficiency of C6-*comK* strain was (4117±363) CFU/μg, the efficiency was improved by about 8 folds ($P < 0.01$) compared to BS-C6 (wild type). Notably, the transformation efficiency of PCR products was (442±52) CFU/μg, transcending BS-C6 by about 73.7 folds ($P < 0.01$). Furthermore, the qRT-PCR results showed that the expression of key genes for competence formation were significantly increased compared to BS-C6. The *comK*, *comGB*, *comGF*, *comFA* and *comFC* was improved 77, 1 654, 1 180, 885 and 108 folds ($P < 0.01$), respectively. In contrast, the gene expression levels of flagellar basal-body rod protein (*flgB*), xylose isomerase (*xylA*) and xylulokinase (*xylB*) were only 64% ($P < 0.05$), 12% ($P < 0.01$) and 11% ($P < 0.01$) compared to BS-C6. The gene expression levels of C6-*comK* strain and C6-*comK* strain were also compared. The results showed that the gene expression levels of *comK*, *comGB*, *comGF*, *comFA* and *comFC* were significantly increased by 1.5, 451, 403, 797 and 100 folds ($P < 0.01$) in C6-*comK*, respectively; while *xylA* and *xylB* were significantly reduced by 5.2 and 6.6 folds ($P < 0.01$). There was no treatment effect on *flgB* gene expression between C6-*comK* and C6-*comK* strains ($P > 0.05$). Taken together, this study successfully generated super-competence *B. subtilis* from the natural environment and analyzed the reasons for the difference of transformation efficiency, which provided a valuable reference for genetic engineering application of wild-type *B. subtilis* as a host cell.

Keywords *Bacillus subtilis*; Super-competence; Competence transcription factor (*comK*); Genetic engineering

枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种革兰氏阳性杆状细菌,广泛存在于不同环境中,具有好氧、能够产生抗逆性极强的内生芽胞及异源蛋白表达特性优异等特点(Zhang et al., 2021)。已被美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)认定为安全(generally recognized as safe, GRAS)菌株(Phan et al., 2012)。因此,枯草芽胞杆菌在食品工业、畜牧业和化妆保健品等行业具有广泛的应用(Gu et al., 2018)。模式菌枯草芽胞杆菌168能够在自然状态下形成感受态,且能够高效吸收外源的DNA遗传物质(Spizizen, 1958),经过多年的实验室驯化,是用做异源蛋白表达的理想宿主菌。但是,在特定条件下,枯草芽胞杆菌168并非最佳的表达宿主菌。研究者在富集培养下筛选获得具有最佳表型的出发菌,然后进一步通过基因工程方法增加目的蛋白产量(Yin et al., 2021)。与模式菌枯草芽胞杆菌168相比,野生型枯草芽胞杆菌

具有优良的环境富集筛选效应,更加适合工业和农业生产上的应用(闫新, 2008)。但是野生型枯草芽胞杆菌往往能快速降解外源的DNA物质,转化效率低,不利于高效遗传改造,限制了其在通过基因工程方法进一步提高目的蛋白产量上的应用(张晓舟, 2006; 闫新, 2008)。

感受态转录因子(competence transcription factor, *comK*)是影响枯草芽胞杆菌DNA摄取能力和感受态形成的关键调控蛋白,*comK*基因缺失后,枯草芽胞杆菌不能形成感受态(van Sinderen et al, 1995)。同时,*comK*调控多达64个基因的表达,通过特异性结合上游DNA片段或启动子区域影响感受态形成相关基因的表达,包括DNA转运分子(DNA transport machinery, *comGB*, *comGF*)、膜相关DNA依赖性ATP酶(membrane-associated DNA-dependent ATPase, *comFA*)、后期感受态基因(late competence gene, *comFC*)等,这些基因都参与了枯草芽

胞杆菌的DNA摄取和感受态形成过程(van Sinderen, Venema, 1994; van Sinderen et al, 1995; Zhu, Stulke, 2018)。研究者在枯草芽胞杆菌1A751的基因组中过表达 $comK$ 基因获得超级感受态菌株SCK6,转化效率提高至 10^7 CFU/ μg ,便于在枯草芽胞杆菌中构建突变文库(Zhang, Zhang, 2011)。但是,枯草芽胞杆菌1A751是模式菌枯草芽胞杆菌168的衍生菌株,直接过表达 $comK$ 基因提高转化效率的方式是否适用于来自自然环境的野生型枯草芽胞杆菌值得关注。

本课题组前期从圆唇散白蚁(*Reticulitermes labralis*)肠道成功分离出具有良好纤维素降解特性的野生型菌株枯草芽胞杆菌C6。本研究拟通过直接过表达枯草芽胞杆菌C6自身的 $comK$ 基因以及在枯草芽胞杆菌C6基因组中过表达源自枯草芽胞杆菌168的 $comK$ 基因,以期获得具有高效转化效率的野生型枯草芽胞杆菌超级感受态菌株,为后续的基因工程改造以及遗传机制探究提供良好的研究基础;同时,为其他类型的芽胞杆菌建立具有高效遗传改造的表达系统提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株:枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) C6 (BS-C6)来源于圆唇散白蚁(*Reticulitermes labralis*)肠道,由本课题组前期分离保存;枯草芽胞杆菌168 (BS-168)由江南大学生物工程学院刘龙教授馈赠,大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态JM110购自宝生物工程(大连)有限公司。

质粒:质粒psga、pLcx-dCas9 (Wu et al., 2018)、pCrF11-exc、p43NM-GFP、p43NM-mCherry (Wu et al., 2020)由江南大学生物工程学院刘龙教授馈赠。

试剂:菌落PCR聚合酶2×Rapid Mix购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;高保真PCR聚合酶和去基因组反转录试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司;PCR纯化试剂盒、细菌基因组提取试剂盒和柱式细菌总RNA抽提试剂盒均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;DNA Marker和荧光定量PCR试剂购于北京全式金生物公司;木糖(xylose)购自陕西省国药集团(西安),其他常用试剂为化学分析纯。

培养基:LB液体和LB固体培养基为常规组分。

YN培养液:18 g/L营养肉汤(青岛海博)和7 g/L酵母提取物。SPAB液由SP I液和SP II液组成,参照Wu等(2018)的方法配制。上述培养基均于120 °C条件下高压灭菌20 min。

抗生素:枯草芽胞杆菌的抗生素筛选浓度为:卡那霉素20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,博来霉素20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氯霉素5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2 实验方法

1.2.1 基因片段扩增及融合PCR

分别以BS-C6基因组和质粒pLcx-dCas9为模板,设计引物扩增 $comK$ 基因的上下游同源序列以及含氯霉素抗性基因的木糖启动子序列(lox71-CmR-lox66-PxylA),然后通过融合PCR方法获得全长序列PxylA-comK。以BS-C6基因组为模板,设计引物扩增胞外丝氨酸蛋白酶(extracellular serine protease, *epr*)基因的上下游同源序列;以质粒pLcx-dCas9为模板,设计引物扩增氯霉素筛选抗性基因(lox71-CmR-lox66)序列;以质粒pCrF11-exc为模板,设计引物扩增PxylA-comK-comS序列,然后通过融合PCR方法获得全长序列epr-PxylA-comKs。融合PCR产物纯化回收后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行Sanger测序、进一步鉴定。上述PCR扩增程序和体系均参照高保真PCR聚合酶说明书设置,扩增速度为5 s/kb。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,信息见表1。

1.2.2 野生型枯草芽胞杆菌超级感受态的制备及转化

参照Spizizen法(Spizizen, 1958; Wu et al., 2018)制备自然感受态,以YN培养液+2% xylose诱导制备超级感受态(李信志等, 2017; Zhang, Zhang, 2011)。简述操作如下:

Spizizen法:挑取新鲜单克隆转移至2 mL SP I培养液,37 °C 220 r/min过夜摇菌;次日,将上述过夜培养液40 μL 加入新的2 mL SP I培养液稀释,继续37 °C 220 r/min摇菌4~5 h;取200 μL 培养液加入2 mL新鲜的SP II液,37 °C 220 r/min摇菌1.5~2 h;取20 μL 10 mmol/L的乙二醇双四乙酸(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA)加入上述培养液,37 °C 220 r/min摇菌10 min即获得感受态;500 μL 感受态分装至1.5 mL无菌离心管,加入0.5~2 μg DNA,37 °C 220 r/min摇菌孵育1.5~2 h;5 000

r/min 离心后留用 150~200 μL 上清液重悬菌液, 涂布对应 LB 抗性平板。

超级感受态法(YN+2% xylose): 挑取单菌落至 2 mL YN 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 过夜摇菌; 次日测量 OD_{600} , 以 LB 液稀释至 $OD_{600}=1.0$, 加入终浓度 2% 木糖, 诱导摇菌 2 h; 分装 500 μL /管或者加入终浓度 10% 甘油 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 感受态可用于直接转

化, 涂布对应 LB 抗性平板。

1.2.3 菌落 PCR 鉴定

利用菌落 PCR 对同源重组后的 BS-C6 菌落进行鉴定, 根据 1% 琼脂糖凝胶电泳结果判断是否获得预期目的片段, 所用引物见表 1。PCR 程序和体系参照 PCR 聚合酶 2 \times Rapid Mix 说明书设置。

表 1 同源重组片段及菌落 PCR 引物信息

Table 1 Information of primers used for homologous recombination and colony PCR

引物 Primer	序列(5'~3') Sequence	用途 Purpose
Psga-liner-F	CCGCGATGTTTGCAAAACGA	质粒 psga 扩增 amyE-Zeocin 同源片段(2.3 kb)
Psga-liner-R	TCAATGGGAAGAGAACCGCT	Amplifying homologous fragment (amyE-Zeocin) from vector psga (2.3 kb)
comK-HR-UF	GGCAAGCCAAGTGTTCAT	BS-C6 基因组扩增 comK 左同源臂(1 kb)
comK-HR-UR	GGATCAAATCCGGTCGGTTACGGCATTTCGAG	Amplifying left arm of comK from genome of BS-C6 (1 kb)
lox-CmXyl-F	ATGCCGTAAACCGACCGGATTTGATCCCGTATAC	质粒 pLcx-dCas9 扩增 lox71-CmR-lox66- PxylA 片段
lox-CmXyl-R	CTGTTTTCTGACTCATGGATCCCATTTCCCCCTTGATTTTA	(2.7 kb) Amplifying fragment (lox71-CmR-lox66- PxylA) from vector pLcx-dCas9 (2.7 kb)
comK-HR-DF	GGGAAATGGGATCCATGAGTCAGAAAACAGACGCAC	BS-C6 基因组扩增 comK 右同源臂(1 kb)
comK-HR-DR	CGTCTTTCCCTTTACTGGGTG	Amplifying right arm of comK from genome of BS-C6 (1 kb)
OL-Xyl-ComK-5F	GGTTAAACAATGCAGCTGAGC	融合 PCR 全长序列 PxylA-comK 扩增 (4.5 kb)
OL-Xyl-ComK-3R	TTCCGTATTGCGGAGGGA	Used for fusion PCR to PxylA-comK (4.5 kb)
epr-UF	ACAGCAGCGAGAAAGAGTT	BS-C6 基因组扩增 epr 左同源臂 (1 kb)
epr-UR	GGATCAAATCCGGTCGTTGTCTCGGCAGGATCAC	Amplifying left arm of epr from genome of BS-C6 (1 kb)
lox71-Cm-F	TGCCGAGACAAACGACCGGATTTGATCCCGTATAC	质粒 pLcx-dCas9 扩增 lox71-CmR-lox66 片段 (1.2 kb)
lox71-Cm-R	GAGTCCCCGGGACGTTCTTGCC	Amplifying fragment (lox71-CmR-lox66) from vector pLcx-dCas9 (1.2 kb)
Xyl-ComKs-F	GCAAGAACGTCCCGGGAGCTCC	质粒 pCrF11-exc 扩增 PxylA-comK-comS 片段(2.3 kb)
Xyl-ComKs-R	TTGCTCTGCTGCGCCGGTGATTAATTGCTGAATC	Amplifying fragment (PxylA-comK-comS) from vector pCrF11-exc (2.3 kb)
epr-DF	AATCAACCGCGCAGCAGCAAGCTGTG	BS-C6 基因组扩增 epr 右同源臂(1 kb)
epr-DR	GCATCATTGGGTCTTGCTG	Amplifying right arm of epr from genome of BS-C6 (1 kb)
OL-epr-ComKs-F	AACAAGCCGGAAAGGAAAC	融合 PCR 全长序列 epr-PxylA-comKs 扩增 (5.5 kb)
OL-epr-ComKs-R	CACAATCCCGCCATATGTGG	Used for fusion PCR to epr-PxylA-comKs (5.5 kb)
Pxyl-F	GGGAAATGACAAATGGTCC	菌落 PCR 验证 PxylA-comK 基因插入(1.1 kb)
ComK-R	CGTCTTTCCCTTTACTGGGTG	Used for colony PCR verification of PxylA-comK gene insertion (1.1 kb)
Pexc-ComK-F	TGGAGACAGGGAGTTCTTC	菌落 PCR 验证 epr 位点插入 PxylA-comKs 验证(1.1 kb)
Pexc-ComK-R	GCCGGTTGATTAATTGCTGA	Used for colony PCR verification of PxylA-comKs inserted into the epr site (1.1 kb)

1.2.4 枯草芽胞杆菌感受态的转化效率验证

每种枯草芽胞杆菌感受态各取 500 μL , 分别转化去甲基化质粒 p43NM-GFP (阳性菌落可显绿色) 或 PCR 纯化产物 psga-liner (含博来霉素抗性基因); 涂布相应抗性 LB 平板后, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 24 h, 之后进行菌落平板计数。1 μg 质粒或者 PCR 纯化产物转化 500 μL 感受态获得的菌落克隆子数 (colony-forming unit, CFU) 表示转化效率 (CFU/ μg), 每组设置 3 次生物学重复。

1.2.5 RNA 提取、cDNA 反转录及荧光定量 PCR

制备超级感受态加入终浓度 2% 木糖诱导 2 h 后, 取 1 mL 菌液参照细菌总 RNA 抽提试剂盒说明书提取枯草芽胞杆菌细菌总 RNA, 设定 3 次生物学重复。参照 cDNA 反转录试剂盒说明书进行反转录, 获得的 cDNA 用于后期定量实验。

选取枯草芽胞杆菌感受态形成过程的关键调控基因 *comK*、*comFA*、*comFC*、*comGB*、*comGF*、鞭毛基体杆蛋白 (flagellar basal-body rod protein, *flgB*)、木糖异构酶 (xylose isomerase, *xylA*) 和木酮糖激酶 (xylulokinase, *xylB*), 以及内参基因核糖体蛋白 (ribosomal protein, *rpsJ*), 以 cDNA 原液分别进行 20、50、100 和 1 000 倍的梯度稀释, 根据实时荧光定

量仪 (LightCycler[®] 96, Roche, 瑞士) 内置程序绘制标准曲线。设定 3 次生物学重复, 4 次技术重复, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法 (Schmittgen, Livak, 2008) 计算基因相对表达量。荧光定量 PCR 体系为: 50 倍稀释 cDNA 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的正、反向引物各 0.4 μL , $2\times$ qPCR Mix 10 μL , 无核酸酶水补足至 20 μL 。两步法 qPCR 程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 次循环; 并设定仪器内置熔解曲线程序。荧光定量所用引物见表 2, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2.6 统计分析

本研究结果以 $\bar{x}\pm SD$ 的形式表示。用 SPSS (Version 26.0) 进行统计分析, 以独立样本 *t* 检验 (independent-sample *t*-test) 进行组间差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 BS-C6 与 BS-168 菌株转化效率分析

质粒转化结果表明, BS-168 ($> (2000\pm 0)$ CFU/ μg) 的转化效率超过 BS-C6 ((517 ± 15) CFU/ μg) 的 3.9 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$) (图 1A; 1B)。转化 PCR 纯化产物结果显示 BS-168 ((165 ± 30) CFU/ μg) 的转

表 2 荧光定量 PCR 引物序列

Table 2 Primers used for qRT-PCR

引物 Primer	序列(5'~3') Sequence	用途 Purpose
rpsJ-qPCR-F	GAAACGGCAAAAACGTTCTGG	荧光定量 PCR 内参基因
rpsJ-qPCR-R	GTGTTGGGTTTACAATGTCG	Internal reference gene of qRT-PCR
comK-qPCR-F	GGTGGACCCCTTCGAACCAAA	实时荧光定量 PCR 检测基因表达量
comK-qPCR-R	ACGTCACCTTCCGTATCGTCG	qRT-PCR were performed to detect gene expression
comFA-qPCR-F	ACGCATCAGCTTTTTCGATA	
comFA-qPCR-R	TGAACAGCGAATTGAAGGGT	
comFC-qPCR-F	CCTTTTCTAAGGTTTACCCCGA	
comFC-qPCR-R	TGGTTAAATCCGCGCTCTTCT	
flgB-qPCR-F	CCTCGCTCTTGAAGCGATAA	
flgB-qPCR-R	CGATGTATCTCCGCTCGCAA	
comGF-qPCR-F	TTAAGACAGCCGAGCATGGG	
comGF-qPCR-R	AATCGGAACATGCCCTTTGC	
comGB-qPCR-F	CCCGGCAAATGCTGATTTGTA	
comGB-qPCR-R	GGCCTGATTTTAAAAGGCTGCT	
xylA-qPCR-F	GAGCCGACCACCCATCAATA	
xylA-qPCR-R	CCGGCTAATGTGGCATGATTG	
xylB-qPCR-F	GGACGTCAGGGGTCATACTT	
xylB-qPCR-R	CGTGACGCCATCGTATAAAA	

化效率是 BS-C6 ((6±4) CFU/μg) 的 27.5 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$) (图 1C; 1D)。

2.2 野生型枯草芽胞杆菌超级感受态的构建及鉴定

以双交叉同源重组方法将木糖诱导启动子 P_{xylA} 替换 BS-C6 *comK* 基因的原始启动子 (图 2A)。分别获得 *comK* 左同源臂 (*comK*-LH)、含氯霉素抗性基因的木糖启动子序列 (*lox71*-CmR-*lox66*-P_{xylA}) 和 *comK* 右同源臂 (*comK*-RH) 预期片段 926、2 701 和 1 055 bp (图 2B); 融合 PCR (P_{xylA}-*comK*) 预期片段约 4 700 bp (图 2B)。Spizizen 法制备自然感受态并转化 P_{xylA}-*comK* 纯化产物, 菌落 PCR 鉴定获得预期约 1.1 kb 片段 (图 2C), 表明成功获得阳性克隆子 C6-*comK*。

以双交叉同源重组方法将木糖诱导启动子 P_{xylA} 过表达 BS-168 的 *comK* 和 *comS* 基因结合片段 (P_{xylA}-*comK*-*comS*) 插入到 BS-C6 的 *epr* 位点 (图 3A)。分别获得 *epr* 左同源臂 (*epr*-LH)、氯霉素筛选抗性基因 (*lox71*-CmR-*lox66*)、P_{xylA}-*comK*-*comS* 和 *epr* 右同源臂 (*epr*-RH) 预期片段 963、1 232、2 248 和 988 bp (图 3B); 融合 PCR (*epr*-P_{xylA}-*comKs*) 预期片段约 5 500 bp (图 3B)。Spizizen 法制备自然感受态并转化 *epr*-P_{xylA}-*comKs* 纯化产物, 菌落 PCR 鉴定获得预期约 1.1 kb 片段 (图 3C), 表明成功获得阳性克隆子 C6-*comks*, 且能以超级感受态方法制备感受态并转化质粒 p43NM-mCherry (显粉色) (图 3D)。

2.3 野生型枯草芽胞杆菌超级感受态 C6-*comks* 转化效率验证

质粒转化的结果表明, BS-C6、BS-168 和 C6-*comks* 的转化效率分别为 (517±15) CFU/μg (图 1A)、>(2000±0) CFU/μg (图 1B) 和 (4117±363) CFU/μg (图 4A); C6-*comks* 的转化效率分别是 BS-168 和 BS-C6 的 2.06 和 8 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$)。获得的重组菌 C6-*comk* 转化去甲基化质粒 (图 4B) 无克隆子。

PCR 纯化产物转化结果显示, BS-C6、BS-168 和 C6-*comks* 的转化效率分别为 (6±4) CFU/μg (图 1C)、(165±30) CFU/μg (图 1D) 和 (4 117±363) CFU/μg (图 4C); C6-*comks* 的转化效率分别是 BS-168 和 BS-C6 的 2.7 和 73.7 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$)。重组菌 C6-*comk* 转化 PCR 纯化产物 (图 4D) 无克隆子获得。

2.4 枯草芽胞杆菌感受态形成的关键基因表达量分析

以 LightCycler[®] 96 的内置程序绘制基因扩增标准曲线, 结果表明, 内参基因和目的基因扩增效率均为 1.9~2.1, 相关系数 $R^2 > 0.9$ (表 3), 表明定量引物 (表 2) 可用, 扩增效率满足 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量。

荧光定量结果表明, 与野生型菌株 BS-C6 相比, 在 C6-*comks* 中, *comK*、*comGB*、*comGF*、*comFA* 和 *comFC* 的基因表达量分别极显著升高 77、1 654、

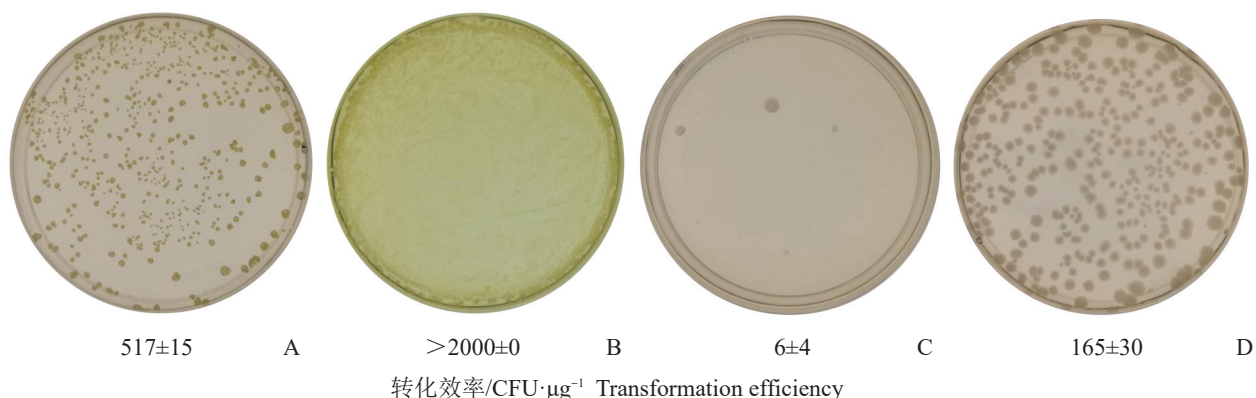


图 1 BS-C6 与 BS-168 转化效率差异

Figure 1 Transformation efficiency of BS-C6 and BS-168

A. BS-C6 转化质粒效果。B. BS-168 转化质粒效果。C. BS-C6 转化 PCR 产物。D. BS-168 转化 PCR 产物

A. Plasmid transformation efficiency of BS-C6. B. Plasmid transformation efficiency of BS-168. C. The transformation efficiency of PCR products in BS-C6. D. The transformation efficiency of PCR products in BS-168

1 180、885 和 108 倍 ($P < 0.01$); 而 *flgB*、*xylA* 和 *xylB* 的基因表达量仅为 BS-C6 的 64% ($P < 0.05$)、12% ($P < 0.01$) 和 11% ($P < 0.01$) (图 5)。

在菌株 C6-comk 中, *comK* 的基因表达量相比 BS-C6 极显著升高 53 倍 ($P < 0.01$), *flgB* 和 *xylA* 的基因表达量仅为 BS-C6 的 69% 和 68% ($P < 0.05$), 其余基因表达量无显著变化 ($P > 0.05$) (图 5)。

3 讨论

枯草芽胞杆菌因其安全无毒的特性, 被广泛应用于工业酶表达、饲料添加和生物防治等领域。与大肠杆菌表达系统相比, 枯草芽胞杆菌表达系统具有细胞壁结构简单、高效分泌及无明显密码子偏好性等蛋白分泌表达优势 (张晓舟, 2006; 卢争辉等,

2015)。但是, 枯草芽胞杆菌的转化效率远远低于大肠杆菌, 从而限制了通过基因工程技术进一步提高其异源蛋白分泌能力的应用。研究人员长期致力于解决枯草芽胞杆菌转化效率的问题, Spizizen (1958) 发现枯草芽胞杆菌 168 菌株具有形成自然感受态的能力, 随后枯草芽胞杆菌 168 及其衍生菌株被广泛应用于枯草芽胞杆菌的理论和应用研究。李瑞芳等 (2011) 优化了枯草芽胞杆菌自然感受态制备的培养基组成, 发现不同基因型枯草芽胞杆菌的质粒转化效率差异较大, 且钙、镁离子对感受态形成有重要作用。李信志等 (2017) 则对枯草芽胞杆菌 SCK6 超级感受态的制备和转化条件进行了优化, 发现 YN 培养基、1.5% 浓度的木糖和去甲基化质粒转化能有效提高质粒转化效率。通过进一步

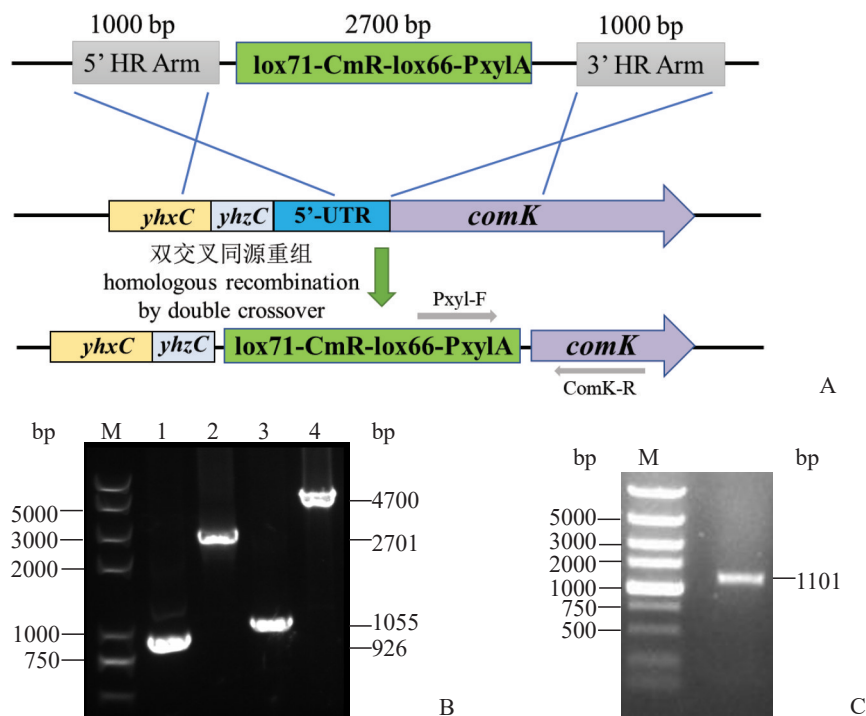


图 2 超级感受态菌株 C6-comk 的构建及鉴定

Figure 2 Construction and identification of super-competence C6-comk strain

A. 同源重组示意图 (5' HR Arm: 左同源臂; lox71-CmR-lox66-PxylA: 含氯霉素抗性基因的木糖启动子序列; 3' HR Arm: 右同源臂; *comK*: 感受态转录调控因子; *yhxC* 和 *yhzC*: *comK* 的上游基因; 5'-UTR: 5' 非翻译区; Pxy1-F/ComK-R: 图 2C 菌落 PCR 的引物位置)。B. 同源重组片段 PCR 检测 (M: 2K plusII DNA Marker; 1: *comK*-LH: *comK* 左同源臂; 2: lox71-CmR-lox66-PxylA; 3: *comK*-RH: *comK* 右同源臂; 4: Pxy1A-*comK* 片段 of overlap PCR)。C. 引物 Pxy1-F/ComK-R 菌落 PCR

A. Schematic of the homologous recombination (5' HR Arm: left arm; lox71-CmR-lox66-PxylA: Xylose-inducible promoter (Pxy1A) with chloramphenicol resistance gene; 3' HR Arm: Right arm; *comK*: competence transcription factor; *yhxC* and *yhzC*: Upstream genes of *comK*; 5'-UTR: 5' untranslated region; Pxy1-F/ComK-R: Position of the primers for colony PCR in Figure 2C). B. PCR products of homologous recombination (M: 2K plusII DNA Marker; 1: *comK*-LH: Left arm of *comK*; 2: lox71-CmR-lox66-PxylA; 3: *comK*-RH: Right arm of *comK*; 4: Pxy1A-*comK* fragment of overlap PCR). C. Colony PCR by primers of Pxy1-F/ComK-R

分析枯草芽胞杆菌生长后期的遗传调控网络,解析感受态形成与芽胞形成的遗传机制,发现了枯草芽胞杆菌感受态形成的关键转录因子 *comK*。研究发现, *comK* 基因表达量的变化会调控细胞形态、影响外源 DNA 吸收等过程,也促进细胞进入感受态状态(van Sinderen et al., 1994; Smits et al., 2005; 卢争辉等, 2015)。这些研究成果为构建来源于自然环境的枯草芽胞杆菌超级感受态提供了良好的理论支撑。

本研究通过对比来源于白蚁肠道的野生型菌株 BS-C6 与模式菌 BS-168 的转化效率,发现野生型枯草芽胞杆菌转化效率极低,尤其当直接转化

PCR 纯化产物时,很难获得重组克隆子。因此期望通过基因重组的方法,在野生型菌株 BS-C6 的基因组中插入源自模式菌 BS-168 的 *comK* 基因,从而提高 BS-C6 的转化效率。比较 C6-*comk* 和 C6-*comks* 的转化效率差异发现,只有 C6-*comks* 能够成功进行转化,并且其质粒转化与 PCR 纯化产物的转化效率均极显著高于 BS-C6 和 BS-168,表明 C6-*comks* 能够形成感受态状态,并高效吸收外源 DNA 遗传物质。

枯草芽胞杆菌中含有多种感受态形成相关蛋白,其中 *comG* 操纵子能够编码 7 种重要的蛋白质,这些蛋白质对于 DNA 转化过程中 DNA 物质与感

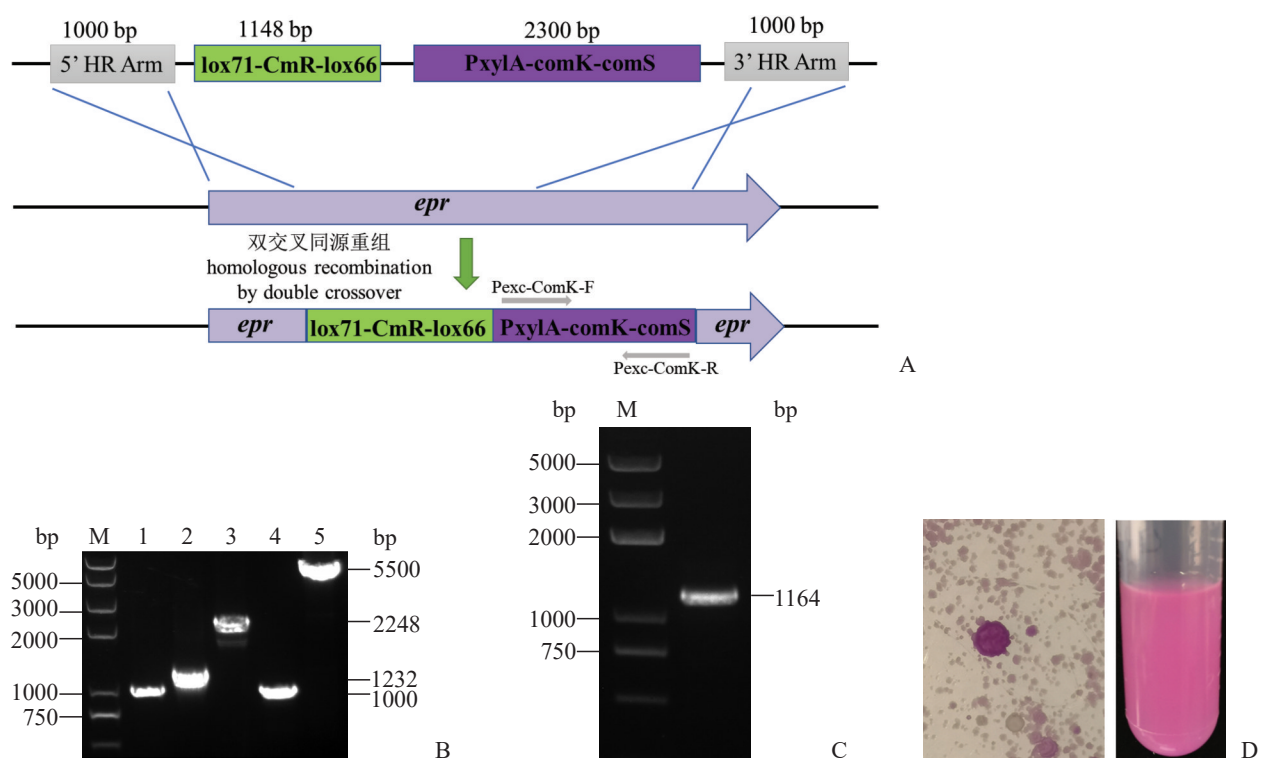


图3 超级感受态菌株 C6-comks 的构建及鉴定

Figure 3 Construction and identification of super-competence C6-comks strain

A. 同源重组示意图(5' HR Arm: 左同源臂; *lox71-CmR-lox66*: 包含氯霉素抗性基因的 *lox* 位点; *PxyIA-comK-comS*: 含木糖启动子的 *comK* 基因序列; 3' HR Arm: 右同源臂; *epr*: 胞外丝氨酸蛋白酶; Pexc-*comK*-F/Pexc-*comK*-R: 图3C 菌落 PCR 的引物位置)。B. 同源重组片段 PCR 检测(M: 2K plusII DNA Marker; 1: *epr*-LH: *epr* 左同源臂; 2: *lox71-CmR-lox66*; 3: *PxyIA-comK-comS*; 4: *epr*-RH: *epr* 右同源臂; 5: 融合 PCR 片段(*epr*-*PxyIA-comKs*))。C. 引物 Pexc-*comK*-F/Pexc-*comK*-R 菌落 PCR。D. C6-*comks* 转化 p43NM-mCherry 验证超级感受态构建

A. Schematic of the homologous recombination (5' HR Arm: Left arm; *lox71-CmR-lox66*: Chloramphenicol resistance gene between *lox71* and *lox66*; *PxyIA-comK-comS*: Xylose-inducible promoter (*PxyIA*) with *comK* gene; 3' HR Arm: Right arm; *epr*: Extracellular serine protease; Pexc-*comK*-F/Pexc-*comK*-R: The position of the primers for colony PCR in Figure 3C). B. PCR product of homologous recombination (M: 2K plusII DNA Marker; 1: *epr*-LH: Left arm of *epr*; 2: *lox71-CmR-lox66*; 3: *PxyIA-comK-comS*; 4: *epr*-RH: Right arm of *epr*; 5: *epr*-*PxyIA-comKs* fragment of overlap PCR). C. Colony PCR by primers of Pexc-*comK*-F/Pexc-*comK*-R. D. C6-*comks* transformed p43NM-mCherry to verify the construction of super-competence

受态细胞表面结合发挥重要作用(Kramer et al., 2007)。comG 蛋白属于多个蛋白家族,而这些蛋白家族与蛋白质分泌过程密切相关,comGB 属于 comG 蛋白家族的第 2 家族,comGB 缺失会导致细菌转化能力降低(Chung et al., 1998)。comGF 不属于任何 comG 蛋白家族,其作为一种小蛋白,是 DNA 物质与感受态细胞表面结合必不可少的蛋白(Chung, Dubnau, 1998)。comFA 和 comFC 均由 comF 操纵子编码,这两种蛋白均参与 DNA 物质转化,在细菌整合环境中 DNA 物质发挥重要作用(Chilton et al., 2017)。本研究荧光定量 PCR 结果显示, C6-comks 中 *comK*、*comGB*、*comGF*、*comFA* 和 *comFC* 的基因表达量显著增加,这能够解释菌株 C6-comks 的转化效率大大提升这一现象,表明成功构建了超级感受态菌株。而对于菌株 C6-comk,除了 PxyIA 直接过表达的 *comK* 基因表达量升高,其他与感受态形成相关的关键基因表达量并没有发生改变,这也解释了 C6-comk 转化质粒和 PCR 产物均不能获得克隆子的原因,说明通过木糖启动子直接过表达 BS-C6 自身的 *comK* 基因不能获得超级感受态菌株。由于 C6-comk 和 C6-comks 基因组中均插入了木糖诱导启动子 PxyIA,更多的木糖被启动子消耗,因此 C6-comk 和 C6-comks 中的木糖降解关键酶基因 *xylA* 和 *xylB* 表达量与野生型菌株 BS-C6 相比显著降低。综上所述,重组菌 C6-comks 经木糖诱导启动子 PxyIA 过表达 BS-168 的 *comK* 基因后,引起感受态形成相关基因高表达,从而提高转化效率。

4 结论

本研究通过双交叉同源重组方法,将来源于模式菌枯草芽胞杆菌 168 的感受态形成关键调控基因 *comK* 和 *comS* 整合至野生型枯草芽胞杆菌 C6 的 *epr* 位点,并以木糖启动子 PxyIA 诱导关键基因过表达,成功制备了野生型枯草芽胞杆菌超级感受态 C6-comks。C6-comks 能高效转化质粒和 PCR 纯化产物,为后续的基因工程改造以及遗传机制探究提供了良好的研究基础。同时,为其他类型的芽胞杆

表 3 感受态形成相关基因的扩增效率

Table 3 Amplification efficiency of genes related to competence formation

基因名称 Gene name	斜率 Slope	扩增效率 Efficiency	相关系数(R^2) Correlation index (R^2)
<i>comK</i>	-3.56	1.91	0.95
<i>comFA</i>	-3.28	2.02	0.91
<i>comFC</i>	-3.33	2.00	0.99
<i>comGB</i>	-3.47	1.94	0.93
<i>comGF</i>	-3.57	1.91	0.99
<i>flgB</i>	-3.48	1.94	0.99
<i>xylA</i>	-3.29	2.01	0.98
<i>xylB</i>	-3.37	1.98	0.98
<i>rpsJ</i>	-3.21	2.05	1.00

com: 感受态形成相关蛋白; *flgB*: 鞭毛基体杆蛋白; *xylA*: 木糖异构酶; *xylB*: 木酮糖激酶; *rpsJ*: 核糖体蛋白; 下同
com: Competent proteins; *flgB*: Flagellar basal-body rod protein; *xylA*: Xylose isomerase; *xylB*: Xylulokinase; *rpsJ*: Ribosomal protein; The same below

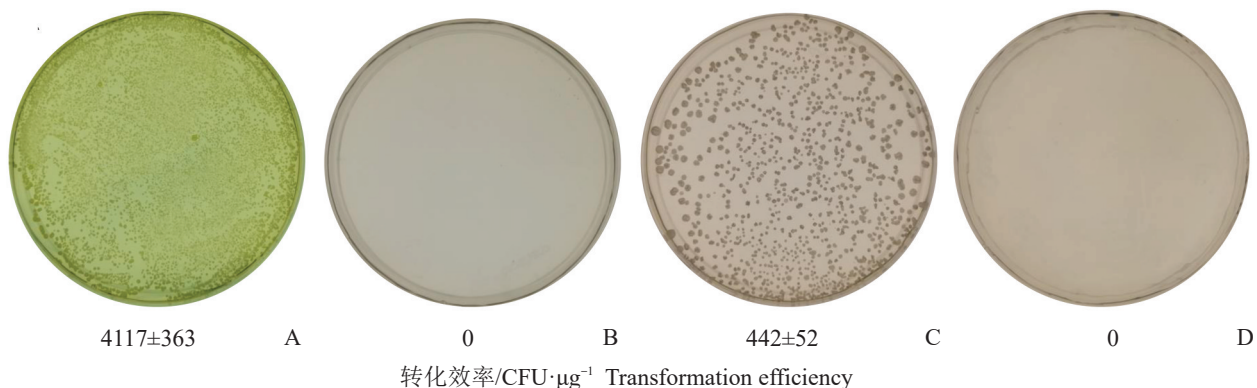


图 4 枯草芽胞杆菌超级感受态 C6-comks 转化效率验证

Figure 4 Evaluation transformation efficiency of *Bacillus subtilis* C6-comks

A. C6-comks 转化质粒效果。B. C6-comk 转化质粒效果。C. C6-comks 转化 PCR 产物效果。D. C6-comk 转化 PCR 产物效果
A. Plasmid transformation efficiency of C6-comks. B. Plasmid transformation efficiency of C6-comk. C. PCR products transformation efficiency of C6-comks. D. PCR products transformation efficiency of C6-comk

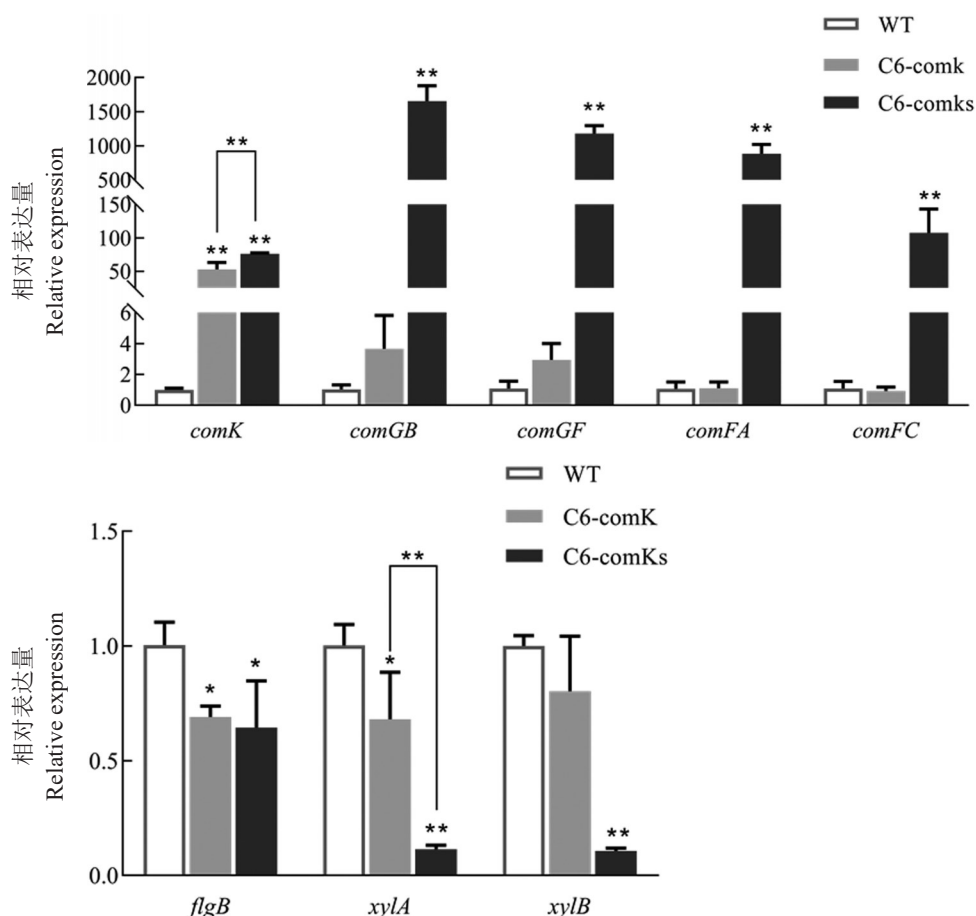


图5 荧光定量PCR检测感受态形成关键基因的相对表达

Figure 5 Detection of the relative expression of key genes for competent cells formation using qRT-PCR

WT:野生型菌株;C6-comk:菌株C6-comk(未获得超级感受态菌株);C6-comks:菌株C6-comks(超级感受态菌株);com:感受态形成相关蛋白;*:差异显著($P<0.05$);**:差异极显著($P<0.01$)

WT: Wild-type strain; C6-comk: Strain C6-comk (super-competent strain cannot be obtained); C6-comks: Strain C6-comks (super-competent strain); com: Competent proteins; *: Significant difference ($P<0.05$); **: Extremely significant difference ($P<0.01$)

菌建立具有高效遗传改造的表达系统提供一定的理论指导。

致谢

衷心感谢江南大学生物工程学院武耀康博士和湖北大学生命科学学院卢争辉博士对实验操作的指导和帮助!

参考文献

李瑞芳, 薛雯雯, 黄亮, 等. 2011. 枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备及质粒转化方法研究[J]. 生物技术通报, 35(05): 227-230. (Li R F, Xue W W, Huang L, et al. 2011. Competent preparation and plasmid transformation of *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Bulletin, 35(05): 227-230.)

李信志, 卢争辉, 周玉玲, 等. 2017. 枯草芽孢杆菌 SCK6 超级感受态的制备和转化条件优化[J]. 生物工程学报, 33(4): 692-698. (Li X Z, Lu Z H, Zhou Y L, et al. 2017. Preparation and transformation optimization for super-competent *B. subtilis* SCK6 cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 33(4): 692-698.)

卢争辉, 周玉玲, 张晓舟, 等. 2015. 感受态还是芽孢?细胞命运决定的遗传调控网络[J]. 生物工程学报, 31(011): 1543-1552. (Lu Z H, Zhou Y L, Zhang X Z, et al. 2015. Sporulation or competence development? A genetic regulatory network model of cell-fate determination in *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 31(011): 1543-1552.)

闫新. 2008. 枯草杆菌基因一步敲除法的建立和 MPH 在芽孢杆菌中表达的研究[D]. 博士学位论文, 南京农业大

- 学, 导师: 李顺鹏, pp. 101-110. (Yan X. 2008. Establishment of one-step gene knockout method in *Bacillus subtilis* and studies on MPH expression in *Bacillus*[D]. Thesis for Ph D, Nanjing Agriculture University, Supervisor: Li S P. pp. 101-110.)
- 张晓舟. 2006. 枯草杆菌新型表达系统和遗传操作体系的建立及应用[D]. 博士学位论文, 南京农业大学, 导师: 李顺鹏. pp. 1-21. (Zhang X Z. 2006. Establishment and application of the new expression and genetic manipulation system in *Bacillus subtilis*[D]. Thesis for Ph. D, Nanjing Agriculture University, Supervisor: Li S P, pp. 1-21.
- Chilton S S, Falbel T G, Hromada S, et al. 2017. A conserved metal binding motif in the *Bacillus subtilis* competence protein ComFA enhances transformation[J]. *Journal of Bacteriology*, 199(15): e00272-17.
- Chung Y S, Breidt F, Dubnau D. 1998. Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular Microbiology*, 29(3): 905-913.
- Chung Y S, Dubnau D. 1998. All seven comG open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 180(1): 41-45.
- Gu Y, Xu X, Wu Y, et al. 2018. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications[J]. *Metabolic Engineering*, 50: 109-121.
- Kramer N, Hahn J, Dubnau D. 2007. Multiple interactions among the competence proteins of *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 65(2): 454-464.
- Phan T T, Nguyen H D, Schumann W. 2012. Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements[J]. *Journal of Biotechnology*, 157(1): 167-172.
- Schmittgen T D, Livak K J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nature Protocol*, 3(6): 1101-1108.
- Smits W K, Eschevins C C, Susanna K A, et al. 2005. Stripping *Bacillus*: ComK auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development[J]. *Molecular Microbiology*, 56(3): 604-614.
- Spizizen J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 44(10): 1072-1078.
- van Sinderen D, Luttinger A, Kong L, et al. 1995. comK encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 15(3): 455-462.
- van Sinderen D, Venema G. 1994. ComK acts as an autoregulatory control switch in the signal transduction route to competence in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 176(18): 5762-5770.
- Wu Y, Chen T, Liu Y, et al. 2018. CRISPRi allows optimal temporal control of N-acetylglucosamine bioproduction by a dynamic coordination of glucose and xylose metabolism in *Bacillus subtilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 49: 232-241.
- Wu Y, Liu Y, Lv X, et al. 2020. CAMERS-B: CRISPR/Cpf1 assisted multiple-genes editing and regulation system for *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(6): 1817-1825.
- Yin X, Zhang G, Zhou J, et al. 2021. Combinatorial engineering for efficient production of protein-glutaminase in *Bacillus subtilis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 150: 109863.
- Zhang Q, Wu Y, Gong M, et al. 2021. Production of proteins and commodity chemicals using engineered *Bacillus subtilis* platform strain[J]. *Essays in Biochemistry*, 65(2): 173-185.
- Zhang X, Zhang Y H P. 2011. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Biotechnology*, 4(1): 98-105.
- Zhu B, Stulke J. 2018. SubtiWiki in 2018: From genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 46 (D1): D743-D748.

(责任编辑 张丽春)