

苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigE* 基因 敲除突变株的构建与特点

魏娟^{1,2} 孙长坡^{2,3} 宋福平^{2*} 张杰² 高继国¹ 黄大昉³

(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. 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘要: SigE 因子是芽胞杆菌芽胞形成过程中起重要作用的 sigma 因子, 它控制着众多芽胞形成相关基因的表达。在苏云金芽胞杆菌中, CryI 等杀虫晶体蛋白的表达也受 SigE 因子的控制。本研究利用同源重组技术构建了苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种标准菌株 HD-73 *sigE* 缺失突变株。研究表明: 突变株衰亡期提前, 丧失了形成芽胞和晶体的能力; *cryIAa* 指导的 β -半乳糖苷酶活性分析表明 *sigE* 基因对 *cryIAa* 基因的转录有较大影响。利用载体 pHT315 携带 *sigE* 所在操纵子 *spoIIIG* 及其启动子序列在突变株中表达, 使突变株恢复了产生芽胞和形成杀虫晶体的能力, 生长基本恢复正常, 这些结果表明 SigE 因子是 Bt 库斯塔克亚种菌株产生芽胞和形成晶体所必需的。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, *cry* 基因, *sigE* 基因, 突变

Construction and Characteristics of the *sigE* Mutation in *Bacillus thuringiensis* HD-73

WEI Juan^{1,2} SUN Chang-Po^{2,3} SONG Fu-Ping^{2*} ZHANG Jie²
GAO Ji-Guo¹ HUANG Da-Fang³

(1. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

(2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

(3. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: SigE, encoded by *sigE* gene is an important sigma factor in the sporulation process. Many known genes and operons are controlled by this sporulation-specific factor, as well as most of *cry* genes in *Bacillus thuringiensis*. In this study, a *sigE* deletion mutant HD-73 (Δ sigE) was constructed by homologous recombination from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 strain. The result showed that the mutant strain lost the ability of sporulation and crystallization of Cry protein. At the same time, the expression of insecticidal crystal proteins was severely reduced in HD-73 (Δ sigE) mutant, and growth speed of the mutant was affected intensively. The *lacZ* gene was fused with the promoter of the *cryIAa* gene, and expressed in HD-73 (Δ sigE) mutant and HD-73 acrySTALLIFEROUS mutant respectively. The activity of β -galactosidase ex-

pressed by *lacZ* gene in HD-73 (Δ sigE) mutant was much lower than that in the HD-73 acrySTALLIFEROUS mutant. The ability of sporulation and crystallization of Cry protein was normally complemented by the expression of *spoIIIG* operon, which contained the *sigE* gene after transformation with recombinant plasmid, and growth speed of the complemented strain also recovered. All the results indicated that for the *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* strain, *sigE* gene is essential to sporulate and crystallize. Acquisition of HD-73 (Δ sigE) mutant will redound to understanding mechanism of Cry protein expression and regulation, crystallization and its relationship with sporulation.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *cry* gene, *sigE* gene, Mutation

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis* 简称 Bt) 是一类广泛存在于土壤中的革兰氏阳性菌, 在芽胞形成的同时能够积累大量的 δ -内毒素(Delta-endo-toxin)。杀虫晶体蛋白对许多昆虫具有特异性的毒杀作用^[1], 现已在农林害虫的防治中得到了广泛的应用。

δ -内毒素由 *cry* 基因或 *cyt* 基因编码, *cry* 基因的表达调控主要是由 σ^E 和 σ^K 因子控制^[2-4]。苏云金芽胞杆菌在细胞发育过程中不同于枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)之处在于芽胞形成的同时能形成蛋白晶体, 因此芽胞的区室化(细胞分化为母细胞和前芽胞室)表达和杀虫晶体蛋白在母细胞中积累、并组装成晶体更是一种精巧的时空调控。有关蛋白表达后如何形成晶体, 以及晶体与芽胞形成之间关系的报道极少。1996 年, Lereclus 等^[3]利用基因插入失活的方法初步研究了 Bt 407 无晶体株的 *sigE* 和 *sigK* 基因突变株, 突变体丧失了产生芽胞和晶体的能力, 但作者并未对晶体形成机制及晶体与芽胞形成之间关系作深入研究。目前, 对芽胞形成的研究主要集中在枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)中, 通过级联反应激活 6 个 σ 因子即营养期 σ^A 和芽胞形成期的 σ^{H^+} 、 σ^F 、 σ^E 、 σ^G 和 σ^K 因子, 有序地启动不同基因的表达, 使芽胞形成基因在时间和空间上有序而准确无误地表达^[5]。 σ^E 调控的基因最多, 达 253 个^[6]。通过构建 *sigE* 基因突变体研究 *sigE* 基因调控的基因, 进而研究 Bt 所特有的基因, 对于明确 *cry* 基因的表达调控网络及其蛋白形成晶体的机制具有十分重要的理论意义。

本研究利用同源重组技术缺失了 HD-73 菌株中的 *sigE* 基因后获得了相应的突变株, 分析了突变株生长情况、形成芽胞和晶体的能力, 利用报告基因 *lacZ* 与 *cryIAa* 基因的启动子融合表达分析了 SigE 因子对 *cryI* 类启动子活性的影响。本研究为利用基

因芯片等高通量技术研究 SigE 因子控制的基因、芽胞形成和晶体形成的关系提供了重要的实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 所用菌株与质粒见表 1, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)的培养采用 Luria-Bertani(LB)培养基; Bt 的培养采用 Sporulation medium(SM)培养基^[7](营养肉汤 8 g, 1.2% MgSO₄ 10 mL, 10% KCl 10 mL, 1 mol/L NaOH 1 mL, 定容至 997 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 补加过滤除菌的 1 mmol/L FeSO₄ 1 mL, 1 mol/L Ca(NO₃)₂ 1 mL, 10 mmol/L MnCl₂ 1 mL)。

1.1.2 酶及试剂: Taq DNA 聚合酶购自于鼎国生物技术公司; KOD DNA 聚合酶购自于 TOYOBO 生物技术公司; PCR 产物回收试剂盒购自于 BBI 公司; 相关的内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自于 TaKaRa 公司; 其他生化试剂均为进口或国产生化纯或分析纯级试剂。

1.1.3 引物合成及序列测定: 所用引物根据 Bt 97-27 菌株的基因组序列设计, 引物名称及序列见表 2。引物合成和序列测定由上海 Sangon 公司完成。

1.2 细菌的培养条件

E. coli 在 37°C 培养, 摇床转速为 230 r/min; 苏云金芽胞杆菌在 30°C 培养(只是在敲除突变过程中, 培养温度为 40°C), 摇床转速为 200 r/min。氨苄青霉素使用浓度为 200 μ g/mL, 红霉素使用浓度为 5 μ g/mL。

1.3 DNA 操作、转化、PCR

大肠杆菌质粒提取及转化, DNA 片段纯化参考文献[8]。Bt 总 DNA 提取^[9]和电击转化参考文献[10]。序列比对和搜索使用美国国立生物技术信息中心(NCBI)的基本工具 PSI-Blast 及 Blastx。根据

表 1 菌株和质粒 Table 1 Strains and plasmids		
菌株/质粒 Strains and plasmids	特性 Characterization	来源 Source
Strains		
JM110	<i>Rpsl thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	This lab
SCS110	<i>rpsl thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	This lab
<i>B. thuringiensis</i> HD-73	HD-73 wild strain (only containing <i>cryIAc</i>)	This lab
<i>B. thuringiensis</i> HD-73 (<i>cry</i> [−])	HD-73 wild curing plasmid pHT73	This lab
HD-73 (Δ <i>sigE</i>)	The <i>sigE</i> gene was deleted	This study
HD-73(<i>cry</i> [−])-Pcry1Aa-lacZ	HD-73 (<i>cry</i> [−]) containing plasmid Pcry1Aa-lacZ	This study
HD-73 (Δ <i>sigE</i>)-Pcry1Aa-lacZ	HD-73 (Δ <i>sigE</i>) containing plasmid Pcry1Aa-lacZ	This study
HD-73 (<i>sigE</i> -LHF)	HD-73 (Δ <i>sigE</i>) containing plasmid pHT <i>sigE</i> -LHF	This study
Plasmids		
pMAD	Amp ^R , Erm ^R , <i>E.coli-Bacillus</i> shuttle vector, 9.7kb	文献[11]
pMADE	pMAD carrying partial <i>sigE</i> gene	This study
pHT315	Amp ^R , Erm ^R , <i>E. coli</i> -Bt shuttle vector, 6.5kb	Dr. D. Lereclus
Pcry1Aa-lacZ	Amp ^R , Erm ^R , pHT315 carrying <i>cryIAa'-lacZ</i>	文献[13]
pHT <i>sigE</i> -LHF	Amp ^R , Erm ^R , pHT315 carrying <i>spoIIIG</i> operon	This study

表 2 引物名称及序列 Table 2 Primers and sequences	
引物名称 Primers	序列 Sequences (5'-3')
sigE1	(<i>Bam</i> H) 5'-CGCGGATCCGTGTATACAGCATTGGGTTTA-3'
sigE2	5'-GAAATGTATGACTGTGGTCTTAATTCCTAATTCAG-3'
sigE3	5'-CTGAAATTAGGAATTAAGACCACAGTCATACATTTC-3'
sigE4	(<i>Sal</i> I) 5'-ACGCGTCGACCCATAACAAAGATAGGATCTC-3'
sigE-LHF1	(<i>Bam</i> H) 5'-CGCGGATCCCAGCTTCAGATCCAGAAGTA-3'
sigE-LHF2	(<i>Eco</i> R) 5'-CCGGAATTCATAACGGCT GGTCTTATTC-3'

Bt 97-27 菌株的基因组序列设计了一对引物 sigE1 和 sigE4, 用于 *sigE* 基因的克隆与测序。

PCR 反应采用 50 μ L 体系, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 53 $^{\circ}$ C 1 min, 68 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 缺失突变株的构建

质粒 pMAD 是 *E. coli-Bacillus* 穿梭载体, 含有革兰氏阳性菌温度敏感型的复制区, 用于同源重组, 进行基因敲除操作^[11]。引物 sigE2 和 sigE3 分别与 sigE1 和 sigE4 配对扩增 *sigE* 的缺失突变盒。

将敲除载体电击转入 HD-73 出发菌株。在红霉素抗性平板上筛选转化子, 并用引物 sigE1 和 sigE4 进行 PCR 验证。将正确的转化子在 30 $^{\circ}$ C 扩增培养后, 在 40 $^{\circ}$ C 诱导载体上的缺失突变盒与出发菌株 HD-73 基因组中 *sigE* 的野生拷贝同源区域进行重组, 而发生双交换, 将 *sigE* 敲除。然后稀释适当的倍数

涂布 LB 平板并置于 40 $^{\circ}$ C 过夜培养。将菌落同时转接到添加红霉素的 LB 平板和无抗生素的 LB 平板上, 在 30 $^{\circ}$ C 培养。挑取红霉素敏感菌株培养, 并以引物 sigE1 和 sigE4 筛选突变株。

1.5 突变株的 Southern blotting 验证

分析 Bt 97-27 基因组 *sigE* 两翼序列的酶切位点, 选用 *Hind* 对筛选的 HD-73 突变株总 DNA 进行酶切, Southern 转移操作按文献[8]进行。以 sigE1 和 sigE2 为引物扩增探针, 68 $^{\circ}$ C 进行杂交, 探针标记和杂交检测采用 Roche 公司的“DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit ”试剂盒。

1.6 恢复株的构建

根据 Bt 97-27 中 *sigE* 所在操纵子 *spoIIIG* 的序列, 设计了扩增 *spoIIIG* 全长操纵子序列(含启动子)的一对引物: sigE-LHF1 和 sigE-LHF2, 用于构建恢复载体。

将恢复载体电击导入突变株 HD-73($\Delta sigE$)中, 利用红霉素和 PCR 筛选 *sigE* 的恢复株。

1.7 生长情况分析

将各菌株接种于 SM 培养基中 220 r/min、30°C 培养; 每 2 h 取样, 利用分光光度计测定在 600 nm 的吸光值 OD_{600} , 确定各菌株的生长曲线, 并确定 T_0 (T_0 是对数生长期结束的时间, T_n 是距离 T_0 前后的时间)。

1.8 菌株产生芽孢和杀虫蛋白晶体分析

利用光学显微镜和电子扫描显微镜观察菌株培养, T_{12} 开始连续取样, 观察产生芽孢和形成晶体情况, 同时利用 SDS-PAGE 方法分析各菌株样品 Cry 蛋白表达量, 方法参考文献[12]。

1.9 β -半乳糖苷酶活性分析

将携带 *lacZ* 基因与 *cryIAa* 基因启动子融合片段的表达载体 p*cryIAa-lacZ* 分别导入 HD-73(*cry*⁻) 和突变株 HD-73($\Delta sigE$) 中, 1% 接种于无抗性的 SM 培养液中, 30°C、220 r/min 振荡培养。从 T_{-2} 开始, 每隔 2 h 测定 β -半乳糖苷酶活性, 每次取样 1 mL, 同时测定样品的 OD_{600} 值, 立即将样品置于 -20°C 保存。酶活测定方法参照孙长坡等[13]。

2 结果

2.1 *sigE* 基因的克隆与序列分析

用引物 *sigE1* 和 *sigE4* 扩增 HD-73 菌株中包括 *sigE* (720 bp) 和上、下游大小各约 700 bp 的 DNA 片段, 获得 2.154 kb 的片段, 经测序获得 *sigE* 基因序列, 并在 GenBank 上登录, 登录号为 EU370933。HD-73 菌株 *sigE* 基因的核苷酸序列与蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* ATCC 14579 相似性为 100%, 与 *Bt israelensis* 相似性为 98%, 与 Bt 97-27 相似性为 93%, 与炭疽芽孢杆菌 *Bacillus anthracis* Ames 相似性为 93%, 而与 *Bacillus subtilis* 168 相似性为 74%。

2.2 HD-73 *sigE* 突变株的构建

通过重叠 PCR 得到 *sigE* 的缺失突变盒, 突变盒由 *sigE* 基因上游 724 bp、*sigE* 基因 5' 端 68 bp、*sigE* 基因 3' 端 74 bp 和 *sigE* 基因下游 710 bp 的核苷酸序列组成, 共 1576 bp; 用 *Bam*H 和 *Sal*I 进行双酶切处理后, 插入 pMAD 的相应位点, 构建了 *sigE* 的敲除载体 pMADE (图 1A)。将 pMADE 转入 HD-73 出发菌株, 经过抗性筛选, 得到转化子; 在 40°C 诱导完成同源重组后, 筛选获得了一批红霉素敏感的突

变菌株; 以红霉素抗性基因引物扩增呈阴性、以 *sigE1* 和 *sigE4* 引物扩增呈阳性 (1.6 kb) 的突变菌株命名为 HD-73($\Delta sigE$)。

Southern blotting 验证结果表明: 出发菌株 HD-73 在 2.8 kb 处有阳性条带, 而突变株 HD-73 ($\Delta sigE$) 只有 2.2 kb 的条带 (图 1B), 说明该菌株缺失了 *sigE* 基因中 578 bp 的片段, 获得的 *sigE* 基因缺失突变株正确无误。

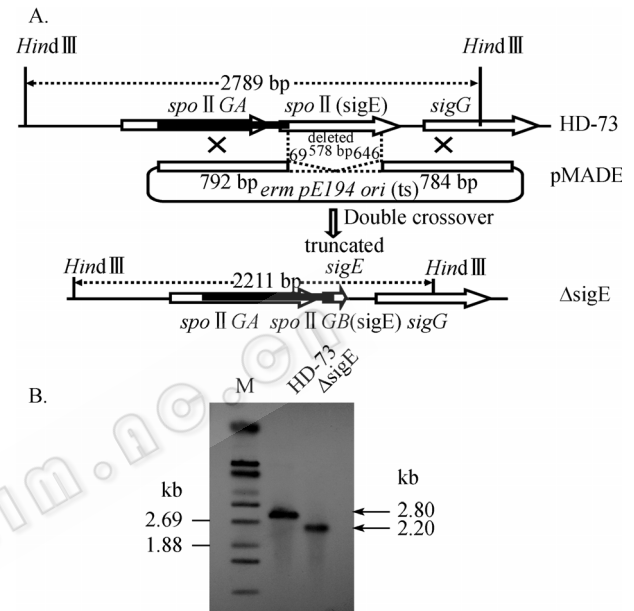


图 1 *sigE* 基因敲除载体的构建和 HD-73($\Delta sigE$) Southern blotting 分析

Fig. 1 Construction of knocking out vector for *sigE* gene and analysis result of Southern blotting

2.3 恢复株的获得

将引物 *sigE*-LHF1 和 *sigE*-LHF2 扩增获得的 DNA 片段 (2.232 kb), 测序验证无误后, 经 *Bam*H 和 *Eco*R 双酶切处理后, 插入到载体 pHT315 的 *Bam*H 和 *Eco*R 位点之间, 获得恢复载体, 命名为 pHTsigE-LHF。将该载体导入突变株 HD-73($\Delta sigE$) 中, 以红霉素抗性筛选得到的转化子的总 DNA 为模板, 以 *sigE*-LHF1 和 *sigE*-LHF2 为引物, 扩增 *spoIIIG* 全长操纵子序列 (含启动子), 突变株只能扩增获得约 1.6 kb 的条带, 恢复株则能扩增得到 2.2 kb 的条带。将具有红霉素抗性、PCR 鉴定正确的转化子命名为 HD-73(*sigE*-LHF)。

2.4 突变株的特性

生长曲线测定结果表明 (图 2): 突变株 HD-73

($\Delta sigE$)结束指数生长期后很快进入衰亡期, 这表明 *sigE* 对菌体生长有重要的作用; 恢复株 HD-73(*sigE*-LHF)的生长情况得到了恢复, 与出发菌株差别不大。

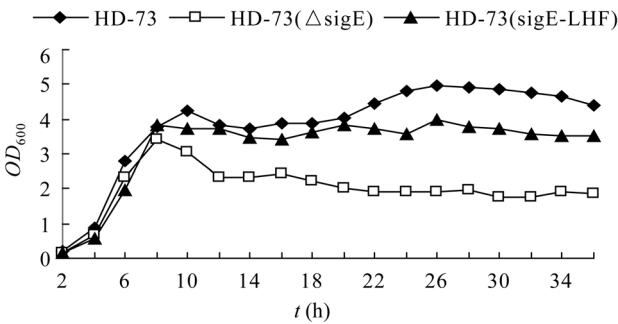


图 2 菌株的生长速率比较
Fig. 2 Comparison of the growth speed of Bt strains

以出发菌株 HD-73 为对照, 利用 SM 培养液培养突变株 HD-73($\Delta sigE$)和恢复株 HD-73(*sigE*-LHF), 到达 T_{16} 后用电子显微镜观察、拍摄照片见图 3。从图中可以看出, 出发菌株的细胞已经完全裂解, 并释放出卵圆形的芽孢和菱形晶体。而突变体则仍然以营养体的形式存在, 没有芽孢和晶体出现。恢复株能够产生卵圆形的芽孢和菱形晶体。利用 SDS-PAGE 检测各菌株培养至 T_{16} 的 Cry 蛋白表达情况, 从图 4 中可以看出, 出发菌株 HD-73 可以产生大量 130 kD 的杀虫晶体蛋白(图 4 Lane 2), 而突变株 HD-73($\Delta sigE$)只能产生极少量 130 kD 的杀虫晶体蛋白(图 4 Lane 3)。这说明 *sigE* 缺失显著降低了 Cry 蛋白的表达量。恢复菌株 HD-73(*sigE*-LHF)能够表达 130 kD 的 Cry 蛋白(图 4 Lane 4), 这表明突变株产生杀虫晶体蛋白的能力得到了恢复。

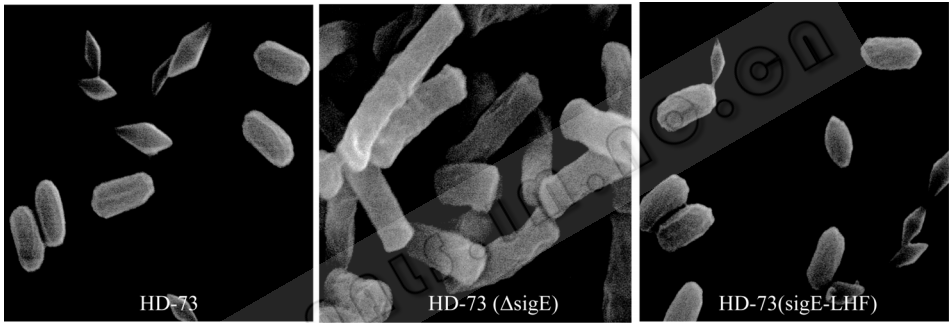


图 3 HD-73 菌株的扫描电镜观察结果
Fig. 3 Scanning electron microscopic images of HD-73 strains

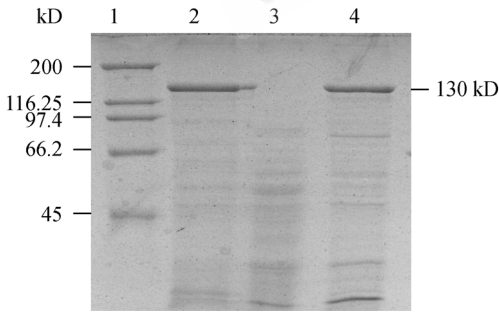


图 4 突变株产生杀虫晶体蛋白 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the production of ICPs from tested strains
1: 蛋白 Marker; 2: HD-73; 3: 突变株 HD-73 ($\Delta sigE$); 4: 恢复株 HD-73 (*sigE*-LHF)
1: Protein Marker; 2: HD-73 strain; 3: HD-73 ($\Delta sigE$) mutant strain; 4: HD-73 (*sigE*-LHF) complement strain

β -半乳糖苷酶的活性, 随着培养时间的延长, 酶的活性不断增强, 并在 T_{12} 时达到高峰(105 Millier Unit), 然后酶的活性逐渐下降; 在突变株 HD-73 ($\Delta sigE$)中, 只能检测到极微弱的 β -半乳糖苷酶活性(11.8 Millier Unit)。这说明 *sigE* 的缺失导致突变株

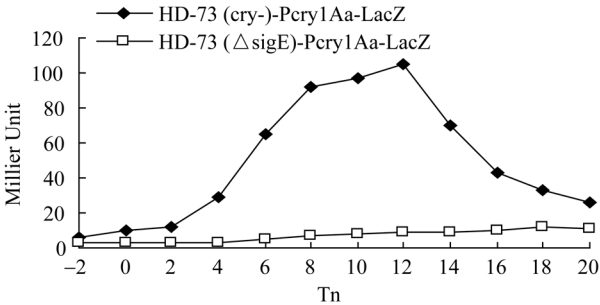


图 5 突变株 HD-73 ($\Delta sigE$)的 β -半乳糖苷酶活性
Fig. 5 Activity assay of β -galactosidase expressed in mutant

2.5 突变株 β -半乳糖苷酶活性分析
由图 5 可以看出, HD-73(*cry*-)在 T_0 可以检测到

cryIAa 启动子的活性显著降低, 从而影响 β -半乳糖苷酶的表达和活性。

3 讨论

本研究所用材料为仅含有 *cryIAC* 基因的 Bt 标准菌株 HD-73, 它属于库斯塔克亚种, 目前全球生产应用的主要产品就来源于这个亚种的菌株, 因此, HD-73 菌株是研究芽胞与晶体关系重要的基础材料。本文构建了 HD-73 的 *sigE* 基因缺失突变株, 通过 Southern blotting 进行了验证, 该突变株不能产生芽胞和晶体; 通过 *sigE* 基因的恢复, 突变体基本恢复了原有的生长特性, 并能正常产生芽胞和晶体。Lereclus 等^[3]是以另外的亚种菌株 407 为材料, 并且对该菌株进行了质粒缺失, 使之变成了无晶体突变株; 遗传操作方法是采用基因插入失活的方法; 所获得的 Bt 407 *sigE* 基因突变株的确丧失了产生芽胞和晶体的能力。与 Lereclus 等人的研究相比, 我们在苏云金芽胞杆菌极为重要的库斯塔克亚种中验证了 *sigE* 基因的作用, 在此基础上, 将能进一步开展 *sigE* 基因调控基因、芽胞与晶体形成机制等研究工作, 这些都是 Bt 407 无晶体突变株所不具备的条件。

研究表明, 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* 168)的 4226 个基因^[14]中, 有 253 个基因的表达受 σ^E 的调控^[6]。而苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis* 97-27)则有 5344 个基因^[15], 相比 *B. subtilis* 168 多 1000 多个基因。在苏云金芽胞杆菌中, σ^E 可能调控更多、独有的基因, 并参与 *cry* 基因表达和晶体形成的调控网络。因此, 苏云金芽胞杆菌 *sigE* 基因突变株的获得对研究 *cry* 基因表达的调控、晶体形成机制及其与芽胞形成间的关系具有重要的意义。

本研究苏云金芽胞杆菌 *sigE* 基因突变株的获得为下一步利用先进的基因芯片表达谱分析技术、解析苏云金芽胞杆菌中 SigE 因子调控的基因数目, 以及揭示杀虫晶体蛋白的表达、晶体形成机制及其与芽胞形成的相互关系提供了宝贵、必要的材料。

参 考 文 献

[1] Schnepf E, Crickmore N, Van J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, **62**(3): 775–806.

[2] Wong HC, Schnepf HE, Whitely HR. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J Biol Chem*, 1983, **258**: 1960–1967.

[3] Bravo A, Lereclus D. Analysis of *cryIAa* expression in *sigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Gen Genet*, 1996, **250**: 734–741.

[4] Sedlak M, Walter T, Aronson A. Regulation by overlapping promoters of the rate of synthesis and deposition into crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins. *J Bacteriol*, 2000, **182**(3): 734–741.

[5] Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev*, 1993, **57**: 1–33.

[6] Eichenberger P, Jensen ST, Conlon EM, et al. The σ^E regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, 2003, **327**: 945–972.

[7] Schaeffer P, Ionesco H, Ryter A, et al. La sporulation de *Bacillus subtilis*: étude génétique et physiologique. *Colloq Int Cent Natl Rech Sci*, 1965, **124**: 553–563.

[8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[9] Stobdan T, Kaur S, Singh A. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**(14): 1153–1156.

[10] Lereclus D, Arantes O, Chauvaux J, et al. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **51**(1): 211–218.

[11] Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-Positive bacteria. *Appl Envir Microbiol*, 2004, **70**(11): 6887–6891.

[12] Xue J, Liang GM, Crickmore N, et al. Cloning and characterization of a novel Cry1A toxin from *Bacillus thuringiensis* with high toxicity to the Asian corn borer and other lepidopteran insects. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, **280**(1): 95–101.

[13] 孙长坡, 宋福平, 张 杰, 等. 苏云金芽胞杆菌 G03 *spoIVF* 操纵子敲除对芽胞和晶体形成的影响. *微生物学报*, 2007, **47**(4): 583–587.

[14] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, **390**: 249–256.

[15] Han CS, Xie G, Challacombe J, et al. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*, 2006, **188**: 3382–3390.