

# 苏云金芽胞杆菌 G03 *spoIVF* 操纵子敲除 对芽胞和晶体形成的影响

孙长坡<sup>1,2</sup> 宋福平<sup>1</sup> 张 杰<sup>1</sup> 黄大昉<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院植物保护所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100094)

(<sup>2</sup>中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

**摘 要:** *spoIVF* 是一个普遍存在于芽胞杆菌中的操纵子。在枯草芽胞杆菌中,它编码的两个蛋白是芽胞形成所必需的。采用基因重组技术敲除了苏云金芽胞杆菌 G03 菌株中的 *spoIVF* 操纵子,构建了 *spoIVF* 缺失株 G03 (*spoIVF*<sup>-</sup>)。研究表明,该突变株丧失了形成芽胞和晶体的能力。*lacZ* 基因与 *cryIAa* 基因的启动子融合表达分析发现,突变株中的 *cryIAa* 基因的活性严重降低。利用载体 pSTK 携带 *spoIVF* 操纵子在突变株中的表达,使突变株部分恢复了产胞和形成杀虫晶体蛋白的能力。这说明 *spoIVF* 操纵子是所必需的,同时该操纵子还影响  $\sigma^F$  因子控制的 *cryIAa* 基因表达。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌;芽胞;晶体;*spoIVF* 操纵子

中图分类号:Q78;Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)04-0583-05

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)是一类可以产生芽胞的革兰氏阳性、杆状细菌。它在形成芽胞的同时,还可以在生长的中后期产生一类对昆虫具有毒杀作用的晶体蛋白<sup>[1]</sup>。当前的研究表明,参与芽胞形成的重要调控因子  $\sigma^F$  和  $\sigma^K$  通过识别 *cry1* 或 *cry2* 类杀虫晶体蛋白基因的双启动子 Bt I 和(或)Bt II 来直接控制绝大多数 *cry* 基因的转录<sup>[2]</sup>,而其它与芽胞形成相关的因子是否影响 *cry* 基因表达的研究还未开展。

枯草芽胞杆菌是研究芽胞形成的模式菌。研究发现,芽胞形成的调控是通过级联反应实现的。随着菌体密度增加、营养匮乏等不利因素的出现, Spo0A 因子被激活,这标志着芽胞形成的开始。在芽胞形成的不同阶段,通过信号蛋白在母细胞和前芽胞之间的信号传导,控制着众多基因表达的  $\sigma^F$ 、 $\sigma^E$ 、 $\sigma^G$  和  $\sigma^K$  因子依次被激活<sup>[3]</sup>。*spoIVF* 是信号传导通路上的一个重要操纵子,该操纵子编码两个蛋白 SpoIVFA 和 SpoIVFB,这两个蛋白与 bofA 形成复合体,并被 SpoIVB 蛋白激活后再通过级联反应激活下游的  $\sigma^K$  因子。SpoIVFB 切去 pro- $\sigma^K$  的 N 端部分氨基酸来激活  $\sigma^K$  因子,而 SpoIVFA 对于复合体在芽胞外膜上的定位起着重要作用。在枯草芽胞杆菌中,阻断该操纵子表达则阻碍成熟芽胞的形成<sup>[7,8]</sup>。有关

*spoIVF* 操纵子是否在苏云金芽胞杆菌的芽胞和晶体形成过程中起着重要作用以往未见报道。

本试验通过同源重组的方法敲除了苏云金芽胞杆菌 G03 菌株中的 *spoIVF* 操纵子后获得了相应的缺失突变株。并分析了突变株形成芽胞、晶体以及产生杀虫晶体蛋白的能力。互补实验使突变株产生芽胞和杀虫晶体蛋白的能力得到了部分恢复。进一步利用报告基因 *lacZ* 与 *cryIAa* 基因的启动子融合表达初步分析了突变株不能产生芽胞和晶体的原因。这为深入开展苏云金芽胞杆菌的芽胞形成和晶体产生机制研究提供了一定的借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养基:**表 1 为本研究所用菌株与质粒。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);苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*)的培养采用 1/2 LB 培养基。

**1.1.2 主要试剂:**Taq DNA 聚合酶购自于鼎国生物技术公司;KOD DNA 聚合酶购自于 TOYOBO 生物技术公司;PCR 产物回收试剂盒购自于 BBI 公司;相关的内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自于北京六合通公

基金项目:国家 973 项目(2003CB114201);国家 863 计划(2006AA022189)

\* 通讯作者。Tel:86-10-62896634;Fax:86-10-62812642;E-mail:dfh313@public.bta.net.cn

作者简介:孙长坡(1975-)男,山东梁山人,博士研究生,主要从事 Bt 功能基因组学的研究。Tel 86-10-62817545;E-mail:zhpsun@163.com

收稿日期:2006-12-25;接受日期:2007-01-09;修回日期:2007-05-23

司。其它生化试剂和抗生素均为进口或国产生化级 或分析纯级试剂。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant characteristic	Resource
<i>E. coli</i> JM110	<i>rplI thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	This Lab
<i>B. thuringiensis</i> G03	<i>B. thuringiensis</i> strain ,wild- type	This Lab
G03( <i>spoIVF</i> -)	Mutant strain of <i>B. thuringiensis</i> G03 ,in which the <i>spoIVF</i> operon was deleted by homologous recombinant	This study
G03( <i>spoIVF</i> -) complement strain	The <i>spoIVF</i> operon was introduced into the G03( <i>spoIVF</i> -) mutant strain by the vector of pSTK	This study
G03( <i>spoIVF</i> -)- <i>PeryIAa-lacZ</i>	The G03( <i>spoIVF</i> -) mutant strain contains p HT315( <i>P1Aa'-lacZ</i> )	This study
pRN5101	Amp <sup>r</sup> ,Em <sup>r</sup> ,Temperature-sensitive vector containing the <i>ori</i> ( Ts) and <i>erm</i> of pE194ts and the <i>oriEc</i> ,amp <sup>r</sup> and multi cloning region of pBR322	Lereclus D
pRIVF	pRN5101 carried the deleted alle of <i>spoIVF</i> operon	This study
pHT315( <i>P1Aa'-lacZ</i> )	Amp <sup>r</sup> ,pHT315 carrying <i>PeryIAa-lacZ</i>	This lab
pSTK	Kan <sup>r</sup> , <i>E. coli</i> -Bt shuttle vector 8.5kb	This lab
pSIVF	Kan <sup>r</sup> ,pSTK carrying <i>spoIVF</i> operon	This study

## 1.2 细菌的培养条件

苏云金芽胞杆菌在 30℃ 培养 ;只是在敲除突变过程中 ,苏云金芽胞杆菌的培养温度为 40℃ ,摇床转速为 200r/min ,红霉素使用浓度为 5μg/mL。 *E. coli* JM110 在 37℃ 培养 ,摇床转速为 230r/min ,氨苄霉素使用浓度为 100μg/mL ,红霉素使用浓度为 5μg/mL ,卡那霉素使用浓度为 100μg/mL。

## 1.3 DNA 操作和转化

大肠杆菌质粒提取及转化 ,DNA 片段纯化参考文献 [9]。苏云金芽胞杆菌总 DNA 提取和电击转化参考文献 [10]。序列比对和搜索使用美国国立生物技术信息中心( NCBI)的基本工具 PSI-BLAST 及 BLASTX。根据苏云金芽胞杆菌 YBT1520 菌株的基因组序列设计了一对引物 ,分别为 P1 :5'-CCCAAGCTTCTATTCCAAAATGGTTAAAC-3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点)和 P2 :5'-CGCGGATCCAACTTAGACGTAGTAATGGG-3'(下划线为 *Hind*III 酶切位点)。以 G03 的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增 ,扩增的 DNA 片段包括 *spoIVF* 操纵子(1.6kb)和侧翼的 DNA 片段 ,总长度为 3.2kb。

PCR 反应采用 50μL 体系 ,反应条件 94℃ 4min ; 94℃ 30s ,53℃ 30s ,68℃ 1min ,30 个循环 ;68℃ 10min。

## 1.4 *spoIVF* 操纵子敲除突变株的构建

根据 G03 菌株中的 *spoIVF* 操纵子及上下游片段的 DNA 序列设计一条引物 P3 :5'-AAGAA GGGAGACAGTTGTTGACGTTAGCAC-3' ,与引物 P1 配对扩增侧翼上游 800bp 的 DNA 片段 ;设计一条引物 P4 :5'-GTGCTAACGTCAACAACCTGTCT CCCTTCTT-3' ,与引物 P2 配对扩增侧翼下游 800bp 的 DNA 片段。

利用引物 P2 和 P4 采用重迭 PCR 的方法获得了缺失 *spoIVF* 操纵子的重迭 DNA 片段(1.6kb)。再将重迭片段经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切处理后连接到温敏、穿梭载体 pRN5101 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点之间 ,得到了重组质粒 pRIVF。

将重组质粒 pRIVF 电击转入 G03 菌株。在红霉素抗性平板上筛选转化子 ,并用引物 P1 和 P2 进行 PCR 验证。将正确的转化子在 30℃ 扩增培养后 ,再在 40℃ 培养指数生长中期 ;然后稀释适当的倍数涂布 LB 平板并置于 40℃ 过夜培养。将菌落同时转接到添加红霉素的 LB 平板和 LB 平板上 ,在 30℃ 培养。挑取红霉素敏感菌株培养 ,并以引物 P1 和 P2 筛选突变株。因为质粒 pRIVF 在 40℃ 时不能复制 ,故菌株丢失了红霉素抗性( Ems ) 并只含有重迭 PCR 产物的菌株应该是发生了同源双交换。进一步提取总 DNA 进行 PCR 验证。

## 1.5 *spoIVF* 操纵子互补株的构建

根据 G03 中 *spoIVF* 操纵子序列 ,设计扩增全长操纵子的一对引物 :P5 :5'-CGCGGATCCGATGAAG AATAGACGCGTAGA-3'( *Bam*H I )和 P6 :5'-ACGC GTCGACCTAACCGATTAATTCCTTCAA-3'( *Sal* I )。扩增的 DNA 片段经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切处理后插入到载体 pSTK 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点之间 ,获得重组质粒 pSIVF。将互补载体 pSIVF 电击导入突变株 G03(*spoIVF*-)中 ,利用卡那霉素和 PCR 筛选 *spoIVF* 操纵子的互补株。

## 1.6 Bt 菌株产生芽胞、晶体和杀虫蛋白能力的分析

利用光学显微镜和电子扫描显微镜观察 Bt 菌株产生芽胞和形成晶体的能力。菌株产生杀虫蛋白的能力利用 SDS-PAGE 分析 ,方法参见金冬雁等 [11]。

## 1.7 $\beta$ -半乳糖苷酶活分析

将 Bt 菌株按 1% 接种量接种于 50mL 含红霉素的 1/2LB 培养液中, 30°C 振荡培养。当培养 8h 后开始取样, 以后每隔 2h 取样一次, 每次取样 200 $\mu$ L, 同时测定样品  $A_{600}$  的值, 立即将样品置于 -20°C 保存。冰上超声波破碎细胞样品后, 加入 1 滴氯仿于细胞样品中振荡混匀, 经上述处理的样品, 加入 0.8mL Z 缓冲液 (0.06mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.04mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01mol/L KCl 0.001mol/L  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  0.05mol/L  $\beta$ -巯基乙醇, pH 7.0), 0.2mL ONPG (邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷) (4mg/mL ONPG 溶于 Z 缓冲液) 后开始计时。当出现淡黄色反应时, 立即加入 1mL 1mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应, 记录反应时间, 测定样品的  $A_{420}$  和  $A_{550}$  值。按下列公式计算  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。酶活性的单位数 =  $1000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{550}) / t \times V \times A_{600}$   $t$  为反应时间 (分钟),  $V$  为参加反应的样品体积 (mL),  $A$  为不同波长下的吸光值。求得 3 次重复测定的平均值。

## 2 结果和分析

### 2.1 *spoIVF* 操纵子的克隆和序列分析

从 G03 菌株中扩增出的 *spoIVF* 操纵子全长为 1.6kb (GenBank 接受号为 DQ786005)。序列分析表明, G03 *spoIVF* 操纵子的核苷酸序列与苏云金芽胞杆菌 YBT-1520、Bt 97-27、炭疽芽胞杆菌 (*B. anthracis* Ames) 蜡样芽胞杆菌 (*B. cereus* ATCC 14579) 和枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis* 168) 的 *spoIVF* 操纵子的同源性分别为 99%、88%、86%、90% 和 66%。说明 *spoIVF* 操纵子在芽胞杆菌属中, 尤其是在蜡样芽胞杆菌族中具有较强的保守性。

### 2.2 G03 *spoIVF* 操纵子敲除突变株的获得

以红霉素敏感菌株的总 DNA 为模板, 利用引物 P1 和 P2 进行 PCR 筛选。电泳检测发现大部分菌株扩增出了 3.2kb 的条带, 这与作为对照的 G03 菌株的 PCR 扩增产物相同。最终发现 5 个菌株只扩增出了 1.6kb 的条带, 与缺失了 *spoIVF* 操纵子的重迭 DNA 片段大小相同。这个结果说明在突变株的基因组中, *spoIVF* 操纵子 (1.6kb) 确实已被敲除, 随即一株定名为 G03 (*spoIVF*-)。

### 2.3 突变株产生芽胞和晶体的能力

将出发菌株 G03 和突变株 G03 (*spoIVF*-) 在 1/2LB 液体基中, 30°C 振荡培养 72h 后, 用电子显微镜观察不同菌株的芽胞和晶体形成情况。结果表明,

出发菌株 G03 的细胞已经完全裂解, 并释放出大量卵圆形的芽胞和菱形晶体 (图 1-A)。而突变株 G03 (*spoIVF*-) 则仍然以营养体的形式存在, 没有芽胞和晶体产生 (图 1-B)。再经过 24h 培养后, 突变株的营养体开始自溶, 最终也没有芽胞和晶体产生。这说明 *spoIVF* 操纵子的缺失导致 G03 菌株丧失了产生芽胞和晶体的能力。

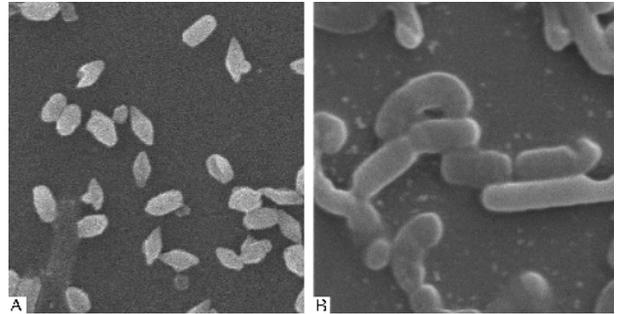


图1 Bt 菌株 G03 (A, 8000 $\times$ ) 和突变株 G03 (*spoIVF*-) (B, 9900 $\times$ ) 的扫描电镜照片

Fig.1 Photo of Bt G03 strain (A, 8000 $\times$ ) and G03 (*spoIVF*-) (B, 9900 $\times$ ) mutant strain with scanning electron microscope.

### 2.4 突变株产生杀虫蛋白的能力

出发菌株 G03 和突变菌株 G03 (*spoIVF*-) 在 1/2 LB 液体培养基中培养 36h, 并稀释定容至相同的浓度。SDS-PAGE 分析表明, 出发菌株 G03 可以产生大量 130kDa 的杀虫蛋白 (图 2 lane 1), 而突变株只能产生少量 130kDa 的杀虫蛋白 (图 2 lane 2)。这说明 *spoIVF* 操纵子缺失后, 杀虫蛋白的表达量因严重降低而不能形成晶体。

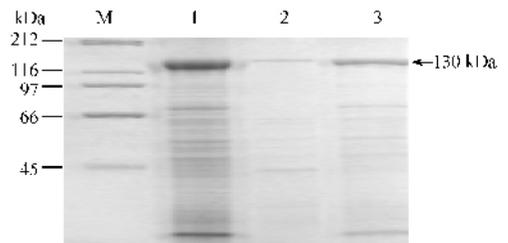


图2 出发菌株 G03 和突变株 G03 (*spoIVF*-) 产生杀虫晶体蛋白能力的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the ability of production of ICPs. M: protein Marker; Lane 1: G03 wild strain; Lane 2: G03 (*spoIVF*-) mutant strain; Lane 3: complement strain.

### 2.5 互补菌株产生芽胞和杀虫晶体能力的分析

电子显微镜观察发现互补株产生的芽胞和形成杀虫蛋白晶体量较少 (电镜图片略)。从图 2 可以看出互补菌株 (图 2 lane 3) 产生杀虫晶体蛋白的量比突变株 G03 (*spoIVF*-) 产生的量大, 而比出发 G03 菌株产生的杀虫晶体蛋白量少。这表明突变株形成芽

胞和杀虫晶体蛋白的能力得到了部分恢复。并进一步说明苏云金芽胞杆菌产生芽胞和杀虫晶体蛋白受 *spoIVF* 操纵子的影响。

## 2.6 *spoIVF* 突变株中 $\sigma^E$ 和 $\sigma^K$ 的活性分析

将携带 *lacZ* 基因与 *cryIAa* 基因启动子融合片段的重组载体 pHT1Aa( 另文发表 ) 分别导入出发菌株 G03、突变株 G03( *spoIVF*<sup>-</sup>) 和互补菌株中, 在 1/2LB 液体培养基中 30℃ 培养。从第 8 小时开始, 每隔 2h 测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。结果显示( 图 3 ), 出发菌株 G03 在第 8 小时可以检测到  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性。随着培养时间的延长, 酶的活性不断增强, 并在第 26 小时达到第一个高峰, 然后酶的活性逐渐下降, 并在第 30 小时降到最低点后上升。在第 34 小时又出现一个峰值, 然后酶的活性又再一次降低。在突变株 G03( *spoIVF*<sup>-</sup>) 和互补株中,  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性也可在第 8 小时检测到。随着培养时间的延长, 突变株 G03( *spoIVF*<sup>-</sup>) 的酶活略有增加, 但上升很慢, 而互补株的  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性得到一定的恢复, 并表现了与出发菌株 G03 相同的趋势。这说明 *spoIVF* 操纵子的缺失很可能导致突变株 G03( *spoIVF*<sup>-</sup>) 中的  $\sigma^E$  和  $\sigma^K$  因子的活性降低。而通过载体 PSIVF 将 *spoIVF* 操纵子导入突变株 G03( *spoIVF*<sup>-</sup>) 使  $\sigma^E$  和  $\sigma^K$  因子的活性得到了部分恢复。

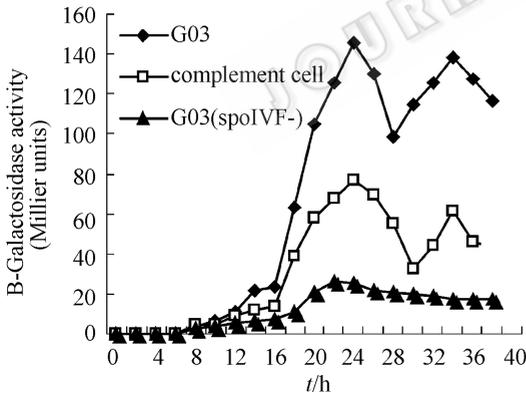


图 3 含有 *cryIAa'*-*lacZ* 质粒的 G03 菌株、突变株 G03( *spoIVF*<sup>-</sup>) 和互补株的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性

Fig.3 *CryIa*a-directed  $\beta$ -galactosidase expression in G03 wild strain, G03( *spoIVF*<sup>-</sup>) mutant strain and complement strain harbouring pHT315( *P1Aa'*-*lacZ* ).

## 3 讨论

基因敲除技术是研究芽胞杆菌基因功能的有效途径之一<sup>[12]</sup>。与出发菌株 G03 相比, *spoIVF* 操纵子缺失突变株丧失了产生芽胞和晶体的能力。互补株产生的芽胞、晶体和杀虫蛋白的量相对于出发菌株

G03 较少, 这可能是由于我们使用的为营养期 *cry3A* 基因的启动子<sup>[13]</sup>, 从而使 *spoIVF* 操纵子上的基因在互补菌株中的表达与在出发菌株中的表达出现时空差异, 并影响了互补效果。如果利用 *spoIVF* 本身的启动子可能效果要好的多。

在枯草芽胞杆菌中, *spoIVF* 操纵子是由芽胞形成调控网络上游的  $\sigma^E$  因子控制转录的<sup>[14]</sup>。 *spoIVF* 操纵子编码的蛋白特异存在于母细胞中, 并在芽胞形成的第四阶段激活  $\sigma^K$  因子。因此, 若这一途径正确并运用于苏云金芽胞杆菌, 当 *spoIVF* 操纵子被敲除以后, 不应该影响到  $\sigma^E$  因子的活性和主要由  $\sigma^E$  因子控制的 *cryIAa* 基因的转录和表达。但报告基因 *lacZ* 与 *cryIAa* 基因的启动子融合表达分析表明: 在突变株中  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性远低于出发菌株中的活性, 这间接地反映出 *spoIVF* 操纵子的缺失导致了  $\sigma^E$  因子的活性降低。据此推论, 这也可能是菌株在丧失产生芽胞能力的同时, 亦不能大量表达杀虫晶体蛋白和产生晶体的原因。如果排除其它因素的影响<sup>[15]</sup>, 可以将 *cryIAa* 基因的活性变化作为反映  $\sigma^E$  和  $\sigma^K$  因子活性变化的报告基因。

这是首次在苏云金芽胞杆菌中研究发现 *spoIVF* 操纵子缺失不但导致  $\sigma^E$  因子的活性降低, 而且还影响到芽胞和杀虫蛋白晶体不能形成。因此, 在芽胞形成的过程中可能存在着更为复杂的调控机制, 该设想有待进一步证实。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Schnepf E, Crickmore N, Van J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998 **62**(3): 775 - 806.
- [ 2 ] Sedlak M, Walter T, Aronson A. Regulation by overlapping promoters of the rate of synthesis and deposition into crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxins. *Journal of Bacteriology* 2000, **182**(3): 734 - 741.
- [ 3 ] Hibert DW, Piggot PJ. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004 **68**: 234 - 262.
- [ 4 ] Fawcett P, Eichenberger P, Losick R, et al. The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 2000 **97**: 8063 - 8068.
- [ 5 ] Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiology review* 2003, **57**: 1 - 33.
- [ 6 ] James A, Baum, Malvar T. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 1995,

- [ 7 ] Dong TC, Simon Cutting SM. SpoIVB-mediated cleavage of SpoIVFA could Provide the intercellular signal to activate processing of Pro- $\sigma^K$  in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* ,2003 ,**49**( 5 ):1425 – 1434.
- [ 8 ] Kroos L, Yu YT, Mills D, *et al.* Forespore signaling is necessary for pro- $\sigma^K$  processing during *Bacillus subtilis* sporulation despite the loss of SpoIVFA upon translational arrest. *Journal of Bacteriology* 2002 , **184**( 19 ) 5393 – 5401.
- [ 9 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.
- [ 10 ] Kim HS, Sherman D, Johnson F, *et al.* Characterization of a major *Bacillus anthracis* spore coat protein and its role in spore inactivation. *J Bacteriol* 2004 ,**186**( 8 ):2413 – 24171.
- [ 11 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [ 12 ] Duelli DM, Tobin A, Box JM, *et al.* Genetic locus required for antigenic maturation of *Rhizobium etli* CE3 lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* 2001 ,**183** 6054 – 60641.
- [ 13 ] Agaisse H, Lereclus D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cry III A toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant. *Journal of Bacteriology* ,1994 **176**( 15 ): 4734 – 41.
- [ 14 ] Zhang B, Struffi P, Kroos L.  $\sigma^K$  Can negatively regulate sigE expression by two different mechanisms during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* ,1999 **181**( 13 ) 4081 – 4088.
- [ 15 ] Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ,1998 **62**( 3 ) 775 – 806.

## Deletion of *spoIVF* operon affects the sporulation and the production of crystal in *Bacillus thuringiensis* G03

SUN Chang-po<sup>1,2</sup>, SONG Fu-ping<sup>1</sup>, ZHANG Jie<sup>1</sup>, HUANG Da-fang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

(<sup>2</sup> Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract** :The *spoIVF* operon exists in *Bacillus* universally. Two proteins encoded by the *spoIVF* operon are essential for the sporulation of *Bacillus subtilis*. In this study, a *spoIVF* operon disruption mutant G03 (*spoIVF*-) in which the *spoIVF* operon was deleted, was constructed by homologous recombination. The result showed that the mutant strain lost the ability of sporulation. At the same time, the expression of Insecticidal Crystal Protein (ICP) was severely reduced in G03 (*spoIVF*-) mutant strain and resulted in no crystals. The *lacZ* gene was fused with the promoter of the *cryIAa* gene and expressed in mutant strain G03 (*spoIVF*-) and G03 wild strain. The activity of  $\beta$ -galactosidase much lower in mutant G03 (*spoIVF*-) strain than in the wild-type strain. This further suggested that the activity of  $\sigma^E$  and  $\sigma^K$  factors was affected in mutant G03 (*spoIVF*-) strain. The ability of sporulation and production of Insecticide Crystal Protein was complemented by the expression of *spoIVF* operon through the vector of pSTK in the mutant strain. In all, The *spoIVF* operon is essential for the sporulation and the expression of cry gene controlled by  $\sigma^E$  and  $\sigma^K$  factors.

**Keywords** : *Bacillus thuringiensis* ; sporulation ; crystal ; *spoIVF* operon