

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.05.026

# 短小芽孢杆菌 sRNA *Bpsr112* 的鉴定及功能研究

覃 佳, 徐云帆, 黄 宇, 王海燕

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

**摘 要:** 为了给短小芽孢杆菌的改造提供新思路,提高碱性蛋白酶产量,实验室前期对短小芽孢杆菌进行了转录组测序,预测了短小芽孢杆菌的 sRNA. 本研究通过生物信息学方法和 Northern 杂交鉴定了一个新的 sRNA *Bpsr112*. 然后构建了 *Bpsr112* 的敲除型菌株和过表达菌株,利用相关菌株进行了生长曲线、盐胁迫和蛋白酶活等实验,再利用 SDS-PAGE 检测胞外蛋白酶 AprE 的表达水平. 结果表明,在发酵至 60 h 和 72 h 时,与对照菌株相比,敲除型菌株酶活显著降低( $P<0.01$ ),过表达菌株酶活显著提高( $P<0.01$ );同时 SDS-PAGE 结果表明, AprE 蛋白含量在敲除菌株中降低,在过表达菌株中提高,说明 sRNA *Bpsr112* 对短小芽孢杆菌蛋白酶活具有正调控. 本研究鉴定了短小芽孢杆菌中的 sRNA,并发现 *Bpsr112* 对蛋白酶活具有促进作用.

**关键词:** 短小芽孢杆菌; sRNA; 胞外蛋白酶; Northern 杂交

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2020)05-0993-09

## Identification and functional study on sRNA *Bpsr112* of *Bacillus pumilus*

QIN Jia, XU Yun-Fan, HUANG Yu, WANG Hai-Yan

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** In order to provide new ideas for the transformation of *Bacillus pumilus* and increase the yield of alkaline protease, in our previous studies, transcriptome of *Bacillus pumilus* was analysed based on RNA-seq and sRNAs were predicted. In this study, a new sRNA *Bpsr112* was identified by the bioinformatics analysis and northern blot. Then the knockout and overexpression strains of *Bpsr112* were constructed, and the growth curve, salt stress and protease activity were compared among them. The results showed that, compared with the control strains at 60h and 72h, the protease activities of knockout strains were significantly decreased ( $P<0.01$ ), while the protease activities of overexpression strains were significantly increased ( $P<0.01$ ). At the same time, SDS-PAGE results showed that the content of AprE protein decreased in knockout strains and increased in overexpression strains. These results indicated that *Bpsr112* may has positive regulation on the protease activity of *Bacillus pumilus*. In this study, sRNA in *Bacillus pumilus* was identified, and *Bpsr112* was found to promote protease activity.

**Keywords:** *Bacillus pumilus*; Small RNA; Extracellular protease; Northern blot

# 1 引 言

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) SCU11 是一株经过复合诱变的菌株,能够通过发酵培养高效产生胞外蛋白酶,发酵液具有良好的生皮脱毛效果,在生物制革方面具有广阔的应用前景<sup>[1,2]</sup>.

细菌小 RNA (small RNA, 又称作 sRNA) 是一类能够转录,但通常不编码蛋白质的 RNA,长 50-500 nt,大多数由基因组上的基因间隔区编码,少数由基因编码区的互补链编码.

基因间隔区的 sRNA 主要通过不完全的碱基配对与靶基因的 mRNA 直接结合<sup>[3]</sup>,影响靶 mRNA 的翻译<sup>[4]</sup>或者稳定性<sup>[5]</sup>,从而实现对不同靶基因的调控.已有的研究表明,sRNA 能参与调控铁离子代谢<sup>[6-7]</sup>、碳代谢<sup>[8-9]</sup>、氨基酸代谢<sup>[10-11]</sup>、细菌毒力<sup>[12]</sup>、酸胁迫<sup>[13]</sup>、氧化胁迫<sup>[14]</sup>和蛋白酶活<sup>[15]</sup>等多个生理过程.目前越来越多的 sRNA 被发现,然而

研究多集中在大肠杆菌等革兰氏阴性菌中,革兰氏阳性菌研究相对较少.

本实验室前期对短小芽孢杆菌 SCU11 在发酵培养的各个关键生长时期的总 RNA 进行了链特异性转录组测序,并预测了 sRNA<sup>[16]</sup>.我们发现了一个长约 118 nt 的 sRNA *Bpsr112*,在短小芽孢杆菌不同生长时期转录活性差异较大,在 48 h 转录活性达到最高,而胞外蛋白酶酶活通常在 48 h 最高,这暗示 *Bpsr112* 可能在这个时期发挥作用.本研究对 *Bpsr112* 在短小芽孢杆菌的生长代谢、胁迫应答和蛋白酶活等生理过程中发挥的作用进行了描述.

# 2 材料与方法

## 2.1 材 料

2.1.1 菌株和质粒 本研究所用的菌株和质粒详见表 1.

表 1 菌株和质粒  
Tab. 1 Strains and plasmids

Strains or plasmids	Description	Resource
<i>B. pumilus</i> strains		
SCU11	<i>Bacillus pumilus</i> strains producing alkaline proteases	This laboratory
SCU11(Δ112)	SCU11 carrying an in-frame deletion in the <i>Bpsr112</i> gene	This study
<i>E. coli</i> strains		
DH5a	<i>F</i> <sup>-</sup> , $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M</i> 15, Δ( <i>lacZYA</i> - <i>argF</i> ) <i>U</i> 169, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17 ( <i>rK</i> <sup>-</sup> , <i>mK</i> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE</i> 44, $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>thi</i> <sup>-</sup> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>relA</i> 1	This laboratory
Plasmids		
pUCETs	<i>E. coli</i> / <i>Bacillus</i> shuttle vector; <i>ermCR</i> <i>Amp</i> <sup>R</sup> , <i>OriE. coli</i> , <i>Ori</i> <i>ts</i> , <i>LacZ</i>	This laboratory <sup>[17]</sup>
pUCETs-Δ112	pUCETs derivative, carrying a deletion cassette for <i>Bpsr112</i> gene	This study
pSU03m	<i>E. coli</i> / <i>Bacillus</i> shuttle vector; <i>LacZ</i> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> , <i>Kan</i> <sup>R</sup> , <i>Ori</i> , <i>E. coli</i> , <i>DSO</i> , <i>SSO</i>	This laboratory
pSU03m-112	pSU03m derivative, carrying <i>aBpsr112</i> gene	This study

2.1.2 培养基 发酵培养基(1L):麸皮 25 g,黄豆粉 20 g, K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 4 g, 酵母粉 3 g, CaCO<sub>3</sub> 3 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 g, pH = 8.3.

M9 基本培养基(1L): Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 17.096 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, NaCl 0.5 g, 20% 葡萄糖 10 mL, 2M MgSO<sub>4</sub> 1 mL, 0.1M CaCl<sub>2</sub> 1 mL.

MM 培养基(1L):蛋白胨 10 g, 硫酸铵 2 g, K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 14 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g, 柠檬酸钠 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, 葡萄糖 5g, 酵母粉 2.5 g.

群集运动(Swarming)培养基:在 LB 培养基中补充 0.5%(m/v)葡萄糖、0.6%(m/v)琼脂粉.

2.1.3 主要工具酶和试剂 DIG-Northern Star-

ter kit 购自 Roche 公司;PrimeStar Max、SYBR II 以及反转录试剂盒购自 TaKaRa (大连)公司;常规 rTaq 酶和多片段克隆连接试剂盒购自南京诺维赞生物科技有限公司;限制性内切酶购自 Fermentas (Thermo) 公司;质粒提取、胶回收和纯化试剂盒购自 OMEGA 公司;TRIzol Reagent 购自 Life Technologies 公司;福林酚购自科伦公司;山梨醇、甘露醇、甜菜碱购自生工生物工程上海(股份)有限公司;其它试剂均为国产分析纯.

## 2.2 方 法

2.2.1 引物设计 采用 Primer 5 软件进行引物设计,表 2 列出了本研究所用的主要引物信息.

表 2 本研究使用的引物  
Tab. 2 Primers used in this study

引物名称	用途	序列(5'-3')
T7-112-F	<i>Bpsr112</i> 探针	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGTTGCGTAATGTTATTGTATAAAAC
T7-112-R		CTTCTTTTCGGCAAGATATGAG
<i>Bpsr112</i> -AF	同源臂 A	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGTTTTTCGATTGTTTTAGCGGA
<i>Bpsr112</i> -AR		CGTCATCATCTGTATGAATCGCAACCTGAATCTACTTTGAAAAACA
<i>Bpsr112</i> -BF	同源臂 B	GAACGATGACCTCTAATAATTGGTCACCTTTTGAGGAAAACCTCTTAGTA
<i>Bpsr112</i> -BR		CGGTACCCGGGGATCCTTCTGAGGCTGGTCCCTTACTT
kan-F	<i>Kan<sup>R</sup></i> 基因	CAATTATTAGAGGTCATCGTTC
kan-R		GATTCATACAGATGATGACG
112screen-F	筛选双交换	CGAATTACCGACTCTCAAACATATG
112screen-R		TCACATTACACAAATCAACAAAAAAGC
kan-yz-R	筛选单交换	CTTCCTAAGCATCCTTCAATCC
GBD-112-F	<i>Bpsr112</i> 基因	CGGAATTCAACACCTAAAATGCCGCC
GBD-112-R		CGGAATTCAACATCCAACGGTTAGTCCC

2.2.2 生物信息学分析 *Bpsr112* 的转录活性和靶基因 利用生物信息学方法,将短小芽孢杆菌 SCU11 的转录组数据比对到短小芽孢杆菌 BA06 基因组,生成 bam 文件,通过 IGV 可视化 *Bpsr112* 的转录活性,获得 *Bpsr112* 表达活性堆积图. 利用 TargetRNA2 和 CopraRNA 软件预测靶基因.

2.2.3 总 RNA 提取、反转录和 Northern 杂交 将过夜活化的菌株接种到 30 mL LB 中,37℃,200 r/min,培养 48 h,然后离心收集菌体,加入 15 mg/mL 的溶菌酶重悬,37℃,温浴 10 min,最后利用 TRIzol 提取样品总 RNA. 利用反转录试剂盒去除 gDNA,再进行反转录,得到 cDNA,用于 qRT-PCR 分析. 利用 DIG-Northern Starter kit 试剂盒进行 Northern 杂交,先用 T7-112-F/R 引物扩增出融合 T7 启动子的 *Bpsr112* 片段,然后体外转录,获得带标记的反义链 RNA 探针(用于杂交和 Maker),总 RNA 电泳后与 RNA 探针进行 Northern 杂交,成像观察.

2.2.4 短小芽孢杆菌电转化 短小芽孢杆菌 SCU11 的电转化参照王超等人<sup>[17]</sup>建立的高渗透压电转化法进行,只是将电压调整至 2 200 V,其余条件和步骤与文献方法一致.

2.2.5 *Bpsr112* 基因敲除载体的构建 以温度敏感型穿梭质粒 pUCETs 为骨架载体,以抗性基因 *kan* 替代 *Bpsr112* 目的基因,构建敲除载体 pUCETs- $\Delta$ 112,载体的同源臂构建策略如图 1 所示.

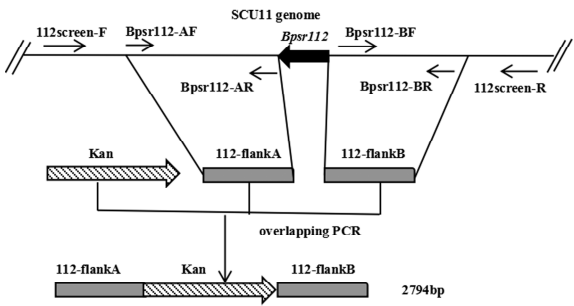


图 1 敲除载体 pUCETs- $\Delta$ 112 的同源臂构建策略  
Fig. 1 Construction strategy of homologous arms in knockout vector pUCETs- $\Delta$ 112

2.2.6 *Bpsr112* 基因敲除菌株的筛选 通过高渗透压电转化法,将敲除载体 pUCETs- $\Delta$ 112 转化至短小芽孢杆菌 SCU11. 挑单菌落至 5 mL 含 5  $\mu$ g/mL 红霉素和 10  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 中,30℃振荡培养 36 h. 再按 1% 比例接到 30 mL 无抗 LB 中,42℃振荡培养 12 h,连续传 3 代. 菌液稀释后涂布于含 4  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板,用 112screen-F/*kan*-yz-R 引物筛选单交换整合子. 挑单交换菌落于 5 mL 无抗 LB 中,42℃振荡培养 12 h,连续传 2 代,菌液稀释后涂布于含 4  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板,然后用 112screen-F/R 引物筛选 *Bpsr112* 基因敲除菌株.

2.2.7 *Bpsr112* 基因表达载体的构建 用质粒 pSU03m 作为骨架载体,以 SCU11 的 gDNA 为模板,以 GBD-112-F/R 为引物,扩增 *Bpsr112* 基因

和其上下游启动子、终止子的序列,通过酶切连接插入 pSU03m 载体,筛选后得到用于过表达的表达载体 pSU03m-112.

2.2.8 生长曲线的测定 将过夜活化的菌液稀释到  $OD_{600nm}=1.0$ ,然后按 1% 比例转接到 30 mL M9 液体培养基中,再在 37 °C,200 r/min 培养,在合适的时间点取样,测量  $OD_{600nm}$  时的吸光值,绘制生长曲线.盐胁迫实验在含有 0.8 mol/L NaCl 的 MM 培养基中进行,然后测生长曲线.

2.2.9 运动性实验 将过夜活化的菌液稀释到  $OD_{600nm}=1.0$ ,吸取 1  $\mu$ L 实验菌液和对照菌液,点在同一个 Swarming 平板上,然后正置于 37 °C 培养箱,12 h,拍照观察,每组 3 个重复.

2.2.10 发酵培养及蛋白酶活测定 将过夜活化的菌液稀释到  $OD_{600nm}=1.0$ ,然后按照 4% 的比例接种至 25 mL 发酵培养基中,每个菌株三个重复,34 °C,200 r/min 培养,分别在 48 h、60 h、72 h 和 84 h 收集发酵液,13 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清测定蛋白酶活,蛋白酶活的测定按照蛋白酶活测定标准 GB/T 23527-2009<sup>[18]</sup> 进行.

### 3 结 果

#### 3.1 转录组数据分析显示 *Bpsr112* 是一个差异表达的 sRNA

本实验室前期对短小芽孢杆菌 SCU11 在各个发酵时期的总 RNA 进行了链特异性转录组测序.本研究首先对转录组数据中 *Bpsr112* 在不同时间点的 RPKM 值以及 *Bpsr112* 及其邻近染色体区域的 reads 覆盖情况进行了分析,结果显示(图 2A),*Bpsr112* 在不同时间点差异转录,在 36 h 之前几乎没有表达,但在 48 h 迅速达到峰值,然后下降,初步推测 *Bpsr112* 发挥功能是在 48 h,而前期的实验结果表明,胞外蛋白酶酶活通常是在 48 h 达到最高.我们进一步分析了 48 h 转录组样品中 *Bpsr112* 和其邻近基因位置的 reads 覆盖情况,结果显示(图 2B)*Bpsr112* 的转录方向和染色体上的下游基因 RI02\_RS06200(编码假设蛋白)相反,与上游基因 RI02\_RS06195(*ispA*,编码丝氨酸蛋白酶)转录方向相同,并且与 *ispA* 基因启动子部分重叠.进一步比较 6 h,12 h 和 48 h 的 reads 堆积图,结果显示(图 2C) *Bpsr112* 所在区域在 6 h 和 12 h 均无 reads 覆盖,但上游基因 RI02\_RS06195 却一直在表达,因此推测 *Bpsr112* 是一个独立转录的 sRNA,不属于上游基因的 5'UTR 区域.

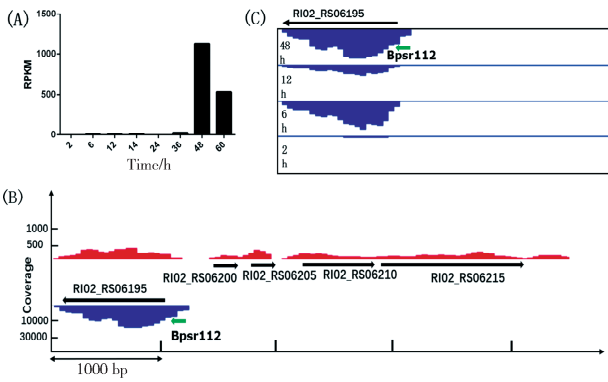


图 2 转录组分析 *Bpsr112* 的表达水平  
(A) *Bpsr112* 在不同时间点转录水平的 RPKM 值; (B) 48 h 样品中 *Bpsr112* 和其邻近染色体区域的 reads 覆盖情况; 横坐标表示 DNA 长度,纵坐标为 reads 的覆盖数目,红色表示染色体正义链的 reads 覆盖度,蓝色表示反义链的 reads 覆盖度,绿色箭头表示 *Bpsr112* 基因及其方向,黑色箭头表示邻近基因及其方向; (C) 2 h、6 h、12 h、48 h 四个时间点 *Bpsr112* 和其上游基因 RI02\_RS06195 在染色体上的 reads 覆盖情况.  
Fig. 2 Transcriptome analysis of *Bpsr112* expression levels  
(A) RPKM value of *Bpsr112* at different time points; (B) the reads coverage of *Bpsr112* and its adjacent chromosomal regions in 48h; the abscissa represents the length of DNA, the ordinate represents the number of reads coverage, the red region represents the reads coverage of sense chain, the blue region represents the reads coverage of antisense chain, the green arrow represents the *Bpsr112* gene and its direction, the black arrow represents the adjacent gene and its direction; (C) the reads coverage of *Bpsr112* and its upstream gene RI02\_RS06195 at 2 h, 12 h and 48 h.

#### 3.2 *Bpsr112* 基因序列保守性分析

通过 NCBI 比对分析 *Bpsr112* 基因序列,发现 *Bpsr112* 基因在随机挑选的 19 个短小芽孢杆菌株 (*B. pumilus*) 中高度保守,在亲缘关系很近的 *B. cellulosensis*、*B. aerophilus*、*B. safensis*、*B. sp.* WP8、*B. altitudinis* 等菌株中都存在同源序列.用进化树分析 *Bpsr112* 序列保守性,如图 3 所示,在

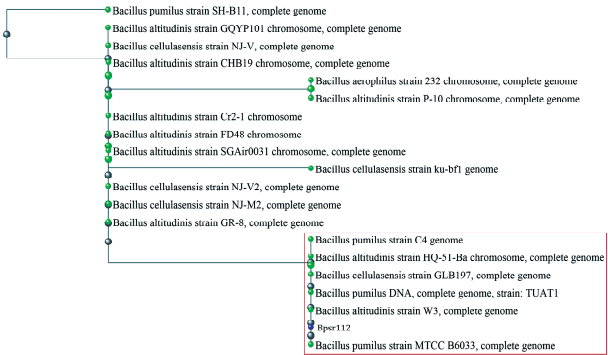


图 3 *Bpsr112* 序列的进化树  
Fig. 3 Evolutionary tree of *Bpsr112* sequence

红色方框的六个菌株中,*Bpsr112* 序列的一致性达到 100%,具有高度的结构和序列保守性.但是另

一方面,在模式菌株枯草芽孢杆菌 168 中却不存在 *Bpsr112*,这或许和亲缘关系的远近以及 sRNA 的物种特异性有关.

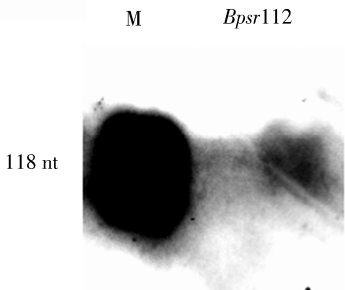


图 4 Northern 杂交鉴定 sRNA *Bpsr112*  
总 RNA 上样量为 10  $\mu$ g, M 为带标记的 RNA 探针,左边显示探针长度.

Fig. 4 Northern blot of sRNA *Bpsr112*  
The total RNA sample loading volume is 10  $\mu$ g, M is labeled RNA probe, and the length of probe is shown on the left.

3.3 Northern 杂交鉴定 *Bpsr112*

Northern 杂交是验证基因转录的标准实验. 因为转录组测序显示 *Bpsr112* 在 48h 表达水平最高,因此将 SCU11 发酵到 48 h 的总 RNA 进行

Northern 杂交,结果如图 4 所示,*Bpsr112* 产生一条杂交带,而且大小和探针一致,说明和转录组预测的 118 nt 基本一致,而且证明它是独立转录的 sRNA.

3.4 *Bpsr112* 的靶基因预测

由基因间隔区编码的 sRNA 主要通过不完全的碱基配对与靶 mRNA 结合,影响靶 mRNA 的翻译或稳定性. 了解 sRNA 结合的靶基因,对于深入研究 sRNA 功能和后续实验具有指导作用. 因此,采用不同软件对 *Bpsr112* 的潜在靶基因进行预测. 利用 TargetRNA2 软件预测出 30 个靶基因,利用 CopraRNA 软件预测出的 200 个靶基因,表 3,表 4 分别展示前 15 个预测的靶基因,功能涉及氨基酸代谢、细胞壁合成、细菌运动性等多个生理代谢. 其中,TargetRNA2 预测的靶基因 *fliM* 与细菌的运动性相关,*glmS* 参与细胞壁的形成. CopraRNA 预测出蛋白酶基因 *aprE*,而 AprE 是短小芽孢杆菌胞外蛋白酶活的主要贡献者,因此 *Bpsr112* 具有深入研究价值. 但是,两个软件预测的靶基因几乎没有重合.

表 3 TargetRNA2 预测 *Bpsr112* 靶基因  
Tab. 3 *Bpsr112* targets predicted by TargetRNA2

Rank	Gene	Synonym	p-value	Annotation
1	—	bpum_rs05255	0.002	Glutamate or tyrosine decarboxylase or a related PLP-dependent protein
2	—	bpum_rs05070	0.002	Anionic cell wall polymer biosynthesis enzyme, LytR-Cps2A-Psr (LCP) family
3	—	bpum_rs01285	0.007	Alpha-mannosidase
4	<i>fliM</i>	bpum_rs07715	0.01	Flagellar motor switch protein FliM
5	—	bpum_rs07200	0.014	DNA-binding transcriptional regulator LsrR, DeoR family
6	<i>glmS</i>	bpum_rs01040	0.02	Glucosamine 6-phosphatesynthetase, contains amidotransferase and phosphosugar isomerase domains
7	<i>mscL</i>	bpum_rs16305	0.025	Large-conductancemechanosensitive channel
8	<i>dapD</i>	bpum_rs06645	0.028	Tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase
9	—	bpum_rs01390	0.034	DNA-binding transcriptional regulator, MarR family
10	—	bpum_rs18400	0.043	Multimeric flavodoxin WrbA
11	—	bpum_rs 12045	0.044	hypothetical protein
12	<i>ydaN</i>	bpum_rs 02215	0.046	hypothetical protein
13	<i>nfo</i>	bpum_rs 11225	0.047	endonuclease IV
14	<i>gatA</i>	bpum_rs 03365	0.047	asapartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A partyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A
15	<i>ytrH</i>	bpum_rs 12770	0.048	sporulation protein YtrH

表 4 CopraRNA 预测 *Bpsr112* 靶基因  
Tab. 4 *Bpsr112* targets predicted by CopraRNA

Rank	Gene	Synonym	p-value	Annotation
1	<i>nadB</i>	bpum_rs12080	0	L-aspartate oxidase
2	<i>engB</i>	bpum_rs12245	1.1E-06	YihA family ribosome biogenesis GTP-binding protein
3	<i>atpC</i>	bpum_rs16500	3.9E-05	ATP synthase epsilon chain
4	<i>ykuL</i>	bpum_rs06615	0.00013	CBS domain-containing protein
5	<i>qoxD</i>	bpum_rs17150	0.00038	cytochrome aa3quinol oxidase subunit IV
6	<i>rocF</i>	bpum_rs01005	0.00105	arginase
7	<i>alsS</i>	bpum_rs16245	0.0011	acetolactate synthase AlsS
8	—	bpum_rs01055	0.00125	Derived by automated computational analysis using gene prediction method; Protein Homology.
9	<i>mraZ</i>	bpum_rs07095	0.00132	transcriptional regulatorMraZ
10	<i>dpaA</i>	bpum_rs07950	0.00147	dipicolinic acid synthetase subunit A
11	—	bpum_rs04810	0.00157	lysine/ornithine N-monooxygenase
12	<i>ylqD</i>	bpum_rs07560	0.00211	Derived by automated computational analysis using gene prediction method; Protein Homology.
13	—	bpum_rs16075	0.00247	carbohydrate ABC transporterpermease
14	<i>aprE</i>	bpum_rs04990	0.00263	peptidase S8
15	<i>uvrC</i>	bpum_rs12475	0.00272	excinuclease ABC subunit UvrC

3.5 *Bpsr112* 敲除菌株及过表达菌株的构建

为了研究 *Bpsr112* 功能,利用同源重组的方法构建敲除菌株. 先通过 PCR 扩增出 *Bpsr112* 的上下游同源臂 flank A 和 flank B,以及卡那霉素抗性基因 *Kan*,通过重叠 PCR 将三个片段连接起来得到融合片段 flank A-*kan*-flank B,再将它插入双酶切后的载体 pUCETs,得到敲除载体 pUCETs-Δ112.

通过高渗透压电转化法,将敲除载体 pUCETs-Δ112 转化至短小芽孢杆菌 SCU11 菌株,经过双交换和质粒丢失后,通过 PCR 筛选得到 *Bpsr112* 基因敲除菌株,通过 PCR 及测序验证,表明 *Kan* 基因成功替换 *Bpsr112*,敲除菌株命名为 SCU11(Δ112).

将染色体上的 *Bpsr112* 完整基因扩增下来,插入到载体 pSU03m 上,得到 pSU03m-112 表达载体. 然后通过高渗透压电转化法,将 pSU03m-112 表达载体和 pSU03m 空载体转化 SCU11,通过 PCR 筛选,得到 *Bpsr112* 过表达菌株及其对照菌株,分别命名为 SCU11/pSU03m-112 和 SCU11/pSU03m.

3.6 生长曲线的测定和盐胁迫实验

许多 sRNA 对细菌生长和胁迫应答具有调控作用,而 *Bpsr112* 预测的靶基因涉及到细胞壁/膜/包膜合成,*Bpsr112* 是否可能对细菌生长和胁迫产生影响? 将 SCU11, SCU11(Δ112), SCU11/pSU03m 和 SCU11/pSU03m-112 共 4 种菌株过夜

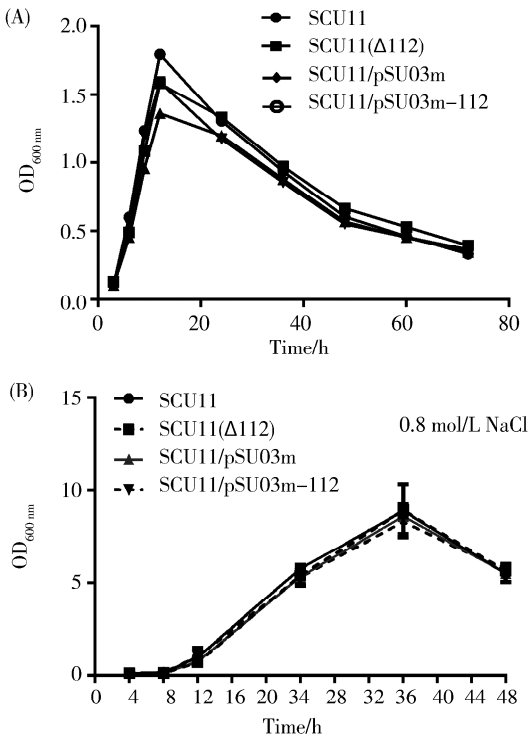


图 5 生长曲线和盐胁迫实验  
(A)4 种菌株在 M9 基本培养基中的生长曲线;(B)4 种菌株在盐胁迫条件下的生长曲线.  
Fig. 5 Growth curve and salt stress experiment  
(A) Growth curves of 4 strains in M9 basic medium;  
(B) growth curves of 4 strains under salt stress.

活化,然后接到 M9 基本培养基中培养,分别在 3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 取样,测量吸光值,绘制生长曲线,结果如图 5(A)所示,

实验组与对照组的生长情况没有明显的差异,表明 *Bpsr112* 不影响生长。

将 4 种菌株接到含有 0.8 mol/L NaCl 的 MM 培养基中培养,分别在 4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h 取样,测量吸光值,绘制生长曲线. 结果如图 5(B)所示,4 种菌株的生长曲线几乎重合,表明 *Bpsr112* 不参与盐胁迫的调节。

### 3.7 运动性实验

*Bpsr112* 预测的靶基因中 *fliM* 编码鞭毛运动开关蛋白,表明 *Bpsr112* 可能与细菌运动有关. 利用 Swarming 运动平板研究 *Bpsr112* 对细菌运动性的影响. 将 SCU11, SCU11 ( $\Delta 112$ ), SCU11/pSU03m 和 SCU11/pSU03m-112 共 4 种菌株过夜活化,稀释 OD 值到 1.0,分别取 1  $\mu$ L 菌液,点在 Swarming 运动平板上. 培养 12 h,观察拍照. 结果如图 6 所示,实验组与对照组差异不明显,表明 *Bpsr112* 可能不参与短小芽孢杆菌运动性的调控。



图 6 *Bpsr112* 对细菌运动性的影响  
Fig. 6 Effects of *Bpsr112* on mobility of strains

### 3.8 *Bpsr112* 对胞外蛋白酶酶活的影响

*Bpsr112* 的候选靶基因还包括碱性蛋白酶基因 *aprE*. 将 4 种菌株过夜活化,然后接到发酵培养基中培养,由于蛋白酶主要在发酵后期产生,因此分别在 48 h、60 h、72 h 和 84 h 收集上清液,测定蛋白酶活. 结果如图 7(A)所示,在 48 h 时,4 种菌株酶活差异不明显;在 60 h 和 72 h 时,敲除后的菌株酶活显著降低 ( $P < 0.01$ ),过表达后酶活显著提高 ( $P < 0.01$ ),其中 60 h 时,过表达菌株平均酶活达到 4702 U/mL,比对照菌株提高了 153%;在 84 h 时,敲除后酶活差异不明显,但是过表达后酶活显著提高 ( $P < 0.01$ ).

将 60 h 和 72 h 的发酵上清液进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 7(B)所示,与对照相比,AprE 蛋白含量在敲除菌株中降低,在过表达菌株中提高,这与蛋白酶活测定的结果一致. 结果表明 *Bpsr112* 对短小芽孢杆菌胞外蛋白酶酶活具有正调控作用。

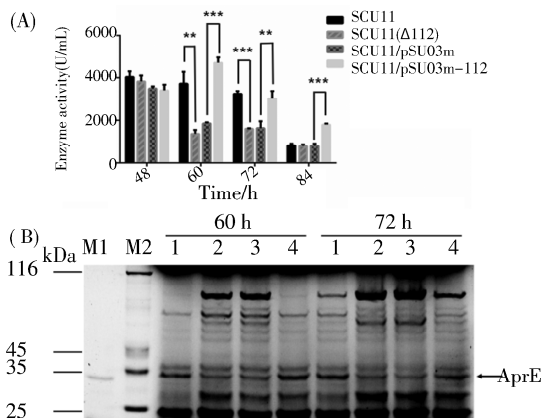


图 7 *Bpsr112* 对胞外蛋白酶酶活的影响

(A) 4 种菌株发酵 48 h、60 h、72 h、84 h 时的蛋白酶酶活; (B) 4 种菌株发酵 60 h、72 h 时的上清液的 SDS-PAGE 电泳. M1: AprE 蛋白标准品,略小于 35 kDa; M2: 蛋白 Maker; 数字 1、2、3、4 分别表示 SCU11, SCU11 ( $\Delta 112$ ), SCU11/pSU03m 和 SCU11/pSU03m-112 四种菌株。

Fig. 7 Effects of *Bpsr112* on extracellular protease activity

(A) Protease activities of 4 strains at 48 h, 60 h, 72 h and 84 h; (B) SDS-PAGE electrophoresis of supernatant of 4 strains at 60 h and 72 h. M1: AprE protein standard, slightly less than 35 kDa; M2: protein maker; numbers 1, 2, 3, 4 represent SCU11, SCU11 ( $\Delta 112$ ), SCU11/pSU03m and SCU11/pSU03m-112, respectively.

## 4 讨论

短小芽孢杆菌 SCU11 能够通过发酵培养,高效产生胞外蛋白酶. 实验室前期已经对各个发酵关键时期的菌液进行了转录组测序,我们通过分析发现了一个长 118 nt 的新 sRNA *Bpsr112*,并且通过 Northern 杂交证明 *Bpsr112* 能够独立转录. 为了探究 *Bpsr112* 的功能,根据预测的靶基因的功能,我们对野生型、*Bpsr112* 敲除及过表达菌株进行了盐胁迫和运动性实验比较,结果表明 *Bpsr112* 并无明显的调控作用. 一方面的原因可能是生物信息学软件预测的可靠性比较低,存在假阳性. 生物信息学软件预测靶基因主要是根据 sRNA 的保守性、sRNA 二级结构、mRNA 二级结构以及 sRNA-mRNA 相互作用的自由能来预测靶基因. 但是保守的序列并不容易获取;高结合能也并不意味着一定能和 mRNA 有效结合;sRNA 与靶基因的作用还可能会受到蛋白质的影响,这又会严重地影响软件预测<sup>[19]</sup>. 另一方面可能是因为调控细菌盐胁迫和运动性的网络比较复杂,*Bpsr112* 突变的影响可能被其他调节途径恢复了,因此未表现出明显的差异。

CopraRNA 软件预测出蛋白酶基因 *aprE* 是 *Bpsr112* 潜在的靶基因,而 AprE 是短小芽孢杆菌胞外蛋白酶活的主要贡献者. 通过 *Bpsr112* 敲除

菌株和过表达菌株的蛋白酶活实验,结果表明 *Bpsr112* 对胞外蛋白酶活具有正调控作用. 推测 *Bpsr112* 能够促进 *aprE* 基因的表达,从而提高胞外蛋白酶活,但这种促进作用是直接的还是间接的,则需要更多的实验鉴定. 一般来说,sRNA 直接激活靶基因的机制可能是由于靶 mRNA 的 5' UTR 区域存在二级结构封闭了 RBS 位点,核糖体无法结合上去. 一些 sRNA 可以与靶 mRNA 结合,改变该二级结构,暴露出 RBS 位点,从而激活翻译. 也可能是由于 sRNA 的结合封闭了 RNA 酶的切割位点,增强了 mRNA 的稳定性,从而促进翻译<sup>[20]</sup>. 通过 Mfold 软件预测 *aprE* mRNA(5'UTR 和起始密码子后部分区域)的二级结构,如图 8(A)所示,*aprE* mRNA 的 RBS 位点区域(通常 RBS 位于起始密码子前 8~13 个核苷酸)形成了二级结构,封闭了 RBS 位点. CopraRNA 软件预测 *Bpsr112* 可与 *aprE* mRNA 形成碱基配对,如图 8(B)所示. 当 *aprE* mRNA(红色区域部分)与 *Bpsr112*

结合后,原先的二级结构被改变,RBS 位点暴露出来,从而可能激活 *aprE* 基因翻译. 有研究表明 sRNA 可直接或间接地调控芽孢杆菌蛋白酶基因表达,例如,在地衣芽孢杆菌中,由 *apr* 基因反义链编码的 sRNA AprAs 可以通过碱基配对,抑制枯草杆菌蛋白酶(Apr)的表达<sup>[15]</sup>. 在枯草芽孢杆菌中,sRNA RnaC/S1022 可以通过调节全局转录调控因子 AbrB 来负调控 *aprE* 基因的表达<sup>[21]</sup>. *Bpsr112* 与 *aprE* 之间的相互作用需要进一步的实验验证,比如利用报告基因探究 *Bpsr112* 与 *aprE* mRNA 的直接相互作用. 这对系统揭示 *Bpsr112* 的功能至关重要,对进一步提高短小芽孢杆菌的酶活也有重要意义.

5 结 论

本研究通过分析短小芽孢杆菌的转录组数据,发现了一个新 sRNA *Bpsr112*,并通过 Northern 杂交进行鉴定. 通过敲除菌株和过表达菌株,进行生长曲线、盐胁迫和蛋白酶活等实验,发现 *Bpsr112* 对蛋白酶活具有正调控. 本研究首次描述了短小芽孢杆菌中具体的 sRNA 功能,对于进一步提高短小芽孢杆菌的酶活具有重要意义.

参考文献:

[1] Huang Q, Peng Y, Li X, *et al.* Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus* [J]. *Curr Microbiol*, 2003, 46: 169.

[2] 黄蓉. 脱毛碱性蛋白酶(DHAP)的饱和突变 [D]. 成都: 四川大学, 2014.

[3] Hoe C H, Raabe C A, Rozhdestvensky T S, *et al.* Bacterial sRNAs: regulation in stress [J]. *Int J Med Microbiol*, 2013, 303: 217.

[4] Huettenhofer A, Noller H F. Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes [J]. *EMBO J*, 1994, 13: 3892.

[5] Chao Y, Li L, Girodat D, *et al.* In vivo cleavage map illuminates the central role of rNase E in coding and non-coding RNA pathways [J]. *Mol Cell*, 2017, 65: 39.

[6] Gerrick E R, Barbier T, Chase M R, *et al.* Small RNA profiling in *Mycobacterium tuberculosis* identifies MrsI as necessary for an anticipatory iron sparing response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 6464.

[7] Massé E, Vanderpool C K, Gottesman S. Effect of

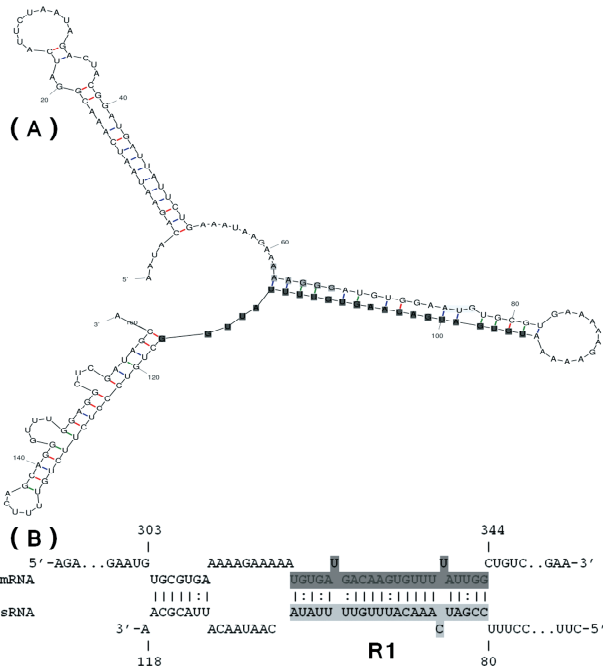


图 8 *Bpsr112* 与 *aprE* mRNA 相互作用分析  
(A) *aprE* mRNA 二级结构, 红色区域为预测的结合位置, 绿色区域为推测的 RBS 位点, 紫色区域为起始密码子; (B) 预测 *Bpsr112* 与 *aprE* mRNA 的碱基配对, 红色区域对应于 (A) 的红色区域, 蓝色区域为 sRNA 的主要结合区域.  
Fig. 8 Interaction between *Bpsr112* and *aprE* mRNA  
(A) Secondary structure of *aprE* mRNA. The red region is the predicted binding site, the green region is the predicted RBS site, and the purple region is the initial codon. (B) Predicted base pairing of *Bpsr112* and *aprE* mRNA. The red region corresponds to the red region of (A), and the blue region is the main binding region of sRNA.

- RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187: 6962.
- [8] Camacho M I, Alvarez A F, Chavez R G, *et al*. Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-component signaling system [J]. *J Bacteriol*, 2015, 197: 983.
- [9] Kazushi S, Babitzke P, Kushner S R, *et al*. Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E [J]. *Genes Dev*, 2006, 20: 2605.
- [10] Urbanowski M L, Stauffer L T, Stauffer G V. The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli* [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 37: 856.
- [11] Nadja H, Alberto C, Ulf G, *et al*. The small untranslated RNA SR1 from the *Bacillus subtilis* genome is involved in the regulation of arginine catabolism [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 62: 520.
- [12] Morfeldt E, Taylor D, Gabain A V, *et al*. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII [J]. *EMBO J*, 1995, 14: 4569.
- [13] Opdyke J A, Ju-gyeong K, Gisela S. GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186: 6698.
- [14] Johnson J R, Clabots C, Rosen H. Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator oxyR on the colonization ability of *Escherichia coli* O1:K1:H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection [J]. *Infect Immun*, 2006, 74: 461.
- [15] Hertel R, Meyerjürgens S, Voigt B, *et al*. Small RNA mediated repression of subtilisin production in *Bacillus licheniformis* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 5699.
- [16] 贺婷婷. 短小芽孢杆菌非编码 RNA 的筛选、鉴定及功能分析[D]. 成都: 四川大学, 2017.
- [17] 王超. 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)遗传操作系统的建立[D]. 成都: 四川大学, 2016.
- [18] 张晶雪, 李永其, 张蔚, 等. 中华人民共和国国家标准, GB/T 23527-2009, 蛋白酶制剂, 蛋白酶活力的测定, 福林法[S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2009.
- [19] Pain A, Ott A, Amine H, *et al*. An assessment of bacterial small RNA target prediction programs [J]. *RNA Biol*, 2015, 12: 509.
- [20] Wright P R, Jens G, Martin M, *et al*. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 119.
- [21] Mars R A T, Nicolas P, Ciccolini M, *et al*. Small regulatory RNA-induced growth rate heterogeneity of *Bacillus subtilis* [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005046.

#### 引用本文格式:

中 文: 覃佳, 徐云帆, 黄宇, 等. 短小芽孢杆菌 sRNA *Bpsr112* 的鉴定及功能研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2020, 57: 993.

英 文: Qin J, Xu Y F, Huang Y, *et al*. Identification and functional study on sRNA *Bpsr112* of *Bacillus pumilus* [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2020, 57: 993.