

研究报告

苏云金芽胞杆菌 LM1212 菌株 *cry* 基因启动子的活性分析程丹丹^{1,2}, 张睿彬², 江丽丽^{1,2}, 彭琦², 宋福平^{*1,2}

1 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 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综合治理全国重点实验室, 北京 100193

程丹丹, 张睿彬, 江丽丽, 彭琦, 宋福平. 苏云金芽胞杆菌 LM1212 菌株 *cry* 基因启动子的活性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 626-641.CHENG Dandan, ZHANG Ruibin, GANG Lili, PENG Qi, SONG Fuping. Activity of *cry* gene promoter of *Bacillus thuringiensis* LM1212[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 626-641.

摘要:【背景】前期发现一株具有独特分化表型的苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) LM1212, 该菌株共有 14 种杀虫基因, 组成了 10 个转录单元。利用源自菌株 LM1212 的晶体产生细胞调控因子(crystal producing cell regulator, CpcR)以及其可以激活的 *cry35-like* 基因启动子, 已在典型 Bt 菌株 HD73 中成功构建了非芽胞杀虫蛋白表达体系。【目的】比较菌株 LM1212 的不同杀虫基因启动子的转录活性, 明确可被转录因子 CpcR 激活的且转录活性较高的启动子, 以此为基础优化非芽胞杀虫蛋白表达体系。【方法】将 10 个启动子区域分别与 *lacZ* 报告基因融合构建在 pHT304-18Z 载体上, 得到了 10 个重组质粒; 然后将 *cpcR* 基因及其启动子(*P_{cpcR}-cpcR*)分别反向构建在选取的启动子区域与 *lacZ* 报告基因的上游, 得到可以表达 CpcR 且与上述构建相对应的 10 个重组质粒, 将这些重组质粒分别转入不含 CpcR 的菌株 HD73, 即获得 20 个可用于测定 β -半乳糖苷酶活性的重组菌株。通过光学显微镜观察和 SDS-PAGE 检测明确杀虫蛋白表达的情况。【结果】在菌株 HD73 中, β -半乳糖苷酶活性检测结果显示, 启动子 *P₁*、*P₃*、*P₄*、*P₅*、*P₆*、*P₇* 和 *P₈* 转录均可被转录因子 CpcR 激活, 启动子 *P₁₀* 的转录受到转录因子 CpcR 抑制。在 CpcR 存在时, *P₇*、*P₈* 启动子的转录活性相对较高。利用转录因子 CpcR 和 *P₇*、*P₈* 启动子成功表达了对草地贪夜蛾有较高杀虫活性的 Vip3Aa11 蛋白。【结论】筛选到的高转录活性的启动子可用于优化非芽胞杀虫蛋白表达体系, 从而构建新型工程菌, 为草地贪夜蛾的生物防治提供新思路。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; *cry* 基因启动子; 转录活性; 草地贪夜蛾

资助项目: 国家自然科学基金(32072499); 中国博士后科学基金(2021M693463)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072499) and the China Postdoctoral Science Foundation (2021M693463).

*Corresponding author. E-mail: fpsong@ippcaas.cn

Received: 2023-07-11; Accepted: 2023-08-14; Published online: 2023-09-20

Activity of *cry* gene promoter of *Bacillus thuringiensis* LM1212

CHENG Dandan^{1,2}, ZHANG Ruibin², GANG Lili^{1,2}, PENG Qi², SONG Fuping^{*1,2}

1 College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

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

Abstract: [Background] *Bacillus thuringiensis* (Bt) LM1212 with a unique differentiation phenotype has been identified. It carries 14 insecticidal genes, which comprise 10 transcription units. With the crystal producing cell regulator (CpcR) derived from the LM1212 strain and the *cry35-like* gene promoter activated by CpcR, the non-sporulating expression system of insecticidal protein has been successfully established in the typical Bt strain HD73. [Objective] To compare the transcriptional activities of different insecticidal gene promoters of strain LM1212, identify the promoters with high transcriptional activity and activated by the transcription factor CpcR, and optimize the non-sporulating expression system. [Methods] Ten promoter regions were respectively fused with *lacZ* reporter gene on the pHT304-18Z vector, and 10 recombinant plasmids were obtained. The *cpcR* gene and its promoter ($P_{cpcR-cpcR}$) were reversely integrated in the upstream region of each selected promoter region and the *lacZ* reporter gene, and 10 recombinant plasmids capable of expressing CpcR and corresponding to the above construction were obtained. Subsequently, these recombinant plasmids were separately transferred into the HD73 strain without CpcR, and thus 20 recombinant strains were obtained for the determination of β -galactosidase activity. The expression of insecticidal protein was determined by microscope observation and SDS-PAGE. [Results] In HD73 strain, the transcription of the promoters P_1 , P_3 , P_4 , P_5 , P_6 , P_7 , and P_8 could be activated by CpcR, while that of the promoter P_{10} was inhibited by CpcR. In the presence of CpcR, P_7 and P_8 showed high transcriptional activities. Vip3Aa11 protein with strong activity against *Spodoptera frugiperda* was successfully expressed by CpcR combined with P_7 and P_8 . [Conclusion] The screened promoter with high transcriptional activity can be used to optimize the non-sporulating expression system of insecticidal protein, so as to construct novel bacteria for the biocontrol of *S. frugiperda*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; *cry* gene promoter; transcriptional activity; *Spodoptera frugiperda*

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)是源自北美和南美的一种农业害虫, 又称为秋黏虫(fall armyworm, FAW)^[1], 其属于鳞翅目(*Lepidoptera*)、夜蛾科(*Noctuidae*)、灰翅夜蛾属(*Spodoptera*)^[2], 依据其对寄主的偏好性不同分

为了玉米型和水稻型两种类型, 玉米型喜食玉米、高粱和大型禾本科植物等^[3-4], 并且已经成为危害玉米的主要害虫。2018年12月草地贪夜蛾首次在中国云南省被发现, 并迅速蔓延至全国各地, 对我国的经济作物产量构成了严

重的威胁^[5-6]。截至 2020 年,除了新疆、青海和东北部 5 个省市未发现草地贪夜蛾踪迹外,其余各地均有报道^[7]。为了减少草地贪夜蛾带来的粮食安全问题和影响农民生产生计的问题,我国农业农村部制定了以生态控制和农业防治为基础,生物防治和理化诱控为重点,化学防治为底线的防控对策。从防治手段来看,化学防治无疑是应急防控的主要办法,但超量不合理地使用化学农药会引起农残超标、抗药性上升和害虫再增猖獗等一系列问题。生物防治作为重要的防治手段^[8-9],将有助于草地贪夜蛾的绿色与可持续治理。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是重要的革兰氏阳性生防菌,其显著的特点是在芽胞形成的同时会在同一个细胞内产生伴胞晶体,伴胞晶体主要由具有特异性杀虫活性的 Cry、Cyt 蛋白组成^[10],此外,在苏云金芽胞杆菌 AB88 营养期培养上清中发现的营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal protein, Vip) Vip3Aa,也具有比较特异性的杀虫谱^[11],因此 Bt 制剂具有杀虫特异性和环境友好性,是目前应用最广泛的微生物杀虫剂^[12]。目前用于防治草地贪夜蛾的菌株有苏云金芽胞杆菌 KN11、苏云金芽胞杆菌 G033A 等,试验结果显示,KN11 微生物杀虫剂对草地贪夜蛾(*S. frugiperda*)、美国白蛾(*Hyphantria cunea*)和斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)都有较好的杀虫活性^[13]。苏云金芽胞杆菌 G033A 制剂是国内第一个获得农药登记证的工程菌,对草地贪夜蛾的田间防效达到 85%以上^[14],2020 年 11 月该产品获批扩作登记于玉米草地贪夜蛾的防治。

菌株 LM1212 是一株具有独特表型的 Bt 菌株,该菌株可分化为 2 类细胞亚群:一类是芽胞形成细胞,一类是晶体产生细胞,即晶体和芽胞形成在不同的细胞内^[15]。前期研究在菌株

LM1212 中筛选到一个名为晶体产生细胞调控因子(crystal producing cell regulator, CpcR)的转录因子^[16]。CpcR 蛋白属于 OmpR 家族,具有两方面的功能:(1) 参与细胞分化的过程,即转录因子 CpcR 在典型的 Bt 菌株中,能够显著降低芽胞细胞的数量,并且通过调控芽胞形成过程的起始来决定细胞命运^[16];(2) 参与 *cry* 基因的表达调控,CpcR 在菌株 HD73 中能够激活菌株 LM1212 中 *cry35-like* 基因启动子的转录^[17]。因此,利用 CpcR 的这两方面功能构建了全新的杀虫蛋白表达体系——非芽胞杀虫蛋白表达体系,该体系以典型 Bt 菌株 HD73 为出发菌株,引入 CpcR 的表达及受其调控的启动子,成功在非芽胞细胞中大量表达杀虫蛋白^[17]。菌株 LM1212 含有 14 种不同的杀虫蛋白基因,具有丰富的杀虫蛋白基因启动子资源^[18],这些基因的启动子是否都受 CpcR 的调控以及它们的转录活性尚未可知。本研究筛选了受 CpcR 调控的高转录活性的杀虫基因启动子,在此基础上优化非芽胞杀虫蛋白表达体系,进一步构建防治草地贪夜蛾的新型工程菌。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

研究所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基

1/2 LB 培养基(g/L): NaCl 5.0, 蛋白胨 5.0, 酵母提取物 2.5。LB 液体培养基(g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0。芽胞形成培养基(Schaeffer's sporulation medium, SSM) (g/L): 营养肉汤 8.00, MgSO₄·7H₂O 0.25, KCl 1.00, MnCl₂·4H₂O 0.002, 调节 pH 至 7.0, 使用前加入灭菌的 CaCl₂ 和 FeSO₄, 终浓度分别为 5×10⁻⁴ mol/L 和 1×10⁻⁶ mol/L。抗生素: 红霉素(erythromycin)

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	特点 Characteristics	来源 Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> TG1	$\Delta(lac-proAB) supE thi hsd-5 (F' traD36 proA^+ proB^+ lacI^q lacZ\Delta M15)$	Laboratory stock
<i>E. coli</i> ET	$F^- dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202::Tn10 galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1$	Laboratory stock
HD73 ⁻	HD73 acrystalliferous strain	Laboratory stock
HD73	A wild-type strain containing <i>cryIAc</i> gene	Laboratory stock
LM1212	Wild-type strain	Laboratory stock
HD (P _n -18Z)	HD73 strain containing plasmid P _n -18Z	This study
HD (<i>cpcR</i> -P _n -18Z)	HD73 strain containing plasmid <i>cpcR</i> -P _n -18Z	This study
HD ⁻ (<i>cpcR</i> -1618K)	HD73 ⁻ strain containing plasmid pHT1618K and pHT304- <i>cpcR</i>	This study
HD ⁻ (<i>cpcR</i> -P ₇ - <i>vip3Aa</i>)	HD73 ⁻ strain containing plasmid P ₇ - <i>vip3AaII</i> and pHT304- <i>cpcR</i>	This study
HD ⁻ (<i>cpcR</i> -P ₈ - <i>vip3Aa</i>)	HD73 ⁻ strain containing plasmid P ₈ - <i>vip3AaII</i> and pHT304- <i>cpcR</i>	This study
Plasmids		
pHT304-18Z	Bt- <i>E. coli</i> shuttle vector harboring the promoterless <i>lacZ</i> gene	Laboratory stock
pHT304- <i>cpcR</i>	pHT304 carrying <i>cpcR</i> gene and its promoter	Laboratory stock
P _n -18Z	pHT304-18Z carrying the promoter fragment <i>n</i> , <i>n</i> ranges from 1 to 10, representing different promoters	This study
<i>cpcR</i> -P _n -18Z	pHT304-18Z carrying P _n and <i>cpcR</i> gene with its promoter, <i>n</i> ranges from 1 to 10, representing different promoters	This study
pET- <i>vip3AaII</i>	pET-28a carrying <i>vip3AaII</i> gene	Laboratory stock
pHT1618K	The pHT1618K vector carries the <i>tetracycline</i> gene	Laboratory stock
P ₇ - <i>vip3Aa</i>	pHT1618K carrying <i>Vip3AaII</i> under the control of P ₇	This study
P ₈ - <i>vip3Aa</i>	pHT1618K carrying <i>Vip3AaII</i> under the control of P ₈	This study

工作浓度为 10 μg/mL, 卡那霉素(kanamycin)和氨苄青霉素(ampicillin)的工作浓度为 100 μg/mL。

(1) Z-buffer (g/L): Na₂HPO₄·7H₂O 16.080, NaH₂PO₄·H₂O 5.520, KCl 0.750, MgSO₄·7H₂O 0.246, 然后调节 pH 至 7.00, 常温储存即可。

(2) 邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(ortho-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside, ONPG): 将称量的 0.4 g ONPG 溶于 100 mL Z-buffer, 并用锡箔纸包裹, 于-20 °C冰箱中保存备用。(3) 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液(g/L): Na₂CO₃ 106。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶、PrimeSTAR HS (Premix) DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶, TaKaRa 公司; DNA

胶回收和质粒提取试剂盒, Omega 公司; PCR 产物纯化试剂盒, Axygen 公司; 细菌基因组抽提试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; Bradford 试剂, 上海兰易科学仪器有限公司; 引物序列详见表 2, 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; 基因序列测序, 北京六合华大基因科技有限公司。紫外分光光度计, 岛津企业管理(中国)有限公司; 显微镜, 奥林巴斯中国有限公司。

1.2 载体构建

1.2.1 启动子融合 *lacZ* 基因表达载体的构建

为了明确杀虫基因的启动子是否受 CpcR 调控, 分别在两种遗传背景的 Bt 菌株中(即无 CpcR 的菌株 HD73 和表达 CpcR 的菌株 HD73)

表 2 引物及序列

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Oligonucleotide sequences (5'→3')	Restriction enzyme cutting site
1F	CGTCTAGATCCTCTACTGAAATAGGTAGTACC	<i>Xba</i> I
1R	AGCATGCATGAGTTTTGGC	<i>Sph</i> I
2F	CGTCTAGACTCTCGTATAAGTAATGTAAGTTTCT	<i>Xba</i> I
2R	AGCATGCACTCTTTGGTTTAACAGCATAAAG	<i>Sph</i> I
3F	CGTCTAGACCCCTTTTATATTTTATATTTCTTAAACACC	<i>Xba</i> I
3R	AGCATGCGGAAATTGATATTTTATAGAATTTTAGCAG	<i>Sph</i> I
4F	AGCATGCATGAATTCACCCCTCGT	<i>Sph</i> I
4R	CGTCTAGAACATATTCATTTCTATCCAAATCGTAACT	<i>Xba</i> I
5F	CGTCTAGATTTCTACTGAAATAGGTGGTACCTCTC	<i>Xba</i> I
5R	AGCATGCTAAATGTTTTCGGATACGCTTCTTT	<i>Sph</i> I
6F	AGCATGCTTCTATATTAGAATCATTTCTGGACGTCTCG	<i>Sph</i> I
6R	CGGGATCCCTCGTATATTAATATTAAGCCCTATCCAAG	<i>Bam</i> H I
7F	CGTCTAGACCCCTTCGGATTAATTTTATAATAC	<i>Xba</i> I
7R	AGCATGCCCATTTTCAAATCGTTTAGCTTTTTTG	<i>Sph</i> I
8F	CGTCTAGACCTCCCATATTCTTTTGTATAGTGATC	<i>Xba</i> I
8R	AGCATGCGCTTAAAAAACTTGGTAAAAAACATTTTATG	<i>Sph</i> I
9F	CGTCTAGACCCCTCGTAAATATAGTTTAGATAAGTATTT	<i>Xba</i> I
9R	AGCATGCCAACTTTAAAAAGGTGCGTGATTAG	<i>Sph</i> I
10F	CGTCTAGACTCCTTTTAAAAAATCAAGATATAACTTGT	<i>Xba</i> I
10R	AGCATGCCTGCTTTTCAATCCCTTTATTTTCAAC	<i>Sph</i> I
<i>cpcR</i> -F	CCCAAGCTTTTATGTGTCTAGTTTATAACCAACGCC	<i>Hind</i> III
<i>cpcR</i> -R	AGCATGCTTCAAATCGTTTAGCTTTTTTGCACC	<i>Sph</i> I
<i>P₇</i> -F	AGCATGCTTTCAAATCGTTTAGCTTTTTTGCACCAG	<i>Sph</i> I
<i>P₇</i> -R-Vip	TAATTTAGTATTATTCTTGTTTCATCAAACAGTTCCCTTTTCGGATTAATT	
<i>VipF</i> - <i>P₇</i>	ATTAATCCGAAAGGGGAACTGTTTGATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGCACAA	
<i>Vip3A</i> -R	ACGCGTCGACCTACTTAATAGAGACATCGTAAAAATGTACA	<i>Sal</i> I
<i>P₈</i> -F	AGCATGCGCTTAAAAAACTTGGTAAAAAACATTTTATGAATAAA	<i>Sph</i> I
<i>P₈</i> -R-Vip	TTAATTAGTATTATTCTTGTTTCATGATCATTCTCCCTCCCATATTCTT	
<i>VipF</i> - <i>P₈</i>	AAAGAATATGGGAGGGAGAATGATCATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGCACA AGA	

下划线为酶切位点

Underline is the restriction site.

引入 10 个启动子融合 *lacZ* 报告基因的表达载体, 并比较 β -半乳糖苷酶活性。用细菌基因组抽提试剂盒抽提菌株 LM1212 的基因组 DNA。根据 LM1212 基因组序列设计上、下游引物, 详见表 2。以菌株 LM1212 的基因组 DNA 为模板扩增 10 个杀虫基因的启动子区域。PCR 反应

体系: PrimeSTAR HS (Premix) 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, 基因组模板(100 ng/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 kb/min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min; 12 $^{\circ}$ C 10 min。用引物序列上标注的限制酶分别对

10 个杀虫基因启动子和含有 *lacZ* 报告基因的 pHT304-18Z 载体进行双酶切, 然后连接并转入 *E. coli* TG1 菌株中获得重组子。经测序鉴定获得正确的 10 个重组质粒, 分别命名为 P_n -18Z (n 代表启动子的序号)。此外, 进一步将 *cpcR* 及其启动子引入上述重组质粒中, 分别命名为 *cpcR*- P_n -18Z (n 代表启动子的序号), 构建流程如图 1 所示。将得到的 20 个重组质粒转化 *E. coli* ET 菌株, 使重组质粒去甲基化, 进而通过电击转入 Bt HD73 菌株中, 分别命名为 HD (P_n -18Z) 和 HD (*cpcR*- P_n -18Z) (表 1)。

1.2.2 指导表达 *Vip3Aa11* 蛋白的载体构建

按照 1.2.1 所述的 PCR 反应体系和条件, 以 LM1212 基因组 DNA 为模板, P_7 F 和 P_7 R-Vip 为引物, 扩增出 *cry35-like2* 与 *cry35-like* 基因上游 220 bp 的启动子区 P_7 片段。以质粒 pET-*vip3Aa11* (实验室保存) 为模板并以 *VipF*- P_7 和 *Vip3A*-R 为引物扩增出 *vip3Aa11* 基因片段,

其片段大小为 2 368 bp。然后用引物 P_7 F 和 *Vip3A*-R 将上述 2 个片段进行重叠 PCR, 重叠 PCR 的反应体系: PrimeSTAR HS (Premix) 25 μ L, 引物 P_7 F 和 P_7 R-Vip (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, P_7 片段和 *vip3Aa11* 基因片段 (100 ng/ μ L) 各 1 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件同 1.2.1。重叠 PCR 得到的片段大小为 2 572 bp。将重叠后的片段与 pHT-1618K 表达质粒同时用 *Sph* I 和 *Sal* I 进行双酶切, 并通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 将连接产物转入 *E. coli* TG1 菌株里, 获得重组质粒, 经鉴定正确的重组质粒 P_7 -*vip3Aa11* 转化 *E. coli* ET 菌株, 使质粒去甲基化。再通过电击转化进含有质粒 pHT304-*cpcR* 的 Bt HD73⁻菌株内, 转化子经 PCR 鉴定正确, 命名为 HD⁻ (*cpcR*- P_7 -*vip3Aa*) (表 1)。

按照 1.2.1 所述的 PCR 反应体系和条件, 以 LM1212 基因组 DNA 为模板, P_8 F 和 P_8 R-Vip 为引物, 通过 PCR 扩增出 *cry45Ba1*、*cry74Aa1*

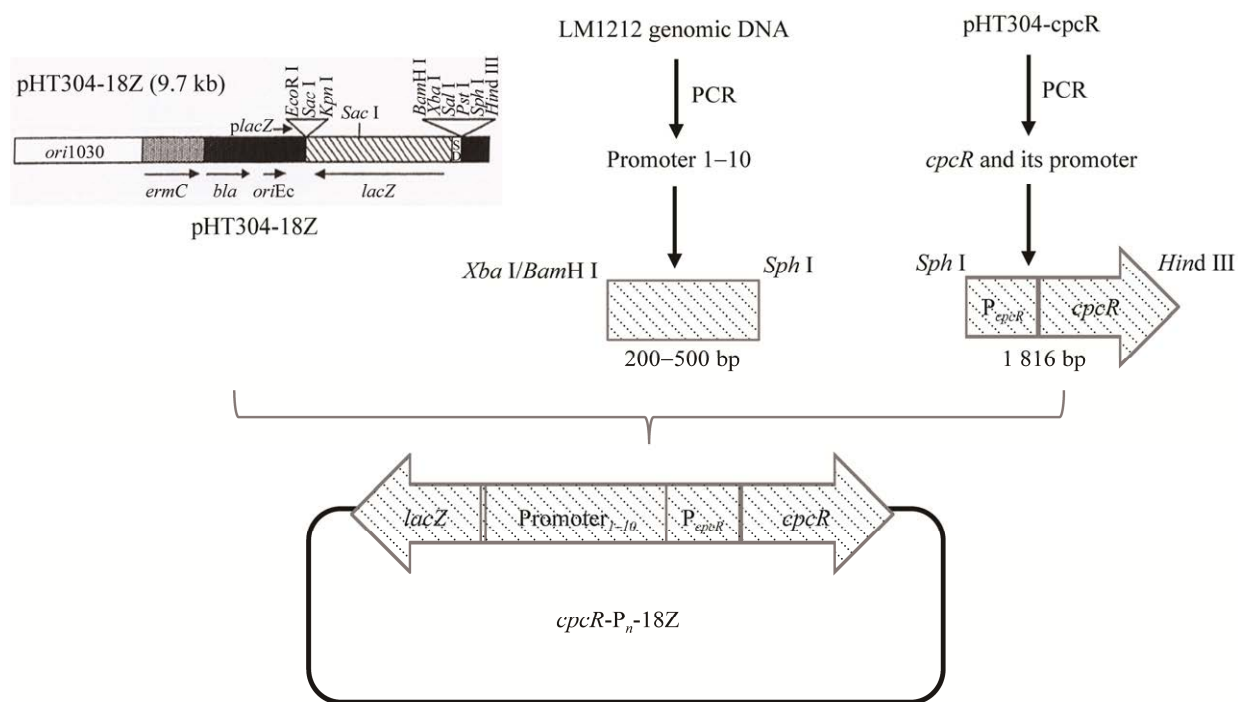


图 1 *cpcR* 和启动子与 *lacZ* 融合载体构建流程图

Figure 1 Flow chart of construction of fusion vector *cpcR* and promoter with *lacZ*.

和 *NT32-like* 基因上游 490 bp 的启动子区 P_8 片段。以质粒 pET-*vip3Aa11* (实验室保存) 为模板并以 VipF- P_8 和 Vip3A-R 为引物扩增出 *vip3Aa11* 基因片段, 其片段大小为 2 368 bp。然后用引物 P_8 F 和 Vip3A-R 将上述 2 个片段进行重叠 PCR, 重叠 PCR 的反应体系: PrimeSTAR HS (Premix) 25 μ L, 引物 P_8 F 或引物 P_8 R-Vip (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, P_8 片段或 *vip3Aa11* 基因片段 (100 ng/ μ L) 各 1 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件同 1.2.1。重叠 PCR 得到的片段大小为 2 870 bp。将重叠后的片段与 pHT-1618K 表达质粒同时用 *Sph*I 和 *Sal*I 进行双酶切, 并通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 将连接产物转化 *E. coli* TG1, 经鉴定正确的重组质粒 P_8 -*vip3Aa11* 转入 *E. coli* ET 菌株, 使质粒去甲基化。再通过电击转化进含有质粒 pHT304-*cpcR* 的 Bt HD73⁻ 菌株内, 转化子经 PCR 鉴定正确, 命名为 HD⁻ (*cpcR*- P_8 -*vip3Aa*) (表 1)。

1.3 生长曲线的测定

将 Bt 菌株在含有 10 μ g/mL 红霉素的 LB 平板上进行划线, 30 $^{\circ}$ C 培养箱培养 10–12 h。在平板上挑取单克隆转接入含有 10 μ g/mL 红霉素的 5 mL LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养。次日吸取 1 mL 转接到 100 mL SSM 液体培养基中, 摇匀后取 1 mL 样品测定初始 OD_{600} , 在 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床继续培养。每间隔 1 h 取样并测定 OD_{600} 。将得到的所有数据作图绘制生长曲线, 试验进行 3 个生物学重复。

1.4 β -半乳糖苷酶活性的测定

将 Bt 菌株在含有 10 μ g/mL 红霉素的 LB 平板上划线, 30 $^{\circ}$ C 培养箱培养 10–12 h。在平板上挑取单克隆, 将其转接入加有相应抗生素的 5 mL LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜。吸取 1 mL 菌液转接到 100 mL SSM 液体培养基中, 培养至 T0 时期 (OD_{600} 约为 2.0–2.2), 开始间隔 1 h 取样。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心

1 min, 弃上清, -20 $^{\circ}$ C 冷藏保存。向收集的沉淀中加入 500 μ L Z-buffer, 加入适量石英砂进行振荡破碎 2 min 30 s, 破碎后置于冰上。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min 后放置在冰上, 向新的 2 mL Ep 管中加入 700 μ L Z-buffer 和 100 μ L 破碎后菌体上清, 加入 200 μ L ONPG, 并涡旋混匀置于 37 $^{\circ}$ C 恒温干浴锅上, 并记录反应时间。反应至液体表现为黄色时加入 500 μ L Na₂CO₃ 终止反应, 并记录下反应结束时间, 测定 OD_{420} 值。若液体反应至黄色的时间在 5 min 以内, 可以适当稀释菌体上清, 再进行测定。接着向新的 2 mL Ep 管中加入 750 μ L Bradford 反应试剂和 15 μ L 破碎离心后的菌体上清, 测定 OD_{595} 。

$$\text{Protein (units/mg)} = \frac{OD_{420} \times 1374}{A \times B \times (OD_{595} - 0.0618)}$$

式中: A 为反应时间(min); B 为反应体积(mL)。

1.5 Bt 中表达 Vip3Aa11 蛋白及检测

将含有 Vip3Aa11 表达载体的 Bt 菌接种于含有 10 μ g/mL 红霉素和 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 10–12 h 至长出单菌落。挑取单菌落于 5 mL 含有上述抗性的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 10 h。按 1% 接种量转接至 300 mL 1/2 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 36 h, 4 $^{\circ}$ C、7 500 r/min 离心 10 min 收集菌体。取一小部分菌体用于显微镜观察菌体形态, 将菌体重悬于适宜体积的灭菌水中, 使用显微镜进行观察。将剩余菌体振荡破碎, 用于 SDS-PAGE 检测 Vip3Aa11 蛋白表达情况。

1.6 草地贪夜蛾幼虫的室内生物活性测定

将保存的 Bt 菌接种于含有 10 μ g/mL 红霉素和 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养约 12 h 至长出单菌落。挑取单菌落接种于 5 mL 含有相应抗性的 LB 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 10 h。吸取 3 mL 的菌液

转接至 300 mL 的 1/2 LB 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 36 h。将菌液收集到 50 mL 离心管中, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。将收集的菌体用灭菌水清洗 2 遍, 接着放入 -80 °C 冰箱中存放 2 d。然后放置在冷冻干燥仪中 3 d 至菌体成粉末状。

称取 10 mg 菌粉溶于 10 mL 的灭菌水中, 配制成为浓度为 1 mg/mL 的母液。按等比级数稀释法, 分别稀释配制成为不同的浓度。称取提前配好的人工饲料 15 g 置于培养皿中, 并将饲料按压至无明显块状。吸取 3 mL 待测样品溶液, 均匀地添加到饲料表层, 并充分地混合均匀, 室温静置一段时间, 使饲料中多余的水分蒸发。用称量勺将饲料均匀地分装到 24 孔板中, 同时将饲料按压在孔壁的一侧。将幼虫从袋中倒出置于白纸上, 将白纸翻过来, 这时幼虫会拉丝并向下滑, 借助毛笔将拉丝的幼虫接于孔内, 一孔一只。将接好的 24 孔板用吹塑纸覆盖并用盖子盖好, 再用橡皮筋将其固定, 防止幼虫串孔。

将 24 孔板置于光照周期 16 L:8 d, 相对湿度 65%±5%, 温度(27±1) °C 的养虫室中。每天定时去观察饲料的湿度情况、饲料是否霉变、培养条件是否正常, 7 d 后记录虫的死亡情况, 整理试验数据, 计算校正死亡率公式如下, 并用 PoloPlus 软件计算 LC_{50} 。

$$\text{校正死亡率(\%)} = \frac{\text{对照存活率} - \text{处理组存活率}}{\text{对照存活率}}$$

式中: 对照组死亡率在 20% 以下生测数据结果才有效, 对照组死亡率超过 20% 则该试验视为无效试验。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析菌株 LM1212 中杀虫基因及其启动子

在菌株 LM1212 中共有 14 种杀虫基因 10 个

转录单元, 其中 *cry69Aa-like*、*cry41Ca1* 和 *cryBP1* 基因共转录, 将其启动子区命名为 P_1 , *cytCa-like* 基因的启动子区命名为 P_2 , *cytAa-like* 基因的启动子区命名为 P_3 , *cryBP1* 基因的启动子区命名为 P_4 , *cry69Aa-like*、*cry32Wa1* 基因共转录, 将其启动子区命名为 P_5 , *cry32Va1* 基因的启动子区命名为 P_6 , *cry35-like2*、*cry35-like* 基因共转录, 将其启动子区命名为 P_7 , *cry45Ba1*、*cry74Aa1* 和 *NT32-like* 基因共转录, 将其启动子区命名为 P_8 , *cry32-like* 基因的启动子区命名为 P_9 , *MTX2-like* 基因的启动子区命名为 P_{10} 。这些杀虫基因及其启动子在各质粒上的位置如图 2 所示, 灰色标注区域表示本研究选取的启动子区域。

利用在线网站 MEME suite 5.1.1 (<http://meme-suite.org/>) 对选取的 10 个启动子序列进行了保守基序的预测与分析。结果显示在 P_1 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_7 和 P_8 启动子序列中均存在一段保守的序列, 而在 P_2 、 P_6 、 P_9 和 P_{10} 启动子的序列中不存在保守序列(图 3), 该保守序列与前期预测的 CpcR-Box^[17]有部分重叠部分, 因此推测具有保守序列的启动子可能会受到转录因子 CpcR 的调控。

2.2 筛选受 CpcR 调控的杀虫基因启动子

2.2.1 启动子和 *lacZ* 基因融合表达菌株生长曲线的测定

为了确定重组质粒是否对菌株 HD73 的生长趋势有影响, 以野生型菌株 HD73 为对照, 将得到的重组菌株 HD (P_1 -18Z)、HD (P_2 -18Z)、HD (P_3 -18Z)、HD (P_4 -18Z)、HD (P_5 -18Z)、HD (P_6 -18Z)、HD (P_7 -18Z)、HD (P_8 -18Z)、HD (P_9 -18Z)、HD (P_{10} -18Z)、HD (*cpcR*- P_1 -18Z)、HD (*cpcR*- P_2 -18Z)、HD (*cpcR*- P_3 -18Z)、HD (*cpcR*- P_4 -18Z)、HD (*cpcR*- P_5 -18Z)、HD (*cpcR*- P_6 -18Z)、HD (*cpcR*- P_7 -18Z)、HD (*cpcR*- P_8 -18Z)、HD (*cpcR*- P_9 -18Z) 和

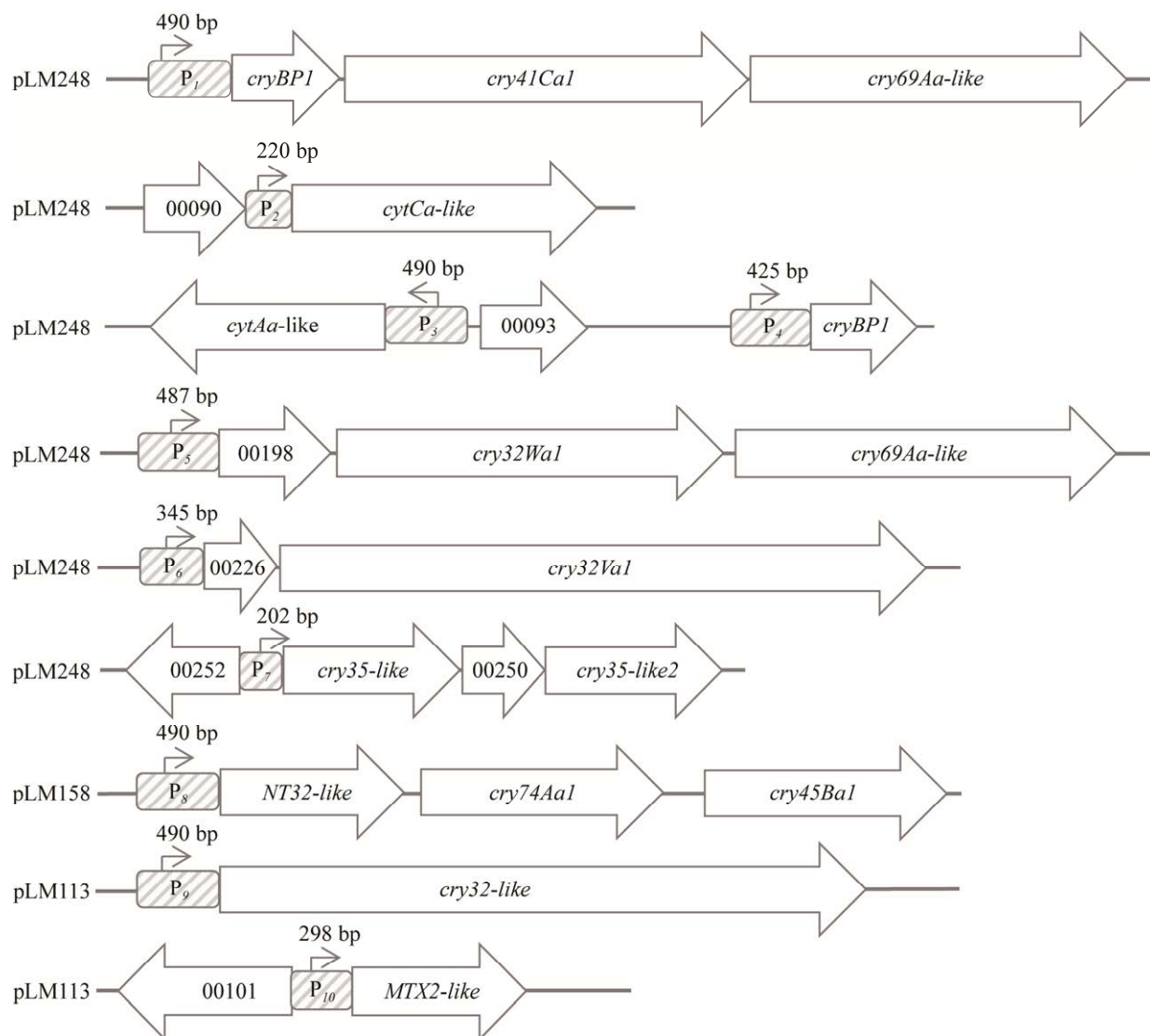


图 2 菌株 LM1212 杀虫基因启动子位置关系图

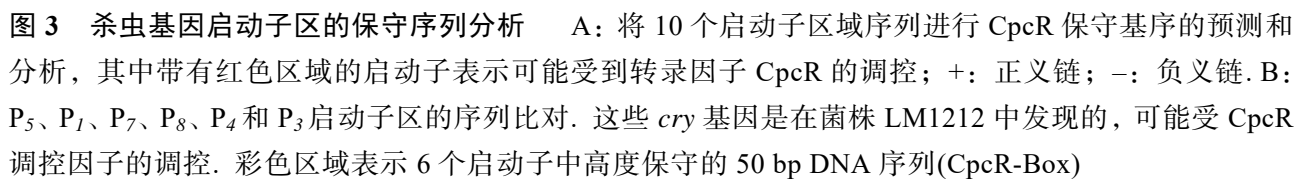
Figure 2 Strain LM1212 insecticide gene promoter position relationship map.

HD (*cpcR*-P₁₀-18Z)进行生长曲线的测定, 从生长曲线的试验结果可以看出重组菌株与野生型菌株 HD73 的生长趋势一致, 表明这些重组质粒的转入不会影响菌株 HD73 的生长(图 4)。

2.2.2 杀虫基因启动子转录活性分析

β-半乳糖苷酶活性结果显示: 在菌株 HD73 中未引入 *CpcR* 表达时, P₁ 启动子在整个生长过程中转录活性较低, 引入 *CpcR* 表达后转录

活性在 T0-T8 时期呈逐渐上升趋势(图 5A); P₃ 启动子在整个生长过程中转录活性最高只有约 100 units/mg-protein, 引入 *CpcR* 表达后, 转录活性明显提高(图 5B); P₄ 启动子在引入 *CpcR* 表达后转录活性明显提高, 转录活性在 T1-T4 时期呈增强趋势, 在 T5-T7 时期达到平台期, T8 时期活性又有所上升(图 5C); P₅ 启动子引入 *CpcR* 表达后转录活性明显提高, 活性在 T0-T8 时期呈逐渐上升趋势(图 5D)。



Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

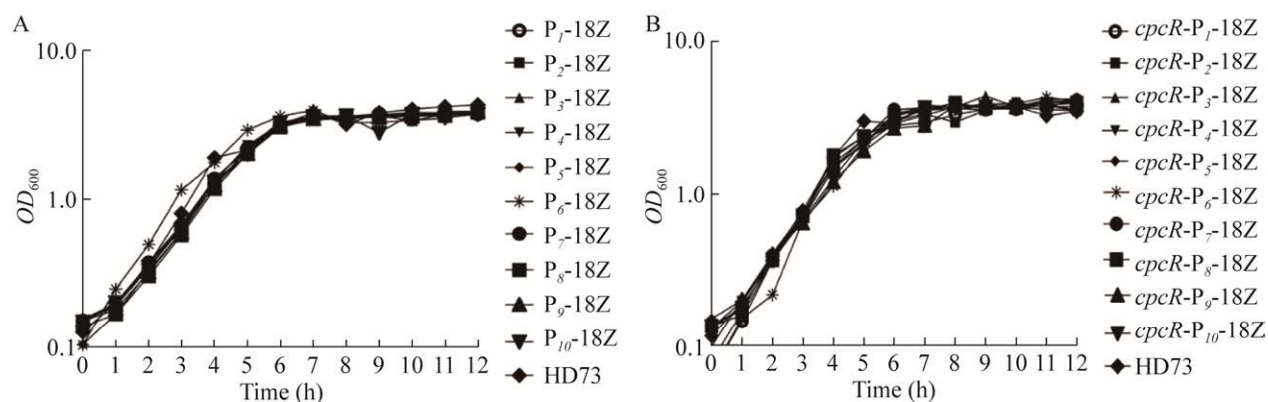


图4 含 *lacZ* 报告基因菌株的生长曲线 A: 含 *lacZ* 报告基因及启动子的菌株 HD73 生长曲线与野生型菌株 HD73 比较. B: 含 *cpcR* 基因和 *lacZ* 报告基因及启动子的菌株 HD73 与野生型菌株 HD73 生长曲线比较

Figure 4 The growth curve of strains containing the *lacZ* gene. A: Comparison of growth curves of strains HD73 containing promoters fused with *lacZ* reporter gene. B: Comparison of growth curves of strains HD73 containing *cpcR* genes and promoters fused with *lacZ* reporter gene. Strain HD73 as a control.

P_6 启动子在整个生长过程中转录活性较低, 引入 *CpcR* 表达后, 转录活性明显提高(图 5E); P_7 启动子在整个生长过程中转录活性较低, 引入 *CpcR* 表达后, 启动子 P_7 的转录活性在 T0–T6 时期转录活性持续增强, T7 时期转录活性达到约 10 000 units/mg-protein (图 5F); P_8 启动子在整个生长过程中转录活性较低, 而引入 *CpcR* 表达后转录活性明显提高, T0–T5 时期转录活性持续增强, 在 T5 时期转录活性达到约 50 000 units/mg-protein, 此时期后逐渐呈下降趋势(图 5G)。以上试验结果表明 *CpcR* 可以激活 P_1 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 和 P_8 启动子的转录。

此外, β -半乳糖苷酶活性的测定结果(图 6)显示, 在菌株 HD73 中未引入 *CpcR* 表达时, P_2 、 P_9 启动子在整个生长过程中转录活性均较低, 引入 *CpcR* 后转录活性无明显变化(图 6A、6B), 即 P_2 、 P_9 启动子不受 *CpcR* 的调控; 而 P_{10} 启动子在菌株 HD73 中未引入 *CpcR* 表达时, 转录活性较高, T0 到 T8 时期转录活性逐渐增强, 在 T8 时期转录活性到达约

45 000 units/mg-protein, 但引入 *CpcR* 表达后转录活性明显则明显下降, 在 T8 时期转录活性到达约 8 000 units/mg-protein (图 6C), 推测 P_{10} 启动子受到 *CpcR* 的负调控。

2.3 受 *CpcR* 调控的杀虫基因启动子的转录活性比较

根据上述试验结果可知, 启动子 P_1 、 P_4 、 P_7 和 P_8 可被转录因子 *CpcR* 激活且转录活性较高, 因此将菌株 HD (*cpcR*- P_1 -18Z)、HD (*cpcR*- P_4 -18Z)、HD (*cpcR*- P_7 -18Z) 和 HD (*cpcR*- P_8 -18Z) 进一步进行 β -半乳糖苷酶活性比较分析, 结果表明, *cry35-like2*、*cry35-like* 基因的启动子(P_7)和 *cry45Ba1*、*cry74Aa1*、*NT32-like* 基因的启动子(P_8)转录活性相对较高(图 7)。

2.4 高活性启动子指导表达 *Vip3Aa11* 蛋白

将 HD⁻ (*cpcR*- P_7 -*vip3Aa*)、HD⁻ (*cpcR*- P_8 -*vip3Aa*) 和 HD⁻ (*cpcR*-1618K) 菌株在 1/2 LB 培养基中培养至 36 h 进行镜检观察菌体的状态。与对照菌株 HD⁻ (*cpcR*-1618K) 相比(图 8A), 菌株 HD⁻ (*cpcR*- P_7 -*vip3Aa*) 与 HD⁻ (*cpcR*- P_8 -*vip3Aa*)

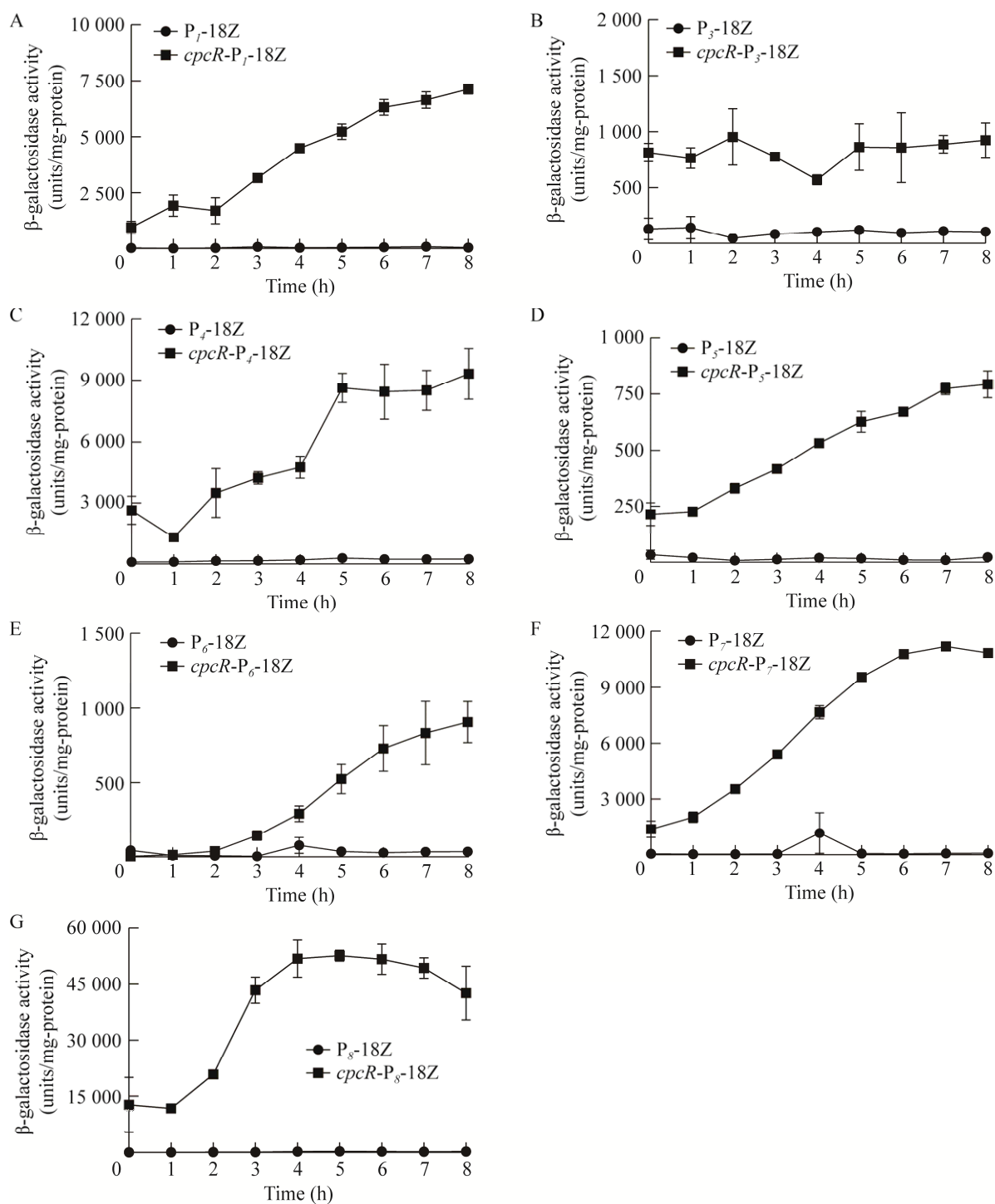


图 5 重组菌株中 P_1 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 和 P_8 启动子的转录活性测定 A-G 分别对应启动子 P_1 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 和 P_8 的转录活性. 时间 0 (T0) 为指数阶段增长结束; T_n 为 T0 后 n 小时

Figure 5 Transcriptional activity of promoter P_1 , P_3 , P_4 , P_5 , P_6 , P_7 , and P_8 in recombinant strains. A-G corresponds to transcriptional activity of promoter P_1 , P_3 , P_4 , P_5 , P_6 , P_7 and P_8 . Time zero (T0) is the end of the exponential growth phase, and T_n is n hours after T0.

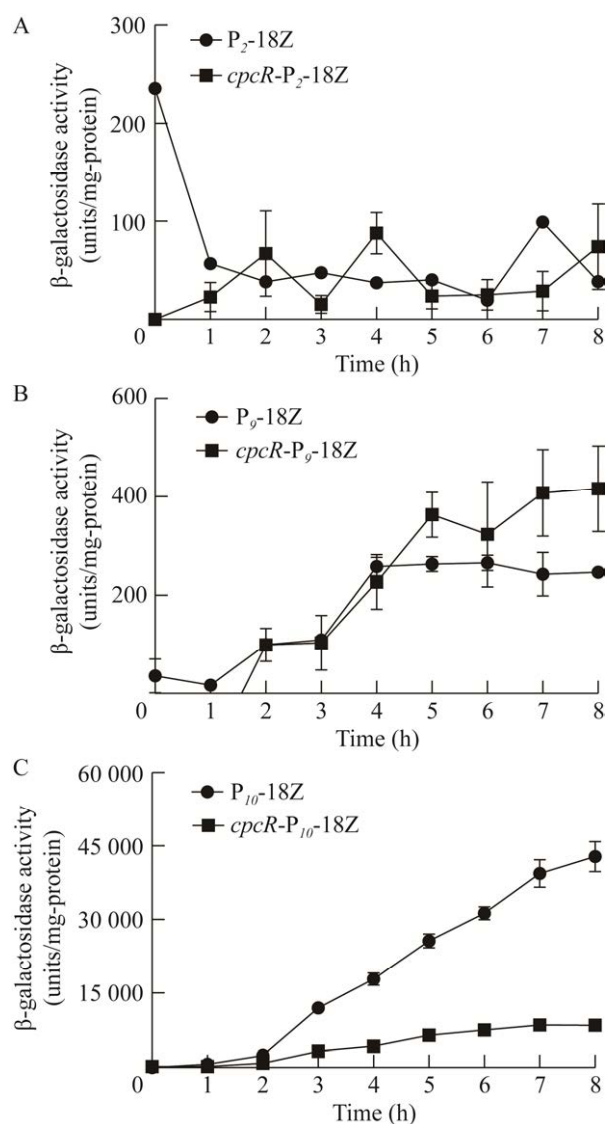


图 6 重组菌株中 P_2 、 P_9 和 P_{10} 启动子的转录活性测定 A: P_2 启动子不受 CpcR 调控. B: P_9 启动子不受 CpcR 调控. C: P_{10} 启动子受 CpcR 负调控
Figure 6 Transcriptional activity of promoter P_2 , P_9 , and P_{10} in recombinant strains. A: The P_2 promoter is not regulated by CpcR. B: The P_9 promoter is not regulated by CpcR. C: The P_{10} promoter is negatively regulated by CpcR.

菌株均有晶体蛋白形成(图 8B 和图 8C),说明在菌株 HD73⁻中成功表达了 Vip3Aa11 蛋白。为进一步检测 Vip3Aa11 蛋白是否在菌株 HD73⁻中成功表达,以菌株 HD⁻ (*cpcR*-1618K)为阴性对

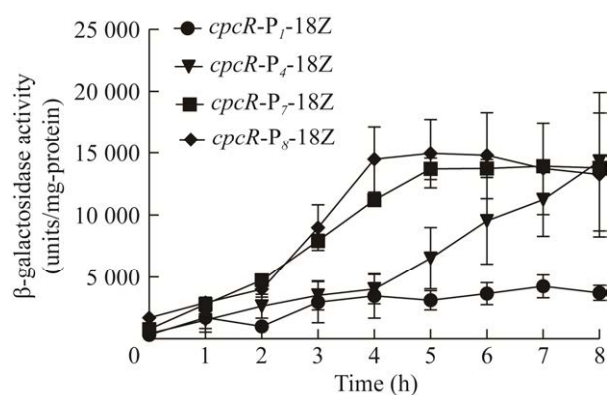


图 7 受 CpcR 调控的启动子转录活性的比较
Figure 7 Comparison of the transcriptional activity of promoters regulated by CpcR.

照,将菌株 HD⁻ (*cpcR*- P_7 -vip3Aa)和 HD⁻ (*cpcR*- P_8 -vip3Aa)进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果如图 8D 所示,菌株 HD⁻ (*cpcR*- P_7 -vip3Aa)和菌株 HD⁻ (*cpcR*- P_8 -vip3Aa)在 85 kDa 左右存在目的条带即 Vip3Aa11 蛋白,同时在 60–70 kDa 之间存在另一条带,推测该条带是 Vip3Aa11 蛋白在弱碱性条件下被胰蛋白酶剪切而成的活性多肽。将表达出的目的条带进行蛋白质谱检测,结果显示,蛋白名称注释为营养期杀虫蛋白,登录号为 3070-AAR36859.1,分子量为 88 kDa,等电点为 5.05,序列覆盖率分别为 88%和 86%,即在菌株 HD73⁻中由 P_7 启动子和 P_8 启动子指导的 Vip3Aa11 蛋白表达成功。

2.5 生物活性测定评估非芽胞杀虫蛋白表达系统

为了明确菌株 HD⁻ (*cpcR*- P_7 -vip3Aa)、HD⁻ (*cpcR*- P_8 -vip3Aa)的杀虫活性,以菌株 HD⁻ (*cpcR*-1618K)为阴性对照,以对草地贪夜蛾有较好杀虫活性的生产菌株 KN11 为阳性对照,在 1 mg/mL 和 100 μg/mL 的浓度下,进行草地贪夜蛾幼虫的室内生物活性测定。结果表明,利用非芽胞表达体系表达出的 Vip3Aa11 蛋白与 KN11 菌株相比杀虫活性相当(表 3)。

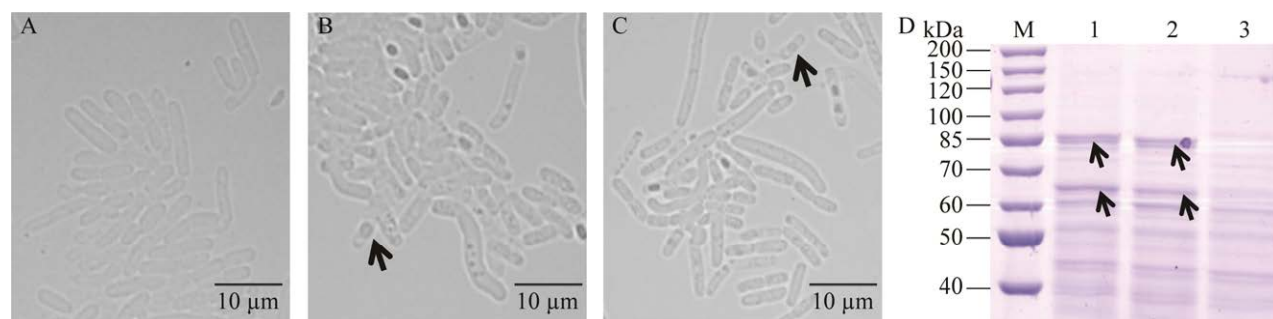


图 8 高活性启动子指导表达 Vip3Aa11 蛋白 A: 菌株 HD⁻ (*cpcR*-1618K)显微镜检测. B: 菌株 HD⁻ (*cpcR*-P₇-vip3Aa)显微镜检测. 箭头指示晶体. C: 菌株 HD⁻ (*cpcR*-P₈-vip3Aa)显微镜检测. 箭头指示晶体. D: SDS-PAGE 检测 Vip3Aa11 蛋白表达情况. M: 标准蛋白; 1: HD⁻ (*cpcR*-P₇-vip3Aa); 2: HD⁻ (*cpcR*-P₈-vip3Aa); 3: HD⁻ (*cpcR*-1618K). 箭头指示 Vip3Aa11 蛋白条带以及其剪切后活性多肽

Figure 8 The highly active promoter directs the expression of Vip3Aa11 protein. A: Microscopic detection of HD⁻ (*cpcR*-1618K). B: Microscopic detection of HD⁻ (*cpcR*-P₇-vip3Aa). Arrow represents crystals. C: Microscopic detection of HD⁻ (*cpcR*-P₈-vip3Aa). Arrow represents crystals. D: The expression of Vip3Aa11 protein was detected by SDS-PAGE. M: Size marker protein; 1: HD⁻ (*cpcR*-P₇-vip3Aa); 2: HD⁻ (*cpcR*-P₈-vip3Aa); 3: HD⁻ (*cpcR*-1618K). Arrows indicate Vip3Aa11 protein bands and their cleaved active peptides.

3 讨论与结论

本研究以菌株 LM1212 10 个杀虫基因启动子为研究对象, 预测其保守序列, 同时引入 CpcR 的表达进行转录活性的测定, 发现启动子 P₁、P₃、P₄、P₅、P₇ 和 P₈ 均存在一段相对保守的序列, 且与 CpcR-box 部分重叠, 这些启动子在 β-半乳糖苷酶活性检测中, 表现为在引入

CpcR 的表达后, 启动子转录活性具有明显提高, 即除 *cry35-like* 基因的启动子外, CpcR 还可以调控 LM1212 菌株中其他杀虫基因的启动子。

将筛选到的受 CpcR 调控的较高活性的启动子 P₇、P₈, 用于构建非芽胞杀虫蛋白表达体系, 通过 SDS-PAGE 检测发现, 在 88 kDa 左右存在 Vip3Aa11 蛋白的目的条带, 即利用该体系成功表达出了 Vip3Aa11 蛋白。同时在 60 kDa 左右存在另一条带, 经质谱鉴定两者均为 Vip3Aa11 蛋白, 60–70 kDa 之间的条带可能是 Vip3A 蛋白在弱碱性条件下被胰蛋白酶剪切为的活性多肽。

Bergamasco 等的研究发现草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)、亚热带黏虫 (*Spodoptera eridania*) 和斜纹夜蛾 (*Spodoptera litur*) 对 Vip3Aa 和 Cry1Ia10 蛋白较为敏感, 且单独和组合使用时 LC₅₀ 均较低, 其中对草地贪夜蛾、白斑蛾和斜纹夜蛾进行单一杀虫蛋白生物活性测试时,

表 3 Vip3Aa11 蛋白对草地贪夜蛾初孵幼虫的校正死亡率

Table 3 Corrected mortality rate of Vip3Aa11 protein against *Spodoptera frugiperda* (%)

菌株 Strains	浓度 Concentration	
	1 mg/mL	100 μg/mL
HD ⁻ (<i>cpcR</i> -1618K)	8.40	—
HD ⁻ (<i>cpcR</i> -P ₇ -vip3Aa)	100	63.77
HD ⁻ (<i>cpcR</i> -P ₈ -vip3Aa)	100	71.09
KN11	97.09	62.31

—: 无杀虫活性

—: No insecticidal activity.

Vip3Aa 蛋白比 Cry1Ia10 更有效,同时观察到 Vip3Aa 和 Cry1 类蛋白在对草地贪夜蛾、斜纹夜蛾作用时有协同作用^[11]。因此,可以利用 Vip3A 蛋白与其他杀虫蛋白的协同增效作用,对草地贪夜蛾或其他害虫进行生物防治,如先正达(Syngenta)、拜耳(Bayer)等公司利用基因叠加策略^[19],将 2 种或 2 种以上杀虫蛋白成功导入一株植物内从而实现对病虫害的控制^[20]。

同样利用非芽胞杀虫蛋白表达体系、基因叠加策略,选取高转录活性的启动子及其有较强调控能力的 CpcR 同源蛋白,在 HD73 菌株中指导异源蛋白在非芽胞细胞中高效表达,可为实现草地贪夜蛾的绿色可持续防治提供方法和思路,进一步为开发高效稳定的 Bt 产品奠定基础。

REFERENCES

- [1] HARRISON RD, THIERFELDER C, BAUDRON F, CHINWADA P, MIDEGA C, SCHAFFNER U, van den BERG J. Agro-ecological options for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) management: providing low-cost, smallholder friendly solutions to an invasive pest[J]. Journal of Environmental Management, 2019, 243: 318-330.
- [2] HUSSAIN AG, WENNMANN JT, GOERGEN G, BRYON A, ROS VID. Viruses of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: a review with prospects for biological control[J]. Viruses, 2021, 13(11): 2220.
- [3] MONTEZANO DG, SPECHT A, SOSA-GÓMEZ DR, ROQUE-SPECHT VF, SOUSA-SILVA JC, PAULA-MORAES SV, PETERSON JA, HUNT TE. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas[J]. African Entomology, 2018, 26(2): 286-300.
- [4] 张磊, 靳明辉, 张丹丹, 姜玉英, 刘杰, 吴孔明, 萧玉涛. 入侵云南草地贪夜蛾的分子鉴定[J]. 植物保护, 2019, 45(2): 19-24, 56.
ZHANG L, JIN MH, ZHANG DD, JIANG YY, LIU J, WU KM, XIAO YT. Molecular identification of invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Yunnan Province[J]. Plant Protection, 2019, 45(2): 19-24, 56 (in Chinese).
- [5] 李国平, 姬婷婕, 孙小旭, 姜玉英, 吴孔明, 封洪强. 入侵云南草地贪夜蛾种群对 5 种常用 Bt 蛋白的敏感性评价[J]. 植物保护, 2019, 45(3): 15-20.
LI GP, JI TJ, SUN XX, JIANG YY, WU KM, FENG HQ. Susceptibility evaluation of invaded *Spodoptera frugiperda* population in Yunnan Province to five Bt proteins[J]. Plant Protection, 2019, 45(3): 15-20 (in Chinese).
- [6] WU QL, HE LM, SHEN XJ, JIANG YY, LIU J, HU G, WU KM. Estimation of the potential infestation area of newly-invaded fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in the Yangtze River valley of China[J]. Insects, 2019, 10(9): 298.
- [7] LI Y, WANG Z, ROMEIS J. Managing the invasive fall armyworm through biotech crops: a Chinese perspective[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(2): 105-107.
- [8] 吴超, 张磊, 廖重宇, 吴孔明, 萧玉涛. 草地贪夜蛾对化学农药和 Bt 作物的抗性机制及其治理技术研究进展[J]. 植物保护学报, 2019, 46(3): 503-513.
WU C, ZHANG L, LIAO CY, WU KM, XIAO YT. Research progress of resistance mechanism and management techniques of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to insecticides and Bt crops[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(3): 503-513 (in Chinese).
- [9] 杨现明, 韩蕾, 赵胜园, 王兴亚, 姜玉英, 吴孔明. 麦田草地贪夜蛾农药防治技术研究[J]. 植物保护, 2020, 46(5): 281-285, 315.
YANG XM, HAN L, ZHAO SY, WANG XY, JIANG YY, WU KM. Insecticides applications for control of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in wheat field[J]. Plant Protection, 2020, 46(5): 281-285, 315 (in Chinese).
- [10] LERECLUS D, AGAISSE H, GRANDVALET C, SALAMITOU S. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2000, 290(4/5): 295-299.
- [11] BERGAMASCO VB, MENDES DRP, FERNANDES OA, DESIDÉRIO JA, LEMOS MVF. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2013, 112(2): 152-158.
- [12] 束长龙, 张贤, 王奎, 曹蓓蓓, 张杰. 几种常用化学杀虫剂对 Bt 菌株生长影响的初步研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(5): 1166-1173.
SHU CL, ZHANG X, WANG K, CAO BB, ZHANG J.

- A preliminary study on the effects of several frequently used chemical insecticides on the growth of diverse *Bacillus thuringiensis* strains[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(5): 1166-1173 (in Chinese).
- [13] 胡虓, 伍森, 张晓明, 束长龙, 张杰, 马朋, 李青, 刘华梅. 高效苏云金杆菌 KN11 杀虫剂产品开发及应用[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(6): 842-846.
- HU X, WU M, ZHANG XM, SHU CL, ZHANG J, MA P, LI Q, LIU HM. Development and application of efficient *Bacillus thuringiensis* KN11 insecticides[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(6): 842-846 (in Chinese).
- [14] 王宇航, 束长龙, 耿丽丽, 刘华梅, 张杰. 苏云金芽胞杆菌 G033A 产业化现状及应用前景分析[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(6): 837-841.
- WANG YH, SHU CL, GENG LL, LIU HM, ZHANG J. Commercialization status and prospect analysis of *Bacillus thuringiensis* G033A product[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(6): 837-841 (in Chinese).
- [15] DENG C, SLAMTI L, RAYMOND B, LIU GM, LEMY C, GOMINET M, YANG JN, WANG HL, PENG Q, ZHANG J, LERECLUS D, SONG FP. Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain[J]. The ISME Journal, 2015, 9(2): 286-296.
- [16] HOU S, ZHANG RB, LERECLUS D, PENG Q, ZHANG J, SLAMTI L, SONG FP. The transcription factor CpcR determines cell fate by modulating the initiation of sporulation in *Bacillus thuringiensis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(6): e02374-21.
- [17] ZHANG RB, SLAMTI L, TONG L, VERPLAETSE E, MA LX, LEMY C, PENG Q, GUO SY, ZHANG J, SONG FP, LERECLUS D. The stationary phase regulator CpcR activates *cry* gene expression in non-sporulating cells of *Bacillus thuringiensis*[J]. Molecular Microbiology, 2020, 113(4): 740-754.
- [18] 佟蕾, 张睿彬, 彭琦, 张杰, LERECLUS D, 宋福平. 苏云金芽胞杆菌 LM1212 菌株和突变株的全基因组序列比较分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1888-1900.
- TONG L, ZHANG RB, PENG Q, ZHANG J, LERECLUS D, SONG FP. Comparative analysis of two complete genome sequences from *Bacillus thuringiensis* strain LM1212 and its mutant[J]. Microbiology China, 2020, 47(6): 1888-1900 (in Chinese).
- [19] YU XM, LIU T, SUN ZG, GUAN P, ZHU J, WANG SQ, LI SC, DENG QM, WANG LX, ZHENG AP, LI P. Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*[J]. Current Microbiology, 2012, 64(4): 326-331.
- [20] LEMES ARN, DAVOLOS CC, LEGORI PCBC, FERNANDES OA, FERRÉ J, LEMOS MVF, DESIDERIO JA. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107196.