

苏芸金杆菌 cry 基因的遗传学 分析及基因工程进展

李扬 任改新

(南开大学生命科学学院微生物系, 天津 300071)

1 引言

苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 简称 *Bt*) 是一种微生物杀虫剂, 在农林、卫生害虫的综合防治中占有极其重要的地位。 *Bt* 是一种从土壤和死亡昆虫体内分离出来的革兰氏阳性细菌, 在孢子形成时期可以产生一种或多种杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, 简称 ICPs), 它们在孢子囊中形成一个或多个晶体。晶体在孢子成熟, 细胞裂解后释放到环境中。敏感昆虫吞食了这些晶体后, 晶体在昆虫碱性肠液中溶解, 被中肠内蛋白酶加工剪切成活性的毒素。毒素与中肠上皮细胞特异受体结合, 在细胞膜上形成孔洞, 导致细胞功能受损直至破裂而使昆虫幼虫死亡。编码 ICPs 的基因通常称为 cry 基因, 它们定位在不同大小的质粒上。1981 年以来, 已有 50 多个 cry 基因得到了克隆和鉴定^[1]。科学家们利用生物工程的方法和技术, 构建出了高效、广谱、作用持久的新菌株, 其中一些菌株已制成商品应用到生产实践中^[2, 3]。

本文是在遗传学和分子生物学基础上对 cry 基因的分类分布, cry 基因的遗传学特征及 cry 基因工程进展进行概括和总结。

2 cry 基因的分类及分布

Bt 最早分类系统是由 Barjac 把鞭毛抗原作为分类标准而建立起来的, 把 *Bt* 分成 27 个 H 型, 7 个 H 亚型^[4]。到 1994 年, 国际昆虫病原芽孢杆菌中心公布, *Bt* 已增至 45 个 H 型, 13 个 H 亚型^[5]。其它分类方法还包括生理生化反应及酯酶型等, 一些新的分类方法如 RAPD, Ap-PCR 等^[6, 7]已应用于 *Bt* 亚型和蜡状芽孢杆菌分类中, 但这些分类标准与 *Bt* 杀虫特异性并无直接相关。

Bt 品系及杀虫特性的多样性与 ICPs 及其编码基因的多样性有着紧密的联系。1989 年, Höfte 和 Whiteley 发表的 cry 基因的分类系统^[8]以 cry 基因产物的杀虫谱和 cry 基因序列相似性为依据, 把当时已鉴定的 40 个 cry 基因分成四型。cry I 基因编码 130ku 蛋白, 对鳞翅目昆虫有活性; cry II 基因编码 70ku 蛋白, 对鳞翅目和双翅目昆虫有活性; cry III 基因产生 70ku 蛋白, 对鞘翅目昆虫有活性; cry IV 基因产生 70ku 和 130ku 蛋白, 对蚊和蚋具高毒性。1992 年, Tailor 等人发现一种新的 cry 基因, 命名为 cry V, 对于鳞翅目和鞘翅目昆虫有毒性^[30]。到目前为止, 已经鉴定和克隆了 50 多个 cry 基因^[1]。此外在 *Bt* subsp. *israelensis* 和 subsp. *morrisoni* PG14 中发现了两种导致细胞裂解的晶体蛋白 cytA, 在 *Bt* subsp. *kyushuensis* 中发现对双翅目有毒效的 cytB, 形成 cyt 家族^[1]。cry 基因的分类及分布^[2, 8, 22]见表 1。

近几年来, 一些新的 cry 基因分类方法对 Höfte 和 Whiteley 的分类系统进行了修改和补充, 为 cry 基因的分类提供了新证据。用 GCG 序列分析软件的 Pileup 程序对 cry 基因及其毒性片段

表1 *Bt* cry 基因的分类及分布

基因类别	序列编号	晶体形状	基因产物的 分子量(ku)	杀虫特异性	分布*	
cry I	cry I A(a)	M11250	双金字塔形	133		<i>kur sotaiz ent thu ale</i>
	cry I A(b)	M13898	双金字塔形	131		<i>kur sot thu dar tol</i> <i>ent ale</i>
	cry I A(c)	M11068	双金字塔形	133	鳞翅目	<i>kur ken</i>
	cry I B	X06711	双金字塔形	138		<i>aiz thu ent</i>
	cry I C	X07518	双金字塔形	135		<i>aiz ent</i>
	cry I D	X54160	双金字塔形	133		<i>aiz ent gal dar</i>
	cry I E	X53985	双金字塔形	133		<i>ken dar tol</i>
	cry I F	X63897	双金字塔形	134		<i>aiz</i>
	cry I G	X58120	双金字塔形	130		<i>gal</i>
cry II	cry II A	M31738	立方形	71	鳞翅目	<i>kur</i>
	cry II B	M23723	?	71		<i>kur</i>
	cry II C	X57252	立方形	69	双翅目	?
cry III	cry III A	M22472	菱形	73		<i>ten</i>
	cry III B	X17123	不规则	74	鞘翅目	<i>tol</i>
	cry III B(b)	M89794	不规则	74		<i>kyu</i>
cry IV	cry IV A	Y00423	双金字塔形	134		<i>Bti</i>
	cry IV B	X07423	双金字塔形	128		<i>Bti</i>
	cry IV C	M12662	?	78	双翅目	<i>Bti</i>
	cry IV D	M31737	圆形?	72		<i>Bti</i>
	cytA12	X03182	不规则	27		<i>Bti</i>
	cytB					<i>Bti</i>
cry V					鳞翅目	<i>kur</i>
					鞘翅目	
未 分 类	cryX1(III C)	M64478	双金字塔形	129		<i>gal</i>
	cryX2(III D)	X59797	菱形	73		<i>kur</i>
	cryX3	—	立方形	35		<i>tho</i>
	cryX4	—	立方形	38		<i>tho</i>

* 表中的“分布”指 cry 基因在 *Bt* 不同亚种的分布,“kur sot”等为亚种的英文缩写。“?”表示尚未确定。

kur: 库斯塔克亚种

sot: 猝倒亚种

aiz: 鲇泽亚种

ent: 杀虫亚种

thu: 苏芸金亚种

ale: 阿莱亚种

dar: 达姆斯塔特亚种

tol: 多窝亚种

ken: 肯尼亚亚种

gal: 蜡螟亚种

ten: 拟步行蝗亚种

kyu: 九州亚种

Bti: 以色列亚种

tho: 汤普生亚种

的核苷酸和氨基酸序列进行比较,显示出依据序列相似性而形成的 cry 基因的相互关系,并揭示了 cry 基因在进化中的紧密联系^[2]。cry I 蛋白中, cry I B 和 cry I G 比其他蛋白有更多的差异, cry I A 和 cry I G 之间的差异实际上与 cry I A 和 cry IV A 的差异性相同(图 1)。这种序列同源性的比较支持了一些报道: cry III A、cry III B、cry I B 和 cry XI 之间的序列有较大的相似性,是 cry XI 可以被胰蛋白酶

激活而对马铃薯甲虫起作用的原因; cry II A 比 cry I A 更接近于 cry IV D, 可以解释 cry II A 对双翅目具有的活性; 而 cry IV 蛋白的毒性部分在序列上有很大差异, 其中 cry IV A 和 cry IV B 差别最大。

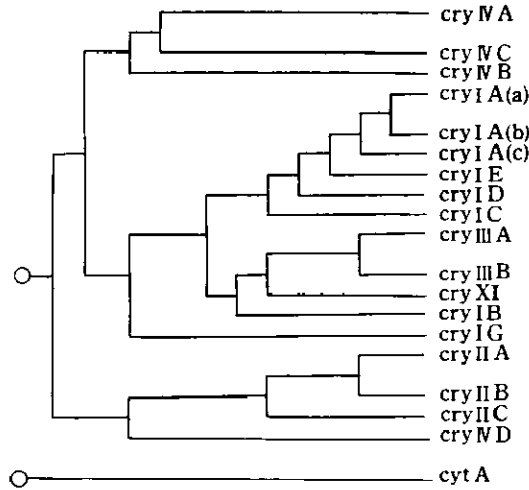


图 1 cry 基因活性片段序列同源关系^[2]

3 cry 基因的遗传学特征和杀虫特异性

作为生物杀虫剂的 *Bt* 菌株其杀虫活性是极其复杂多样的, 分子遗传学的研究为说明 ICPs 的杀虫特异性和多样性提供了新证据, 从遗传学角度说明了这些复合蛋白活性形式的遗传学基础。

cry 基因除少数亚种(如 *Bt* subsp. *wuhanensis*, *Bt* subsp. *dendrolimus* 和 *Bt* subsp. *berliner* 1715)^[10] 定位于染色体以外, 绝大多数定位于质粒上。这个结论是通过大量实验证明的。80 年代初的一些报道已提到, 缺少某些质粒的 *Bt* 菌株会丧失产生 ICPs 的能力。1981 年的消除(curing)实验有力地证明了质粒确实能编码并表达 ICPs^[3]。这一论断的直接证据来自两方面。一方面是 Kronstad 等^[11] 利用分子探针与 *Bt* 的全 DNA 及质粒 DNA 进行 Southern 杂交; 另一方面是接合转移现象的发现^[2, 3]。当一种失去 ICPs 表达能力的 *Bt* 菌株通过接合得到另一菌株的含有 cry 基因的质粒时, 它会表达这种 cry 基因。这些研究, 特别是分子杂交实验, 揭示了 *Bt* 菌株的 cry 基因是多重的, 因为特异的分子探针可以同时与几个不同大小的质粒杂交。一个 *Bt* 菌株往往含有不同的 cry 基因, 由于拷贝数各不相同, 它们呈现不同的表达水平。一些高毒性的 cry 基因的表达往往被另一些毒性并不高的 cry 基因产物所抑制; 而一些 cry 基因产物可以产生协同作用形成比单独一种 ICPs 更强的复合杀虫活性, 如 *Bt* subsp. *israelensis*^[12]。cry 基因调控序列的研究也有一些报道。Kin-Fu Chak 等人^[13] 在研究 *Bt aizawai* HD133 的 cry I A(b) 时发现, 开放阅读框上游的 72 个核苷酸序列可以调控此基因在 *E. coli* 中的表达。他们利用启动子探针发现, 任何一个带有这 72 个核苷酸的 DNA 片段都可以显示启动子活性, 认为上游的 72 个核苷酸序列中含有可在 *E. coli* 中表达的启动子序列。Herve Agaisse^[14] 利用启动子载体质粒 pHT 304-i8Z 对 cry III A 的启动子进行研究的结果表明, -365~-553 和 -367~+18 的这两段序列对 cry III A 转录是必须的, 而 cry III A 的表达并不依赖于孢子的形成。

ICPs 杀虫活性研究得最多的是 cry I 型蛋白。cry I A 的几种基因由于序列的微小差异会导致杀虫活性极大的不同^[2, 15]。*Bt* subsp. *kurstaki* NRD 12 的 cry I A(b) 比 *kurstaki* HD-1 的 cry I A(b) 对粉纹夜蛾和甜菜夜蛾的活性高很多; *Bt* subsp. *kurstaki* HD-73 的 cry I A(c) 比 *kurstaki* HD-1 的 cry I A(b) 对粉纹夜蛾的活性低很多; 小菜蛾和欧洲玉米螟对 *Bt* subsp. *kenyae*

HD588的 cry I A(c) 的敏感程度远远高于 *kurstaki* HD-263 的 cry I A(c), 而实际上这两个基因的序列 99% 是同源的。来自 *Bt* subsp. *aizawai* 和 *entomoridus* 的 cry I C 是迄今发现在 *Bt* 中对夜蛾科最有活性的蛋白^[2]。来自对夜蛾科特异的 *kenyae* 的 cry I E 其杀虫活性存在着争议。Visser 等^[16]认为, cry I E 对甜菜夜蛾的活性与 cry I C 大致相同, 而 Masson^[22]却认为 cry I E 对这种昆虫无毒。

几个精巧的实验设计分析了 cry I 基因杀虫特异片段的起始和终止位点^[2]。首先, 用杀虫谱不同但又部分同源的两种蛋白进行部分片段的交换, 其杀虫活性由生测来检验。另外, 把部分同源的 cry 基因进行交换和连接, 在 *E. coli* 或不同 ICPs 的 *Bt* 中表达, 以研究各个基因片段的杀虫活性, 结果见表 2。

表 2 cry 基因杀虫特性片段的起点和终点^[2]*

特异昆虫	cry I A(a)	cry I A(c)	cry I C	cry II A
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	332~450			
粉纹夜蛾 <i>Trichoplusia ni</i>		335~450		
烟芽夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>		335~615		
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>		429~447		
烟芽夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>		332~772		
海灰翅夜蛾 <i>Spodoptera littoralis</i>			261~654	
双翅目 <i>Diptera</i>				307~382

* 表中数字代表 a.a. 顺序号

4 *Bt* 杀虫毒蛋白的基因工程进展

每年都分离鉴定出新的 *Bt* 杀虫菌株, 其中一些高效广谱的菌株逐步运用到生产中。但这些天然菌株不论在杀虫特异性, 杀虫毒力及持效方面仍不能满足实际生产的需要。对于 *Bt* 杀虫活性分子机理的深入了解使我们能够运用分子生物学的方法改变 *Bt* 的杀虫潜能, 这些方法包括 ICPs 编码质粒的遗传学操纵以及运用重组和非重组的方法改变 *Bt* 的遗传信息来提高其杀虫作用。

cry III A 的三级结构由 x-光衍射的方法得到确定, 这个蛋白含有三个独立的结构域 (domain I-III), domain II 的三个 β -折叠的顶部有三个伸到溶剂中的环, 这三个环包含了受体的识别位点, 决定了蛋白的杀虫特异性。定点突变实验表明, 这三个环中任一个环的一个氨基酸的改变会明显改变其杀虫特异性, 使 cry III A 蛋白对鳞翅目和双翅目有毒效^[1,2]。在 cry I A(c) 保守序列区引入一个定点突变, 它位于 domain I 的第五个 α -helix 上。这个区域非保守性的突变会导致二级及三级结构的破坏而导致杀虫活性的丧失^[2]。ICPs 在昆虫肠内对蛋白酶的降解作用比较敏感。蛋白酶的作用至少可以部分导致 ICPs 在某些昆虫体内的活性降低, 这也是昆虫对某种 ICPs 产生抗性的原因之一。在最近的一项实验中, 为使 subsp. *aizawai* IPL7 的 cry I A(b) 对胰蛋白酶有较强的抵抗作用, 把对胰蛋白酶敏感的氨基酸 (Arg 和 Lys) 用 Gln 代替。在 Arg 219 和 Lys 662 确实使蛋白活性有所提高, 这是毒素对蛋白酶降解作用敏感性降低的结果^[2]。

在适宜条件下, *Bt* 菌株之间的接合转移可以很高的频率发生。研究表明, 许多 ICPs 编码质粒可以自动或诱动地转移到其他菌株中^[3]。由于同一细胞中不同质粒的相容性不同, 我们可以首先消除一种或几种不理想的质粒, 然后依靠接合作用引入其他高效的 ICPs 编码质粒, 从而改变菌株的杀虫特性。这种遗传物质的相互交换过程实际上在自然界中构成了 *Bt* 杀虫活性多样性的分子机制。Ecogen 公司 1991 年注册的生物杀虫制品 Foilo F 的有效成分 EG2424 正是运用消除和接

合转移不同的 ICPs 编码质粒形成的新型工程菌(图 2)^[3]。EG2424 在孢子形成期产生 cryIII A 和 cry I A(c) 蛋白, 形成菱形和双金字塔形晶体, 对鳞翅目和鞘翅目昆虫均有杀伤作用, 已应用到土豆、茄子及其他农作物的生物防治中。过去十几年中, 除了利用接合转移以外, 还利用原生质体融合^[17, 18], 原生质体转化^[19]和电击转化^[20]等方法。实验结果表明, 这些方法对质粒的转移是十分有效的, 其中电击法被认为是把质粒 DNA 转入 *Bt* 的首选方法。

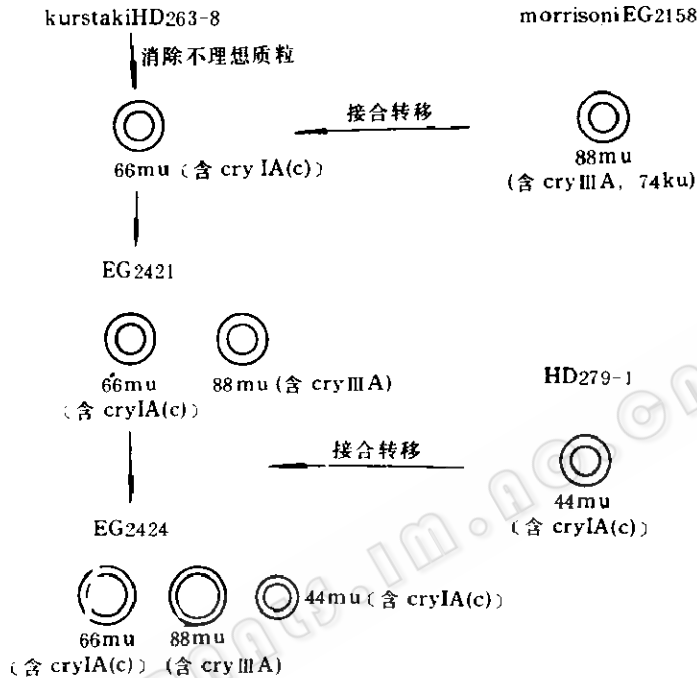


图2 EG2424 的构建过程简图

重组 DNA 技术为构建新的 cry 基因提供了更大的灵活性。许多 cry 基因不能通过接合作用进入一个新的受体细胞, 因为并不是每一种质粒都可以通过接合进行转移。另外, 对于几种昆虫特异的 ICPs 可能定位在同一质粒上。重组 DNA 技术不但解决了这一难题, 能够克隆表达单独的 cry 基因, 还可以通过改变 cry 基因的调控序列来提高 ICPs 的产量。

许多实验室构建的载体质粒已广泛应用到 cry 基因的克隆和表达中。这些种类和数目繁多的各类载体可以把 cry 基因及其毒性片段引入 *Bt*^[2, 3], *E. coli*^[20, 21], 农杆菌^[23], 枯草芽孢杆菌^[24], 巨大芽孢杆菌^[25], 蜡状芽孢杆菌^[26]甚至各种植物组织^[27, 28, 29]中, 为扩大 ICPs 的杀虫剂型, 提高 ICPs 的杀虫活性开辟了新的道路。1991 年 Mycogen 公司将 cry 基因转入植物共生菌假单胞杆菌经过简单处理名为“Cell Cap”的产品, 已获得专利并被 FDA 批准应用^[9]。一种穿梭质粒包含两个复制起点, 一个来自 *E. coli*, 另一个来自 *Bt*。这种穿梭质粒首先把 *Bt* 毒素基因引入到失去 ICPs 编码质粒的 *Bt* 菌株中, 转化子表达了 130ku 的蛋白。另一种结合了 *Bt* 质粒的 pHT 1030 和 pUC 18 的穿梭载体把 *Bt* subsp. *thuringiensis* 407 的 cry I A(a) 引入到 *Bt* 中。有趣的是, 这个表达质粒使毒素表达水平比野生株有很大提高, 可能是基因拷贝数增加了^[2]。Sandrine Poncet 等人^[31]利用温度敏感载体 pRN 5101 将 subsp. *israelensis* 的 cryIVB 和 cryIVD 分别引入 *Bacillus sphaericus* 2297 染色体组, 生测结果表明这两种 cry 基因确实得到了表达, 对斑须按蚊的作用有一些提高, 但对埃及库蚊和尖音库蚊作用与 *Bacillus sphaericus* 相同。*Bt* subsp. *aizawai* 的 cry A(b) 和 subsp. *entomorphus* 60.5 的 cry I C 毒性片段相连接表达了一个复合 ICPs, 它具有两种天然毒素的

杀虫活性^[2]。这个实验的吸引力在于它可以使编码不同的 ICPs 的几种基因同时表达,并且这几种毒素的表达水平是相同的。Brian A. Federici 等人^[12]用修饰了的穿梭质粒 pHT 3101 表达了 *Bt* subsp. *israelensis* 的 *cytA* 和 *cryIVD* 并进行了生测。结果表明,*cytA* 和 *cryIVD* 蛋白的复合作用比单独一种蛋白的作用提高 10 倍。

Gamel 和 Piot 把鞘翅目特异的 *cryIII* 基因利用载体质粒导入 *Bt* subsp. *kurstaki*, 转基因菌株不仅表达了高水平的鞘翅目杀虫活性,而且保持了鳞翅目昆虫的杀伤作用^[2]。Cecil Rang 等^[32]利用 *Bt* subsp. *kurstaki* NRD 12 的 *cryIIA* 启动子及 *orf-1*, *orf-2* 表达 *Bt* subsp. *thompsoni* Hnc 的两个杀虫基因,用穿梭载体 pHT 3101 引入 *Bt* subsp. *kurstaki* HD-1 (*cry⁻*)。结果表明,*cryIIA* 启动子能够表达蛋白而不形成晶体内含物,而 *orf-1* 和 *orf-2* 指导晶体的形成。Toshihiki 等^[33]根据 *cryV* 序列^[30]设计特异性的引物,以 *Bt* subsp. *kurstaki* INAO2 的 DNA 为模板进行 PCR,扩增出包含对鳞翅目及鞘翅目有效的基因 *cryV*。这段基因随后进行了测序并克隆到 *E. coli* 中进行表达。

生物杀虫剂使用的常规方法是通过空间和地面的喷撒杀伤害虫。许多生态因素的变化,如阳光、温度、降雨等使 *Bt* 杀虫剂的性能很不稳定。转基因植物的产生为提高 *Bt* 杀虫剂的杀虫效果开辟了新途径。1987 年,*cryIA* 基因成功地移入烟草中,成为转 *cry* 基因植物的第一例^[2, 18]。这种转基因烟草至少部分地免受了烟草天蛾的侵害。1987 年以来,国内外已有大量转基因植物获得成功。经过修饰的 *cryIA(b)* 和 *cryIA(c)* 在棉花,烟草,蕃茄,玉米,土豆,白云杉等植物中得到较高水平表达,其中一些转基因植物已通过了大田实验^[34]。迄今还没有报道转基因植物的产量和质量有明显降低。

在国内,1991 年范云六等报道^[27],把对棉铃虫、红铃虫有活性的 *Bt* subsp. *aizawai* 7-29 及 *kurstaki* HD-1 的毒素基因通过植物表达载体导入我国棉花品种而表达成功。他们还利用植物表达载体 pBI 121.2 将 *aizawai* 7-29 的杀虫基因导入水稻品种“中花 11 号”。这是以中国栽培品种为对象,获得转杀虫基因水稻的首次报道^[28]。同年,田颖川等^[29]把 *Bt* subsp. *kurstaki* 的杀虫基因经过加工改造后,通过双元载体 pBIN 37,借助 Ti 质粒 pAL 4404 转入烟草,获得了抗烟青虫的转基因烟草植株。使 ICPs 高水平表达是通过改变和修饰调控区的核苷酸序列从而提高翻译和转录水平来实现的。这些修饰方法包括去掉内含子序列, poly(A) 尾,翻译中止信号及使 mRNA 形成二级结构的序列。另外,使其 3' 端缺失(毒性非必须部分),5' 端经过修饰与 35S 启动子相连,并融合了 GUS 报告基因,使毒素表达的植株易于检测^[23, 29]。1995 年赵荣敏,范云六等^[35]将人工改造的 *Bt* 基因与 CPTi 基因共转化烟草,获得含双基因的高抗虫转基因烟草,表现出比转单基因烟草有更强的杀虫活性,这些转基因植物对于延缓昆虫对 *Bt*- δ 内毒素产生抗性的研究具有重要意义。

近年来,昆虫对 *Bt* 杀虫制品产生抗性引起人们极大的关注。抗性产生较突出的两例是在菲律宾等地发现的小菜蛾对 *Bt* subsp. *kurstaki* 的抗性,以及在巴西和印度致乏库蚊对 *Bacillus sphaerensis* 的抗性^[36]。现在普遍认为,抗性是毒素-受体亲和力下降或丧失的结果。也有报道认为,昆虫体内中肠蛋白酶对毒素的剪切作用也是产生抗性的原因之一^[36]。最新研究表明,ICPs 的特异性受体是一种含 N-乙酰半乳糖胺(GalNac)的糖蛋白,GalNac 直接参与毒素与受体的结合^[1]。昆虫产生抗性的分子机制有待进一步研究。

5 结语

本文对于 *Bt* 杀虫毒蛋白在遗传学和基因工程方面的最新进展进行了小结。在今后的十几年中,会有大量的 *cry* 基因进行克隆和鉴定。我们可以利用分子遗传学的方法来研究毒素蛋白及 *cry*

基因结构和功能的相互关系。今后的研究重点在于中肠上皮细胞特异受体的结构分析,毒素的作用及昆虫抗性的分子机制。这些研究成果必将推动广谱高效的 *Bt* 新菌株和植物越来越广泛地应用到生产实践中。

参 考 文 献

- [1] Ellar D J. In: VIth ICIP & MC and IIInd IC on BT, proceeding, Montpellier, France, 1994, 1: 243.
- [2] Takashi Yamamoto, Gary K Dowell. *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins Recent Advances in Understanding its Insecticidal Activity, In: Advanced Engineered Pesticides, edited by Leo Kim, Marcel Dekker, Inc. N. Y. 1993, 3~42.
- [3] Bruce C Calton, Cynthia Gaworn-Burke. Genetic Improvement of *Bacillus thuringiensis* for Bioinsecticide Development, In: Advanced Engineered Pesticides, edited by Leo Kim Marcel Dekker Inc. N. Y. 1993, 43~62.
- [4] de Barjac H, J Frachon. *Entomophaga*. 1990, 35: 233~240.
- [5] International Entomopathogenic Bacillus Centre. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (Classified by H Serotypes). Catalogue N I, UNITE BACTERIES ENTOMOPATHOGENES, Institut Pasteur, Paris, France, 1994, 1.
- [6] Sylvie N Bourouc, Jose R Valero. *Applied & Environmental Microbiology*, 1993, 2: 523~527.
- [7] Brosseau R, Alain saint-onge. *Applied & Environmental Microbiology*, 1993, 2: 114~119.
- [8] Hofte Herman, H R Whiteley. *Microbiology Reviews*, 1989, 6: 242~255.
- [9] Frank H Gaertner, Thmas C Quick. Cellcap: An Encapsulation System for Insecticidal Biotoxin Protein In: Advanced Engineered Pesticides, edited by Leo Kim Marcel Dekker Inc. N. Y. 1993, 73~84.
- [10] 张用梅. 苏芸金杆菌的遗传, 见: 喻子牛编. 苏芸金杆菌, 北京: 科学出版社, 1990, 134.
- [11] Kronstad JW, Schnepf H E. *Journal of Bacteriology*, 1983, 4: 419~428.
- [12] Federici A Brain, Dong Wu. In: VIth ICIP& MC and IIInd IC on BT proceeding, Montpellier, France 1994, 1: 243.
- [13] Kin-Fu Chak, Jui-Chin Jen. *Proceedings of the National Science Council ROC part B: Life Science* 1993, 17(1): 7~14.
- [14] Herve Agaisse, M Gpminet. In: VIth ICIP & MC and IC on BT, proceedings, Montpellier France 1994, 1: 226.
- [15] Michel A Von Tersh, Helen Loid Robbins. *Applied & Environmental Microbiology*, 1991, 2: 349~358.
- [16] Visser Bert, Ellie Mounsterman. *Journal of Bacteriology*, 1990, 12: 6783~6788.
- [17] 王章瑜, 范云六. *生物工程学报*, 1987, 3(3): 230~232.
- [18] 王宪, 范云六. *生物工程学报*, 1987, 3(1): 29~37.
- [19] Bourgouin, Armelle Delecluse. *Applied & Environmental Microbiology*, 1990, 2: 340~344.
- [20] 田颖川, 蔡发兴, 王瑛. *生物工程学报*, 1989, 5(1): 11~18.
- [21] 陈琪, 范云六. *科学通报*, 1991, 36(13): 1014~1017.
- [22] Bosse M, L Masson. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(24): 7443.
- [23] 郭三堆, 陈学军, 杨虹. *生物工程学报*, 1991, 7(1): 54~61.
- [24] 余学政, 吴柏华. *生物工程学报*, 1990, 6(1): 69~72.
- [25] Roop Singh Bora, M G Murty. *Applied & Environmental Microbiology*, 1994, 1: 214.
- [26] William J Moar, John T Trumble. *Applied & Environmental Microbiology*, 1994, 3(2): 896.
- [27] 谢道昕, 范云六, 倪万潮. *中国科学*, 1991, B(4): 367~373.
- [28] 谢道昕, 范云六, 倪丕冲. *中国科学*, 1991, B(8): 830~834.
- [29] 田颖川, 秦晓峰. *生物工程学报*, 1991, 7(1): 1~10.
- [30] Taior. R, J Tippett, G Gibb, *et al.* *Molecular Microbiology*, 1992, 6: 1211~1217.
- [31] Poncet Sandrine, Aemelle Delecluse, G Anello, *et al.* In: VIth ICIP & MC and IIInd IC on BT, proceedings, Montpellier, France, 1994, 1: 240.
- [32] Cecile Rang, M Bes, William J Moar, *et al.* In: VIth ICIP & MC and IIInd IC on BT, proceeding, Montpellier, France, 1994, 2: 31.
- [33] Toshihiko Lizuka, Jun Sasaki, shinichiro Asano, *et al.* In: VIth ICIP & MC and IIInd IC on BT, proceeding, Montpellier, France, 1994, 2: 29.
- [34] 莽克强. *生物工程进展*, 1993, 13: 1~8.
- [35] 赵荣敏, 范云六, 石西平等. *生物工程学报*, 1995, 11(1): 1~5.
- [36] Georghiou P George. In: VIth ICIP & MC and IIInd IC on BT, proceedings, Montpellier France 1994, 1: 48.