

研究报告

苏云金芽胞杆菌 Sigma K 在大肠杆菌中的表达与纯化

杨敏¹ 彭琦¹ 黄闽忠^{1,2} 考桂伟¹ 张杰¹ 宋福平^{1*}

(1. 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)

(2. 东北农业大学生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】在大肠杆菌中表达纯化苏云金芽胞杆菌 HD73 的转录调控因子 Sigma K (σ^K)。【方法】PCR 扩增出苏云金芽胞杆菌 HD73 中 *sigK* 基因的 ORF (Open reading frame) 装载到带有 His 标签的表达载体 pET21b 上, 转入到表达菌株 BL21(DE3) 中获得重组菌株 BL21(pETsigK), 通过 SDS-PAGE、镍柱亲和纯化、阴离子交换纯化和凝胶迁移实验(EMSA)等方法对 Sigma K 蛋白进行提取、纯化和生物活性分析。【结果】正确表达出大小约为 27 kD 的 His-Sigma K 蛋白, 并获得了纯化的蛋白。EMSA 结果表明纯化的 His-Sigma K 蛋白可以与受其控制的 *cryIAC* 基因启动子结合。【结论】表达和纯化了 His-Sigma K 蛋白, His-Sigma K 具有与受其控制的启动子结合的功能。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, Sigma K 蛋白, 生物活性, 转录调控

Expression and purification of *Bacillus thuringiensis* Sigma K in *Escherichia coli*

YANG Min¹ PENG Qi¹ HUANG Min-Zhong^{1,2} KAO Gui-Wei¹ ZHANG Jie¹
SONG Fu-Ping^{1*}

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

(2. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] To express and purify the regulator protein Sigma K (σ^K) from *Bacillus thuringiensis* HD73 in *Escherichia coli*. [Methods] The ORF (open reading frame) of the *sigK* gene was amplified by PCR from Bt strain HD73, and then cloned into the vector pET21b to generate pETsigK. The pETsigK was transformed into BL21(DE3). The SDS-PAGE, nickel column affinity purification, Q-Sepharose fast flow column purification and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments were carried out to analyze the purity and binding activity of His-Sigma K with *cryIAC* gene controlled by Sigma K *in vitro*. [Results] The 27 kD His-Sigma K was expressed. EMSA results showed that the His-Sigma K could bind to the promoter of *cryIAC* gene, which is controlled by

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270111, 31300085)

*Corresponding author: Tel: 86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

Received: March 10, 2015; **Accepted:** May 20, 2015; **Published online** (www.cnki.net): September 28, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270111, 31300085)

*通讯作者: Tel: 86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

收稿日期: 2015-03-10; **接受日期:** 2015-05-20; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-09-28

Sigma K. **[Conclusion]** The His-Sigma K protein was successfully expressed and purified. The purified His-Sigma K could bind to Sigma K-controlled promoter.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Sigma K protein, Biological activity, Transcriptional regulation

Sigma 因子能够识别基因的启动子与 RNA 聚合酶核心酶构成全酶控制基因的转录, 在细菌生长、发育和对不同环境的适应中发挥重要作用。芽胞杆菌的模式菌株——枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*, Bs)在芽胞形成过程中通过顺序激活 6 个不同的 σ 因子即 σ^A (营养生长期)和 σ^H 、 σ^F 、 σ^E 、 σ^G 、 σ^K (芽胞形成期), 识别与芽胞形成有关的基因启动子, 使它们在时间和空间上有序而准确地表达^[1]。在营养生长期, 基因的转录依赖于由 σ^A 组成的 RNA 聚合酶全酶, σ^H 在隔膜形成前有较高的活性, 当细胞区室化完成后, σ^F 和 σ^E 分别在前芽胞室和母细胞中起始基因的转录, 随后被 σ^G 和 σ^K 所代替^[2]。 σ^K 是芽胞晚期母细胞中重要的转录调控因子, σ^K 在枯草芽胞杆菌中能控制 71 个转录单元中的 111 个基因的转录^[3], 如 DNA 结合蛋白 GerE 的编码基因 *gerE*^[4-5]、与 DPA 合成积累有关的基因 *spoVA* 和 *spoVK*^[1,6], 芽胞成熟所需的 *spoVD* 基因以及 14 个与芽胞衣蛋白的合成和积累相关的基因^[4,7-11]。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)属于蜡样芽胞杆菌群(*B. cereus* group), 是广泛分布于土壤中的革兰氏阳性细菌, 它区别于其他芽胞杆菌的一个重要特点是在产生芽胞的同时会产生由杀虫蛋白组成的伴胞晶体(Parasporal crystal)^[12]。因其对靶标生物高效、对环境安全友好等特点成为目前应用最广泛的杀虫微生物。在苏云金芽胞杆菌芽胞形成的同时, *cry* 基因编码的杀虫晶体蛋白也在母细胞中产生和积累。*cry* 基因分为两种类型: 一类是依赖芽胞的 *cry* 基因; 一类是不依赖芽胞形成的 *cry* 基因。目前已知的 *cry* 基因大部分是依赖芽胞形成的, 其中受 σ^K 控制的 *cry* 基因主要有 *cryIA*、*cryID*、*cry4A*、*cry4B*、*cry11A* 和 *cry18A* 等^[13-14], 但是 σ^K 控制的其它基因特别是与芽胞外壁形成和母细胞裂解相关的基因仍不清楚。因此, 研究 σ^K 因子控制

的基因具有重要的意义。

本研究完成了 Sigma K 蛋白的表达纯化, 并通过与 *cryIAC* 基因启动子体外作用, 验证了结合功能, 为研究 Sigma K 控制的基因谱和芽胞形成晚期的调控网络奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 实验所用菌株与质粒见表 1。大肠杆菌(*Escherichia coli*)在 LB 培养基^[15](g/L, 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, pH 7.2) 37 °C、220 r/min 条件下培养; 苏云金芽胞杆菌在 SSM^[16]培养基中 30 °C、220 r/min 培养。氨苄青霉素(Amp): 100 mg/L。

1.1.2 主要试剂及仪器: 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PrimerStar HS DNA 聚合酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品; DNA Marker、2×*Taq* Mix 等购自北京博迈德科技发展有限公司; 质粒提取及 DNA 清洁试剂盒购于美国 Axygen 公司。CP750 超声波细胞破碎仪购于美国 Cole-Parmer 公司; 蛋白 Low Range Marker 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 镍亲和层析柱填料(Chelating sepharose fast flow)购自美国 GE 公司; Poly (dI:dC)(dI:dC) [Poly (ethylene glycol) di-(4-hydroxyphenyl)diphenylphosphine] 购自上海 Sigma 公司; 营养肉汤购于北京奥博星生物技术有限责任公司; Gel Shift Assay Systems 为 Promega 公司产品。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。

1.2 Sigma K 蛋白的克隆表达

1.2.1 表达引物设计与 PCR 扩增: 根据 GenBank 中 Bt HD73 菌株(GenBank 登录号: CP004069)的 *sigK* (HD73_4645)基因序列及 pET21b 质粒的酶切位点设计出扩增 *sigK* 基因 ORF 的引物对 *sigK-F*

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characterization	来源 Resource
<i>E. coli</i> TG1	$\Delta(lac-proAB) supE thi hsd-5 (F' traD36 proA^+ proB^+ lacI^f lacZ\Delta M15)$	This lab
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F^- , <i>dcm</i> , <i>ompT hsdS(rB-mB-)</i> , <i>gal</i> , $\lambda(DE3)$	[17]
BL21(pETsigK)	BL21(DE3) with pETsigK plasmid	This study
BLpET	BL21 strain carrying pET21b	This lab
HD73	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain carrying <i>cry1Ac</i> gene	This lab
pET21b	Expressional vector, Amp ^r , 5.4 kb	This lab
pETsigK	pET21b containing <i>sigK</i> gene, Amp ^r	This study

(5'-CGGATCCGTTGAGTCTATTCGCCGCAATTG G-3')和 *sigK*-R (5'-GTCGACCTCTTTCGCTTTTTT CTCTTCTC-3'), 并以 HD73 基因组为模板扩增出编码转录调控因子 Sigma K 的 *sigK* 基因的 ORF 区。20 μ L 体系: PrimerStar HS DNA 聚合酶(2 \times) 10 μ L, 引物 *sigK*-F/*sigK*-R (10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板(约 280 mg/L) 1 μ L, 用超纯水补至 20 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。引物合成由上海生工生物工程公司完成。

1.2.2 PCR 产物和质粒的酶切与连接: 用质粒提取试剂盒从菌株 BLpET 中提取质粒 pET21b, 分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 对 pET21b 和纯化后的 PCR 产物进行双酶切。酶切体系如下: 质粒和目的 DNA 片段分别为 15 μ L (约 100 mg/L), *Bam*H I 和 *Sal* I 各 2.5 μ L, 10 \times Buffer T 15 μ L, 补加去离子水至总体积 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h。酶切产物用 PCR 产物纯化试剂盒回收。

酶切纯化后的 pET21b 与 PCR 产物进行连接: PCR 酶切纯化产物 7 μ L 和 pET21b 酶切纯化产物 3 μ L (100 ng), Solution I 10 μ L, 16 $^{\circ}$ C 连接 4 h。

1.2.3 连接产物的转化: 取 100 μ L TG1 感受态细胞加入 10 μ L 连接体系中, 冰浴 30 min 后于 42 $^{\circ}$ C 热冲击 90 s 立即放在冰上, 在超净工作台中加入 800 μ L 液态 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养细菌 1 h, 取 200 μ L 涂布于含氨苄青霉素的 LB 培养基平

板上, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养至出现单克隆。

1.2.4 重组克隆的鉴定: 挑取重组单克隆于 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μ L 无菌去离子水, 100 $^{\circ}$ C 作用 10 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 用上清作模板, 以 *sigK*-F/*sigK*-R 为引物对 PCR 扩增鉴定, 阳性克隆可见大小约为 714 bp 的条带。将 PCR 鉴定阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序, 测序引物为 pET21b 通用引物 T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')和 T7t (5'-GC TAGTTATTGCTCAGCGG-3'), 提取克隆片段无突变的阳性克隆的质粒同 1.2.3 方法转入 BL21(DE3) 中得到重组菌株 BL21(pETsigK)。

1.2.5 Sigma K 蛋白的表达: 将得到的 BL21 (pETsigK)菌种接种活化于 5 mL LB 培养基的试管中, 菌液按 1%转接于含 300 mL 有 100 mg/L 氨苄青霉素的新鲜 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 $OD_{600}=0.5-0.6$, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 18 $^{\circ}$ C、150 r/min 诱导 12 h。8 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 用 30 mL pH 8.0 的 50 mmol Tris-HCl 缓冲液悬浮菌体, 将悬浮液放于冰上用超声破碎仪进行超声破碎。用 1/2 探头在 600 W 功率下破碎 6 min (超声功率: 40%, 超声: 3 s, 暂停: 5 s)。12 000 r/min 离心 10 min 分离上清和沉淀进行 SDS-PAGE (12%)电泳检测, 鉴定该诱导条件下 Sigma K 的表达情况。

1.2.6 His-Sigma K 蛋白的纯化: 取 2 mL 镍亲和层

析柱填料装入层析柱,用5倍柱体积的超纯水清洗层析柱;加入2倍柱体积的0.1 mol/L NiSO₄,用移液器吸打混匀,室温静置20 min,再用3-5倍柱体积的超纯水洗柱子;加入5倍柱体积的平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)平衡柱子,将Sigma K蛋白上清液上样,接流穿的液体;待样品上完后,用5倍柱体积的平衡缓冲液洗去杂蛋白;用5倍柱体积的洗脱缓冲液1(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 0.5 mol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑)洗脱下目的蛋白并收集(每1 mL收集1管);用5倍柱体积的洗脱缓冲液2(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 0.5 mol/L NaCl, 1 mol/L 咪唑)洗脱下杂蛋白;加入各种清洗缓冲液(2 mol/L NaCl, 1 mol/L NaCl, 70%乙醇)进行清洗;加入再生缓冲液(0.5 mol/L NaCl, 0.05 mol/L EDTA, 0.5 mol/L NaCl)将层析柱再生;SDS-PAGE检测洗脱下来的蛋白样品。对纯化的蛋白用pH 8.0 Tris-HCl进行透析。

1.2.7 His-Sigma K蛋白的阴离子交换层析纯化:用AKTA avant 25蛋白液相分析系统对经过镍柱亲和层析纯化并透析得到的Sigma K蛋白进行阴离子交换层析纯化,将pH 8.0 Tris-HCl缓冲液用0.22 μm滤膜抽滤,用3倍柱体积的20%乙醇和5倍体积的水冲洗Q-Sepharose Fast Flow column,再用8倍体积的pH 8.0 Tris-HCl平衡柱子,待基线平衡后以1 mL/min的速度上样,上样结束后用2个柱体积的平衡缓冲液冲洗柱子,冲洗掉未结合的蛋白;最后用NaCl(0-1 mol/L)洗脱缓冲液线性洗脱,收集吸光值在260-280 nm之间的蛋白,SDS-PAGE检测纯度。

1.3 凝胶迁移实验

以苏云金芽胞杆菌HD73为模板,用带有FAM(羧基荧光素)标记的引物*cry1Ac*-FAMf(5'-GGAATGCATTCATTGATGTTTCGG-3')和*cry1Ac*-FAMr(5'-CGGAATACAAACCCTTAATGC-3')扩增*cry1Ac*基因启动子P*cry1Ac*。纯化后的启动子在体外与纯化的Sigma K蛋白结合。20 μL反应体系中:

10×结合反应液2 μL, Poly (dI:dC) 2 μL (500 mg/L), Sigma K蛋白2-14 μL, 双蒸水补足混匀,室温静置反应20 min。然后加入2 μL带有FAM标记的P*cry1Ac*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 目的片段的克隆和鉴定

*sigK*基因的ORF区全长为714 bp,利用PCR的方法扩增,扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定,在500-750 bp处有一条与目的片段大小相符的条带(图1)。提取pET*sigK*重组质粒进行酶切鉴定,结果出现与预期结果相同的两条带(图1)。重组质粒测序显示插入的*sigK*基因片段与GenBank(登录号:CP004069)中报道的序列大小一致,二者的基因一致性为100%。

2.2 Sigma K蛋白的表达

测序正确的阳性克隆菌株进行蛋白表达。重组菌株BL21(pET*sigK*)经IPTG诱导2 h后,用超声破

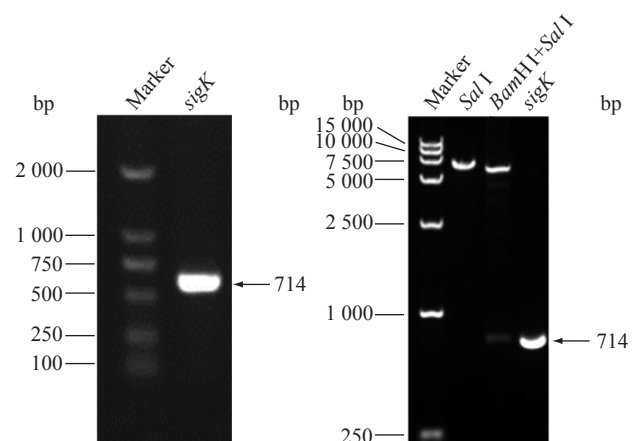


图1 *sigK*基因的PCR扩增和重组质粒pET21b-*sigK*的酶切鉴定

Figure 1 Electrophoresis results of PCR amplification of *sigK* fragment and restriction analysis of recombinant plasmid pET21b-*sigK*

碎法提取 Sigma K 蛋白。对菌体裂解物进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示重组菌株菌液的可溶性和不可溶性组分中均在相对分子质量 29 kD 处出现特异条带, 与预期的 His-Sigma K 融合蛋白理论值相符(融合端约 2 kD), 且可溶性蛋白表达量高于不可溶性蛋白。而空载体转化的菌株均无特异性条带出现(图 2)。

2.3 Sigma K 蛋白的纯化

将离心收集的 His-Sigma K 粗蛋白上清通过 Ni^{2+} 螯合琼脂糖亲和纯化后, 得到的 His-Sigma K 蛋白经紫外分光光度计测得浓度约为 0.5 g/L。用 50 mmol 的 pH 8.0 Tris-HCl 透析后得到 His-Sigma K 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳(图 3A)。对透析后的蛋白通过阴离子交换层析纯化, 并用 1 mol/L NaCl 进行线性洗脱, SDS-PAGE 结果可以看出所得蛋白纯度较高, 分子量大小正确(图 3B)。

2.4 Sigma K 蛋白的结合活性

利用 FAM 标记的引物对 *cryIAC*-FAMf/*cryIAC*-FAMr 扩增 *cryIAC* ATG 上游 236 bp 处和 ATG 下游 32 bp 之间 268 bp 的片段与纯化的 His-Sigma K 蛋白体外结合。如图 4 所示, 凝胶底部的条带为带标记的自由 DNA, 自由 DNA 上层的带为 DNA 与蛋白结合的带, 随着蛋白浓度的增加,

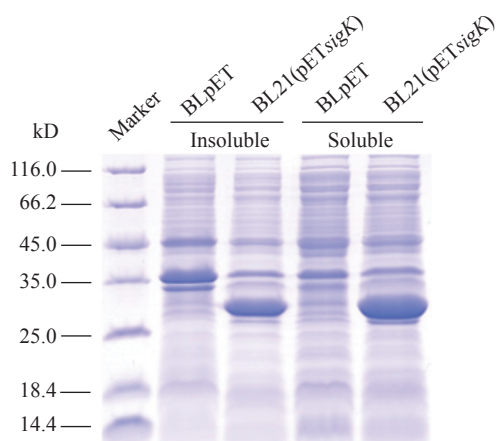


图 2 His-Sigma K 蛋白的表达

Figure 2 Expression of His-Sigma K protein

底部自由 DNA 条带浓度越来越低, 上层带浓度逐渐升高, 说明 His-Sigma K 蛋白可以 *cryIAC* 启动子结合。

3 结论与讨论

利用大肠杆菌的 BL21(DE3) 表达系统成功表达并纯化出了苏云金芽胞杆菌 HD73 中的 Sigma K 蛋

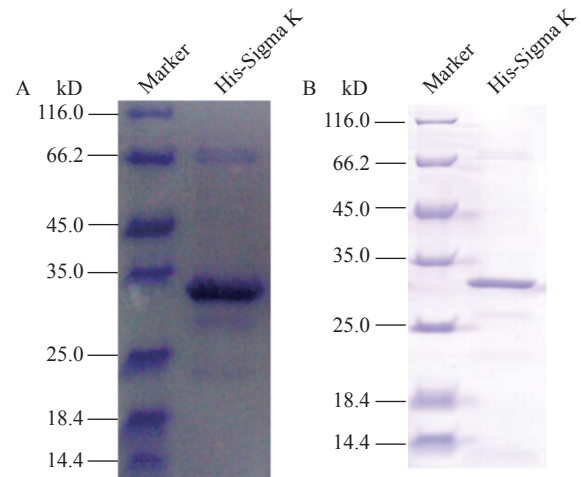


图 3 镍柱纯化的 His-Sigma K 蛋白(A)和阴离子交换柱纯化 His-Sigma K 蛋白(B)

Figure 3 His-Sigma K protein purification by nickel column (A) and His-Sigma K protein purification by Q-Sepharose fast flow column (B)

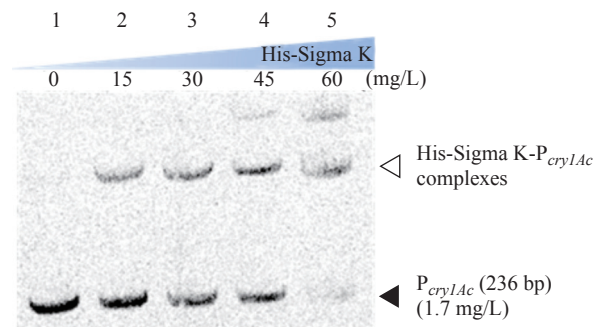


图 4 Sigma K 蛋白与 *cryIAC* 启动子的结合

Figure 4 Sigma K protein binding to the promoter of *cryIAC*

注: 凝胶阻滞实验利用标记的 P_{cryIAC} 启动子与浓度逐渐升高的 His-Sigma K 蛋白结合. 1: 不加 His-Sigma K 蛋白; 2-5: His-Sigma K 蛋白的浓度分别为 15、30、45、60 mg/L。

Note: EMSA using labeled P_{cryIAC} and increasing concentrations of His-Sigma K. 1: Lacked His-Sigma K; 2-5: Contained 15, 30, 45, 60 mg/L His-Sigma K.

白, 获得了相对分子质量与理论值一致的较纯的目的蛋白。1990年 Chang 等表达纯化出了 Bs 中的 σ^A 蛋白^[18], 1991年 Popham 等建立了从鼠伤寒沙门氏菌中提取纯化 σ^{54} 的方法, 并利用纯化的 σ^{54} 对其功能特点进行研究^[19]。2003年 Imamura 等为研究 σ 因子在能进行光合作用的蓝细菌中的功能, 从大肠杆菌中纯化出了 9 种 σ 因子: σ^A 、 σ^B 、 σ^C 、 σ^D 、 σ^E 、 σ^F 、 σ^G 、 σ^H 、 σ^{I20} 。1990年 Lu 等对枯草芽胞杆菌中 Pro- σ^K 蛋白进行了表达纯化以及相关的研究^[21], 但到目前为止还没有苏云金芽胞杆菌中 Sigma K 蛋白表达纯化的相关研究报道。根据 FastN 分析发现在核苷酸水平上 Bt 和 Bs 中 σ^K 的一致性为 65%, 但氨基酸水平上两者有较高的一致性为 86%^[22]。

依赖于芽胞形成的 *cryIA* 基因启动子是目前研究比较清楚的 *cry* 基因启动子, 其为重叠的双启动子, 由一个较强的 BtI 和一个较弱的 BtII 组成。两个启动子在 σ^E 和 σ^K 的协同作用下起始 *cryIA* 基因的转录^[23-25], 因此本实验利用表达纯化得到的苏云金芽胞杆菌中 Sigma K 蛋白与 *cryIAC* 启动子进行了体外结合实验, 结果证明纯化的 His-Sigma K 因子具有与启动子结合的活性。

苏云金芽胞杆菌中对 Sigma K 因子控制的基因研究甚少, 目前已明确受 Sigma K 因子控制的基因有芽胞外壁基质结构基因 *exsB*^[26], 编码赖氨酸变位酶的 *kamA* 基因^[27]等。而 Bt 基因组比 *B. subtilis* 多 1 000 多个基因, 因此 Bt 中 Sigma K 因子可能控制更多、独有的基因。Sigma K 因子对芽孢晚期芽胞的成熟与释放、晶体的形成、以及母细胞裂解等细胞过程都有十分重要的作用, 利用纯化的 Sigma K 蛋白对研究其控制的基因谱并了解苏云金芽胞杆菌晚期的调控机制进而为构建工程菌, 延长晶体蛋白对害虫毒力的持效性奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis[J]. Microbiological Reviews, 1993, 57(1): 1-33
- [2] Du LX. Study on transcriptional regulation of *cry8E* gene of *Bacillus thuringiensis*[D]. Baoding: Doctoral Dissertation of Agricultural University of Hebei, 2011 (in Chinese)
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
- [3] Eichenberger P, Fujita M, Jensen ST, et al. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. PLoS Biology, 2004, 2(10): e328
 - [4] Cutting S, Panzer S, Losick R. Regulatory studies on the promoter for a gene governing synthesis and assembly of the spore coat in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Molecular Biology, 1989, 207(2): 393-404
 - [5] Zheng LB, Halberg R, Roels S, et al. Sporulation regulatory protein GerE from *Bacillus subtilis* binds to and can activate or repress transcription from promoters for mother-cell-specific genes[J]. Journal of Molecular Biology, 1992, 226(4): 1037-1050
 - [6] Daniel RA, Errington J. Cloning, DNA sequence, functional analysis and transcriptional regulation of the genes encoding dipicolinic acid synthetase required for sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Molecular Biology, 1993, 232(2): 468-483
 - [7] Foulger D, Errington J. Effects of new mutations in the *spoIIAB* gene of *Bacillus subtilis* on the regulation of σ^F and σ^G activities[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(12): 3197-3203
 - [8] Cutting S, Driks A, Schmidt R, et al. Forespore-specific transcription of a gene in the signal transduction pathway that governs Pro-sigma K processing in *Bacillus subtilis*[J]. Genes & Development, 1991, 5(3): 456-466
 - [9] Roels S, Driks A, Losick R. Characterization of *spoIVA*, a sporulation gene involved in coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(2): 575-585
 - [10] Zheng LB, Donovan WP, Fitz-James PC, et al. Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore[J]. Genes & Development, 1988, 2(8): 1047-1054
 - [11] Zheng LB, Losick R. Cascade regulation of spore coat gene expression in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 212(4): 645-660
 - [12] Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, et al. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?[J]. Trends in Microbiology, 2010, 18(5): 189-194
 - [13] Yang H. The transcriptional regulation of *cryIAC* gene in *Bacillus thuringiensis*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese)
杨慧. 苏云金芽胞杆菌 *cryIAC* 基因启动子转录调控研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2010
 - [14] Wanapaisan P, Chumsakul O, Panbangred W. Enhanced *CryIADa* production in *Bacillus thuringiensis* by driving expression from the σ^E -dependent BtI promoter[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(3): 859-871
 - [15] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 2344
 - [16] Munson RS Jr, Sasaki K. Protein D, a putative immunoglobulin D-binding protein produced by *Haemophilus influenzae*, is glycerophosphodiester phosphodiesterase[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(14): 4569-4571
 - [17] Schaeffer P, Millet J, Aubert JP. Catabolic repression of bacterial sporulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1965, 54(3): 704-711
 - [18] Chang BY, Dio RH. Overproduction, purification, and characterization of *Bacillus subtilis* RNA polymerase sigma A factor[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(6): 3257-3263
 - [19] Popham D, Keener J, Kustu S. Purification of the alternative sigma factor, sigma 54, from *Salmonella typhimurium* and characterization of sigma 54-holoenzyme[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(29): 19510-19518
 - [20] Imamura S, Yoshihara S, Nakano S, et al. Purification, characterization, and gene expression of all sigma factors of RNA polymerase in a cyanobacterium[J]. Journal of Molecular

- Biology, 2003, 325(5): 857-872
- [21] Lu S, Halberg R, Kroos L. Processing of the mother-cell sigma factor, sigma K, may depend on events occurring in the forespore during *Bacillus subtilis* development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(24): 9722-9726
- [22] Adams LF, Brown KL, Whiteley HR. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(12): 3846-3854
- [23] Komano T, Takabe S, Sakai H. Transcription of the insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis*[J]. Biotechnology Annual Review, 2000, 5: 131-154
- [24] Ibrahim MA, Griko N, Junker M, et al. *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective[J]. Bioengineered Bugs, 2010, 1(1): 31-50
- [25] Zhang JB, Schairer HU, Schnetter W, et al. *Bacillus popilliae cry18Aa* operon is transcribed by σ^E and σ^K forms of RNA polymerase from a single initiation site[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(5): 1288-1293
- [26] Qu N, Peng Q, Qiu LL, et al. Transcriptional regulation of exosporium basal layer structural gene *exsB* in *Bacillus thuringiensis* by SigmaK and GerE[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(3): 241-248 (in Chinese)
曲宁, 彭琦, 邱丽丽, 等. SigmaK 和 GerE 对芽胞外壁基质结构基因 *exsB* 的转录调控[J]. 微生物学报, 2013, 53(3): 241-248
- [27] Zhang Z, Yang M, Peng Q, et al. Transcription of the lysine-2,3-aminomutase gene in the *kam* locus of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 is controlled by both σ^{54} and σ^K factors[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(16): 2934-2943

**征订启事****欢迎订阅《微生物学通报》**

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012、2013、2014 年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014 年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助; 2015 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2016 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所 《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413