

# 苏云金芽孢杆菌高效价杀虫剂的研究进展

刘石泉<sup>1</sup> 单世平<sup>2</sup> 夏立秋<sup>2\*</sup>

(1. 湖南城市学院化学与环境工程系 益阳 413000)

(2. 湖南师范大学生命科学学院 微生物分子生物学湖南省重点实验室 长沙 410081)

**摘要:** 苏云金芽孢杆菌制剂是目前应用广泛而有效的一种微生物杀虫剂。本文从菌种分离筛选、构建遗传工程菌、突变筛选及定向进化等方面介绍了获得苏云金芽孢杆菌高效价杀虫的几种研究策略,并对各种策略的进展及应用前景进行了简要综述。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌, 分离筛选, 构建遗传工程菌, 突变筛选, 定向进化, 杀虫策略

## Advances on High Performance Insecticide of *Bacillus thuringiensis*

LIU Shi-Quan<sup>1</sup> SHAN Shi-Ping<sup>2</sup> XIA Li-Qiu<sup>2\*</sup>

(1. Department of Chemistry and Environmental Engineering, Hunan City University, Yiyang 413000)

(2. College of Life Science, Hunan Normal University, Key Laboratory for Molecular Biology of Microorganism of Hunan Province, Changsha 410081)

**Abstract:** *Bacillus thuringiensis* is one of the most effective and the most widely used microbial insecticides at present. The approaches to the strategy for high performance insecticide such as selective preference strain, constructive genetic engineering bacteria, mutagenesis screening and directed evolution are reviewed in this paper. Moreover, the advancement and the application prospects in high performance insecticide are discussed.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, Selective preference strain, Constructive genetic engineering bacteria, Mutagenesis screening, Directed evolution, Insecticide strategy

害虫防治是农业生产中的一项重要任务,随着人们环保意识不断增强,生物农药正引起广泛关注。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称Bt)制剂克服了传统化学农药污染环境、危害人畜、易产生抗性等缺点,具有选择性强、安全、原料简单等优点,是目前世界上用途最广、产量最大的微生物杀虫剂,占微生物杀虫剂总量的90%~95%,主要用来防治鳞翅目、双翅目和鞘翅目的某些种类的

害虫。近年来又发现Bt对其它目(如膜翅目、同翅目、直翅目、食毛目、虱目和蚤目)昆虫以及吸虫、鞭毛虫、线虫、蜱螨、原生动物有活性,杀虫谱扩大到昆虫纲的9个目<sup>[1,2]</sup>。然而迄今为止,已经发现许多昆虫能够对Bt产生抗性。此外,Bt还具有菌种容易退化、基因产物表达水平受细菌自身调节系统及毒素基因拷贝数的限制、杀虫范围窄、有效成分易分解等缺点。因此,Bt制剂作为微生物农药,要取代化学

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30670052); 国家“863计划”项目(No. 2006AA02Z187, No. 2006AA10A212); 湖南省自然科学基金重点项目(No. 06jj2009)

\* 通讯作者: ✉ xialq@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-07; 接受日期: 2008-02-01

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

农药,除了依靠人们生态意识的提高,作为科研工作者则更要从技术上利用各种方法对其进行改造以达到Bt制剂的高效价,本文就高效价Bt研究策略进行分析,以期能更好的开展Bt生物农药的基础和应用研究工作。

## 1 Bt 的分离筛选策略

土壤是微生物的大本营,Bt也是一种土壤习居菌。起初本来以为它是一种昆虫病,科学家们认为只有找到死昆虫才能找到这些细菌。但实践证明,Bt实际上是多种土壤中的正常组分。Martin和Travels发明的可以从土壤中分离Bt的新技术,仅花了2年时间就鉴定出72个菌种,而以前大家熟知的24个菌种却花了85年时间才被发现。运用温度筛选法、醋酸钠选择筛选法、弹土分离法、抗生素选择性筛选法等,结合生理生化鉴定、血清型鉴定<sup>[3-6]</sup>,目前全世界被分离和保藏的Bt估计有60000株。它广泛分布于世界各地,从热带雨林到北极冻土带,已经从许多材料上分离获得该菌,如土壤<sup>[7,8]</sup>、植物叶片<sup>[9-11]</sup>、鲜水<sup>[12]</sup>、粪便<sup>[13]</sup>、动物活体<sup>[14]</sup>、食物、仓储等<sup>[15]</sup>,可见Bt几乎无处不在。

世界上许多科学家都为Bt的分离研究做出了贡献:如美国农业部的Dulmage博士分离的HD-1菌至今还在许多国家生产;我国科学家喻子牛、李荣森等先后发现了华中亚种、山东亚种、云南亚种等,丰富了Bt资源;我们实验室十多年来一直从事Bt研究,成功地从湖南省不同生态区域的旱作地、果园和稻田采集的858份土样的芽孢杆菌分离物中,筛选出30株具典型Bt菌落特征的菌株,并对其进行了较为深入的研究,其中的一株起始701<sup>2c</sup>菌株经我们改进,已经申请发明专利,并获生产许可<sup>[8,16]</sup>。

大多数生产厂家主要使用血清型、型、型菌株,包括HD-1、Bt-K、8010等,在连续人工转接和生产中,Bt会出现芽孢和晶体变小、数量减少、生长速度缓慢等退化性状,一般采用虫体复壮方法重新得到高毒力的菌株。

在漫长的40亿年进化岁月中,自然界中蕴藏着巨大的微生物资源,据测算1g土壤中含有1亿个微生物,我们应该看到自然界中仍有大量的Bt资源尚没有被发现、被研究。很显然从自然界中直接分离高效杀虫Bt是研究Bt作为生物农药的基础,自然界Bt资源来源广、适应性广、进化性状多样,始终是

生物农药用之不竭宝贵资源,但从庞大的自然界Bt库中分离高效杀虫菌株显然效率过低,难以满足现代生物农药高速发展的需要。

## 2 构建 Bt 遗传工程菌策略

### 2.1 载体的种类和应用

载体的类型不断增多,性能也有很大提高。目前主要的载体包括穿梭质粒载体、整合载体(同源重组整合载体、转座整合载体、插入序列-整合载体、Bt转座子-整合载体、非Bt转座子-整合载体)、Bt转座-解离载体和双价基因/km<sup>r</sup>组合重组载体。这些载体的出现,基本上能够满足Bt工程菌的各项操作,应用十分广泛,例如在大肠杆菌和Bt中稳定复制,可用于克隆和表达ICP基因梭质粒载体<sup>[17]</sup>;能在Bt-Ecoli-pseudomonas三种细菌间自由穿梭的广宿主载体,可实现cry3Aa, crylAb, crylCa等基因的表达<sup>[18]</sup>;含cry3A启动子全序列的Bt营养期表达载体pHPT,可避免两种ICP基因在同一Bt菌株中共表达时引起的竞争问题,平均菌体的生理负荷,提高蛋白表达总量,扩大杀虫谱<sup>[19]</sup>;染色体整合载体pBMB-F7E,可随温敏复制子在高温下被消除,大大降低了整合到染色体上基因发生再次转座的几率<sup>[20]</sup>;不能形成TnpA蛋白的重组子pTYP45(含有完整的对蚊子具高毒效及有广谱溶细胞性的cyt1A基因、分子伴侣基因及crylAc启动子序列)和pTYP26(含有对双翅目蚊子具有高毒力的cry1A基因),成功将cyt1A、crylAc基因整合到HD1菌株染色体上,可避免质粒的不稳定性,使工程菌遗传稳定,又可提高基因的表达水平<sup>[21]</sup>;解离穿梭载体pBMB1205可特定消除抗性标记基因和其它非苏云金芽孢杆菌DNA片段<sup>[22]</sup>;解离载体pBMB1204在两个同向res区间具有多个限制酶位点,可方便插入其它质粒复制区得到其它类型的解离穿梭载体,这有利于克服质粒的不相容性问题,也可用来构建多价重组<sup>[23]</sup>;不同ICPs之间存在增效作用,是构建高效遗传工程杀虫剂、预防和延缓害虫抗性的重要途径,Bt双价基因/km组合重组质粒pBlue-crylAb-km<sup>r</sup>-2Aa和pBlue-crylAc-km<sup>r</sup>-2Aa的出现正是这一思想的成功尝试<sup>[20]</sup>。目前许多科学家致力于采用遗传工程的方法,对原有的ICP基因重组改造,构建成杂种基因或工程菌,以提高杀虫效率,扩大杀虫谱,延长有效期或改进制剂效能。商品化的Bt杀虫剂主要源自

库斯塔克亚种, 如 HD-1 及类似菌株。

## 2.2 Bt 工程菌载体优化策略及展望

不论是广谱杀虫工程菌, 还是提高杀虫活性的工程菌、延缓抗性的工程菌、延长持效期的工程菌, 载体是将供体基因导入受体菌中进行表达的运载工具, 在扩大杀虫谱, 延长持效期并改善菌体的释放性能, 提高毒力和 ICPs 产量等方面起着关键的作用, 是利用基因工程手段构建工程菌的关键环节。所以近些年来研究者们想尽各种思路构建高性能克隆-表达载体。

构建高性能的载体需要考虑各个方面的因素, 其中载体的表达性能和稳定性是至关重要的环节, 此外, 基因本身的杀虫效果、受体菌的选择和靶害虫肠道的吸收情况等也是影响载体表达性能和稳定性的重要方面。除 Bt 无晶体突变株是良好的受体菌外, 假单胞杆菌、根际细菌、荧光极毛菌、植物内生菌、蓝细菌都会成为特定领域里的理想受体菌。假单胞杆菌、根际细菌用于杀灭地下害虫; 荧光极毛菌、植物内生菌用于延长工程菌的持效期; 蓝细菌用于杀灭蚊虫。同时深入研究杀虫机理和靶害虫肠道的吸收过程将为载体的构建提供指导, 从而提高杀虫蛋白结构域与害虫肠上皮受体的结合效率, 快速形成孔道。还有为使外源基因表达量增加, 除增加载体的克隆数量外, 构建一个高效的与核糖体结合的 SD 序列以提高 mRNA 的翻译效率不失为构建高性能载体的一个新颖思路。综合考虑以上各方面因素, 可为构建高性能载体提供理论指导, 为生产高效生物杀虫剂奠定坚实基础。与传统育种方法相比, 构建的工程菌不仅能提高自身性状, 而且可以有目的、定向地增加新的性状。这些工程菌有的已开发出制剂并投入田间应用, 有的还处于研究阶段, 它们的应用效果和开发前景还有待实践检验。

构建遗传工程菌是 Bt 生物农药研制中最为活跃的研究策略之一, 从文献检索到的相关研究数量以及具体应用的生产实际, 都证明了构建遗传工程菌的有效性和生命力。虽然各种构建高性能载体为生产高效生物杀虫剂奠定坚实基础, 但由于载体和所载基因的限制, 加上生物物种之间的隔离屏障, 改良一个高效杀虫的毒蛋白难度是比较大的, 而且构建遗传工程菌策略只能研究单个或少数几个基因, 通过 DNA 重组技术来改进那些由分散在基因

组的不同位置上的多个或数十个基因所共同赋予的细胞特性往往是十分烦琐和困难的, 而且生物系统中诸要素相互作用的复杂性及其动力学行为的非线性和不均匀性、可替代途径和未知途径的存在, 均在一定程度上限制了 Bt 生物农药工程的应用。

## 3 Bt 的突变筛选策略

### 3.1 Bt 物理、化学随机诱变筛选策略

针对 Bt 菌种发酵效价低、杀虫谱窄、见效慢、菌种退化等问题, 可以采用物理或化学透变剂处理 Bt, 促进其突变频率大幅度提高, 然后设法采用简便、快速和高效的筛选方法, 从中挑选少数高效杀虫效率的突变株。目前常用的诱变剂主要有紫外线、硫酸二乙酯、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG 或 MNNG)和亚硝基甲基脒(NMU)等。后两种因有突出的诱变效果, 所以被誉为“超诱变剂”。当前所使用的高产发酵菌株, 很多是通过透变育种而来的。

诱变剂的复合处理常呈现一定的协同效应。选择合适的诱变剂量, 将化学诱变和物理诱变结合能显著提高突变率。如我们实验室<sup>[8]</sup>将菌株 7012c 经紫外线和两次亚硝基胍的交替复合诱变, 菌株的毒力与原始菌株相比提高了 7.5 倍。

但在诱变工作中, 往往难以确定一个合适的剂量进行有效突变; 突变的方向不确定, 正突变、负突变往往也不容易把握; 经多次诱变而高效价的菌株中更容易出现回复突变。因此, 在诱变工作中, 目前比较倾向于采用较低的剂量。例如, 过去在用紫外线作诱变剂时, 常采用杀菌率为 99%或 99.9%的剂量, 而近年来则倾向于采用杀菌率为 70%~75%, 甚至更低(30%~70%)的剂量, 特别是对于经多次诱变后的高产菌株更是如此。

### 3.2 Bt 引进随机碱基诱变筛选策略

通过引进随机的碱基替换进行随机诱变方法, 进而筛选理想的突变体。通常, 采用错误倾向 PCR 方便地引进突变<sup>[24]</sup>。本方法的关键点在于如何选择合适的突变频率。一般有益突变的频率很低, 绝大多数突变是有害的。当突变频率太高时, 几乎无法筛选到有益突变; 但突变频率也不能太低, 否则未发生任何突变的野生型将占突变群体的优势类型, 也很难筛选到理想的突变体。以往的研究表明: 目标基因内有 1.5~5 个碱基发生碱基替换时, 诱变结果是最理想的<sup>[25]</sup>。总体来看, 随机诱变的方法带有

一定的盲目性,在实际工作中成功率很低。

### 3.3 Bt 定点突变筛选策略

定点突变作为研究蛋白质结构与功能的重要手段之一,特别是对于Bt杀虫蛋白的结构、功能、作用机理等日趋明了的背景下,对其相应结构域进行定点突变,可以改变Bt毒蛋白的特性,产生的突变蛋白比未突变的蛋白毒力更高,杀虫谱更广,为细菌杀虫剂和转基因植物的开发提供充足的后备资源,有关这方面的研究,很多学者进行了卓有成效的研究,仅我们实验室就取得了较为可喜的成绩<sup>[26-29]</sup>。该方法比使用化学因素、自然因素导致突变的方法具有突变率高、简单易行、重复性好的特点;目前该方法主要用于改变核苷酸序列获得突变基因、研究基因的结构与功能的关系;通过改变特定的氨基酸获得突变蛋白质,研究蛋白质的结构与功能,从微观水平上阐明正常状态下基因的调控机理、疾病的病因和机理,而且定点突变只是针对单个基因内的某些碱基进行的,高效价的Bt制剂的获得显然也有它的局限性。

## 4 定向进化策略

### 4.1 DNA 改组

1994年,一种崭新的定向分子进化新技术——DNA改组在美国Affymax研究所的Stermmer实验室悄然而生<sup>[30]</sup>。该技术在试管里模拟达尔文进化的过程,在分子水平上创造分子的多样性,结合灵敏的筛选技术,迅速得到理想的变异。DNA改组是DNA分子的体外重组,是基因在分子水平上有性重组。通过改变单个基因或基因家族原有核苷酸序列,创造新基因,并赋予表达产物以新功能。DNA改组是目前分子定向进化技术中最成功,也是应用最广泛的随机突变方法,突变库构建成功后,能否从中筛选到最佳基因成为定向进化技术成败与否的另一个关键。只有建立有针对性的高效筛选模型,才能减少工作量,快速地选择到目标突变体。目前,高通筛选技术层出不穷,筛选技术的更新有赖于细胞表面展示技术的不断完善,其中以噬菌体、酵母、核糖体与mRNA四类展示技术最为常见。在Bt毒蛋白定向进化研究中,如Hiroshi Ishikawa<sup>[31]</sup>等运用噬菌体表面展示技术,对Cry基因中的受体结合位点进行了成功的定向进化。实践证明,DNA改组技术是一种加速分子进化的有效手段,但当采用单一出发

基因时由于随机点突变基因来源于聚合酶反应,得到的随机点突变率很低,并且多数点突变是有害的或中性的,使得有益突变的积累和所期望功能的进化非常缓慢<sup>[32]</sup>。因此DNA改组技术方法面世后,很多以此为基础的改进技术如雨后春笋般涌现,大大加速了基因体外定向进化的速度。比较典型的有:基因家族改组技术、交错延伸过程技术、SCRATCH技术、临时模板随机嵌合技术等。

### 4.2 Bt 改组的机遇与挑战

2004年,第一个Bt全基因组序列的测序的完成标志着Bt进入功能基因组学研究时代。目前,美国能源部联合基因组研究所已完成2个Bt菌株(97-27和ALH)的全基因组序列测定,均含有520万多碱基对<sup>[33]</sup>。同时目前160多种微生物的全基因组序列的测定已经完成,同时,还有大量的微生物和动植物的全基因组测序工作正在进行之中。这极大地推动了功能基因组学的发展、拓展了Bt研究的范围。近年来DNA改组技术极其扩展技术的日臻成熟及推广应用,Bt及其相关基因的丰富必将给Bt改组带来一场深刻的技术革命,Bt生物农药工程面临着前所未有的发展机遇。

DNA改组作为一种实用的分子进化技术自诞生之日起就受到了广泛的关注,它在生物分子工程中起着关键的作用,与点突变不同的是DNA改组可通过交换大片段的功能区域来寻找最佳组合的分子,它既在体外模仿了自然进化,又大大地加速了有性重组的进化过程。特别是对于那些三维结构不明确,不需要知道蛋白的三维结构与功能之间的关系,就可以达到体外进化的目的。随着DNA改组技术的发展,定向进化出具有优良性质的基因或蛋白,似乎不再是阻碍基因进化速度的关键,但从文献检索我们可以看到,尽管其它蛋白质、酶等的体外定向进化有很多成功的实例,在Bt中定向进化却是比较少的,国内学者关于这方面的研究还未见报道。究其原因我们认为主要是Bt毒蛋白的高通量筛选方法的瓶颈限制。一旦这个瓶颈突破,直接对已知或未知的毒素蛋白代谢途径进行快速优化以获得高效、广谱的Bt菌株会进入一个高速发展的时期,也必将成为Bt研究的热点之一。

## 参 考 文 献

- [1] Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R. Bacterial

- insecticidal toxins. *Crit Rev Microbiol*, 2004, **30**(1): 33–54.
- [2] Whalon ME, Wingerd BA. Bt: mode of action and use. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2003, **54**(4): 200–211.
- [3] Oliveira MFD, Ianz H, Rodriguez MH, *et al.* Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(9): 5269–5274.
- [4] Xu D, Cote JC. Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* *sensu lato* flagellin (H antigen) protein: comparison with H serotype diversity. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(7): 4653–4662.
- [5] Martinez C, Ibarra JE, Caballero P. Association analysis between serotype, cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. *J Invertebr Pathol*, 2005, **90**(2): 91–97.
- [6] Ariu RR, Ibarra JE. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **62**(6): 1346–1355.
- [7] 夏立秋, 孙运军, 丁学知. 生物农药的发展与苏云金杆菌杀虫剂的研究. 中国微生物学会第九届微生物学教学和科研及成果产业化研讨会. 中国微生物学会, 2003: 121–129.
- [8] 丁学知, 夏立秋. Bt 高毒力菌株 4.0718 的快速选育. 中国生物防治, 2001, **17**(4): 163–165.
- [9] Damgaard PH, Abdel-Hameed A, Ellenberg J, *et al.* Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on grass foliage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, **14**: 239–242.
- [10] Normander B, Christensen BB, Molin S, *et al.* Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the Bush Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl and Environ Microbiol*, 1998, **64**: 1902–1908.
- [11] Maduell P, Callejas R, Cabrera KR, *et al.* Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of Piper (Peperaceae) in three altitudinal levels. *Microb Ecol*, 2002, **44**: 144–153.
- [12] Ichimatsu, Mizuki E, Nishimura K, *et al.* Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Curt Microbiol*, 2000, **40**: 17–20.
- [13] Ohba M, Lee DH. *Bacillus thuringiensis* associated with faeces of the Kerama-jika, *Cervus nippon keramae*, a wild deer indigenous to the Ryukyus, Japan. *J Basic Microbiol*, 2003, **43**: 158–162.
- [14] Swiecicka I, Fiedoruk K, Bednars G. The occurrence and properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from free-living animals. *Lett Appl Microbiol*, 2002, **34**: 194–198.
- [15] Salehi Jouzani G, Pourjan Abad A, Seifinejad A, *et al.* Distribution and diversity of Dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, **13**: 634–638.
- [16] 钟基. 湖南研发出新型苏云金杆菌杀虫剂. 农药市场信息, 2007, **5**: 26–27.
- [17] Gamel P H, Piot J C. Characterization and properties a novel plasmid vector for *Bacillus thuringiensis* displaying compatibility with host plasmids. *Gene*, 1992, **120**: 17–26.
- [18] 宋福平. 苏云金芽孢杆菌 cryII 和 cry8 基因的研究. 中国农业科学院博士后论文, 2003.
- [19] 蒙国基, 曾少灵. 苏云金芽孢杆菌 cry3Aa 启动子的克隆和营养期表达载体的构建. 高技术通讯, 2001, **3**(3): 121–125.
- [20] 乐超银, 孙明. 利用整合载体构建苏云金芽孢杆菌杀虫工程菌. 遗传学报, 2003, **30**(8): 737–742.
- [21] 余健秀, 曾少灵. 苏云金芽孢杆菌分子伴侣串联基因 p19-p29 的克隆和表达载体的构建. 微生物学报, 2002, **42**(5): 567–571.
- [22] 韩岚岚. 苏云金芽孢杆菌 Cry 蛋白分离纯化及其增效研究. 东北农业大学硕士学位论文, 2003.
- [23] 吴岚, 孙明. 含质粒复制起始区 ori44 的苏云金芽孢杆菌解离载体的构建. 生物工程学报, 2002, **18**(3): 335–338.
- [24] LIN-Goerke J, Robbins D, Burczak J. PCR based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. *J Biotechniques*, 1997, **23**: 409–412.
- [25] Ryu DD, Nam DH. Recent progress in biomolecular engineering. *Biotecnol Prog*, 2000, **16**(1): 2–14.
- [26] Yunjun Sun, Wei Wei, Xuezhi Ding, *et al.* Detection of chromosomally located and plasmid-borne genes on 20 kb DNA fragments in parasporal crystals from *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol*, 2007, **188**: 327–332.
- [27] Liqiu Xia, Yunjun Sun, Xuezhi Ding, *et al.* Identification of cry-type genes on 20-kb DNA associated with CryI crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 2005, **51**: 53–58.
- [28] 夏立秋, 孙运军, 莫湘涛. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白毒性片段的结构域在毒杀昆虫中的作用. 生物工程进展, 2002, **22**(1): 73–76.
- [29] 邹先琼, 夏立秋, 孙运军. 苏云金杆 4.0718 菌株杀虫晶体性质的研究. 生命科学研究, 2001, **5**(3): 242–245.
- [30] Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*, 1994, **370**(4): 389–391.
- [31] Hiroshi Ishikawa, Yasushi Hoshino, Yutaka Motoki, *et al.* A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Mol Biotechnol*, 2007, **36**: 90–101.
- [32] GJ Williams, AS Nelson, A Berry. Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *CMLS. Cell Mol Life Sci*, 2004, **61**: 3034–3046.
- [33] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>.