

苏云金芽孢杆菌 Cyt 蛋白研究进展

蔡 峻 任改新

(南开大学生命科学学院 微生物系 天津 300071)

Advance in Studies on Cyt Proteins of *Bacillus thuringiensis*

Cai Jun Ren Gaixin

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

关键词 苏云金芽孢杆菌, Cyt 蛋白, 进展

中图分类号 :Q963 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2002)04-0514-06

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是目前世界上应用最广泛、最成功的微生物杀虫剂,也是公认的无公害生物农药。苏云金芽孢杆菌最主要的杀虫活性物质是杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins, ICPs),包括晶体蛋白(Cry)和 Cyt 蛋白(Cyt)两大类。这两类蛋白在氨基酸序列及其基因同源性上相距甚远,但它们均能在靶标害虫中肠内被激活成毒素,并在昆虫中肠细胞膜上形成孔道,进而引起中肠细胞胶样渗透裂解(colloid-osmotic lysis),最终导致靶标害虫的死亡。不过,它们的作用机理完全不同。随着各种 Bt 转基因植物和工程菌株的出现和广泛应用,昆虫对 Bt 杀虫蛋白的抗性也愈来愈严重。因此,延缓或抑制昆虫的抗性是当前 Bt 研究领域的一个非常重要的方向。而 Cyt 蛋白能增强 Cry 蛋白的杀虫活性,降低害虫对 Cry 蛋白的抗性,已经成为这一领域研究的热点。本文就 Cyt 蛋白研究进展作一综述。

1 Cyt 蛋白的来源、性质与分类

Cyt 蛋白首先在苏云金芽孢杆菌以色列亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 Bti)的伴胞晶体中发现^[1]。Bti 所产生的伴胞晶体由多种杀虫晶体蛋白构成,其中包括有 4 种 Cry 蛋白,分子量在 72 ~ 134 kD 之间。除此之外,还存在一种蛋白,这种蛋白分子量较小,仅有 27 kD 左右,并且与 Cry 蛋白没有多大的同源性。尤其不同于 Cry 蛋白的是,这种蛋白具有广泛的溶细胞活性,在体外能够引起无脊椎动物和脊椎动物的细胞发生溶解,甚至能引起高等哺乳动物红细胞的溶解,即具有溶血活性。因此,它被称之为 Cyt 蛋白或溶细胞素,单列为一类^[2]。随后在 Bt *morrisoni*、*medellin*、*kyushuensis* 和 *fukuokaensis* 等亚种中发现了其它 *cyt* 基因。由于 *cyt* 基因几乎都发现于具有杀双翅目害虫活性的菌株中,人们曾一度认为 Cyt 蛋白只存在于对蚊虫等双翅目昆虫有特异毒力的菌株中。1997 年,Guerschicoff 等^[3]在仅对鞘翅目昆虫具有杀虫活性的 *morrisoni* 亚种 *tenebrionis* 血清变型的菌株中发现了 *cyt2Ba6* 基因,改变了人们这一观点,也扩大了 *cyt* 基因的来源范围。但迄今为止,仅发现 *cyt* 基因与 *cry3* 或 *cry4* 基因共存,尚未发现同时具有 *cyt* 基因和 *cry1* 基因的菌株,也未发现具有 *cyt* 基因的菌株对鳞翅目害虫有高毒力。

现已发现了 16 种 *cyt* 基因(见表 1),根据 1995 年杀虫晶体蛋白基因命名委员会提出的新的分类原则,按已知的 *cyt* 基因产物氨基酸序列的同源性,将它们分成两类,即 *cyt1* 和 *cyt2*(见图 1)。这两类蛋白

除了同源性的存在差异外,性质也不尽相同。如 Cyt1Aa 和 Cyt2Aa 有 39%的同源性和 70%的相似性,但 Cyt2Aa 对蛋白酶的耐受性比 Cyt1Aa 强许多。这可能与 Cyt2Aa 的 C-末端比 Cyt1Aa 多一条 15 个氨基酸的“尾”有关,而这 15 个氨基酸可能对于 Cyt2Aa 在无晶体的 Bt 菌株中的高表达和晶体形成也起着重要的作用。另外,Cyt1Aa 和 Cyt2Aa 在溶细胞活性方面也存在差异。Cyt2Aa 是一种原毒素,只有在被昆虫中肠液或蛋白酶 K 水解激活成 23 kD 的毒素后,才具有溶细胞活性,而 27 kD Cyt1Aa 本身就已具溶细胞活性,不过当它被水解成 25 kD 的片段时,其溶细胞活性大幅提高。因此,一般认为 Cyt1Aa 也还是一种原毒素^[4]。

表 1 已知的 cyt 基因

基因	来源	文献来源
<i>cyt1Aa1</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	Waalwijk <i>et al</i> 1985 ,NAR(13)8207 ~ 8217
<i>cyt1Aa2</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	Ward & Ellar 1986 JMB(191)1 ~ 11
<i>cyt1Aa3</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> PG14	Earp & Ellar 1987 ,NAR(15)3619 ~ 3619
<i>cyt1Aa4</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> PG14	Galjart <i>et al</i> 1987 ,Curr Micro(16)171 ~ 177
<i>cyt1Aa1</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>medellin</i>	Thiery <i>et al</i> 1997 ,AEM(63)468 ~ 473
<i>cyt1Ba1</i>		Payne <i>et al</i> 1995 ,JSP 5436002
<i>cyt2Aa1</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kyushuensis</i>	Koni & Ellar 1993 JMB(229)319 ~ 327
<i>cyt2Ba1</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	Guerchicoff <i>et al</i> 1997 ,AEM(63)2716 ~ 2721
<i>cyt2Ba2</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> PG14	Guerchicoff <i>et al</i> 1997 ,AEM(63)2716 ~ 2721
<i>cyt2Ba3</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>fukuokaensis</i>	Guerchicoff <i>et al</i> 1997 ,AEM(63)2716 ~ 2721
<i>cyt2Ba4</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>	Guerchicoff <i>et al</i> 1997 ,AEM(63)2716 ~ 2721
<i>cyt2Ba5</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> HD ~ 518	Guerchicoff <i>et al</i> 1997 ,AEM(63)2716 ~ 2721
<i>cyt2Ba6</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> serovar <i>tenebrionis</i>	Guerchicoff <i>et al</i> 1997 ,AEM(63)2716 ~ 2721
<i>cyt2Ba7</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>medellin</i>	Yu & Pang 2000 unpublished
<i>cyt2Ba8</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>medellin</i>	Yu & Pang 2000 unpublished
<i>cyt2Bb1</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>jegathesan</i>	Cheong & Gill 1997 ,AEM(63)3254 ~ 3260

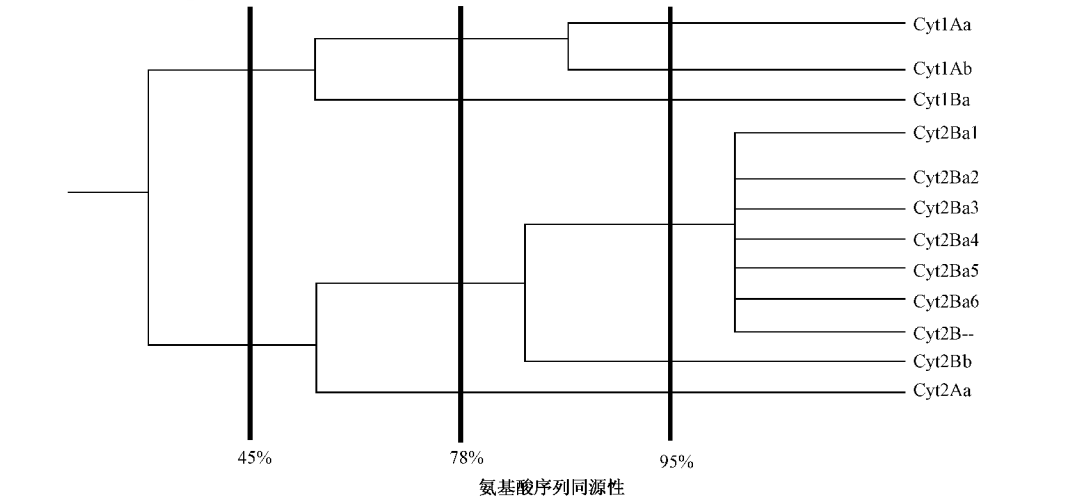


图 1 Cyt 蛋白系统分类树图(引自 Guerchicoff 等^[1])

2 Cyt 蛋白的表达与辅助蛋白 P20 的关系

辅助蛋白 P20 蛋白基因是位于以色列亚种 *cryIIAa* 操纵子上的最后一个基因,编码 20 kD 的蛋白。该蛋白本身不具有杀虫活性,但它对某些杀虫晶体蛋白的正常表达晶体形成却有帮助作用,有时甚至是必须的。

Cyt1 蛋白的表达与 P20 蛋白密切相关。研究发现, *cryI* 基因在大肠杆菌中的正常表达必须依赖辅助蛋白基因 P20 的存在,否则其表达量远远低于在 Bt 菌株中的表达水平,并可造成宿主细胞溶解死亡。如 Mclean 和 Whiteley^[5]研究发现,当存在 P20 基因时, *Cyt1Aa* 蛋白在大肠杆菌中的表达量大大提高。Adams 等^[6]推测 P20 蛋白可能起脚手架蛋白(scaffolding prtein)的作用,或者可以防止 Cyt 蛋白被蛋白酶降解。Visick 和 Whiteley^[7]研究发现 P20 蛋白能防止 *Cyt1Aa* 蛋白在大肠杆菌体内被蛋白酶降解。他们将 *cryIIAa* 基因转入一些大肠杆菌的突变株(它们对体内不正常的蛋白水解能力较弱),结果发现无论 P20 基因存在与否, *cryIIAa* 基因都能在这些突株中正常表达,而在野生株中,只有 P20 基因存在时才能检测到 *Cyt1Aa* 蛋白。同时,他们还发现同一菌株体内产生的 *Cyt1Aa* 蛋白和 P20 蛋白可以发生免疫共沉淀反应,说明 P20 蛋白是通过与正在合成的 *Cyt1Aa* 新生肽结合而发生作用。P20 蛋白可能在细胞内起到一种分子伴侣的作用,能够帮助蛋白分子正确折叠^[7]。

cryIIAa 基因在 Bt 中的正常表达也依赖于辅助蛋白基因 P20 的存在。Wu 和 Federici^[8]发现在 P20 蛋白存在的情况下, *cryIIAa* 基因能在苏云金芽孢杆菌无晶体突变株中超量表达,形成较大的双锥体形伴孢晶体,芽孢也很正常。但若无 P20 存在, *Cyt1Aa* 的表达导致了受体细胞一进入芽孢形成期后,即被杀死。Chang 等^[9]也发现, *Cyt1Aa* 在无晶体突变菌种的表达致使芽孢异常而且菌体裂解受到抑制。这些说明,若无 P20 存在, *Cyt1Aa* 在菌体内表达后即与细胞膜结合而导致菌体生长受阻、甚至死亡。

Cyt2Aa 的表达水平在大肠杆菌和 Bt 中差距很小,并且都不需要 P20 的参与。在没有 P20 存在的条件下, *Cyt2Aa* 也能在大肠杆菌内大量产生,并能形成伴孢晶体,说明其表达和晶体形成不需要 P20 帮助。其晶体的形成可能与其 C-末端的特殊结构有关^[2]。

3 Cyt 蛋白的结构与作用机理

Cyt 蛋白的结构与 Cry 蛋白明显不同。通过 X 光晶体衍射法发现, *Cry3A* 由 3 个结构域组成,结构域 I 由 7 个反向平行的 α -螺旋组成,其中第 5 个螺旋被其它的 6 个螺旋包围。结构域 II 由 3 个反向平行的 β -折叠连接而成,形成 β -棱柱折叠的结构。结构域 III 由 2 个缠绕的反向平行的 β -折叠形成的 β -夹心结构^[10]。 *Cry1Aa* 与 *Cry3A* 的结构相似。

Cyt2Aa 蛋白与 *Cry3A* 氨基酸序列的同源性不到 20%,这种差异在蛋白质三维结构上有很好的反映。 *Cyt2Aa* 蛋白只有一个结构域,两个 α -螺旋位于外层,包裹着一个形成发卡结构的 β -折叠(图 2)。这个 β -折叠可以在细胞膜上形成一个跨膜的 β -圆筒结构。有人通过对 *Cyt1Aa* 和 *Cyt2Aa* 序列比较分析,推测这种结构在不同的 Cyt 蛋白中是普遍存在的^[4]。

Cyt 蛋白的作用机理在体内和体外是不同的。一般认为 Cyt 蛋白在体外的溶细胞活性与特异性受体无关。细胞膜上饱和磷脂被认为是 Cyt 蛋白普遍的受体。饱和磷脂处理后的 Cyt 蛋白溶细胞活性降低,以及磷脂酶 A2 处理后的红细胞与 Cyt 蛋白的结合量减少均有力地支持着这一观点^[4]。值得注意的是,细胞膜磷脂组成在双翅目昆虫和其它昆虫中存在很大的差异。大多数双翅目昆虫磷脂酰乙醇胺约占 50%,差不多是磷脂酰胆碱含量的两倍,鞘翅目昆虫两者含量几乎相等,而在鳞翅目昆虫和脊椎动物中却是磷脂酰胆碱占优势。更重要的是,在双翅目昆虫细胞膜磷脂中饱和磷脂所占比例要高于其它昆虫。双翅目昆虫的这种特性有利于 Cyt 蛋白与其细胞膜结合。这里有一个很好的反证, *Cyt1A* 的一种突变子(E204A)与饱和磷脂的亲合力下降,与此同时,它也失去了对双翅目害虫的毒力^[4]。

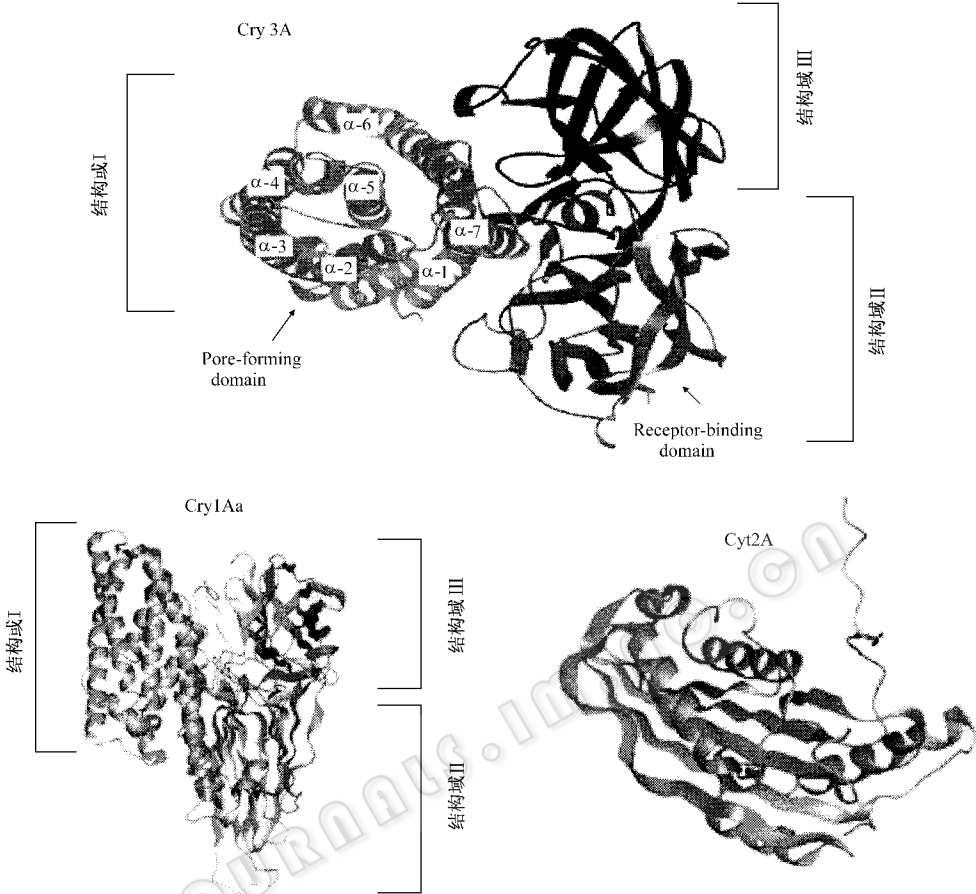


图 2 Cry3A、Cry1Aa 及 Cyt2A 的三维结构(分别引自 Aronson 和 Sha^[10], Schnepf 等^[21])

体外溶细胞过程可分为三个步骤。首先,水解激活后的 Cyt 毒素以单体形式不可逆地与昆虫细胞和哺乳动物细胞膜上的不饱和磷脂结合。研究发现, HgCl₂(一种半胱氨酸的改性物)能明显抑制 Cyt 毒素与细胞膜的结合^[9]。Cyt1Aa 仅具有 2 个半胱氨酸,其中之一(Cys-7)在水解激活成 25kD 时被截掉,另一个(Cys-190)正好位于一个主要的疏水区,而与其螺旋发卡 C-D 很近。该螺旋发卡区被认为与 Cyt 毒素的结合与毒性密切相关。定点突变和单克隆抗体结合实验均证实了这一点^[11]。

第二步:与细胞膜结合的毒素分子开始聚集,形成特定大小的低聚体。这一步骤与细胞膜与结合的毒素浓度密切相关。只有当毒素浓度超过一定的阈值后,毒素的低聚体才会形成。毒素聚集是细胞溶解的必须步骤,只要当一定大小的毒素低聚体形成后,细胞才会发生溶解。同时,毒素的聚集也有利于后续毒素的结合,因而也加速了溶细胞的过程^[4]。最后,毒素低聚体形成跨膜的“孔”。这一过程还不十分清楚,有人认为 Cyt 蛋白会以 β-圆筒为基础形成“孔”。理由是 Cyt2Aa1 的 β5、β6 和 β7 三条链的长度足以跨越膜的疏水核心,并且它们形成的片层具有双亲性和疏水性特征^[2]。但 Cyt 蛋白是否能在细胞膜上形成“孔”尚存争议。有研究发现 Cyt1Aa 与脂质的结合相当松散的,而且并没有证据说明毒素进入了细胞膜,从而推测对膜具有一种普遍性的、类似去污剂的干扰作用^[12]。

Cyt 蛋白在活体内所产生的毒性并不象在体外那样具有非特异性,它主要对双翅目昆虫有毒杀作用。Ravoahangimalala 和 Chavels^[13]报道,纯化的 Cyt1Aa1 蛋白能与冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)的中肠切片上全部中肠区的细胞和前胃区细胞结合,而纯化的 Cyt4 蛋白仅能与前胃区细胞结合;当冈比亚按

蚊取食以色列亚种全晶体后,发现 Cry4 蛋白仍只与前胃区细胞结合,而 Cyt1Aa1 蛋白也只与前胃区细胞结合。由此可见,Cyt1Aa1 本身能与全部中肠区结合,但在以色列亚种中其它 Cry 蛋白存在的情况下,它却只与具有 Cry 蛋白受体区域的细胞结合。

由于 Cry 蛋白与 Cyt 蛋白结构上的巨大差异,因此形成 Cyt-Cry 杂合子“孔”的可能性不大。不过,在 Cry 蛋白存在的情况下,Cyt 蛋白更趋向于结合在具有 Cry 蛋白受体的区域,那么该区域 Cyt 蛋白结合浓度将增加,这有利于 Cyt 蛋白的聚集,进而加速细胞的溶解。这也可能是 Cyt 蛋白与 Cry 蛋白存在协同作用的原因所在^[41]。

4 Cyt 蛋白的杀虫活性及其与其它杀虫晶体蛋白的相互作用

尽管 Cyt 蛋白在体外存在广泛的溶细胞活性,但它的杀虫谱较窄,本身的杀虫活性也并不高。如来源于以色列亚种的 Cyt1Aa1 对埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的 LC_{50} 为 $110 \sim 125 \mu\text{g/mL}$,还不到整个以色列亚种杀虫晶体蛋白杀虫活性的万分之一^[51]。Cyt1Ab1 对尖音库蚊(*Culex pipiens*)斑须按蚊(*Anopheles stephensi*)和埃及伊蚊的毒力也较弱^[13]。

Cyt 蛋白对双翅目害虫的作用并不在于其毒力本身,而在于它能增强其它杀虫晶体蛋白的杀虫活性。Cyt1Aa 蛋白与 *israelensis* 亚种中 Cry4、Cry11A 蛋白之间存在着明显的协同作用^[6,14]。由多种蛋白复合形成的 *israelensis* 亚种野生型伴胞晶体的毒力远远高于单个蛋白的毒力,将 Cyt1Aa 与 *israelensis* 亚种其它杀虫蛋白按照不同比例进行混合,发现比单个蛋白的毒力提高了 4~10 倍。

Cyt 蛋白还能降低双翅目害虫对 Cry 蛋白的抗性。Cyt1A 和 Cry11A 混合能使五带淡色库蚊(*Culex quinquefasciatus*)抗性系对 Cry11A 的抗性降低 1000 倍,而 Cyt1A 与 Cry4、Cry11A 混合使用则能完全抑制五带淡色库蚊抗性系对 Cry4 和 Cry11A 的抗性^[51]。五带淡色库蚊经 *israelensis* 亚种晶体蛋白(含有 Cyt1Aa 蛋白)选择 28 代后,抗性仅提高 3 倍;但若所用为不含 Cyt1Aa 的晶体蛋白,则其抗性将提高 90~900 倍^[16]。*israelensis* 亚种从应用于杀蚊虫以来,至今尚未发现有明显的抗性发生,其中 Cyt1Aa 蛋白起着关键作用^[17]。

Cyt 蛋白的作用并非仅局限于双翅目害虫。1998 年, Federici 和 Bauerz^[16]报道 Cyt1Aa 对一种鞘翅目害虫美洲杨叶甲(*Chrysomela scripta*)的幼虫有很高的毒力,同时还发现 Cyt1Aa 蛋白能降低该害虫对 Cry3A 的抗性五千倍以上。这是首次发现 Cyt 蛋白对非双翅目害虫的作用。

近年来,国内外学者开始研究 Cyt 蛋白与 Cry1 蛋白对鳞翅目害虫的作用,但结果不一。1999 年 Rincon-castro 等^[18]在以粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)为靶标害虫时发现,Cyt1Aa 与 Cry1Ac 之间存在拮抗作用。而在 2000 年,余健秀等^[19]在研究 Cyt1Aa 和 Cry1Aa 对斜纹夜蛾(*Prodenia litura*)的作用后,认为 Cyt1Aa 和 Cry1Aa 具有协同毒杀作用。本实验室将 *cyt1Aa* 基因导入仅含有 *cry1C* 基因的工程菌株 4Q8-T5 中,构建了能同时表达 Cyt1Aa 和 Cry1C 的工程菌株 4Q8-*cyt1Aa*,结果发现 4Q8-*cyt1Aa* 对甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的杀虫效率高于 4Q8-T5^[20]。2001 年, Meyer 等^[21]研究了 Cyt1A 对小菜蛾(*Plutella xylostella*)敏感器系 LAB-PS 和抗性品系 NO-QA 的作用,结果发现无论是单独使用 Cyt1A,还是 Cyt1A 与 Bt 商品制剂 Dipel 混用,对小菜蛾敏感和抗性品系的死亡率均不会造成明显影响。他们同时还发现 Cyt1A 对棉花红铃虫(*Pectinophora gossypiella*)也有类似情况。不久, Sayyed 等^[22]证实 Cyt1Aa 蛋白对小菜蛾敏感品系 ROTH 有明显的毒性,这也是首次发现 Cyt 蛋白对鳞翅目害虫有毒力。此外,他们还发现 Cyt1Aa 与 Cry1Ac 间存在协同作用,Cyt1Aa 能有效增强 Cry1Ac 对小菜蛾抗性品系 Cry1Ac-SEL 的毒性,降低该抗性品系对 Cry1Ac 的抗性。他们认为不同的生测方法,不同的试虫(包括同一昆虫的不同品系)以及不同晶体蛋白的表达体系等均可能是研究结果不一致的原因,最重要的原因可能是不同试虫对 Cyt 蛋白的敏感性不同^[22]。

另外,Cyt 蛋白与球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)间也存在明显的协同作用。Cyt1Aa 能增强球形芽孢杆菌对埃及伊蚊的毒力,Cyt1Ab 和 Cyt2Ba 能增强球形芽孢杆菌对埃及伊蚊和五带淡色库蚊的毒力,球形芽孢杆菌和 Cyt1Ab 还能抑制五带淡色库蚊对球形芽孢杆菌的抗性^[17]。国内一些学者也正在进行这

方面的研究^[18]。

5 展望

自从 1983 年 Georgiou 等首次从五带淡色库蚊中检测到了它对 Bt 杀虫晶体蛋白和 Bt 商品制剂的抗性,随后 Bt 抗性问题的不断在实验室和田间试验中得到证实。目前发现在实验室和田间至少有 10 种昆虫对 Bt 及其杀虫晶体蛋白产生了抗性^[2]。有关专家也提出了一些抗性治理的策略:如轮换、更替或混合使用含不同杀虫晶体蛋白成分的 Bt 杀虫剂等。这些策略存在一个潜在的弊端,即过分(几乎全部)依赖于 Cry 蛋白的作用^[14]。由于 Cry 蛋白有着相对保守的氨基酸序列和相似的作用机理,因此,出现 Cry 蛋白间的交互抗性也就不足为奇。例如,由于美洲扬叶甲对 Cry3A 和 Cry1B 产生了交互抗性,使得用 Cry1B 替换 Cry3A 来防治该害虫的意义荡然无存。而 Cyt1Aa 对美洲扬叶甲也有高毒力,同时,由于作用机理完全不同,所以它与 Cry3A 蛋白间不会产生交互抗性,很显然,它将在今后 Cry3A 的抗性治理中起到重要作用^[14]。

正是由于 Cyt 蛋白独特的作用机理,以及其增强 Cry 蛋白毒力,降低或延缓 Cry 蛋白抗性的特性,使得它将在 Cry 蛋白抗性的长期治理中充当重要角色。目前国内外学者正尝试将 Cyt 蛋白与 Cry1 蛋白进行组合,以期解决鳞翅目害虫对 Bt 的抗性问题的,但由于 Cyt 蛋白的作用机理至今仍不明确,使得 Cyt 蛋白与 Cry1 蛋白的组合还比较盲目,尚处于摸索阶段。相信随着 Cyt 蛋白的作用机理的研究深入,必将能为害虫抗性治理的工作指出一条光明的道路。

参 考 文 献

- [1] Guerchicoff A, Delécluse A, Rubinstein C P. *App Envir Microbiol*, 2001, **67**:1090 ~ 1096.
- [2] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**:775 ~ 806.
- [3] Guerchicoff A, Ugalde R A, Rubinstein C P. *App Envir Microbiol*, 1997, **63**:2716 ~ 2721.
- [4] Chow E, Singh G J P, Gill S S. *App Envir Microbiol*, 1989, **55**:2779 ~ 2788.
- [5] Mclean K, Whitelet H R. *J Bacteriol*, 1987, **169**:1017 ~ 1023.
- [6] Crickmore N, Bone E, Williams J A, et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **131**:249 ~ 254.
- [7] Visick J E, Whitelet H R. *J Bacteriol*, 1991, **173**:1748 ~ 1756.
- [8] Wu D, Federici B A. *J Bacteriol*, 1993, **175**:5276 ~ 5280.
- [9] Chang C, Yu Y M, Dai S M, et al. *App Envir Microbiol*, 1993, **59**:815 ~ 821.
- [10] Aronson A I, Shai Y. *FEMS Microbiol Lett*. 2001, **195**:1 ~ 8.
- [11] Chow E, Singh G J P, Gill S S. *App Envir Microbiol*, 1989, **55**:2779 ~ 2788.
- [12] Butko P, Huang F, Pusztai-Carey M, et al. *Biochemi*, 1996, **35**:11335 ~ 11360.
- [13] Ravaohangimalala O, Chavels J F. *FEBS Letters*, 1995, **362**:111 ~ 115.
- [14] Wu D, Johnson J J, Federici B A. *Mol Microbiol*, 1994, **13**:965 ~ 972.
- [15] Federici B A, Bauer L S. *App Envir Microbiol*, 1998, **64**:4368 ~ 4371.
- [16] Georgiou G P, Wirth M C. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**:1095 ~ 1101.
- [17] Wirth M C, Georgiou G P, Federici B A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:10536 ~ 10540.
- [18] Rincon-Castro M C D, Barajas-Huerta J, Ibarra J. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**:2049 ~ 2053.
- [19] 余健秀, 庞 义, 邓日强. 中国病毒学 2000, **15**:242 ~ 243.
- [20] 李毓冰, 刘春勇, 陈月华, 等. 中国病毒学 2000, **15**:252.
- [21] Meyer S K, Tabashnik B E, Liu Y B, et al. *App Envir Microbiol*, 2001, **67**:462 ~ 463.
- [22] Sayyed A H, Crickmore N, Wright D J. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**:5859 ~ 5860.
- [23] Wirth M C, Delécluse A, Walton W E. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**:3280 ~ 3284.
- [24] 李田勇, 孙 钊, 袁志明, 等. 中国病毒学 2000, **15**:88 ~ 93.