

## 绿色荧光蛋白基因原核表达载体的构建及其在昆虫肠道短短芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌中的表达

殷幼平<sup>#</sup>, 李强<sup>#</sup>, 袁训娥, 王中康<sup>\*</sup>

(重庆大学生物工程学院, 重庆市杀虫真菌生物农药工程技术中心, 重庆市基因功能与调控重点实验室, 重庆 400030)

**摘要:**【目的】构建带有苏云金芽孢杆菌 *cry3a* 基因非芽孢依赖启动子和绿色荧光蛋白基因 *gfp* (Green Fluorescent Protein) 的原核表达载体, 并转化从桑粒肩天牛幼虫肠道分离的两株常驻细菌短短芽孢杆菌 CQUBb 和苏云金芽孢杆菌 CQUBt, 以检测 *cry3a* 启动子在昆虫肠道常驻菌中的启动子活性, 获得 GFP 标记菌株, 为常驻菌在昆虫幼虫肠道中的定殖情况和杀虫工程菌的构建奠定基础。【方法】采用重叠延伸 PCR 将 *cry3a* 基因启动子和 *gfp* 基因进行融合, 并与 pHT304 载体连接构建重组质粒 pHT3AG, 获得的重组质粒以电脉冲转化肠道常驻菌短短芽孢杆菌 CQUBb 和苏云金芽孢杆菌 CQUBt, 于可见光和荧光显微镜下观察荧光并通过 SDS-PAGE 分析重组菌株的蛋白表达情况, 然后对重组菌株进行生长动力学分析和稳定性测试。【结果】重组菌在营养期大量组成型表达 GFP, 经电泳分离在凝胶上出现约 29 kDa 的特异蛋白条带; 重组菌生长曲线与出发菌没有显著差异, 说明外源质粒未对宿主菌的生长带来明显不利影响; 抗性条件下传代 30 次后两菌株外源质粒稳定性仍可达 95%、67%; 两个菌株比较, CQUBb 比 CQUBt 质粒转化率高、重组菌 GFP 表达时间长、表达量大, 并且重组菌株稳定性好。【结论】成功地将 *cry3a* 基因核心启动子和 *gfp* 基因转入桑粒肩天牛幼虫肠道常驻菌, 实现了该启动子在 Bt 之外的菌株中发挥作用, 构建了两个 GFP 标记菌株; 重组基因工程菌株表达量大, 稳定性好, 可以用作昆虫肠道内微生态研究和芽孢杆菌表达系统以及杀虫菌株的构建。**关键词:** *cry3a* 启动子; 绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP); 肠道常驻菌; 短短芽孢杆菌; 苏云金芽孢杆菌

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2010) 05-0614-07

芽孢杆菌是自然界中常见的微生物, 其中一些菌株有抑菌作用和杀虫作用, 但由于野生菌株特性上的一些缺陷, 还难以广泛的应用。因此定向的改造野生型菌株, 使之适合不同环境、不同靶标的生物防治, 无疑具有重要的理论和现实意义。昆虫的肠道中有着大量的微生物群落, 这些肠道内生菌具有适应昆虫肠道环境、容易定植的特点, 因此利用肠道内生菌作为宿主细胞构建杀虫菌株有其天然的优势, 史艳霞等以棉铃虫肠道芽孢杆菌构建了杀虫工

程菌株, 其定殖能力强, 杀虫活性相对较好<sup>[1]</sup>。苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Protein, ICP) 基因 *cry3a* 的启动子 *pro3a* 为非芽孢依赖型启动子, 在芽孢杆菌的营养期就可以启动转录, 使蛋白的表达时间早, 持续时间更长<sup>[2]</sup>, 所以这个启动子在研究外源基因在芽孢杆菌的表达中有广泛的应用。朱晨光等构建了包含 *pro3a* 和 *AiiA* 基因的重组质粒, 并在 Bt 中实现了大量表达<sup>[3]</sup>; 孙明等曾利用 *pro3a* 来启动其他 ICP

基金项目: 重庆市科委重点攻关项目 (CSTC, 2008AB1009)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-23-65120489; E-mail: zkwang646@sina.com

作者简介: #对文章有同等贡献。殷幼平 (1955-), 女, 重庆长寿人, 教授, 主要从事昆虫生理学及病理学研究, E-mail: yinyouping@cqu.edu.cn; 李强 (1984-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事芽孢杆菌表达系统研究, E-mail: liqiang\_mr@live.cn

收稿日期: 2009-09-25; 修回日期: 2010-02-04

的表达<sup>[4]</sup>。重庆大学基因工程研究中心从桑粒肩天牛幼虫肠道中分离得到 2 株常驻细菌,经鉴定为短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis* CQUBb, GenBank Accession Number: FJ966073)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* CQUBt, GenBank Accession Number: FJ966074), 2 菌株均为桑粒肩天牛幼虫肠道中的可培养常驻优势菌<sup>[5]</sup>。本研究以这两株菌为出发菌株,利用启动子 *pro3a* 和报告基因 *gfp*<sup>[6]</sup>, 采用重叠延伸 PCR (Gene Splicing by Overlap Extension PCR, SOE-PCR) 的方法构建芽孢杆菌表达

载体,将此重组载体导入 2 株野生菌株,构建 GFP 标记菌株,并测试其稳定性,为研究这两株菌株在昆虫肠道内的定殖和微生态、高效生防工程菌株的构建以及芽孢杆菌表达系统的开发奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌种:**研究所用的菌株、质粒及其特征和来源见表 1。

表 1 研究中用到的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Characteristics	References/ Sources
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>Amp</i> <sup>-</sup> , <i>Erm</i> <sup>-</sup>	TAKARA Ltd. JP
<i>Brevibacillus brevis</i> CQUBb	<i>Amp</i> <sup>-</sup> , <i>Erm</i> <sup>-</sup> <i>Amp</i> <sup>-</sup> , <i>Erm</i> <sup>-</sup> , without <i>cry3a</i> gene	Stored in this lab
<i>Bacillus thuringiensis</i> CQUBt	<i>Amp</i> <sup>-</sup> , <i>Erm</i> <sup>-</sup> , without <i>cry3a</i> gene	Stored in this lab
<i>Escherichia coli</i> - pHT3AG	<i>Amp</i> <sup>+</sup> , <i>Erm</i> <sup>+</sup> , carrying pHT3AG	Constructed in this study
CQUBb-pHT3AG	<i>Amp</i> <sup>+</sup> , <i>Erm</i> <sup>+</sup> , carrying pHT3AG	Constructed in this study
CQUBt-pHT3AG	<i>Amp</i> <sup>+</sup> , <i>Erm</i> <sup>+</sup> , carrying pHT3AG	Constructed in this study
plasmid pMD18gfp	<i>Amp</i> <sup>+</sup> , 3.4 kb, carrying <i>gfp</i> gene	Stored in this lab
plasmid pHT305a	<i>Amp</i> <sup>+</sup> , <i>Erm</i> <sup>+</sup> , 12.7 kb, carrying <i>cry3a</i> gene	Dr. Lereclus
plasmid pHT3AG	<i>Amp</i> <sup>+</sup> , <i>Erm</i> <sup>+</sup> , 8.5 kb, carrying <i>gfp</i> gene	Constructed in this study

Note: CQUBb and CQUBb-pHT3AG were cultured in T2 medium<sup>[7]</sup> at 37°C, other strains were cultured in LB medium at the same temperature.

**1.1.2 主要试剂和仪器:** PrimeSTAR HS DNA Polymerase 试剂盒、*Taq* 酶试剂盒、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、DNA Marker DL15000、250 bp ladder、Protein Marker D530B 购自宝生物(大连)有限公司(TaKaRa);质粒小提试剂盒购自美国 Axygen 公司;凝胶回收试剂盒购自日本 Bioflux 公司;其他试剂均系进口分装或国产分析纯。本研究使用的主要仪器有:细胞穿孔仪(Gene Pulser II, BIO-RAD, USA);荧光显微镜(Fluorescence Microscope U-

CMAD3, OLYMPUS, Japan); PCR 仪(iCycler, Bio-Rad); SDS-PAGE 系统(PowerPacBasic 1000, BIO-RAD)。

**1.1.3 引物:**根据 pHT305a 序列设计引物对 01F、01R,特异性扩增 *pro3a* 片段;根据 pMD18gfp 序列设计引物对 02F、02R,特异性扩增 *gfp* 基因;根据载体 pHT304 序列设计引物对 03F、03R,特异性扩增外源插入序列。在 01F、02R 上加酶切位点和保护碱基,引物序列见表 2。

表 2 本研究用到的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences of primers (5' → 3')	Product sizes/ bp	Restriction sites
01F	GTCTGGATCCGAAATTAGTTATACAAGCATT	1099	<i>Bam</i> H I
01R	TCGCCCTTGCTCACCAATTTTTCTTCTCCCTTCTT		
02F	AAGAAAGGGAGGAAGAAAATGGTGAGCAAGGGCGA	746	
02R	CTATGCATGCTTACTTG TACAGCTCGTC		<i>Sph</i> I
03F	AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAG	1890	
03R	GGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAA		

Product sizes included the sizes of corresponding primers; The restriction sites were italic and bold; The sequences underlined were complementary sequences with the other DNA fragment; All of the primers were synthesized by Shanghai Sangon Biological Engineering Technology & Services Co., Ltd.

## 1.2 重叠延伸 PCR 构建重组质粒

**1.2.1 质粒构建思路及实验方案:**以现有的质粒 pHT305a 和 pMD18gfp 为模板分别扩增出 *pro3a* 和 *gfp* 片段;两段 DNA 序列进行融合 PCR 反应获得

*pro3a-gfp* 融合片段;质粒 pHT305a 酶切并回收 pHT304 载体<sup>[8]</sup>,此载体与经过相同限制酶双酶切并回收的 *pro3a-gfp* 片段连接成 pHT3AG 质粒。质粒构建整体思路如图 1。

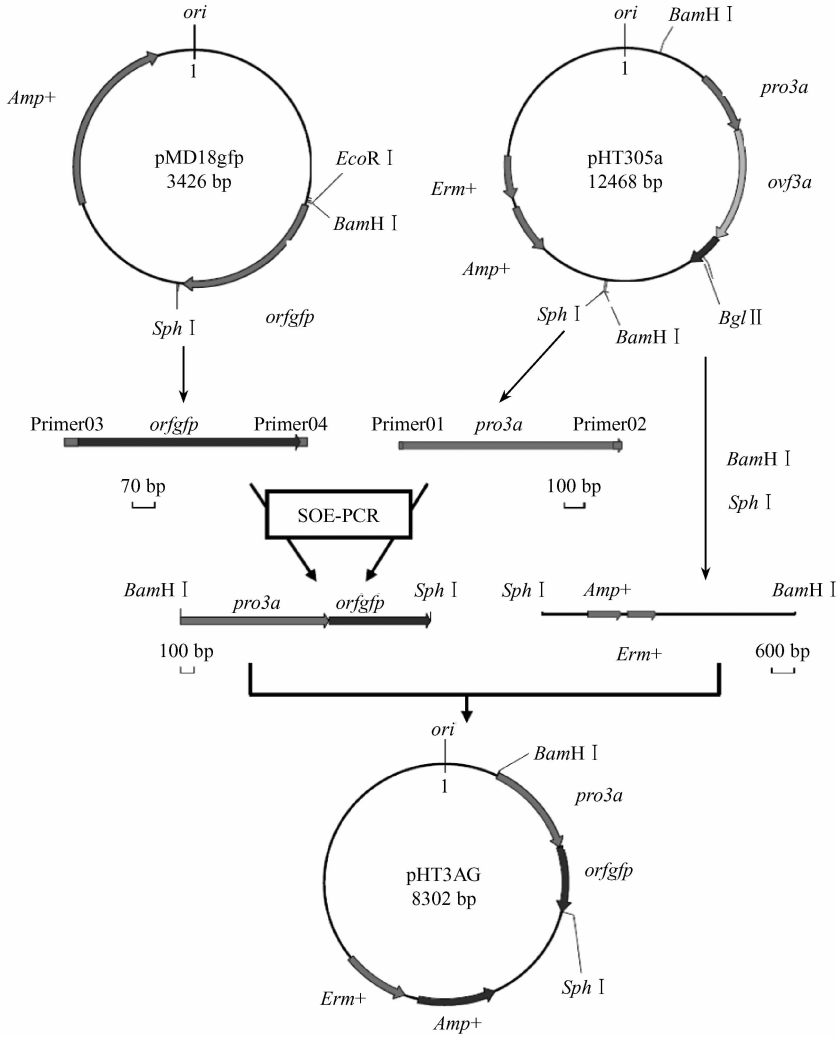


图1 质粒 pHT3AG 构建图

Fig. 1 Construction of plasmid pHT3AG. *pro3A*: the promoter of *cry3A* gene; *Amp*<sup>+</sup>, *Erm*<sup>+</sup>: Ampicillin, Erythromycin resistance gene; *ter3A*: the terminator of *cry3A* gene; *SD seq.*: the SD sequence of *pro3A*; *orf3A*, *orfGFP*: CRY3A, GFP encoding gene respectively.

**1.2.2 *pro3a-gfp* 表达盒的构建:** 引物 01F/R 和 02F/R 分别以 pHT305a 和 pMD18gfp 质粒为模板进行 Touch-down PCR<sup>[9]</sup>, PrimeSTAR HS DNA Polymerase 反应体系参照 TaKaRa protocol. 反应参数为: 98°C 3 min; 98°C 10 s, 57°C → 42°C 15 s, 72°C 70 s, 15 个循环; 98°C 10 s, 42°C 15 s, 72°C 70 s, 30 个循环; 72°C 4 min. 将 *pro3a* 和 *orfGFP* 片段等摩尔加入同一 PCR 体系, 进行 SOE-PCR, 循环参数如下: 98°C 2 min; 98°C 10 s, 68°C 70 s, 10 个循环; 72°C 4 min; 4°C 10 min (4°C 过程中加入引物 01F, 02R); 98°C 2 min; 98°C 10 s, 53°C 10 s, 72°C 1 min 50 s, 36 个循环; 72°C 4 min. 回收融合片段 *pro3a-gfp*, 并以 *Bam*H I、*Sph* I 酶切后回收目的片段, 即为 *pro3a-gfp* 表达盒。

**1.2.3 重组质粒 pHT3AG 的构建:** pHT305a 质粒以

*Bam*H I、*Sph* I 酶切后回收约 6.5 kb 的线性化载体片段; 载体与 *pro3a-gfp* 按照摩尔比 1:3 的比例混合, 加入 T4 DNA 连接酶, 于 16°C 连接过夜后转化 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞, 在固体培养基 (含氨苄和红霉素分别 50 μg/mL) 培养过夜; 挑取克隆子以引物 03F、03R 进行常规 PCR 检测, 提取阳性克隆子的质粒进行酶切鉴定, 并委托上海生工测序, 使用软件 Dnaman 5.0 分析测序结果。

**1.3 重组质粒转化肠道菌 *Brevibacillus brevis* CQUBb 和 *Bacillus thuringiensis* CQUBt**

重组质粒 pHT3AG 电转化 CQUBb 和 CQUBt 感受态细胞<sup>[10]</sup>, 采用的转化条件为: 电压 7.5–12.5 KV/cm, 电阻 200–1000 Ω, 1–2 次电击, 电容 25 μF, 进行优化。转化后在固体培养基 (含红霉素 50 μg/mL) 上培养过夜, 常规 PCR 检测

克隆子。

#### 1.4 GFP 的表达观察与 SDS-PAGE 分析

工程菌 CQUBb-pHT3AG 和 CQUBt-pHT3AG 接种固体和液体培养基, 培养至 2 h 起观察培养物在可见光下的颜色变化并用荧光显微镜(目镜:10×, 物镜:40×)观察细胞的荧光表型。工程菌株液体发酵后在 20、40、60 h 分别取样, 超声波破碎并高速离心保留上清进行 SDS-PAGE, 堆积胶浓度 5%, 分离胶浓度 15%, 设置相同处理的野生菌株发酵产物作为对照, 电泳结束后考马斯亮蓝染色, 使用软件 Bandscan 5.0 分析电泳图谱, 以分析工程菌株中 GFP 的表达特点。

#### 1.5 工程菌株的生长动力学测定

野生菌株和工程菌株分别接种液体培养基并摇床培养, 使用比浊法绘制菌株生长动力学曲线, 以测试外源质粒对宿主菌株生长动力学特性的影响。

#### 1.6 工程菌株的稳定性测试

挑取工程菌株单菌落分别接种于含抗生素和不含抗生素的液体培养基中, 过夜培养作为 0 代, 第 2 天按 1% (v/v) 的接种量分别转接新鲜液体培养基, 摇床振荡培养每隔 6 h 转管, 连续传代至 30 代。每隔 6 h 转管, 取传代菌液适度稀释, 涂布于非抗性平板, 过夜培养后分别挑取单菌落 100 个到抗性平板, 培养后计数并按照下列公式计算工程菌株的稳定性。

质粒稳定性 (Stability, Sp) = 抗性平板上生长的菌落数 ÷ 转接的菌落数 × 100%

## 2 结果和分析

### 2.1 *pro3a-gfp* 表达盒的构建

PCR 分别扩增 *pro3a* 和 *orf<sub>gfp</sub>* 片段并进行两片段的融合, 琼脂糖凝胶电泳显示, 经过 SOE-PCR 扩增, *pro3a* 和 *orf<sub>gfp</sub>* 片段成功融合 (图 2)。

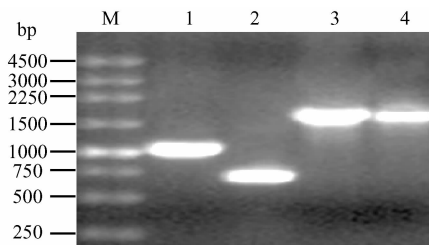


图 2 基因融合过程中的各 DNA 片段的电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis map of DNA segments in the process of gene fusion. M. 250 Ladder DNA Marker; 1. *pro3a*; 2. *orf<sub>gfp</sub>*; 3. *pro3a-gfp*; 4. *pro3a-gfp* digestion of *Bam*H I and *Sph* I.

### 2.2 重组质粒 pHT3AG 的构建与鉴定

载体 pHT304 和 *pro3a-gfp* 融合基因的连接产物转化 JM109 后, 提取质粒经酶切鉴定可知 *pro3a* 和 *gfp* 已成功与载体连接并导入大肠杆菌。测序结果 (文中未显示) 表明重组质粒未发生碱基突变, GFP 编码序列未发生移码, 至此成功构建了重组质粒 pHT3AG。

### 2.3 肠道菌的转化条件与转化子验证

通过转化条件优化得出 pHT3AG 质粒转化 CQUBb 的最佳电转化条件和转化效率为: 电压 8.75 kv/cm, 电阻 500 Ω, 电击 1 次, 转化频率  $3.5 \times 10^4$  CFU/μg DNA; 转化 CQUBt 的最佳条件和效率为: 电压 10.00 kv/cm, 电阻 400 Ω, 电击 2 次, 频率  $8.0 \times 10^2$  CFU/μg DNA。比较可知转化短短芽孢杆菌 CQUBb 的转化频率远高于转化苏云金芽孢杆菌 CQUBt。

以转化平板上的单菌落为模板, 使用引物对 03F、03R, 经 PCR 获得了约 1.9 kb 的目的片段, 与预期结果吻合, 说明转化成功, 转化子的阳性率在 90% 以上。提取转化子质粒并进行琼脂糖电泳, 结果显示转化子比出发菌株多出一条与质粒 pHT3AG 大小相同的条带, 进一步验证了重组质粒成功转入宿主菌株, 获得了 2 个基因工程菌株 CQUBb-pHT3AG 和 CQUBt-pHT3AG。

### 2.4 重组菌 GFP 的表达

固体和液体培养工程菌株, CQUBb-pHT3AG 在培养 5 h 后即可在可见光下观察到绿色, CQUBt-pHT3AG 在培养 10 h 后在可见光下可观察到绿色, 并随发酵时间的延长绿色愈加明显。在荧光显微镜暗视野下两株工程菌株在 3 h 后即可观察到绿色荧光的出现, 而同样条件下野生出发菌株没有绿色荧光出现。两株工程菌株在荧光显微镜下的荧光表型如图 3 所示。

工程菌株液体发酵后提取可溶性总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。结果 (图 4) 显示两株工程菌均可以组成型、可溶性表达 29 kDa 的绿色荧光蛋白, 并且属于营养期表达; 而未转入外源基因的野生出发菌株则无此蛋白表达。菌株 CQUBb-pHT3AG 随着发酵时间的延长 GFP 的量明显增加, 而 CQUBt-pHT3AG 则不明显; 相同发酵时间内菌株 CQUBb-pHT3AG 的表达量比 CQUBt-pHT3AG 的表达量大的多, 使用软件 Bandscan 5.0 分析电泳条带, 结果表明 CQUBb-pHT3AG 在发酵至 20、40、60 h 时目的蛋白 (GFP) 占发酵液中可溶性蛋白的比例分别 70%、80%、86%, 呈上升趋势, 而 CQUBt-pHT3AG 在各个

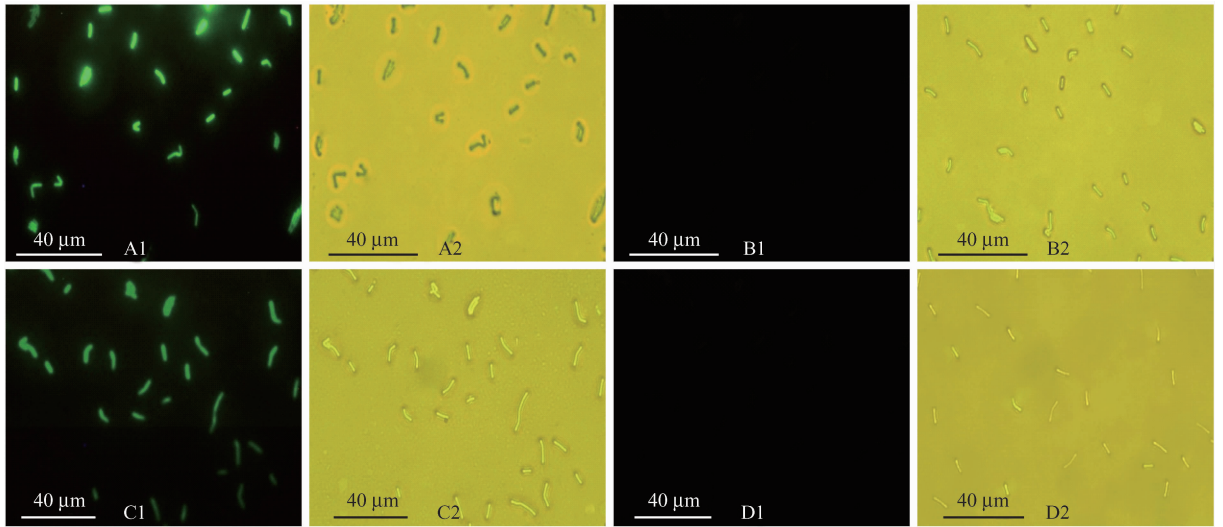


图3 工程菌株发出的绿色荧光

Fig. 3 Green fluorescence of engineering strains and host strains. A, C: CQUBb-pHT3AG and CQUBt-pHT3AG, show the express of Green fluorescence; B, D: CQUBb and CQUBt; 1: Strains observed under dark field of fluorescence microscope. 2: Strains observed under bright field of fluorescence microscope. Note: The dark field in A1/B1/C1/D1 was the same as bright field in A2/B2/C2/D2.

时期产生的目的蛋白占可溶性蛋白的比例相对较低,且呈下降趋势,分别为49%、40%、35%。两株重组菌株产生的杂蛋白与出发菌株相比有明显的减少。

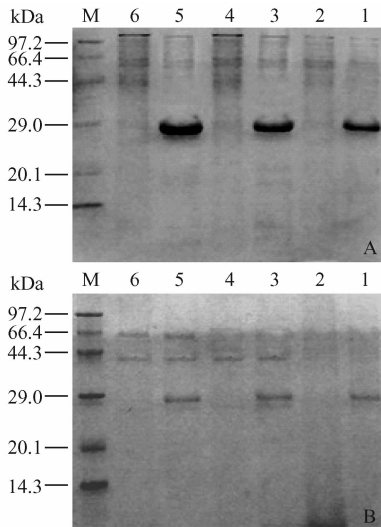


图4 工程菌株中 GFP 的表达

Fig.4 Expression of GFP in engineering strains. A: CQUBb-pHT3AG; B: CQUBt-pHT3AG. M. Protein Marker D530B; lane 1, 3, 5. engineering strain 20 h, 40 h, 60 h; lane 2,4, 6. wild strain 20 h,40 h, 60 h.

## 2.5 工程菌株生长动力学

工程菌株与出发菌株的生长曲线(图5)比较可以看出工程菌株与野生出发菌的生长曲线相比无明显变化,说明外源质粒的存在、外源蛋白的表达未对宿主菌的生理特性产生明显的不利影响。

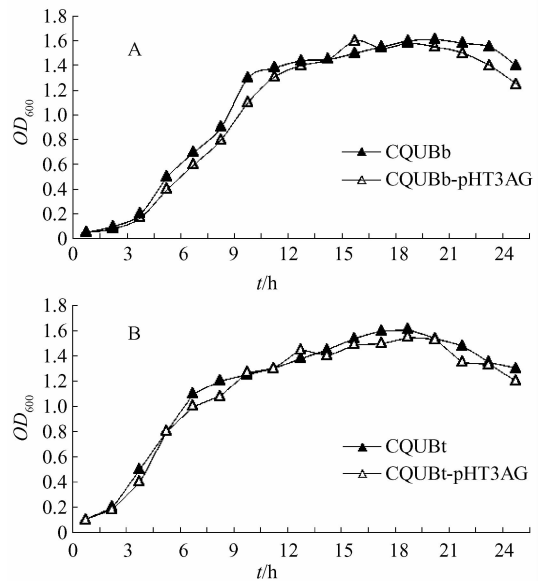


图5 工程菌株和出发菌株生长曲线

Fig.5 The vegetal curves of engineering strains and wild strains. A: CQUBb and CQUBb-pHT3AG; B: CQUBt and CQUBt-pHT3AG.

## 2.6 工程菌株的稳定性

工程菌株稳定性测试结果显示随着传代次数的增加,工程菌株中的重组质粒逐渐丢失,含重组质粒的菌体在总菌量中的比例有降低的趋势。在给与抗生素选择压力的条件下传代30次后 CQUBb-pHT3AG、CQUBt-pHT3AG 的稳定性(含重组质粒的菌株占总菌量的比例)分别为95%、67%,在没有选择压力下二者的稳定性分别为88%、53%,所以适

当的选择压力可以明显的增加菌株稳定性,而且 CQUBb-pHT3AG 的稳定性明显高于 CQUBt-pHT3AG,接近报道的以大肠杆菌为宿主细胞构建的 鲨肝刺激物类似物 sHSA 表达工程菌株的稳定性<sup>[11]</sup>。

### 3 讨论

芽孢杆菌在植物有害生物防治中占有重要地位,而且芽孢杆菌表达系统的研究也是原核表达的一个研究热点。抑菌生防菌株枯草芽孢杆菌是芽孢杆菌表达系统中研究较成熟的菌株,但是由于其很强的胞外蛋白酶活性,会大量降解外源蛋白,所以在构建工程生防菌株时有了较大的局限性;苏云金芽孢杆菌虽然胞外蛋白酶活性不高,但是野生菌株由于含有大量的内生质粒,往往会对外源基因的导入和表达带来较大的影响;短芽孢杆菌和短短芽孢杆菌则只有极低的胞外蛋白酶活性,活性只有 *Bacillus subtilis* 的 1.6%<sup>[12]</sup>,并且细胞壁较薄,内生质粒较少,所以成了生防菌株和外源蛋白表达系统构建中宿主细胞的重要选择。

本研究来自于天牛幼虫肠道的短短芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌为出发菌株,成功构建了带有 *cry3a* 基因的启动子和 *gfp* 基因标记的 2 株重组菌株 CQUBb-pHT3AG 和 CQUBt-pHT3AG。但两个菌株转化性能、表达性能以及稳定性有着明显的差异。这些差异可能是因为菌株 CQUBt 的细胞壁较厚,而且含有较多的内生质粒,使外源质粒较难转入细胞内;同时,我们采用的启动子是苏云金芽孢杆菌 ICP 编码基因 *cry3a* 的启动子,可能会同野生苏云金杆菌 CQUBt 中的其他 ICP 的表达产生排斥作用,使得外源基因的转化效率低、外源蛋白表达量低、工程菌株的稳定性差。反之,CQUBb 含有较少的内生质粒,并且不含有 ICP 基因,所以转化率较好、外源蛋白表达量很高、工程菌株稳定性好。CQUBt-pHT3AG 菌株在发酵过程中外源蛋白的量没有明显的积累,而且发酵 20 h 后,表达蛋白还随时间推移而略有下降,可能因为宿主细胞的胞外蛋白酶活性高,GFP 被降解所致。菌株 CQUBb-pHT3AG 表达的 GFP 随时间推移而显著增加,说明其胞外蛋白酶活性低使得外源蛋白有明显的积累。

重组菌株的质粒稳定性是工程菌株能否有实用价值的关键。本研究发现在抗生素的选择压力下菌株的稳定性会得到一定程度的提高。但是本文的研究方法仅仅研究了工程菌质粒的保有率<sup>[13]</sup>,并没有

分析随传代次数的增加或发酵时间的增长质粒拷贝数的变化趋势,而如果质粒的拷贝数明显降低,也可能会影响到蛋白的表达,这方面工作我们会继续进行。

构建的两株工程菌株表达特性和稳定性比较显示出 CQUBb 是一株非常有前景的蛋白原核表达宿主菌。该工程菌株的构建成功,为下一步重组菌株在昆虫肠道内的定殖能力、分布范围的系统研究奠定了基础,并为利用该菌株作为宿主菌构建广谱高效杀虫工程菌株和芽孢杆菌表达系统的开发提供基础工作。

**致谢** 法国巴斯德研究所的 Dr. Lereclus 博士为本研究提供质粒,在此表示衷心的感谢。

### 参考文献

- [1] 史艳霞,张永军,王桂荣,梁革梅,高继国,吴孔明. *Cry1Ac* 的绿色荧光蛋白 GFP 标记及其在棉铃虫幼虫中肠的定位分布. 植物保护学报 (*Journal of Plant Protection*), 2007, 34 (5): 455-460.
- [2] Schnepf E, Crickmore N, Vanrie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler R, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecularbiology Reviews*, 1998, 9: 775-806.
- [3] Sun M, Wu L, Yu ZN. Expression of *Bacillus thuringiensis cry1Ac10* and *cry1C* genes under the Nosporeulation-Dependent promoter. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2000, 8 (3): 229-232.
- [4] Zhu CG, Sun M, Yu ZN. Expression of gene *AiiA* carrying the promoter of gene *cry3a* in *Bacillus thuringiensis*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003, 19 (4), 397-401.
- [5] 王中康,何伟,彭国雄,夏玉先,李强,殷幼平. 特异性杀虫基因 *Bt cry3a* 在桑枝肩天牛幼虫肠道 2 种常驻内生菌中的转化和表达研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48 (9): 1168-1173.
- [6] Wu SK. The discovery and development of the green fluorescent protein. *Imaging Science and Photochemistry*, 2009, 27 (1): 69-78.
- [7] Takagi H, Kagiya S, Kadowaki K, Tsukagoshi N, Udaka S. Genetic transformation of *Bacillus brevis* with plasmid DNA by electroporation. *Agric Biol Chem*, 1989, 53 (11): 3099-3100.
- [8] Arants O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 1991, 108 (1): 115-119.
- [9] Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick

- JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19 (14): 4008.
- [10] Yue CY, Sun M, Yu ZN. Broadening the insecticidal spectrum of Lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains by chromosomal integration of *cry3a*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 91 (3): 299-301.
- [11] 赵艳景, 王颖. 鲨肝刺激物类似物 sHSA 原核表达载体质粒稳定性的考察. *药物生物技术 (Pharmaceutical Biotechnology)*, 2008, 15 (3): 191-194.
- [12] 周海燕, 饶力群, 吴永尧. 甘露聚糖酶 *man23* 基因的重组及其在短短芽孢杆菌中的表达. *浙江大学学报 (农业与生命科学版) [Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)]*, 2008, 34 (4): 389-394.
- [13] 姜立春, 郭晓萍, 涂朝勇, 舒晓燕, 阮期平. 重组噬核苷磷酸化酶工程菌菌种的稳定性考察. *华西药理学杂志 (West China Journal of Pharmaceutical Sciences)*, 2007, 22 (3): 295-297.

## Construction and expression of prokaryotic expression vector of green fluorescent protein in *Brevibacillus brevis* and *Bacillus thuringiensis* isolated from insect larvae intestines

Youping Yin, Qiang Li, Xun'e Yuan, Zhongkang Wang\*

(Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing Engineering Research Center for Fungal Insecticide, Chongqing Key Lab of Genetic Function and Regulation, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To construct a prokaryotic protein expression vector of green fluorescent protein (GFP) with the non-sporulation promoter of *cry3a* gene of *Bacillus thuringiensis* (Bt), and to obtain recombinant engineering bacteria with labeled *gfp* gene and non-sporulation promoter of *cry3a* gene the construction of insecticidal engineering strains. [ **Methods** ] The promoter of gene *cry3a* and *gfp* gene was connected by SOE-PCR, The recombinant gene *pro3a-gfp* was inserted into shuttle vector pHT304 at sites *Bam*H I and *Sph* I. Then plasmid pHT3AG was introduced into *Brevibacillus brevis* CQUBb and *Bacillus thuringiensis* CQUBt isolated from *Apriona gemari* larvae intestines. The expression of the recombinants was analyzed with fluorescent microscope, SDS-PAGE, and then the stability of engineering strains was tested under the conditions with or without antibiotics. [ **Results** ] Two engineering strains labeling with GFP were obtained. They expressed green fluorescent protein from the vegetative growth period and about 29kDa green fluorescent protein band was detected by SDS-PAGE. Heterogenous plasmid replicated and expressed stably in engineering strains and did not lead to significant adverse effects on these two host strains. After 30 generations, 95% and 67% of clones was still bearing recombinant plasmids respectively. Compared to CQUBt, CQUBb had higher efficiency of electroporation, and the CQUBb-pHT3AG had longer GFP expression time, expressed more protein than CQUBt-pHT3AG, and the stability of CQUBb-pHT3AG was higher than CQUBt-pHT3AG. [ **Conclusions** ] We successfully obtained two transgenic insecticidal engineering strains.

**Keywords:** promoter of *cry3a*; green fluorescent protein (GFP); resident bacteria; *Brevibacillus brevis*; transgenic strains

(本文责编:王晋芳)