

研究报告

cry8E 启动子指导的非晶体蛋白 GabR 在苏云金芽胞杆菌 HD73 菌株中的表达

刘春霞 武建博 彭琦 曲宁 邱丽丽 张杰 宋福平*

(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)

摘要:【目的】利用 *cry8E* 基因启动子指导的高效表达载体 pHT315-8E21b, 构建一个能够在苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)中正确表达非晶体蛋白 GabR 的重组菌株。【方法】将苏云金芽胞杆菌中的功能基因 *gabR* 装载到 *cry8E* 基因启动子指导的高效表达载体 pHT315-8E21b 上, 转入到 HD73⁻无晶体突变株后获得重组菌株 HD-8E-gabR。通过 SDS-PAGE 和凝胶阻滞等方法对 GabR 蛋白的表达和功能进行分析。【结果】通过 SDS-PAGE 及蛋白定量等方法首次证明了在 Bt 表达体系中 *cry8E* 基因启动子指导的高效表达载体能够表达非晶体蛋白 GabR, 且通过碱裂解的方法可以提高 GabR 蛋白在 Bt 系统中的溶解性。进一步凝胶阻滞试验证明 GabR 能与其调控启动子 PgabT 结合。【结论】证明了 *cry8E* 基因启动子指导的 Bt 表达系统具有大量表达非晶体类蛋白的能力。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, *cry8E* 启动子, GabR 蛋白, 表达载体

Expression of GabR protein in *Bacillus thuringiensis* HD73 strain directed by *cry8E* promoter

LIU Chun-Xia WU Jian-Bo PENG Qi QU Ning QIU Li-Li ZHANG Jie
SONG Fu-Ping*

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

Abstract: [Objective] To express a non-crystal protein GabR in *Bacillus thuringiensis*, the *B. thuringiensis* expression system directed by *cry8E* gene promoter was constructed and verified. [Methods] The *gabR* gene of *B. thuringiensis* was cloned into the high-level expression vector pHT315-8E21b initiated by *cry8E* gene promoter and the resulted vector was introduced into the acrySTALLIFEROUS mutant HD73⁻, to obtain HD-8E-gabR. The SDS-PAGE and electrophoretic mobility shift analysis were performed for analysis of expression and function of GabR protein. [Results] SDS-PAGE analysis showed that GabR protein were successfully overexpressed in *B. thuringiensis* with the high-level expression vector pHT315-8E21b initiated by *cry8E* gene promoter, which was the first time to express a non-crystal protein in *B. thuringiensis*. The solubility of GabR protein in *B.*

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070083)

*通讯作者: Tel: 86-10-62896634; Fax: 86-10-62812642; ✉: fpsong@ippcaas.cn

收稿日期: 2013-03-21; 接受日期: 2013-05-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

thuringiensis could be improved in the alkaline buffer. Electrophoretic mobility shift assay showed that GabR could bind with its regulated promoter P_{gabT}. **[Conclusion]** This study proved that the *B. thuringiensis* expression system directed by *cry8E* gene promoter can be utilized to express a large number of non-crystal proteins.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *cry8E* promoter, GabR protein, Expression vector

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)在芽胞形成时产生对多种昆虫有致病性的杀虫毒素,主要以蛋白质晶体的形式存在于细胞内,又称伴胞晶体(Parasporal crystal)^[1]。其产量可达细胞干重的 20%,编码这些蛋白的基因主要为 *cry* 或 *cyt*。苏云金芽胞杆菌能够大量表达 Cry 蛋白,在转录水平上,主要是指导它们表达的启动子具有很高的活性。一些启动子已用于构建表达 *cry* 基因的载体,主要有 pBMB1A、pEMB0557、pSXY-422b 和 pSTK-3A。pBMB1A 是以低拷贝载体 pHT304^[2]为基础,利用 *cryIac* 基因启动子指导而构建的一个可快速克隆表达不同类别 Cry 蛋白的通用载体^[3]; pEMB0557 可以容纳至少 70 kb 的 DNA 片段,可用于克隆或表达较大的基因或基因簇^[4]; pSXY-422b 和 pSTK-3A 均是以高拷贝载体 pHT315^[2]为基础, *cry3A* 启动子指导的穿梭表达载体,只有抗性不同^[5-6]。在比对 *cry1A*、*cry3A*、*cry4A* 和 *cry8E* 四种不同机制的 *cry* 基因启动子的活性后发现,这四种启动子转录活性由高到低依次为 P_{cry8E}>P_{cry1A}>P_{cry4A}>P_{cry3A}^[7]。研究表明 *cry8E* 启动子指导的高效表达载体 pHT315-8E21b 载体可正确表达 *cryIac* 基因,其表达效率高于被广泛应用的 *cry3A* 启动子指导的穿梭表达载体 pSXY422b^[8]。然而用 *cry* 基因启动子来指导非 *cry* 基因的表达未有报道。

在 Bt 生长及芽胞形成过程中发现,γ-氨基丁酸代谢旁路(GABA shunt)可在缺少 α-酮戊二酸脱氢酶的条件下修正三羧酸循环途径^[9]。Bt HD73 中 *gabR* 基因编码的 GabR 蛋白是依赖于 Sigma54 因子的调节蛋白,和 Sigma54 因子一起正调控与 GABA shunt 相关的 *gab* 基因簇。其调控机制为: *gab* 基因簇中特异基因起始转录时, Sigma54-RNA

聚合酶全酶结合到基因启动子上游的-12/-24 区后形成一个闭合的复合结构,它需要 GabR 蛋白 N 端的 Helix-Turn-Helix (HTH)结构结合该基因启动子,使闭合结构异构化形成开放结构才能起始基因转录^[10]。因此过表达 Bt 中 GabR 蛋白有助于研究 *gab* 基因簇在 Bt 中的表达代谢调控,为深入研究 GABA shunt 在 Bt 中的功能和调控机制奠定基础。

本研究首次尝试将 Bt 功能基因 *gabR* 导入 *cry8E* 启动子指导的高效表达载体 pHT315-8E21b 中,以 Bt 表达系统表达非晶体蛋白,从而为建立高效 Bt 表达蛋白体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 本研究所用菌株和质粒见表1。大肠杆菌(*Escherichia coli*)的培养采用 LB 培养基(Tryptone 1.0%, Yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%, pH 7.2), 37 °C、220 r/min 条件下培养; 苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的培养采用 SSM 培养基^[11], 30 °C、220 r/min 条件下培养。各抗生素使用浓度为, 氨苄青霉素(Amp): 100 mg/L, 红霉素(Erm): 5 mg/L。

1.1.2 主要试剂: Taq DNA 聚合酶购自北京康润生物公司; 质粒提取及 DNA 回收试剂盒购自 Axygen 公司; PrimerSTAR HS DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; Pierce® 660 nm Protein Assay 试剂盒购自 Thermo Scientific 公司; G250购自 BIO-RAD 公司。其它生化试剂和抗生素均为进口或国产生化或分析纯级试剂。

1.1.3 引物合成及序列测定: 根据 GenBank 中 Bt HD73 菌株(GenBank 登录号: CP004069) 已

表 1 菌株和质粒		
Table 1 Strains and plasmids		
菌株/质粒	特性	来源
Strains and plasmids	Characterization	Resource
Strains		
<i>E. coli</i> JM110	<i>rpsL(Str^r) thr leu thi-1 lacY galK ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)[F⁺ traD36 proAB lacI^q ZΔM15]</i>	Laboratory collection
<i>E. coli</i> ET 12567	<i>F⁻ dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202::Tn10 galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1</i> , for generation of unmethylated DNA	Laboratory collection
HD73 ⁻	AcrySTALLIFEROUS mutant of Bt HD73 strain	[12]
HD-8E-gabR	HD73 ⁻ strain containing plasmid pHT315-8E-gabR	This study
HD ⁻ -8E	HD73 ⁻ containing plasmid pHT315-8E21b	Laboratory collection
Plasmids		
pHT315-8E21b	pHT315 carrying <i>cry8E</i> promoter and multiple clone sites (MCS) from pET-21b	[8]
pHT315-8E-gabR	pHT315-8E21b containing <i>gabR</i> gene	This study

知序列设计引物,引物对 *gabR*-F (5'-CGGGATCCG ATGGTTGCAGAAAAGGAACG-3')和 *gabR*-R (5'-ACGCGTCGACTCCAATGTTTTCTTCCTCCTC-3')用于扩增 *gabR* 基因;引物对 *gabTp*-FAMF (5'-GATTGCTATGCAATTGGGGTGC-3')和 *gabTp*-FAMR (5'-CGGGATCCCCTTTTCTTTACATTGTT TTCTC-3')用于扩增 *gabT* 基因的启动子序列。引物合成由上海生工生物工程公司完成。对重组质粒进行测序(华大基因)鉴定,用 NCBI BLAST、BioEdit 序列软件对插入基因序列进行比较分析。

1.2 DNA 操作、转化、PCR

大肠杆菌质粒提取、酶切、凝胶电泳、回收纯化、连接、转化以及 PCR 反应均参照文献[13]以及相应试剂盒说明书;苏云金芽胞杆菌总 DNA 提取以及感受态细胞制备和电击转化参考文献[14]。

1.3 蛋白表达及定量

将菌株按 1%接种到 SSM 或 LB 培养基中,220 r/min、30 °C 培养,根据实验需求,不同时期低温离心收集菌体。用适量的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)重悬菌体,超声破碎至菌裂解,将细胞裂解液与上样 Buffer 混合,煮沸 10 min,采用 Pierce® 660 nm Protein Assay Kit 分别对混合液中的总蛋白进行定量,使总蛋白含量一致进行 SDS-PAGE^[15]电泳检测 GabR 蛋白的表达量。

1.4 凝胶阻滞

以 Bt HD73为模板,用带有 FAM (羧基荧光素)标记的引物 *gabTp*-FAMF/*gabTp*-FAMR 扩增 *gabT* 基因启动子(PgabT)。纯化后的启动子在体外与可溶性 GabR 粗蛋白结合。15 μL 反应体系中:10×结合反应液1.5 μL, Poly (dI: dC) 500 mg/L, GabR 蛋白1.5 μL, 双蒸水补足混匀,室温静置反应 20 min。然后加入1 μL 带有 FAM 标记的 PgabT,混匀,室温静置反应20 min。反应产物在160 V 电压,4 °C 条件下进行(5%)非变性胶检测。用荧光凝胶成像系统(富士公司 FLA Imager FLA-5100)对非变性胶进行扫描。扫描条件为: Laser: 473 nm, 电压: 900 V, Filter: 526-000/01。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pHT315-8E-gabR 的构建

重组载体构建过程如图 1 所示,根据 Bt HD73 菌株中的 *gabR* 基因的 DNA 序列设计一对引物 *gabR*-F/*gabR*-R,以 Bt HD73 菌株基因组 DNA 为模板扩增 *gabR* 全长基因(1 365 bp)。PCR 产物纯化后经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切处理后插入到载体 pHT315-8E21b 的相应酶切位点之间得到重组质粒,重组质粒经 *Bam*H I 单酶切鉴定,得到约 9.4 kb 的条带(图 2,泳道 2);经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定,得到约 8.1 kb 的载

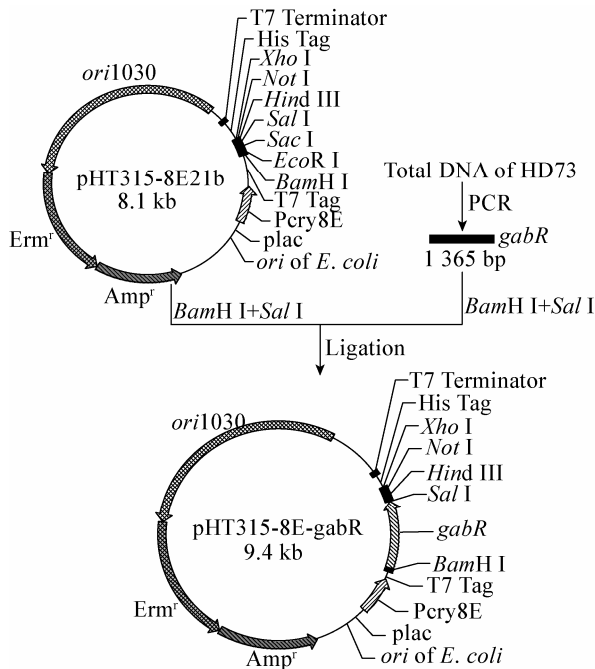


图 1 重组表达载体 pHT315-8E-gabR 构建流程图
Figure 1 Construction of recombinant expression vector pHT315-8E-gabR

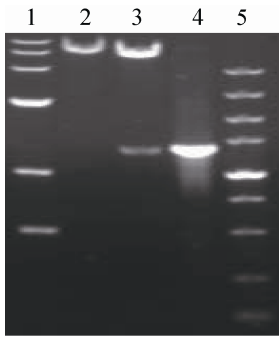


图 2 重组质粒 pHT315-8E-gabR 的酶切鉴定及 PCR 检测
Figure 2 Restriction analysis and PCR screening of recombinant plasmid pHT315-8E-gabR
注: 1: Wide range marker (TaKaRa, 中国); 2: *BamH* I 单酶切 pHT315-8E-gabR; 3: *BamH* I+*Sal* I 双酶切 pHT315-8E-gabR; 4: *gabR* PCR 产物; 5: DL5000 marker (TaKaRa, 中国).
Note: 1: Wide range marker (TaKaRa, China); 2: pHT315-8E-gabR/*BamH* I; 3: pHT315-8E-gabR/*BamH* I+*Sal* I; 4: *gabR* PCR product; 5: DL5000 marker (TaKaRa, China).

体条带和 1.3 kb 的插入片段(图 2, 泳道 3), 该小片段与 PCR 鉴定结果一致(图 2, 泳道 4), 证明得到了正确的重组子, 将其命名为 pHT315-8E-*gabR*。将重组质粒在 *E. coli* ET12567 中去甲基化后, 电击转化到 HD73⁻无晶体突变株, 所得菌株命名为 HD-8E-*gabR*。

2.2 HD-8E-*gabR* 菌株表达 GabR 蛋白的能力分析

记 T₀期为菌体对数生长期结束的时间, T_n 为 T₀后第 n 小时。SSM 培养基中, 分别在 T₄、T₈、T₁₂、T₁₆、T₂₀、T₂₄取样, 以 T₁₂的含有空载体的 HD⁻-8E 菌株为对照(CK); LB 培养基中, 分别在 T₂₀、T₂₄、T₂₈、T₃₂、T₃₆取样, 以 T₂₀的 HD⁻-8E 菌株为对照(CK)。由 SDS-PAGE 分析(图3)可知, 与 HD⁻-8E 对照菌株相比, HD-8E-*gabR* 菌株在 SSM 培养基和营养更为丰富的 LB 培养基中, 均可以表达大小为 55.6 kD 的 GabR 蛋白, 且表达量较稳定。表明 *cry8E* 启动子指导的穿梭表达载体 pHT315-8E21b 能够在 Bt 中稳定表达非晶体蛋白 GabR。

2.3 GabR 蛋白的可溶性表达

收集 SSM 培养基中培养的 HD-8E-*gabR* 菌体, 用 Tris-HCl 处理, 超声破碎后低温离心, 分别对上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析(图 4A), 结果表明 HD-8E-*gabR* 菌株表达的 GabR 蛋白主要以不可溶形式存在于沉淀中。为了得到可溶性蛋白, 以碱裂解的方法来增加 GabR 蛋白的溶解性。将 SSM 培养基中收集的 HD-8E-*gabR* 菌体用适量的 50 mmol/L (pH 11.0) Na₂CO₃ 重悬, 超声破碎。破碎液置于 4 °C 过夜, 低温离心, 分别收集细胞沉淀和上清液。SDS-PAGE (图 4B)分析表明一部分 GabR 蛋白以不可溶蛋白形式存在于沉淀中(图 4B, 泳道 2), 另一部分 GabR 蛋白以可溶蛋白形式存在于上清液中(图 4B, 泳道 3), 且可溶性蛋白量相对用 Tris-HCl 处理的方法有所增加。说明用碱裂解的方法可以提高 GabR 蛋白在 Bt 系统中的溶解性。

2.4 GabR 蛋白与 *gabT* 启动子的结合

Bt *gab* 基因簇中 *gabT* 基因编码琥珀酸半醛脱

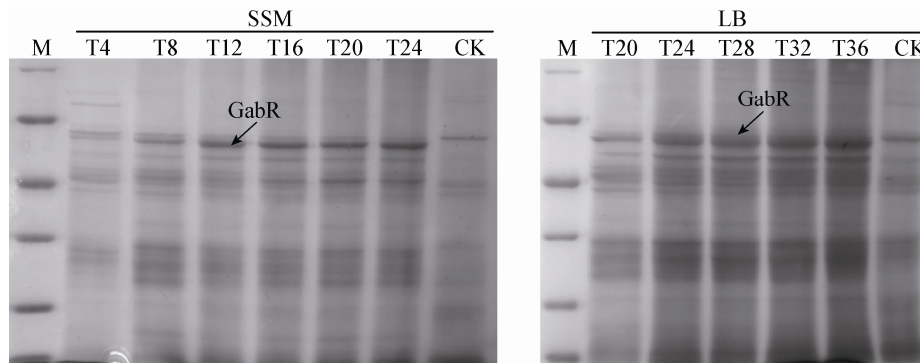


图3 HD-8E-gabR 菌株在不同培养基中 GabR 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of GabR protein of HD-8E-gabR strain in different culture medium

注: M: Unstained protein molecular weight marker (Thermo, 中国); T0: 菌体对数生长期结束的时间, Tn: T0 后第 n 小时。

Note: M: Unstained protein molecular weight marker (Thermo, China); T0: The end of the exponential phase, Tn: n hours after the T0.

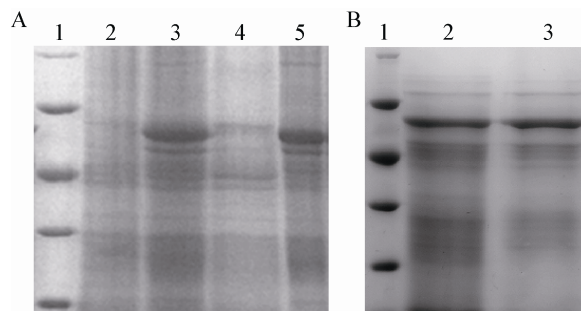


图4 GabR 蛋白可溶性分析

Figure 4 Solubility of GabR protein

注: A: 未经碱裂解. 1: Unstained protein molecular weight marker (Thermo, 中国); 2: HD⁻8E; 3: HD-8E-gabR; 4: HD-8E-gabR 菌株中的可溶性蛋白; HD-8E-gabR 菌株中的不可溶性蛋白. B: 经碱裂解. 1: Unstained protein molecular weight marker (Thermo, 中国); 2: HD-8E-gabR 菌株中的不可溶性蛋白; 3: HD-8E-gabR 菌株中的可溶性蛋白。

Note: A: Without alkaline lysis. 1: Unstained protein molecular weight marker (Thermo, China); 2: HD⁻8E; 3: HD-8E-gabR; 4: Soluble protein of HD-8E-gabR; 5: Insoluble protein of HD-8E-gabR. B: Alkaline lysis. 1: Unstained protein molecular weight marker (Thermo, China); 2: Insoluble protein of HD-8E-gabR; 3: Soluble protein of HD-8E-gabR.

氢酶, 受 GabR 蛋白正调控^[10]。为了验证 HD-8E-gabR 菌株中表达的 GabR 具有功能, 进行了碱处理的可溶性 GabR 粗蛋白与荧光标记的 P_{gabT} 的结合实验。FAM 荧光扫描结果如图 5 所示, 随着 GabR 蛋白浓度的增加, P_{gabT} 条带迁移发生明显的滞后(图 5, Lane 2-5); 加入 12 倍浓度的非标记

P_{gabT}, 明显和标记的 P_{gabT} 发生竞争结合(图 5, Lane 6)。用不调控 *gabT* 的芽胞母细胞基因表达的调控蛋白 GerE^[16]作为对照, 与标记的 P_{gabT} 作用, 未见结合条带(图 5, Lane 7); 用不受 GabR 调控的编码芽胞衣蛋白的 *cotB* 基因启动子(P_{cotB}) (受 SigmaK 和 GerE 调控^[17])作为对照, 与 GabR 蛋白作用, 未见结合条带(图 5, Lane 8)。以上结果表明 GabR 蛋白与 *gabT* 启动子发生结合作用, 这与已经报道的

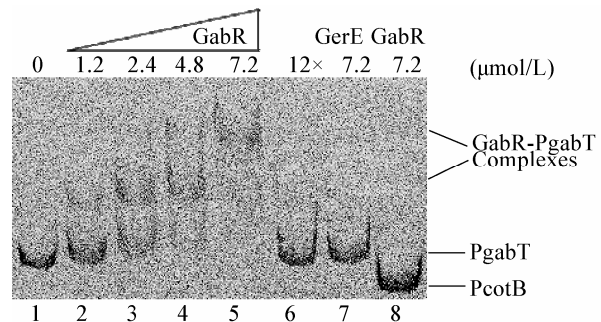


图5 GabR 蛋白与 *gabT* 启动子的结合

Figure 5 GabR protein binding to the promoter of *gabT*

注: 1-5: 标记的 P_{gabT} 与不同浓度的 GabR (0, 1.2, 2.4, 4.8, 7.2 μmol/L)作用; 6: 标记的 P_{gabT} 以及 12 倍浓度的非标记 P_{gabT} 与 7.2 μmol/L GabR 作用; 7: 标记的 P_{gabT} 与 7.2 μmol/L GerE 作用; 8: 标记的 P_{cotB} 与 7.2 μmol/L GabR 作用。

Note: 1-5: The labeled P_{gabT} interacted with different concentrations of GabR (0, 1.2, 2.4, 4.8, 7.2 μmol/L); 6: The labeled P_{gabT} and 12-fold concentration of unlabeled P_{gabT} interacted with 7.2 μmol/L GabR; 7: The labeled P_{gabT} interacted with 7.2 μmol/L GerE; 8: The labeled P_{cotB} interacted with 7.2 μmol/L GabR.

GabR 蛋白的功能一致^[18], 表明通过 Bt *cry8E* 启动子指导并在 Bt 中表达的 GabR 蛋白具有功能。

3 讨论

苏云金芽胞杆菌 *gab* 基因簇受 σ^L 因子控制, 其转录需要转录激活因子 GabR 蛋白的激活。当 σ^{54} -RNA 聚合酶与 *gabT* 启动子的-12/24 区结合形成闭合的复合物时, 低水平 GabR 蛋白以双聚体非活性状态和 *gabT* 基因 ATG 上游的-60 到-130 区的 DNA 序列结合^[18], 当 GabR 蛋白达到一定浓度时形成活化的六聚体与闭合的复合物中 σ^{54} 作用, 同时在核苷酸水解提供能量的情况下, 促使闭合的复合物异构化形成开放的结构从而激活转录^[19]。因此我们发现凝胶阻滞试验中有两条 GabR-PgabT 结合带, 可能是两种状态的 GabR 蛋白结合 DNA 的结果。

通常情况下利用宿主细胞过表达重组蛋白时, 因蛋白表达量过高, 合成速度太快, 以至于没有足够的时间进行折叠, 二硫键不能正确的配对, 或是过多的蛋白间的非特异性结合, 蛋白质无法达到足够的溶解度, 从而形成大量包涵体。利用尿素、Sarkosyl、盐酸胍等强变性剂对包涵体变性常会造成重组蛋白质被彻底变性, 使后续的蛋白质复性处理效率降低。本研究表达的 GabR 蛋白的等电点较高(pI=6.11), 当 pH 与 pI 差距越大时, 蛋白质分子颗粒在溶液中带电荷数越多, 加强了蛋白质链之间的相互排斥作用以及蛋白质与水分子的相互作用, 其颗粒就不易碰撞、凝聚而产生沉淀。因此用 pH 11.0 的 Na_2CO_3 替代 pH 8.0 的 Tris-HCl 能够增加蛋白的可溶性, 且这种方法得到的 GabR 蛋白经凝胶阻滞试验证明依旧具有生物活性。这种提高溶解液 pH 来增加蛋白溶解性的方法在研究杀虫晶体蛋白的溶解性中常使用^[20]。

苏云金芽胞杆菌与其它芽胞杆菌的最大区别就是在芽胞形成时还产生具有杀虫活性的伴胞晶体, 其产量可达发酵产物的 25% 以上。本研究首次发现 Bt *cry8E* 启动子指导的表达载体能够在 Bt 中正确表达具有功能的非晶体蛋白 GabR, 并且通过碱裂解的方法可以得到较多的具有功能的可溶性蛋白, 为研究 *gab* 基因簇的表达调控分子机制奠定了基础, 同时为开发 Bt 表达系统表达外源基因

提供有价值的遗传材料和依据。

参考文献

- [1] Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(3): 283-300.
- [2] Arantes O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*[J]. Gene, 1991, 108(1): 115-119.
- [3] 郑文, 叶伟星, 彭东海, 等. 基于 *cry1Ac* 表达调控元件的苏云金芽胞杆菌表达载体构建[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(2): 400-405.
- [4] Liu X, Peng D, Luo Y, et al. Construction of an *Escherichia coli* to *Bacillus thuringiensis* shuttle vector for large DNA fragments[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(4): 765-772.
- [5] 宋福平. 苏云金芽胞杆菌特异性 *cry* 基因的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2001.
- [6] Wang G, Zhang J, Song FP, et al. Engineered *Bacillus thuringiensis* GO33A with broad insecticidal activity against lepidopteran and coleopteran pests[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5): 924-930.
- [7] 杜立新. 苏云金芽胞杆菌 *cry8E* 基因转录调控机制研究[D]. 保定: 河北农业大学博士学位论文, 2011.
- [8] Li CR, Du LX, Peng Q, et al. Construction of high-level expression vector for *Bacillus thuringiensis*[J]. Microbiology China, 2013, 40(2): 350-361.
- [9] Aronson JN, Borris DP, Doerner JF, et al. Gamma-aminobutyric acid pathway and modified tricarboxylic acid cycle activity during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1975, 30(3): 489-492.
- [10] Zhu L, Peng Q, Song FP, et al. Structure and regulation of the *gab* gene cluster, involved in the gamma-aminobutyric acid shunt, are controlled by a sigma54 factor in *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(1): 346-355.
- [11] Schaeffer P, Millet J, Aubert JP. Catabolic repression of bacterial sporulation[J]. The Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1965, 54(3): 704-711.
- [12] González J, Dulmage HT, Carlton BC. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*[J]. Plasmid, 1981, 5(3): 351-365.
- [13] Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996: 16-69.
- [14] Peng D, Luo Y, Guo S, et al. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(6): 1849-1858.
- [15] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 1999: 334-338.
- [16] Ducros VM, Lewis RJ, Verma CS, et al. Crystal structure of GerE, the ultimate transcriptional regulator of spore formation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 306(4): 759-771.
- [17] Zilhao R, Serrano M, Isticato R, et al. Interactions among CotB, CotG, and CotH during assembly of the *Bacillus*

subtilis spore coat[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4): 1110-1119.

[18] 韩丽丽. 苏云金芽胞杆菌 *gab* 基因簇表达与调控的研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士后研究报告, 2012.

[19] Rappas M, Bose D, Zhang X. Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking sigma54-dependent gene transcription[J].

Current Opinion in Structural Biology, 2007, 17(1): 110-116.

[20] Peng D, Wang F, Li N, et al. Single cysteine substitution in *Bacillus thuringiensis* Cry7Ba1 improves the crystal solubility and produces toxicity to *Plutella xylostella* larvae[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(10): 2820-2831.



2014 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第五届全国微生物基因组及组合生物学学术研讨会	中国微生物学会	5 月	180	湖北武汉	周萍 027-87287254
2	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会暨中国畜牧兽医学会生物制品学分会学术大会	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	5 月	300	辽宁沈阳	丁家波
3	第四届全国人畜共患病学术研讨会	中国微生物学会等	5 月	300	吉林长春	王旭 010-64807200
4	第五届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6 月	300	山东济南	吕向征 010-85158365
5	昆虫与微生物联合转化废弃物机制及资源化利用	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	6 月	120	湖北武汉	张吉斌 027-87287702-8206
6	第五届全国农业微生物研究及产业化研讨会暨第十四届全国杀虫微生物学学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7 月	200	云南昆明	邹成钢 0871-5031092
7	2014 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	8 月	700	黑龙江哈尔滨	杨海花 王旭 010-64807200
8	第五届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9 月	400	四川成都	刘辉
9	病原真菌与宿主相互作用研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9 月	100	江苏常州	卫风莲
10	第十二届全国土壤微生物学术讨论会暨第五届全国微生物肥料生产技术研究研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	9 月	260	广东广州	沈德龙 马鸣超 010-82108702, 82106208
11	第四届北京中关村生物应急与临床 POCT 技术创新论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	10 月	300	北京	肖瑞峰 010-61271105
12	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会第三届学术研讨会	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	待定	100	待定	贾晓娟
13	2014 年全国微生物毒素与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10 月	300	浙江杭州	李会
14	第二届微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	待定	200	山东	翟磊
15	中日韩国国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	11 月	200	韩国济州	欧阳浩森 010-64807420
16	第十七次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	500	四川成都	蒋建东 025-84396314
17	第二届中国放线菌生物学与产业化大会	中国微生物学会分子微生物学及生物工程专业委员会	11 月	150	广东广州	张长生 020-89023105
18	第六届微生物资源学术暨微生物资源平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	11 月	300	福建厦门	姜瑞波 010-82108636