

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (10) :1138 - 1145; 4 October 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.005

芽胞外壁基质组成蛋白的编码基因启动子 *PexsY* 指导的 *cry1Ac* 基因表达

郑庆云^{1,2}, 王冠男^{1,2}, 张喆², 曲宁^{1,2}, 彭琦², 张杰², 高继国^{1*}, 宋福平^{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重点实验室, 北京 100193

摘要: 【目的】利用非 *cry* 基因启动子 *PexsY* (芽胞外壁基质组成蛋白编码基因启动子) 表达 *Cry1Ac* 晶体蛋白, 发现可用于 *cry* 基因表达的新元件, 为高效工程菌的构建奠定基础。【方法】采用启动子融合 *lacZ* 技术, 通过 β -半乳糖苷酶活性分析了 *PexsY* 启动子和截短的 *PexsY* 启动子的转录活性; 利用该启动子在苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) HD73 菌株中表达了 *cry1Ac* 基因, 通过透射电子显微镜观察晶体形态; 蛋白定量、SDS-PAGE 比较蛋白产量; 生物活性测定进行功能验证。【结果】*PexsY* 启动子在芽胞晚期转录活性很高, 透射电镜观察到利用该启动子表达的 *cry1Ac* 基因形成了菱形晶体, SDS-PAGE 分析可以检测到 133kDa 的 *Cry1Ac* 蛋白, 且与 *cry3A* 启动子指导表达的蛋白产量相近, 少于 *cry8E* 启动子指导表达的蛋白产量; 生物活性测定表明 *PexsY* 指导表达 *Cry1Ac* 蛋白对玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 具有杀虫活性。【结论】在 Bt 无晶体突变体中, 非 *cry* 基因启动子 *PexsY* 可以正常表达 133kDa 的 *Cry1Ac* 蛋白, 并形成晶体, 具有在芽胞形成晚期表达 *cry* 基因的能力, 该类启动子将在 Bt 工程菌构建中发挥重要作用。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, *PexsY* 启动子, *Cry1Ac* 蛋白

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 10-1138-08

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种革兰氏阳性产芽孢菌, 广泛分布于自然界中, Bt 属于蜡样芽胞杆菌族 (*Bacillus cereus* group, Bc), 与其它 Bc 族细菌相比, Bt 最大的特点是在芽胞期母细胞中形成主要由 *Cry* 蛋白和 *Cyt* 蛋白组成的伴胞晶体^[1-3]。由于 *Cry* 蛋白对多种重要农业害虫有特异的杀虫活性, 且具有对人畜无害、不污染环境、无

残留、生产原料及杀虫成分为天然产物、能保持生态平衡等优点, 已成为世界上应用最广泛的微生物杀虫剂^[4-5]。

Bt 产生的由 *Cry* 蛋白组成的伴胞晶体可达细胞干重的 20% 以上, 这主要是由于 *cry* 基因强启动子确保了 mRNA 持续且大量的生成, 并且 mRNA 的稳定性在 *cry* 基因大量表达方面至关重要^[6]。根据其

基金项目: 国家自然科学基金 (31270111); 国家“863 计划” (2011AA10A203)

* 通信作者。宋福平, Tel: + 86-40-62896634, E-mail: fpsong@ippcaas.cn; 高继国, Tel: + 86-43359990992, E-mail: gaojigu@1961@hotmail.com

作者简介: 郑庆云 (1988 -), 女, 山东省济宁市邹县人, 硕士研究生, 主要从事苏云金芽胞杆菌功能基因的研究。E-mail: zheng_qingyun1988@126.com

收稿日期: 2013-12-31; 修回日期: 2014-02-17

调控机制的不同, 分为以 *cry1Ac* 基因为代表的芽胞依赖型 *cry* 基因和以 *cry3A* 基因为代表的非芽胞依赖型 *cry* 基因^[5, 7]。寻找强启动子表达 Cry 蛋白, 已经成为一种提高晶体蛋白产量的途径。本实验室李朝睿等利用 *cry8E* 启动子表达 *cry1Ac* 基因, 通过构建 Bt 高效表达载体 pHT315-8E21b 提高了 Cry1Ac 蛋白的产量^[8]。但是利用非 *cry* 基因启动子指导 Cry 蛋白的表达尚无正式报道。

ExsY 存在于 Bc 族中, 是芽胞外壁的基质结构蛋白, 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中 CotZ 同源, 芽胞晚期开始合成, 由 σ^K 控制^[9]。本研究在发现 *PexsY* 启动子在晚期活性非常高的基础上, 构建

了由非 *cry* 基因类启动子 *PexsY* 驱动的 *cry1Ac* 基因表达载体, 发现在 Bt 无晶体突变体中, Cry1Ac 蛋白能正常表达, 且能形成双锥体晶体, 发现了可用于 *cry* 基因表达的新元件, 为高效工程菌的构建奠定了基础。由于 *PexsY* 启动子与 *cry* 启动子调控机制不同, 可以与其它 *cry* 启动子联合使用延长表达时间从而进一步提高产量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本实验所用菌株与质粒见表 1。

表 1. 菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids

Strain and plasmid	Characterization	Resource
strain		
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	$\Delta(lac-proAB) supE thi hsd-5 (F^- traD36 proA + proB + lacIq lac\Delta M15)$	this lab
ET 12567	$F-dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202::Tn10 galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1$, for the generation of unmethylated DNA	this lab
<i>Bacillus thuringiensis</i>		
HD73	<i>B. thuringiensis</i> strain carrying the <i>cry1Ac</i> gene	this lab
HD73 ⁻	AcrySTALLIFEROUS mutant of Bt HD73 strain	[10]
HD-PexsY1Ac-315	HD73 ⁻ strain containing plasmid pHT315-PexsY-1Ac	this study
HD-P8E1Ac-315	HD73 ⁻ strain containing plasmid pHT315-P8E-1Ac	this lab
HD-P3A1Ac-315	HD73 ⁻ strain containing plasmid pHT315-P3A-1Ac	this lab
plasmid		
pHT304-18Z	Promoterless <i>lacZ</i> Vector, Erm ^r , Amp ^r	[11]
pHT304-PexsY-575	pHT304-18Z carrying <i>PexsY</i> promoter of <i>exsY</i>	this study
pHT304-PexsY-410	pHT304-18Z carrying truncated promoter of <i>exsY</i>	this study
pHT315	<i>E. coli</i> -Bt shuttle vector, Amp ^r , Erm ^r	[12]
pHT315-PexsY-1Ac	pHT315 carrying <i>exsY</i> promoter and containing <i>cry1Ac</i> gene	this study

1.1.2 主要试剂: *Taq* PCR StarMix 购于康润生物公司, Premix PrimeStar[®] HS、相应限制性内切酶和 DNA 连接酶均购于大连 TaKaRa 公司, DNA 纯化、DNA

回收及质粒提取试剂盒购买于 Axygen 公司。

1.1.3 PCR 引物: 本实验所用引物名称及序列见表 2。

表 2. 引物序列

Table 2. The sequences of primers

Primer name	Sequences (5'→3')	Restriction site
PexsY-410-F	CCCAAGCTTGGTTCGCAACGATA	<i>Hind</i> III
PexsY-410-R	AACTGCAGTAATGTCACCTCT	<i>Pst</i> I
PexsY-575-R	AACTGCAGAGGGCGGTATTGCTACTGAT	<i>Pst</i> I
PexsY-F	GCGTGCACCGTTCGCAACGATA	<i>Sal</i> I
PexsY-R	CATAAGTTACCTCCATCTTTAAGGGCGGTATTGCT	
1Ac-F	GCAAATACACGCCCTAAAGATGGAGGTAACCTATG	
1Ac-R	ACATGCATGCTTGCATGAGACTATTGCT	<i>Sph</i> I

1.2 培养基和抗生素

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 培养于 LB 培养基中, 37°C, 220 r/min; 苏云金芽胞杆菌培养于 LB 和 SSM^[13] 培养基中, 30°C, 220r/min。

抗生素工作液浓度: 氨苄青霉素水溶液 100 μg/mL, 红霉素乙醇溶液 5 μg/mL, 卡那霉素水溶液 50 μg/mL, -20°C 保存。

1.3 DNA 操作和转化

DNA 片段的纯化、胶回收和大肠杆菌质粒的提取参见试剂盒, 热击转化和电击转化参见文献 [14]。

1.4 β-半乳糖苷酶活性分析

取鉴定正确的单菌落, 过夜活化 (红霉素终浓度为 5 μg/mL), 1% 接种于 SSM 培养基中, 220 r/min, 30°C 培养至 T_{10} (T_0 为菌株对数期结束, OD_{600} 为 2.0 - 2.2), 每隔 1 h 取 1 次样, 从 T_{10} 取到 T_{20} , 每次 2 mL, 12000 × g 离心 2 min, 弃上清, 菌体 -20°C 冻存储备用, β-半乳糖苷酶活性测定方法参照文献 [15]。3 次实验独立重复, 取平均值。

1.5 pHT315-PexsY-1Ac 表达载体构建

以 HD73 基因组为模板, 引物对 PexsY-F 和 PexsY-R, 扩增 PexsY 启动子; 引物对 1Ac-F 和 1Ac-R 扩增 *cry1Ac* 基因, 采用重叠 PCR 方法将 PexsY 启动子与 *cry1Ac* 基因进行连接, 重叠 PCR 产物与 pHT315 载体经 *Sal* I 和 *Sph* I 双酶切后, 连接转化 *E. coli* TG1。

1.6 Cry1Ac 晶体形态观察

透射电镜 (TEM) 样品制备: 20 mL 菌液离心后按 1:20 加入 3% 的戊二醛固定液, 经过前固定、预处理、后固定、脱水、置换、浸透、包埋、切片和染色后进行观察, 具体过程参见文献 [16 - 17]。

1.7 菌株中 Cry1Ac 晶体蛋白产量分析

过夜活化菌按 1% 接种于 50 mL SSM 培养基中, 30°C, 220r/min 培养至 T_{24} , 12000 × g 离心 1 min 收集菌体, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 重悬, 加入石英砂破碎, 混匀, 5 × 上样 buffer 与样品混匀, 煮沸 10 min, 12000 × g 离心 2 min, 取上清用 Pierce® 660 nm Protein Assay Kit 进行总蛋白的定量, 方法参见 Pierce® 660 nm Protein Assay Kit 说明书。调整上样量使总蛋白量一致。SDS-PAGE 检测蛋白产量^[18]。

1.8 菌株的生物活性测定

利用亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 初孵幼虫对 HD-PexsY1Ac-315 菌株产生的 Cry1Ac 蛋白进行杀虫活性测定, 以 HD-P3A1Ac-315 和 HD-P8E1Ac-315 为阳性对照, HD73⁻ 为阴性对照, 其中 HD-P3A1Ac-315 和 HD-P8E1Ac-315 分别是由 *cry3A* 和 *cry8E* 启动子指导 *cry1Ac* 基因表达的菌株^[8]。在 30°C 220r/min 条件下, 将 5 株菌培养至大部分裂解后对菌液进行总蛋白定量和 SDS-PAGE 检测, 根据菌液中总蛋白的浓度将菌液稀释成不同的浓度与饲料混合, 接入玉米螟初孵幼虫, 每个样品 3 次独立重复实验, 培养 7 d 后, 观察并记录实验结果, 计算致死中浓度 (LC₅₀)^[19 - 20]。

2 结果

2.1 PexsY 启动子转录活性分析

本实验室前期完成 *Bacillus thuringiensis* sub sp. *Kurstaki* HD73 全基因组序列测定^[21]。根据 HD73 基因组序列中 *exsY* 基因序列设计引物对 PexsY-410-F、PexsY-410-R 和引物 PexsY-575-R。引物 PexsY-410-F 起始位置设计在基因 ATG 上游 410 bp 处, 引物 PexsY-410-R 起始位点设计在基因 ATG 处; 引物 PexsY-575-R 起始位点设计在基因 ATG 下游 165 bp 处; 在引物 PexsY-410-F 的 5' 端加入 *Hind*III 酶切位点, 在引物 PexsY-410-R 和 PexsY-575-R 的 5' 端加入 *Pst* I 酶切位点, 上游引物 PexsY-410-F 和下游 PexsY-410-R 扩增长度为 410 bp 的 PexsY 启动子; 上游引物 PexsY-410-F 和下游 PexsY-575-R 扩增长度为 575 bp 的 PexsY 启动子; 将上述片段插入到载体 pHT304-48Z 中, 构建不同长度的 PexsY 启动子与 *lacZ* 融合的表达载体, 并转化 HD73 菌株 (图 1)。
β-半乳糖苷酶活性分析结果表明长度为 410 bp 的 PexsY 启动子在芽胞晚期 β-半乳糖苷酶活性较高, 在 T_{14} 达到峰值 (图 2); 长度为 575 bp、含有结构基因 165 bp 的 PexsY 启动子在 SSM 培养基中芽胞晚期 β-半乳糖苷酶活性非常高, 在 T_{16} 达到峰值, 之后 4 h 内保持高的转录活性。结果显示含有 165 bp 结构基因的 PexsY 启动子转录活性远高于不含结构基因的 PexsY 启动子。因此, 本实验选取含有 165 bp 结构基因的 PexsY 启动子进行载体构建。

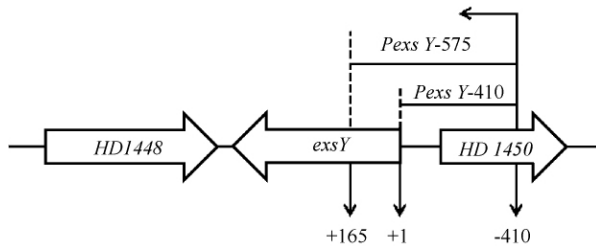


图 1. *exsY* 基因启动子片段示意图

Figure 1. The schematic diagram of *exsY* gene promoter fragment.

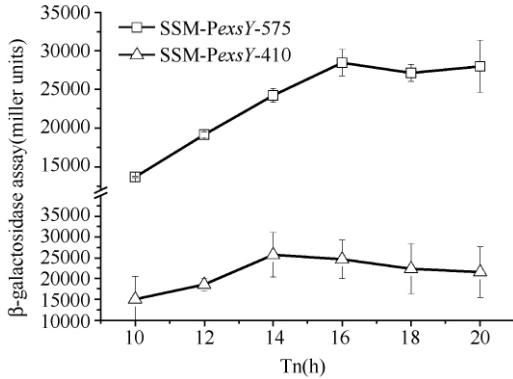


图 2. *PexsY* 启动子转录活性分析

Figure 2. The transcriptional activity of the *exsY* promoter.

2.2 pHT315-PexsY-1Ac 表达载体构建

根据 *exsY* 基因序列, 设计上游引物 *PexsY-F* 和下游 *PexsY-R*, 引物 *PexsY-F* 起始位置设计在基因 ATG 上游 410 bp 处, 在引物 *PexsY-F* 的 5' 端加入 *Sal I* 酶切位点, 引物 *PexsY-R* 起始位点设计在基因 ATG 下游 165 bp 处, 同时引物 *PexsY-R* 的 5' 端加入 TAA 密码子, 以终止 *exsY* 基因的翻译读码框; Bt HD73 菌株是本实验室应用的模式菌株, 只编码一种 Cry 蛋白即 *Cry1Ac*, *cry1Ac* 基因 ORF 长度为 3537 bp, 分析 *cry1Ac* 基因及其 SD 序列 (RBS) GGAGG (为 *cry1Ac* 基因 ATG 上游 6-11 bp), 本文在构建时, 保留了 *cry1Ac* 基因自身的 SD 序列。上游引物 1Ac-F 起始位置设计在基因 ATG 上游 15 bp 处, 下游引物 1Ac-R 起始位点设计在基因 ATG 下游 3547 bp 处, 在引物 1Ac-R 的 5' 端加入 *Sph I* 酶切位点, 引物设计如图 3。重叠 PCR 产物和 pHT315 载体经 *Sal I* 和 *Sph I* 双酶切后, 连接转化 *E. coli* TG1, 得到重组质粒 pHT315-PexsY-1Ac (图 4)。

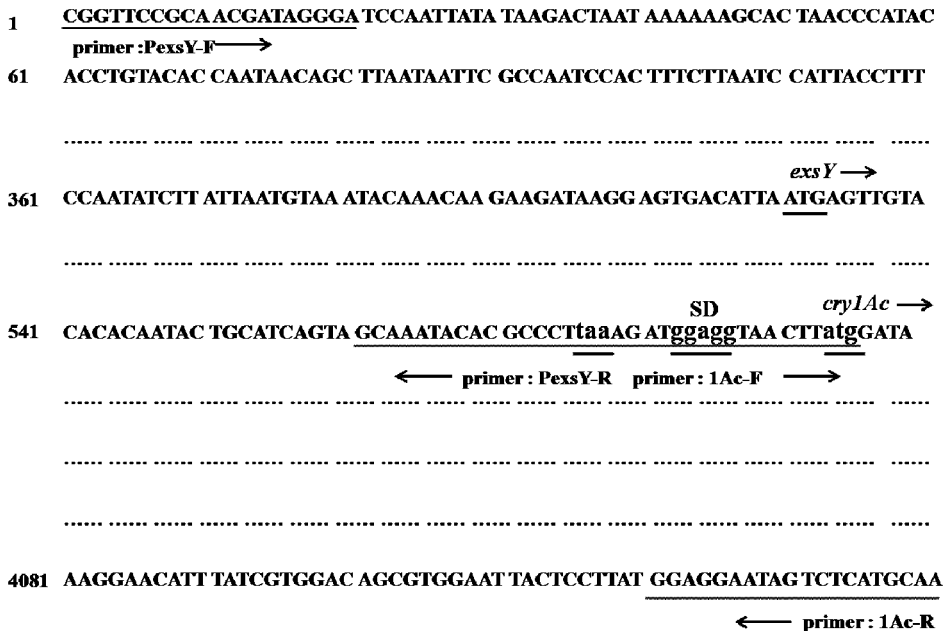


图 3. 重叠片段引物设计

Figure 3. Overlapping fragments primers design.

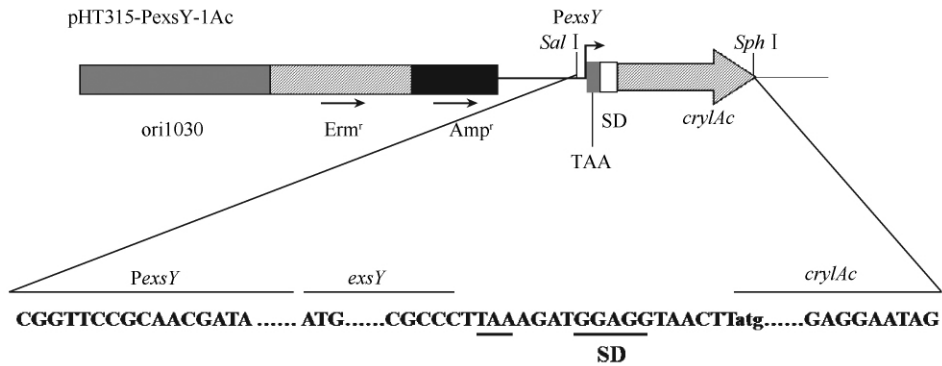


图 4. pHT315-PexsY-1Ac 的物理图谱及表达区序列

Figure 4. Physical map and expression region sequence of pHT315-PexsY-1Ac.

2.3 PexsY 指导 cry1Ac 基因表达

重组质粒 pHT315-PexsY-1Ac 转入 *E. coli* ET 中, 提取 ET 中质粒转入 Bt HD73⁻ 中, 得到 HD-PexsY1Ac-315 菌株。以 HD73、HD-P3A1Ac-315、HD-P8E1Ac-315 为阳性对照, 以 HD73⁻ 无晶体突变株为阴性对照, 在 SSM 培养基中培养至部分裂解后进行透射电镜观察, 在 HD73⁻ 菌株中无晶体存在 (图 5-A), 而在 HD-PexsY1Ac-315 菌株中可观察到菱形晶体 (图 5-B), 与 HD-P3A1Ac-315 和 HD-

P8E1Ac-315 中结果相似 (图 5-C、D)。在 SSM 培养基中培养至 T_{24} , 比较 Cry1Ac 蛋白产量, 结果显示 HD-PexsY1Ac-315 能够表达 133kDa 的 Cry1Ac 蛋白; 在总蛋白量一致的情况下, cry8E 启动子表达 Cry1Ac 量最高, 比野生型 HD73 表达 Cry1Ac 量高, 与李朝睿的研究结果一致; 而 PexsY 启动子和 cry3A 启动子表达量相对较低, 产量接近, HD73⁻ 无晶体突变株不表达 Cry1Ac 蛋白 (图 6)

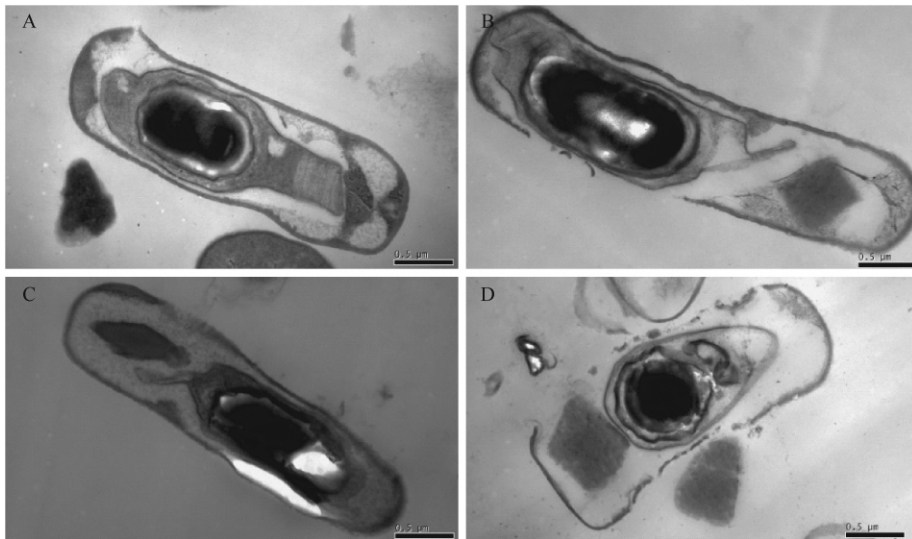


图 5. Bt 菌株的透射电镜观察

Figure 5. Transmission electron microscope observation of Bt strains. A: HD73⁻; B: HD-PexsY1Ac-315; C: HD-P3A1Ac-315; D: HD-P8E1Ac-315.

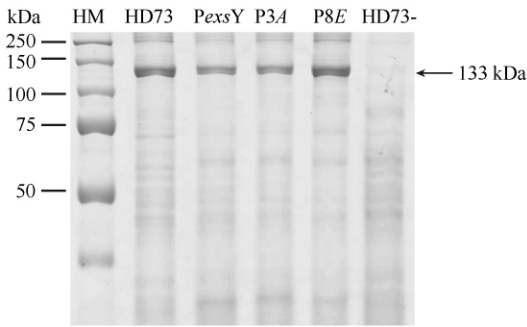


图 6. Bt 菌株中 *Cry1Ac* 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 6. SDS-PAGE analysis for *Cry1Ac* protein in Bt strains.

2.4 生物活性分析

进行了菌株 HD-PexsY1Ac-315 对亚洲玉米螟初孵幼虫生物活性测定, 以野生型 HD73、菌株 HD-P3A1Ac-315 和 HD-P8E1Ac-315 为阳性对照, 以 HD73⁻ 无晶体突变株为阴性对照, 结果表明 HD-PexsY1Ac-315 对亚洲玉米螟具有很高的杀虫活性, LC₅₀ 为 1.76 μg/mL; HD-P3A1Ac-315 的 LC₅₀ 为 1.40 μg/mL 与 HD-PexsY1Ac-315 相似; HD73 和 HD-P8E1Ac-315 的 LC₅₀ 分别为 0.81 μg/mL 和 0.66 μg/mL, LC₅₀ 约为 HD-PexsY1Ac-315 的 1/2 (表 3), 说明 HD73 和 HD-P8E1Ac-315 的杀虫活性高于 HD-PexsY1Ac-315; HD73⁻ 无晶体突变株对亚洲玉米螟无杀虫活性。以上结果表明非 *cry* 基因启动子指导表达的 *Cry* 蛋白具有杀虫活性。图 7 中显示了各菌株所用生测菌液总蛋白浓度为 2 μg/mL 时对玉米螟初孵幼虫进行生测的结果, 左侧均为阴性对照, 虫体生长正常, 右侧均为生测后试虫, 生长极其缓慢或死亡。7-A 为 HD-PexsY1Ac-315、7-B 为 HD73、7-C 为 HD-P3A1Ac-315、7-D 为 HD-P8E1Ac-315、7-E 为 HD73⁻。菌株之间在杀虫效果上差别不大。

表 3. Bt 菌株对亚洲玉米螟的杀虫活性

Table 3. The insecticidal activity of Bt strains against

Ostrinia furnacalis

Sample	LC ₅₀ / (μg/mL)	95% confidence
HD-PexsY1Ac-315	1.76	1.48 - 2.08
HD73	0.81	0.64 - 1.00
HD-P3A1Ac-315	1.40	0.98 - 1.95
HD-P8E1Ac-315	0.66	0.36 - 1.07
HD73 ⁻	NA	NA

NA: No activity.



图 7. Bt 菌株生测结果

Figure 7. The result of insecticidal activity of Bt strains against *Ostrinia furnacalis*. A: HD-PexsY1Ac-315; B: HD73; C: HD-P3A1Ac-315; D: HD-P8E1Ac-315; E: HD73⁻.

3 讨论

苏云金芽胞杆菌制剂对人畜无害、不污染环境、无残留、生产原料及杀虫成分为天然产物、能保持生态平衡等优点, 从 1961 年注册应用以来, Bt 在害虫防治中发挥了巨大的作用^[5]。尽管 Bt 制剂有着很好的商业前景, 但其在应用方面远不及化学杀虫剂, 提高菌株自身的杀虫活性或扩大其杀虫谱可提高 Bt 制剂的应用范围。Bt 杀虫主要成分是晶体蛋白, 提高晶体蛋白的含量是提高 Bt 制剂杀虫活性的有效途径之一^[22]。

Cry 蛋白的表达主要受启动子的转录活性和转录后 mRNA 的稳定性的影响^[5-6]。启动子是 RNA 聚合酶结合区域, 其结构直接关系到基因的表达效率; mRNA 的稳定性在基因表达过程中起着重要的作用^[23], mRNA 的稳定性主要由 3'端和 5'端的特殊结构决定, 3'端可形成茎环结构防止 mRNA 被降解, 5'端起重要作用的是 SD 序列 (Shine-Dalgarno sequence), SD 序列与核糖体 30S 亚基结合保护 mRNA 不受核酸酶的降解^[5]。

ExsY 是存在 Bc 族中的芽胞外壁的基质结构蛋白, *exsY* 基因在芽胞晚期由 σ^K 控制起始转录^[9]。*PexsY* 启动子在晚期活性非常高, 本研究利用该启动子表达 *cry1Ac* 基因, 能形成晶体且对玉米螟存在杀虫活性。这也是首次成功利用非 *cry* 基因启动子表达 *cry* 基因, 为遗传改良 Bt 生物杀虫剂提供了新的思路; *PexsY* 启动子在芽胞晚期起始基因的转录, 多数 *cry* 基因启动子是在芽胞早起起始基因转录, 如 *cry1Ac*、*cry3Aa*、*cry8Ea* 等, 由于 *PexsY* 启动子与 *cry* 启

动子调控机制不同,在同一工程菌内分别转入含有早期转录的 *cry* 基因启动子表达 *cry* 基因和 *PexsY* 启动子表达 *cry* 基因的表达载体,使得在不同的时间内起始表达 *cry1Ac* 基因,进而提高 Cry 蛋白的产量。

参考文献

- [1] Aronson AI, Shai Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 195 (1):1-8.
- [2] Gerhardt P, Pankratz HS, Scherrer R. Fine structure of the *Bacillus thuringiensis* spore. *Applied and Environmental Microbiology*, 1976, 32 (3):438-440.
- [3] Baum JA, Malvar T. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 1995, 18 (1):1-12.
- [4] Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 2010, 18 (5):189-194.
- [5] Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (21):6027.
- [6] Shao Z, Yu Z. High expression mechanism of insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2000, 8 (12):173-176. (in Chinese)
邵宗泽, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白超量表达的机制. *生命科学*, 2000, 8 (12):173-176.
- [7] Mahadeva Swamy H, Asokan R, Thimmegowda GG, Mahmood R. Expression of *cry3A* gene and its toxicity against Asian Gray Weevil *Myloecerus undecimpustulatus undatus* Marshall (*Coleoptera: Curculionidae*). *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53 (8):664-676.
- [8] Li C, Du L, Peng Q, Liang Y, Gao J, Zhang J, Song F. Construction of high-level expression vector for *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology China*, 2013, 40 (2):350-361. (in Chinese)
李朝睿, 杜立新, 彭琦, 梁影屏, 高继国, 张杰, 宋福平. 苏云金芽孢杆菌高效表达载体的构建. *微生物学通报*, 2013, 40 (2):350-361.
- [9] Boydston JA, Yue L, Kearney JF, Turnbough CL. The ExsY protein is required for complete formation of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (21):7440-7448.
- [10] González Jr J, Dulmage HT, Carlton BC. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 1981, 5 (3):351-365.
- [11] Agaisse H, Lereclus D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIII A* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 1994, 13 (1):97-107.
- [12] Arantes O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 1991, 108 (1):115-119.
- [13] Schaeffer P, Millet J, Aubert JP. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1965, 54 (3):704.
- [14] Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, Lecadet MM. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 60 (2):211-217.
- [15] Zhu L, Peng Q, Song F, Jiang Y, Sun C, Zhang J, Huang D. Structure and regulation of the *gab* gene cluster, involved in the γ -aminobutyric acid shunt, are controlled by a σ^{54} factor in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (1):346-355.
- [16] Liu R, Yu G, Zou W, Du T. Improvements in technique of madding ultrathin section for transmission electron microscope. *Jiangxi Forestry Science and Technology*, 2008, 1:11. (in Chinese)
刘仁林, 虞功清, 邹伟民, 杜天真. 植物透射电镜样品制备技术的改进. *江西林业科技*, 2008, 1:11.
- [17] Xu B, Zhang Y, He K, Wang Z, Peng Y, Gan X, Yang J. The research of plant TEM sample preparation technology. *Chinese Wild Plant Resources*, 2006, 25 (3):41-43. (in Chinese)
徐柏森, 张耀丽, 何开跃, 王章荣, 彭冶, 甘习华, 杨静. 植物透射电镜样品制备技术探讨. *中国野生植物资源*, 2006, 25 (3):41-43.
- [18] Ausubel FM, Brent R, Kingston R. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 等译. 北京: 科学出版社, 1999:334-338.
- [19] Abbott W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1987, 3 (2):302-303.
- [20] Ibarra J, Federici B. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1987, 3 (2):187.
- [21] Liu G, Song L, Shu C, Wang P, Deng C, Peng Q, Lereclus D, Wang X, Huang D, Zhang J, Song F. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. *Genome Announcements*, 2013, 1 (2).
- [22] Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9 (3):283-300.
- [23] Murray EE, Rocheleau T, Eberle M, Stock C, Sekar V, Adang M. Analysis of unstable RNA transcripts of insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants and electroporated protoplasts. *Plant Molecular Biology*, 1991, 16 (6):1035-1050.

Expression of *cry1Ac* gene directed by *PexsY* promoter of the *exsY* gene encoding component protein of exosporium basal layer in *Bacillus thuringiensis*

Qingyun Zheng^{1,2}, Guannan Wang^{1,2}, Zhe Zhang², Ning Qu^{1,2}, Qi Peng², Jie Zhang², Jiguo Gao^{1*}, Fuping Song^{2*}

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

²State 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 discover new elements for *cry* gene expression, *PexsY*, which is the promoter of the exosporium basal layer structural gene *exsY*, was used to express *cry1Ac* gene in *Bacillus thuringiensis*. [Methods] We used beta-galactosidase assays by promoter-lacZ fusion to analyze the transcriptional activity of *exsY* promoter and truncated *exsY* promoter. The *cry1Ac* gene was directed by the non-*cry* gene promoter *PexsY* and was then expressed in *Bacillus thuringiensis* HD73. Transmission electron microscope (TEM) was used to observe the formation of crystal inclusion. The Cry1Ac yields were evaluated by protein quantification and SDS-PAGE analysis. Bioassays against *Ostrinia furnacalis* were used for the functional verification. [Results] Beta-galactosidase assays showed that the *exsY* promoter had a strong transcriptional activity in the acrySTALLIFEROUS mutant strain HD73⁻ on the late sporulation phase. Cry1Ac expression products directed by the *PexsY* could form diamond crystals. SDS-PAGE analysis showed that the *cry1Ac* gene directed by the *cry8E* promoter has the highest protein yield among the four promoters while the *cry1Ac* gene under the direction of *PexsY* or *cry3A* promoters showed similar protein yields. The bioassay results showed that the Cry1Ac protein directed by the *PexsY* promoter was toxic against *Ostrinia furnacalis*. [Conclusion] The *cry1Ac* gene under the direction of the non-*cry* gene promoter *PexsY* was able to express the Cry proteins at the late sporulation phase and could form crystal inclusion in a *B. thuringiensis* strain. Our finding provides application potential for the genetically modification of engineered Bt strains.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *PexsY* promoter, Cry1Ac

(本文责编:王晋芳)

Supported by the grant from the National Natural Science Foundation (31270111) and by the National High Technology Research and Development Program of China (2011AA10A203)

Corresponding author. Fuping Song, Tel: + 86-40-62896634, E-mail: fpsong@ippcaas.cn; Jiguo Gao, Tel: + 86-43359990992, E-mail: gaojiguo1961@hotmail.com

Received: 31 December 2013 / Revised: 17 February 2014