

外源基因在苏云金杆菌染色体上的定点整合及表达

刘萍¹, 夏立秋^{1,2*}, 胡胜标¹, 严礼¹, 丁学知¹, 张友明¹, 喻子牛²

(¹ 湖南师范大学生命科学学院, 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 长沙 410081)

(² 华中农业大学, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要:【目的】研究构建稳定表达外源基因、无抗性标记基因的苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)工程菌的方法。在构建 Bt 工程菌时, 高拷贝外源质粒的转入导致 Bt 芽孢数量减少, 芽孢形成期延滞, 影响 Bt 菌株的杀虫活力。而且, 外源质粒在 Bt 中的稳定性较差, 外源基因容易丢失。将基因整合入染色体是一种构建遗传性状稳定、杀虫活力高的 Bt 工程菌的有效方法。【方法】本研究采用 PCR 技术, 分两段扩增定位于 Bt 无晶体突变株 XBU001 染色体上的 *trigger factor* 基因片段作为同源臂, 克隆入温度敏感型载体 pKSV7, 构建了定点整合载体 pKTF12。并利用 pKTF12 质粒将 *cryIAc* 基因定点整合入 XBU001 染色体上。【结果】利用载体 pKTF12 将 *cryIAc* 定点插入 *trigger factor* 位点, 对宿主菌 XBU001 的正常生长没有影响。重组菌株 KCTF12 中的 *cryIAc* 基因能够稳定遗传、表达并形成菱形晶体。与携带高拷贝外源质粒的 Bt 菌株 HTX42 相比较, KCTF12 具有芽孢数量增多、芽孢形成期提前优势。【结论】定点整合法是一种构建稳定表达外源基因、无抗性标记基因 Bt 工程菌的有效方法。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 定点整合; 同源重组; pKSV7; *trigger factor* 基因; *cryIAc* 基因

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 05-0661-07

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是一种分布广泛的革兰氏阳性细菌, 伴随芽孢形成产生具有杀虫活性的晶体蛋白, 在芽孢形成末期可达整个细胞干重的 20~30%。目前, Bt 已知对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等八个目的昆虫以及原生动物、线性动物门、扁形动物门中有害种类有特异的毒杀作用, 作为有效的微生物农药应用于农林害虫的生物防治^[1-3]。随着生物技术的发展及对 Bt 分子生物学和遗传学的深入研究, 在 Bt 中高效表达外源杀虫基因以构建杀虫毒力更高、杀虫范围更广的具有综合优良性能的重组工程菌, 成为国内外微生物农药发展的重要方向^[4-6]。

然而, 高拷贝外源质粒在 Bt 中的稳定性较差, 外源基因容易丢失, 同时还出现了芽孢数量减少, 芽

孢形成期延滞等问题, 影响 Bt 菌株的杀虫活力^[7-9]。解决以上问题的有效途径之一是将外源基因整合到 Bt 菌株染色体上^[10-12]。当前多利用转座子(如 Tn4430、Tn5401 等)将基因随机整合入 Bt 染色体, 转座子的随机整合可能会导致功能基因的缺失、突变等, 对 Bt 菌株存在潜在的危害。本研究利用定位在 Bt 染色体上的 *trigger factor* 基因作为同源臂, 构建了整合质粒 pKTF12。利用该质粒, 通过同源重组将基因定点整合到 Bt 染色体上。*cryIAc* 基因定点整合入染色体对宿主菌 Bt 无晶体突变株 XBU001^[13]的正常生长没有影响。同时, 温度敏感型载体 pKSV7 的使用, 消除了 Bt 工程菌中的抗性标记基因, 避免了环境释放潜在风险。研究表明, *cryIAc* 基因在重组菌株 KCTF12 中得到稳定遗传和表达。而且, 与携带高拷

基金项目: 国家自然科学基金(30570050, 30670052); 国家“863 计划”(2006AA02Z187, 2006AA10A212); 国家博士点基金项目(20060542006)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-731-8872298; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

作者简介: 刘萍(1979-), 女, 湖南株洲人, 硕士研究生, 研究方向为微生物分子生物学。E-mail: ping_liu2008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-09-24; 修回日期: 2007-12-27

贝外源质粒的 Bt 菌株 HTX42^[13] 相比较, KCTF12 具有芽孢数量增多、芽孢形成期提前优势。本研究为外源基因在 Bt 中稳定表达, 构建无抗性标记基因的 Bt 工程菌奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究用菌株与质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

| Strains and plasmids | Characteristics | Origins |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Strains | | |
| XBU001 | Bt acrySTALLIFEROUS strain | Lab Store |
| DH5 α | <i>E. coli</i> strain | Dr. Zhang Jian |
| KCTF12 | XBU001 containing 4.2-kb fragment of <i>cryIAC</i> gene integrated in the chromosome | This work |
| HTX42 | XBU001(pHTX42) | Our laboratory |
| Plasmids | | |
| pKSV7 | Temperature sensitive shuttle vector, Amp ^r in <i>E. coli</i> , Chl ^r in Bt | Dr. Liu Gang |
| pHTX42 | pHT304 carried 4.2-kb fragment of <i>cryIAC</i> gene | Our laboratory |
| pKCTF12 | pKSV7 carried 4.2-kb fragment of <i>cryIAC</i> gene and 2.0-kb fragment of <i>trigger factor</i> gene | This work |

XBU001 为本研究室选育的一株 Bt 无晶体突变株^[13]。携带含 *cryIAC* 基因的高拷贝质粒 pHTX42 电转 XBU001, 获得工程菌 HTX42^[13]。*E. coli* 和 Bt 分别在 37 和 30 培养。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制酶及 Pyrobest Taq 酶购自 TaKaRa 公司, 抗生素购自 Amresco 公司, 使用浓度分别为氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氯霉素 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 红霉素 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其他生化试剂均购自上海生物工程技术服务有限公司。PCR 仪购自 Eppendorf 公司, 电转化仪购自 Bio-Rad 公司, 凝胶成像分析仪购自美国基因公司, 相差显微镜购自日本 Olympus 公司, SPA2400 原子力显微镜购自日本精工公司。

1.2 DNA 操作

大肠杆菌质粒提取、DNA 酶切、片段回收、连接及遗传转化采用常规方法^[14]。Bt 总 DNA 按照文献所述方法提取^[15]。按 *trigger factor* 基因序列设计引物扩增同源臂。引物由上海生工合成, 引物序列如下: TF1-F: ACGCGCATGCGAAAGAACATTTTAATTGC-(*Sph*); TF1-R: ACGCGTCTGACTAATTGGTCTTAAATCTGG(*Sal*); TF2-F: ACGCGGATCCATGTACCAGAACCGATTGC(*BamH*); TF2-R: GCACCCGGGTGCGTATAATATTG-AATTAG(*Sma*)。

1.3 含 *cryIAC* 基因整合质粒 pKCTF12 的构建

以 XBU001 菌株总 DNA 为模板, 分别以 TF1-F/TF1-R 和 TF2-F/TF2-R 为引物, 分段扩增 *trigger*

factor 基因片段, 分别命名为 TF1 和 TF2。*Sph* /*Sal* 双酶切 TF1 片段, 克隆入 pKSV7 质粒, 得到重组质粒 pKTF1。*BamH* /*Sma* 双酶切 TF2 片段, 克隆入 pKTF1, 得到重组整合质粒 pKTF12。*BamH* /*Sal* 双酶切 pHTX42 质粒, 回收 *cryIAC* 基因片段, 克隆入整合质粒 pKTF12, 获得 pKCTF12(图 1)。

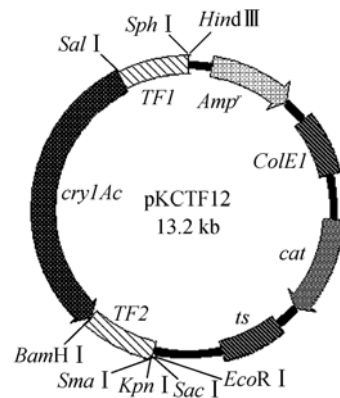


图 1 整合质粒 pKCTF12 图谱
Fig. 1 Plasmid profile of pKCTF12.

1.4 电转 Bt 及重组菌株的筛选

XBU001 感受态细胞的制备参考文献^[4]。采用 SG 缓冲液(272 mmol/L 蔗糖, 10%甘油), 电转条件为 1.8kv, 200 Ω , 25 μF 。电击后的感受态细胞冰浴 10 min 后转移至 0.8 mL LB 液体培养基中, 30 复苏 2~3 h, 涂含氯霉素(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 平板, 30 培养过夜。挑

取转化子进行 PCR 鉴定, 获得阳性转化子。

挑取阳性转化子接种入氯霉素终浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。按 1% 比例转接入新鲜 LB 液体培养基中, 42 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 涂无抗性平板, 挑单菌落进行氯霉素 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 抗性测定。对无氯霉素抗性的转化子进行 PCR 鉴定, 筛选染色体上整合了 *cryIac* 基因的重组菌株 KCTF12。

1.5 生长曲线的测定

为检测 *cryIac* 基因的定点插入对宿主菌 XBU001 生长情况的影响, 将 XBU001、KCTF12 菌株用 LB 培养基培养过夜, 以 2% 的量转接菌株的过夜培养物于 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养, 每隔 2 h 取样测定菌体 OD_{600} 值, 绘制生长曲线。

1.6 基因稳定性的检测

重组菌株 KCTF12 接入 LB 液体培养基, 每 24 h 按 1% 的量转接一次, 共培养 6 d, 取菌液梯度稀释后涂 LB 平板, 获得单菌落。利用 PCR 检测单菌落中的 *cryIac* 基因^[9]。

1.7 重组菌株 KCTF12 镜检、芽孢数量、CryIAc 晶体蛋白表达及杀虫活力测定

相差显微镜观察菌株细胞和芽孢形态。原子力显微镜 (Atomic Force Microscope, 简称 AFM) 观察菌株产生的晶体。

发酵液 65 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 使营养细胞失活, 系列稀释后涂 LB 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h, 计算芽孢数量^[16]。

以 2% 的量接种 XBU001、KCTF12、HTX42 菌株种子液于 G-Tris 发酵培养基^[17]中进行发酵培养, SDS-PAGE 检测晶体蛋白表达情况。提取并纯化 KCTF12 和 HTX42 发酵产生的 CryIAc 晶体蛋白对棉铃虫进行毒性测定^[18]。利用 Probit 软件对生物测定结果进行分析。

2 结果和分析

2.1 重组菌株 KCTF12 的构建及 *cryIac* 基因的稳定性

PCR 检测发现 Bt 无晶体突变株 XBU001 中存在 *trigger factor* 基因。设计引物 TF1-F/TF1-R 和 TF2-F/TF2-R 分段扩增 *trigger factor* 基因作为同源臂。将整合质粒 pKCTF12 电转化 XBU001, 转化子 42 $^{\circ}\text{C}$ 培养后, 挑选的 200 个转化子中有 143 个对氯霉素敏感, 对其中的 8 个转化子进行 PCR 鉴定, 发现有 5 个转化子的总 DNA 中含有 *cryIac* 基因, 对照菌株 XBU001 中没有检测到 *cryIac* 基因。以 TF1-F/TF2-R 为引物 PCR 检测其总 DNA 时获得 6.2 kb 左右的条带, 而对照菌株 XBU001 中 PCR 扩增所获得的条带大小为 2.0 kb。表明 *cryIac* 成功整合到了 XBU001 染色体的 *trigger factor* 基因位点。并利用 PCR 检测了 KCTF12 菌株中 *cryIac* 基因的稳定性。转接培养 6 d 后, 所有检测的单菌落全部都出现了阳性信号, 表明 *cryIac* 基因在 KCTF12 中能够稳定遗传。

2.2 生长特性分析

XBU001 和 KCTF12 的生长曲线很相似。两菌株在 16h 左右都进入稳定期。XBU001 和 KCTF12 的菌落形态和菌体形态都很一致。表明 *cryIac* 的定点整合对宿主菌 XBU001 的正常生长没有影响。

2.3 显微镜形态观察

相差显微镜观察结果显示, KCTF12 菌株 20 h 发酵液和 HTX42 菌株 28 h 发酵液在菌体形态上差异不大 (图 2-A, B)。HTX42 菌株的芽孢呈圆形, KCTF12 菌株的芽孢呈椭圆形, 自由芽孢的数目明显多于 HTX42 菌株。两菌株都产生典型的菱形伴胞晶体, KCTF12 菌株晶体的规格为 $(1.37 \pm 0.23) \mu\text{m} \times (0.53 \pm 0.16) \mu\text{m}$ (图 2-C), 明显小于 HTX42 菌株产生的晶体 $(2.0 \pm 0.19) \mu\text{m} \times (1.2 \pm 0.13) \mu\text{m}$ ^[13]。

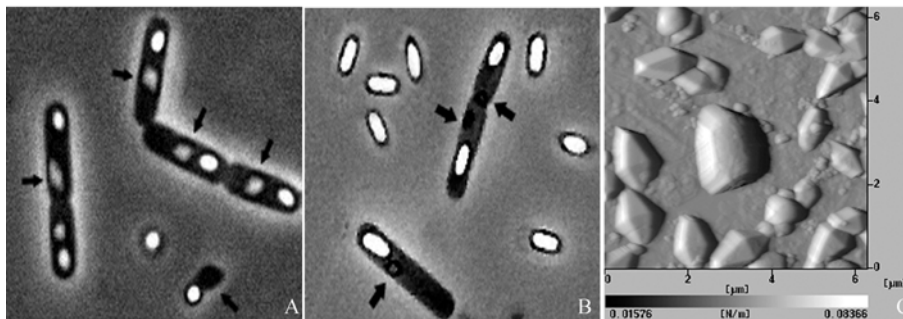


图 2 HTX42 和 KCTF12 的相差显微镜与原子力显微镜观察

Fig. 2 Phase-Contrast micrographs and Atomic Force micrograph of HTX42 and KCTF12. A: HTX42 (1000 \times); B: KCTF12 (1000 \times); C: Bipyramid crystals under AFM produced by KCTF12(4500 \times). The arrows indicate bipyramid crystals.

2.4 芽孢形成情况

显微镜观察和平板计数检测表明, KCTF12 菌株和 XBU001 菌株在 12h 左右便开始产生芽孢, HTX42

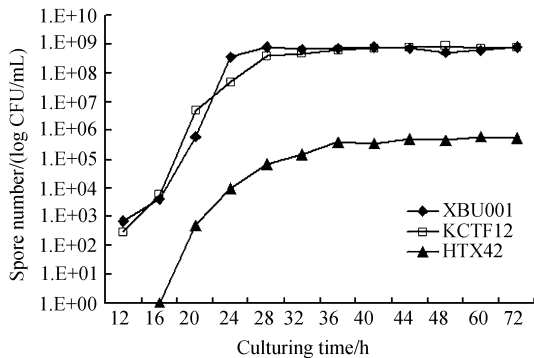


图 3 XBU001, KCTF12 和 HTX42 的芽孢数量随时间的变化
Fig. 3 Time-lapse data for spore number from XBU001, KCTF12 and HTX42.

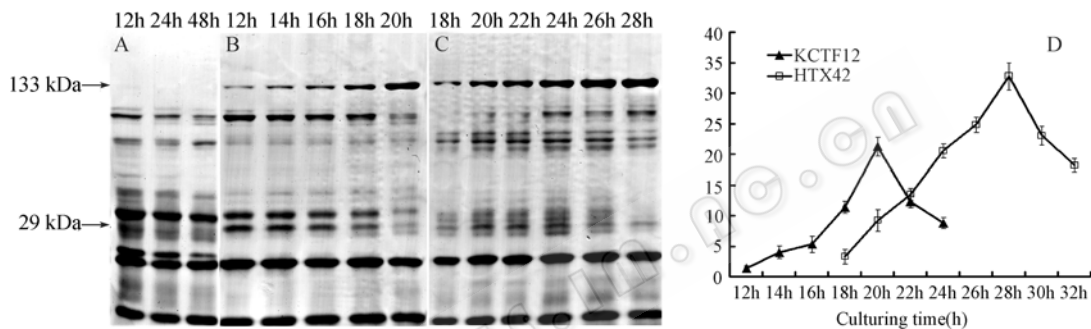


图 4 KCTF12 和 HTX42 中 Cry1Ac 的表达

Fig. 4 Cry1Ac expressed in KCTF12 and HTX42. A: *Bt* acrySTALLIFEROUS strain XBU001 after 12, 24 and 48h of cultivation, respectively; B: Expression of Cry1Ac in KCTF12 after 12, 14, 16, 18 and 20h of cultivation, respectively; C: Expression of Cry1Ac in HTX42 after 18, 20, 22, 24, 26 and 28h of cultivation, respectively; D: Densitometry of Cry1Ac expressed in KCTF12 and HTX42.

2.6 生物测定

结果表明, HTX42 和 KCTF12 菌株发酵液中 Cry1Ac 晶体蛋白对棉铃虫二龄幼虫均有较高的杀虫活力, 72 h 的 LC_{50} 分别为 $6.83 \mu\text{g/mL}$ 和 $7.12 \mu\text{g/mL}$, 两者的毒力没有显著性差异。

3 讨论

许多 *Bt* 工程菌的研究工作表明, 含外源基因的质粒在 *Bt* 中不稳定, 容易导致外源基因的丢失。 *Bt* 芽孢形成过程需要消耗大量的能量^[19], 高拷贝质粒的复制和维持将消耗宿主菌许多能量, 这样就阻碍了宿主菌芽孢的形成, 导致工程菌芽孢形成期延滞、芽孢数量减少。将基因整合入染色体是解决这些问题的一种有效方法。喻子牛等利用转座子 Tn4430 分别将 *cry3A* 基因、 *cry1C* 基因整合入 *Bt* 染色体获得了杀虫

菌株在 18h 才开始产生芽孢。 KCTF12 和 XBU001 在芽孢数量上没有显著差异, HTX42 的芽孢数量要明显少于 KCTF12 和 XBU001 (图 3)

2.5 晶体蛋白表达情况

Cry1Ac 蛋白由 1177 个氨基酸组成, 其分子量大小为 133kDa。重组菌株 KCTF12 在发酵培养 12 h 后检测到了的 Cry1Ac 晶体蛋白, 20 h 其表达量达到最大。重组菌株 HTX42 的 Cry1Ac 晶体蛋白直到 18h 才检测到表达, 到 28 h 达最大值, 其表达量要高于 KCTF12 中的 Cry1Ac 晶体蛋白表达量(图 4)。与 XBU001 比较, 除 Cry1Ac 晶体蛋白以外, KCTF12 发酵液还产生了一条约 29 kDa 的蛋白带。该蛋白带的产生可能是由于在缺少 Trigger Factor 蛋白的情况下, 某些蛋白不能正确折叠而聚集形成包涵体。

活力提高、基因遗传稳定的工程菌^[11~12]。但是, 转座子的随机整合可能会导致功能基因的缺失、突变等, 给宿主菌带来危害。将基因定点整合入 *Bt* 染色体上非细菌生长所必须基因的位置, 可以避免这一潜在的危害。

有研究表明, *trigger factor* 基因定位于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, 简称 Bs)染色体上, 其编码蛋白有辅助新生肽折叠的功能。 *trigger factor* 基因的敲除不影响 Bs 的正常生长^[20]。本研究室利用蛋白质组学技术在 XBU001 菌株中鉴定到了 Trigger Factor 蛋白的存在。通过对 *Bt*、Bs 各亚种间 *trigger factor* 基因的同源性分析, 在其保守区域设计引物, 分别扩增该基因的 5 端和 3 端作为同源臂, 构建了整合质粒 pKTF12。利用 pKTF12 将 *cry1Ac* 基因成功定点整合到 XBU001 染色体上。研究表明, *cry1Ac* 基因定点整

合入 *trigger factor* 基因位点对宿主菌 XBU001 的正常生长没有影响。*cryIac* 基因在重组菌株 KCTF12 中得到稳定遗传、表达并形成了菱形晶体(图 2B 和 C)。与携带外源质粒的工程菌 HTX42 相比较, KCTF12 还具有芽孢数量增多、芽孢形成期提前优势(图 3)。KCTF12 中的 *CryIac* 晶体蛋白表达量要低于 HTX42 中 *CryIac* 的表达量(图 4), 其主要原因是因为 HTX42 中 *cryIac* 基因定位在 pHT304 上, 其拷贝数要高于 KCTF12 中 *cryIac* 基因的拷贝数。

载体 pKSV7 含有温度敏感型复制子 pE194ts, 该复制子在 30 ℃ 时可以在 Bt 中复制, 当培养温度升高到 42 ℃ 便不能在 Bt 中复制, 从而导致质粒丢失以及质粒上抗性基因的消除^[21]。本研究利用载体 pKSV7, 消除了 Bt 工程菌中的抗性标记基因, 避免了环境释放潜在风险。整合载体 pKTF12 的成功构建有利于外源基因定点整合入 Bt 染色体、在 Bt 中稳定表达, 为构建毒力更高、杀虫谱更广的无抗性标记基因的工程菌奠定了重要的研究基础。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所刘刚研究员提供的 pKSV7 质粒和对实验过程中给予的建议!

参 考 文 献

- [1] Schnepf E, Crickmore N, van Rie J *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology Molecular Biology Review*, 1998, 62(3): 775–806.
- [2] Höfte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Review*, 1989, 53(2): 242–255.
- [3] Aronson A. Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Molecular Life Science*, 2002, 59(3): 417–425.
- [4] Park HW, Ge B, Bauer LS *et al.* Optimization of *Cry3A* yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence. *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3932–3938.
- [5] Park HW, Bideshi DK, Federici BA. Molecular genetic manipulation of truncated *Cry1C* protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improve stability and yield. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4449–4455.
- [6] Sirichotpakorn N, Rongnoparut P, Choosang K *et al.* Coexpression of chitinase and the *cry11Aa1* toxin genes in *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2001, 78(3): 160–169.
- [7] Crickmore N, Nicholls C, Earp DJ *et al.* The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal δ -endotoxin combinations. *Biochemistry Journal*, 1990, 270(1): 133–136.
- [8] Arantes O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 1991, 108(1): 115–119.
- [9] Monthon L, Chanpen W, Amaret B *et al.* Expression of Chitinase-Encoding Genes in *Bacillus thuringiensis* and Toxicity of Engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* Toward *Lymantria dispar* Larvae. *Current Microbiology*, 2004, 48(3): 175–181.
- [10] Thamthiankul S, Moar WJ, Miller ME *et al.* Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2004, 65(2): 183–192.
- [11] Yue CY, Sun M, Yu ZN. Improved Production of Insecticidal Proteins in *Bacillus thuringiensis* Strains Carrying an Additional *cry1C* Gene in Its Chromosome. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 92(1): 1–7.
- [12] 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): 296–303.
- [13] 胡宏源, 夏立秋, 史红娟等. 苏云金芽孢杆菌伴孢晶体 20kb DNA 中 *cryIac* 基因的克隆、高效表达和生物活性研究. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2004, 20(5): 656–661.
- [14] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] López-Meza JE, Federici BA, Poehner WJ, *et al.* Highly mosquitoicidal isolates of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae* and *entomocidus* from Mexico. *Biochem Syst Ecol*, 1995, 23(5): 461–468.
- [16] Chen J, Sun F, Shi Y, Xu W, *et al.* Efficient expression of *vip184AP* gene under the control of promoters plus Shine-Dalgarno (SD) sequences of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(2): 426–434.
- [17] Arvidson H, Dunn PE, Stmad S *et al.* Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae: factors involved in vivo and in the structure of a purified protoxin. *Mol Microbiol*, 1989, 3(11): 1533–1543.
- [18] Yu JX, Pang Y, Tang MJ, *et al.* Highly toxic and broad-spectrum insecticidal *Bacillus thuringiensis* engineered by using the transposon Tn917 and protoplast fusion. *Current Microbiology*, 2001, 43(2): 112–119.
- [19] Monica BO, James HH. Energy and Calcium Ion Dependence of Proteolysis during Sporulation of *Bacillus subtilis* Cells. *Journal*

- of *Bacteriology*, 1990, 172(8): 4161–4170.
- [20] Reyes DY, Yoshikawa H. DnaK chaperone machine and trigger factor are only partially required for normal growth of *Bacillus subtilis*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2002, 66(7): 1583–1586.
- [21] Yan XH, Gai YL, Liang L. A gene encoding alanine racemase is involved in spore germination in *Bacillus thuringiensis*. *Architecture Microbiology*, 2007, 187(5): 371–378.

Site-specific integration of heterologous gene into *Bacillus thuringiensis* chromosome and its expression

Ping Liu¹, Liqiu Xia^{1,2*}, Shengbiao Hu¹, Li Yan¹, Xuezhi Ding¹, Youming Zhang¹, Ziniu Yu²

¹Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, Life Science College of Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

²State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: [Objective] To efficiently construct resistance gene-free *Bacillus thuringiensis* engineered strain that can stably express heterologous gene. [Methods] We amplified the *trigger factor* gene located in chromosome of XBU001 strain as homologous arms and constructed an integrative plasmid pKTF12 on the basis of plasmid pKSV7, a temperature sensitive plasmid. We also constructed a recombinant strain KCTF12 containing *cryIAC* gene in its chromosome via the integrative plasmid pKTF12. [Results] Site-specific integration of *cryIAC* into XBU001 chromosome did not affect its normal growth. The *cryIAC* gene could stably express and form bipyrmaid crystals in KCTF12. When compared with HTX42 harboring a high-copy number plasmid, the recombinant strain KCTF12 has the merit of advanced sporulation and an increase in spore number. [Conclusion] The Site-specific integration proved to be a good approach to construct resistance gene-free *Bacillus thuringiensis* engineered strain that can stably express the heterologous gene.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; site-specific integration; homologous recombination; pKSV7; trigger factor gene; *cryIAC* gene

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570050, 30670052), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z187, 2006AA10A212) and the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20060542006)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-8872298; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

Received: 24 September 2007/ Revised: 27 December 2007

答 作 者 问

问：我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表，如果想调整作者并且修改作者及单位署名顺序是否可以？是否需要提供什么证明或者相关的材料？

答：可以变更，但需要作者再提供以下材料。(1) 如变单位署名顺序，需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信，证明内容：原署名顺序—现署名顺序—盖章。(2) 如变更作者署名顺序，需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容：原作者姓名及顺序—修改之后的作者姓名及顺序。(3) 将此证明信返回编辑部(邮寄或扫描后 e-mail 发来)，新的变更即可生效。