

苏云金芽胞杆菌 *cry8Ea* 启动子区 *orf1* 片段 缺失增强启动子活性

崔婷婷^{1,2}, 杜立新³, 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, 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; 3. 河北省农林科学院植物保护研究所, 保定 071000)

摘要 本文分别构建了 *cry8E* 基因上游的启动子 (Porf18E) 和其上游缺失 *orf1* 基因的启动子 (P Δ orf18E) 融合 *lacZ* 基因的表达载体, 通过 β -半乳糖苷酶活性的分析, 发现 P Δ orf18E 的转录活性高于 Porf18E。分别用 P Δ orf18E 和 Porf18E 指导 *cry1Ac* 基因的表达, 通过光学显微镜观察, 发现两个启动子指导表达的 Cry1Ac 蛋白均可形成双锥形晶体; 通过总蛋白定量分析发现, 缺失 *orf1* 基因的启动子 (P Δ orf18E) 指导的 Cry1Ac 蛋白表达量高于 Porf18E 启动子指导的 Cry1Ac 蛋白表达量; 生物活性测定表明: P Δ orf18E 指导的 Cry1Ac 晶体蛋白对小菜蛾 *Plutella xylostella* 具有杀虫活性, 高于 Porf18E 指导的 Cry1Ac 晶体蛋白对小菜蛾的杀虫活性。本文获得的强活性的启动子 P Δ orf18E 是目前已报道的转录活性最高的 *cry* 基因启动子, 该启动子为 Cry 蛋白的表达和遗传工程菌株构建提供了重要元件。

关键词 苏云金芽胞杆菌; *cry* 基因启动子; 转录活性; Cry 晶体蛋白; 晶体蛋白表达

中图分类号: S 476.11 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018138

Deletion of the *orf1* fragment from the *cry8Ea* promoter region enhances the transcriptional activity in *Bacillus thuringiensis*

CUI Tingting^{1,2}, DU Lixin³, PENG Qi², ZHANG Jie², GAO Jiguo¹, SONG Fuping²

(1. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant

Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Institute of

Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding 071000, China)

Abstract The *cry8E* promoter (Porf18E) and the promoter (P Δ orf18E) with the deletion of *orf1* fragment, located upstream of *cry8E*, were fused with *lacZ* gene. The transcriptional activity of P Δ orf18E was higher than that of Porf18E. The expression of Cry1Ac was directed by P Δ orf18E and Porf18E, and the strains HD⁻ (Porf18E-1Ac) and HD⁻ (P Δ orf18E-1Ac) were obtained. Both strains could produce the typical bipyramidal crystals, while HD⁻ (P Δ orf18E-1Ac) strain produced more Cry1Ac, which was more toxic to *Plutella xylostella* than HD⁻ (Porf18E-1Ac). P Δ orf18E has the highest transcriptional activity in *cry* gene promoters. It provides an important element for construction of engineered Bt strains.

Key words *Bacillus thuringiensis*; *cry* gene promoter; transcriptional activity; crystal protein; expression of crystal protein

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt, 是革兰氏阳性细菌, 属于蜡样芽胞杆菌菌族 *Bacillus cereus* group, 其在芽胞形成的同时能够产生对多种农林害虫有杀虫活性的伴胞晶体, 主要由 *cry*

或 *cyt* 基因编码。因其对人畜无害、对环境友好等特性, Bt 已被商业化应用, 成为世界上应用最广的微生物杀虫剂^[1]。但是 Bt 杀虫剂在田间应用过程中, Cry 蛋白存在持效期短、受紫外照射等环境因素

收稿日期: 2018-03-30

修订日期: 2018-04-26

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200400); 国家自然科学基金重点基金(31530095)

* 通信作者 E-mail: fpsong@ippcaas.cn; gaojiguo1961@hotmail.com

影响容易降解等缺点,因此提高 Cry 蛋白的产量和稳定性成为 Bt 遗传改良的有效策略。目前已报道, *cry8E* 基因的启动子指导表达的 Cry1Ac 蛋白产量高于野生菌株 HD73 产生的 Cry1Ac 蛋白^[2]。高活性的非 *cry* 基因的启动子也已成功表达 Cry 蛋白,如编码芽胞外壁基层蛋白的 *exsY* 基因的启动子 *PexsY* 可正确指导 Cry1Ac 蛋白的表达^[3];最新的研究表明, Bt HD73_5014 基因的启动子可以高效地指导表达 Cry1Ac 蛋白,其表达的蛋白产量与 *cry8E* 启动子指导表达的 Cry1Ac 蛋白产量相当^[4]。因此,发掘强活性的启动子指导 Cry 蛋白的表达是一条重要途径。

cry8E 基因和上游基因 *orf1* 以操纵子形式成为一个转录单元,分别受 σ^H 和 σ^E 调控^[5], *cry8E* 基因的启动子 *Porf1-cry8E* 是目前报道的转录活性最强的 *cry* 基因启动子^[4,6]。本研究在此基础上,分析

了缺失 *orf1* 基因的启动子 $P\Delta orf18E$ 的活性;用 $P\Delta orf18E$ 启动子指导表达 Cry1Ac 晶体蛋白并检测其杀虫活性。 $P\Delta orf18E$ 启动子为 Cry 蛋白的表达和遗传工程菌株构建提供了重要元件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基

本试验中所用菌株与质粒见表 1。大肠杆菌 *Escherichia coli* 的培养使用 LB 培养基(胰蛋白胨 1.0%,酵母提取物 0.5%,NaCl 1.0%,pH 7.2)。Bt 的培养使用 LB 培养基和 SSM 培养基^[7]。Bt 在 30℃、220 r/min 条件下培养;*E. coli* 在 37℃、220 r/min 条件下培养,氨苄青霉素使用终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,红霉素使用终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	特性 Characterization	来源 Resource
菌株 Strains		
<i>E. coli</i> TG1	对转化的外源 DNA 既无修饰作用也无限制作用	实验室保存
<i>E. coli</i> ET12567	甲基化缺陷型菌株	实验室保存
Bt 185	Bt 菌株含有 <i>cry8Ea1</i> 和 <i>cry8Fa1</i> 基因	[8]
HD73	Bt 菌株含有 <i>cry1Ac</i> 基因	实验室保存
HD73 ⁻	Bt HD73 菌株的无晶体突变株	实验室保存
HD (Porf18E-18Z)	HD73 菌株含有 pHTPorf18E 质粒	本研究
HD ($P\Delta orf18E$ -18Z)	HD73 菌株含有 pHTP $\Delta orf18E$ 质粒	本研究
HD ⁻ (Porf18E-1Ac)	HD73 ⁻ 菌株含有 pHTPorf18E-1Ac 质粒	本研究
HD ⁻ ($P\Delta orf18E$ -1Ac)	HD73 ⁻ 菌株含有 pHTP $\Delta orf18E$ -1Ac 质粒	本研究
质粒 Plasmids		
pHT304	低拷贝 <i>E. coli</i> -Bt 穿梭载体, Ap ^R , Em ^R	[9]
pHT304-18Z	含有 <i>lacZ</i> 基因的 <i>E. coli</i> -Bt 穿梭载体, Em ^R , Ap ^R	[9]
pHTPorf18E	pHT304-18Z 载体含有 Porf18E 启动子	本研究
pHTP $\Delta orf18E$	pHT304-18Z 载体含有 $P\Delta orf18E$ 启动子	本研究
pHTPorf18E-1Ac	pHT304 载体含有 Porf18E 启动子和 <i>cry1Ac</i> 基因	本研究
pHTP $\Delta orf18E$ -1Ac	pHT304 载体含有 $P\Delta orf18E$ 启动子和 <i>cry1Ac</i> 基因	本研究

1.1.2 主要试剂

TaqMix DNA 聚合酶购自 BioMed;限制性内切酶、PrimeStar[®]、T4 DNA 连接酶、DH5 α 感受态、Solution I 购自大连宝生物有限公司;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 Ax-ygen;无缝克隆试剂盒(Seamless Assembly Cloning

Kit)购自中美泰和生物技术有限公司。

1.1.3 引物合成及序列测定

根据 Bt 185 菌株^[8]和 HD73 菌株^[10]的基因组序列设计引物,引物合成由上海生工生物工程公司北京合成部完成,引物名称及序列见表 2。序列测定由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

表 2 本试验所用引物及序列¹⁾

Table 2 Primers and sequences used in this study

引物名称 Name	序列 Sequence (5'-3')
Porf1-5	AA <u>CTGCAGAATGCACCTCCAATTGTTAATTATGT</u>
Porf1-3	AGAACGTTTTTTGTTTCTATTGAAATTTTTTCTGTGCACCTCCTATCG
P8E-5	CGATAGGAGGGCACAGAAAAAATTTCAATAGAAACAAAAACGTTCT
P8E-3	CG <u>GGATCCCTATTTTCCTCCTATACATACACAAGAT</u>
1AC-F	ATGGATAACAATCCGAACATCAAT
1AC-R	GAATTACTCCTTATGGAGGAATAG
8E-1Ac-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
8E-1Ac-R	AACACCTGATATTTGAGCCGTTTG

1) 下划线表示酶切位点。

Restriction enzyme sites are underlined.

1.2 Porf18E 和 PΔorf18E 启动子融合 lacZ 基因表达载体的构建

以 Bt185 基因组^[8]为模板,以 Porf1-5/P8E-3 为引物扩增含有 *orf1* 的启动子、*orf1* 基因和 *cry8E* 基因启动子的片段 Porf18E(1 352 bp),PCR 产物纯化后经 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切并连接至含有 *lacZ* 报告基因的 pHT304-18Z 载体 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切片段上,转化 *E. coli* TG1 菌株,获得重组质粒 pHTPorf18E;以 Bt185 基因组为模板,分别以 Porf1-5/Porf1-3 和 P8E-5/P8E-3 为引物扩增 *orf1* 的启动子(*Porf1*, 559 bp)和 *cry8E* 基因的启动子(*Pcry8E*, 280 bp),PCR 产物纯化后,应用无缝克隆试剂盒将 *Porf1* 和 *Pcry8E* 片段连接至含有 *lacZ* 报告基因的 pHT304-18Z 载体 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切片段上,转化 *E. coli* TG1 菌株,获得缺失 *orf1* 基因的重组质粒 pHTPΔorf18E。重组质粒经 PCR、酶切和测序鉴定,转化至 *E. coli* ET 菌株使质粒去甲基化,然后将重组质粒电击转化至 Bt HD73 菌株,获得菌株 HD(Porf18E-18Z)和 HD(PΔorf18E-18Z)。

1.3 β-半乳糖苷酶活性分析

分别取 500 μL 活化过夜的 HD(Porf18E-18Z)和 HD(PΔorf18E-18Z)菌株转接到 50 mL SSM 培养基中,30℃,220 r/min 培养至 T_0 时期(T_0 为对数生长期结束时间, T_n 为 T_0 后第 n 小时),每隔 1 h 取样 1 次,每次 2 mL,12 000 r/min 离心,弃上清,沉淀于-40℃保存备用。 β -半乳糖苷酶活性测定方法参考文献^[11],试验至少重复 3 次。

1.4 Porf18E 和 PΔorf18E 启动子指导 Cry1Ac 表达载体的构建

分别以 pHTPorf18E 和 pHTPΔorf18E 质粒为模板,以 Porf1-5/P8E-3 为引物,扩增 Porf18E 和 PΔorf18E 片段;以 BtHD73 基因组为模板,以 1AC-

F 和 1AC-R 为引物扩增 *cry1Ac* 基因(3 537 bp),PCR 产物纯化后,应用无缝克隆试剂盒,分别将 Porf18E 和 *cry1Ac* 两个片段、PΔorf18E 和 *cry1Ac* 两个片段连接至经过 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切的 pHT304 载体上,转化 *E. coli* TG1 菌株,获得重组质粒 pHTPorf18E-1Ac 和 pHTPΔorf18E-1Ac。重组质粒经 PCR、酶切和测序鉴定,转化至 *E. coli* ET 菌株使质粒去甲基化,然后将重组质粒电击转化至 Bt HD73⁻ 无晶体突变菌株中,获得菌株 HD⁻(Porf18E-1Ac)和 HD⁻(PΔorf18E-1Ac)。

1.5 显微镜观察

分别取 500 μL 过夜活化的 HD⁻(Porf18E-1Ac)和 HD⁻(PΔorf18E-1Ac)菌液转接至 50 mL SSM 培养基,30℃,220 r/min,培养至 T_{20} 、 T_{22} 和 T_{24} ,取 1 mL 菌液,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,沉淀用 1 mL 的无菌水清洗 1 次,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,沉淀用 60 μL 的水悬浮,吸取 1 μL 的样品置于载玻片上,上面覆盖盖玻片在 100×的油镜(OLYMPUS, BX61)下观察菌体形态。

1.6 菌体总蛋白定量

分别取 500 μL 过夜活化的 HD⁻(Porf18E-1Ac)和 HD⁻(PΔorf18E-1Ac)菌液转接至 50 mL SSM 培养基,30℃,220 r/min,培养到细胞裂解(T_{24}),12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体,用水重悬,加入石英砂破碎,混合均匀;样品与 5×loading buffer 混匀,沸水浴中 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清用 Pierce660[®] 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。取总蛋白量一致的样品 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)检测 Cry1Ac 蛋白,并利用 Image J 软件分析 Cry1Ac 蛋白的表达量^[2]。

1.7 生物活性测定

以小菜蛾 *Plutella xylostella* 为试虫, 用于生物活性测定的菌株为 HD⁻ (Porf18E-1Ac)、HD⁻ (PΔorf18E-1Ac)、HD73 和 HD73⁻。菌株在 SSM 培养基中培养至 T_{24} 时期, 将菌液冻干, 取相同生物量的 4 株菌的冻干粉, 用灭菌水稀释成相同的浓度, 分别为: 1.25、2.5、5、10、20、40 和 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 将上述不同浓度的菌液均匀地涂抹于直径为 6 cm 的卷心菜叶上, 晾干后, 置于 9 cm 的培养皿中; 每个培养皿中接种 30 头体型相当的小菜蛾 2 龄幼虫。48 h 后计算幼虫成活率和 LC_{50} 。数据独立重复 3 次。

2 结果与分析

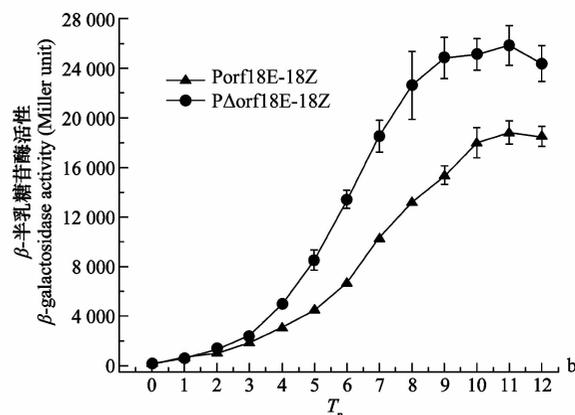
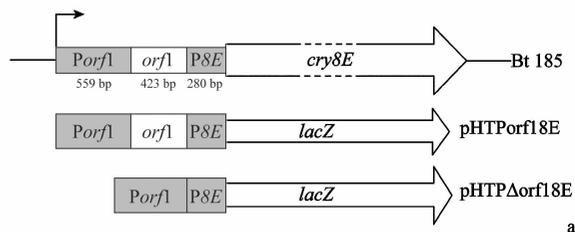
2.1 Porf18E 和 PΔorf18E 启动子活性分析

cry8E 基因上游的全长启动子 Porf18E 和缺失 *orf1* 基因的启动子 PΔorf18E 融合 *lacZ* 基因的表达菌株 HD(Porf18E-18Z) 和 HD(PΔorf18E-18Z) 的构建流程见图 1a, β -半乳糖苷酶活性测定表明, 在 $T_0 - T_3$ 时期, HD(Porf18E-18Z) 和 HD(PΔorf18E-18Z) 菌株的转录活性没有明显区别 (图 1b), 从 T_4 开始到 T_{12} , HD(PΔorf18E-18Z) 菌株的活性明显高于 HD(Porf18E-18Z) 菌株, 说明 *orf1* 基因的缺失导致 *cry8E* 基因启动子的转录活性上升。

2.2 Porf18E 和 PΔorf18E 指导 Cry1Ac 表达菌株的获得

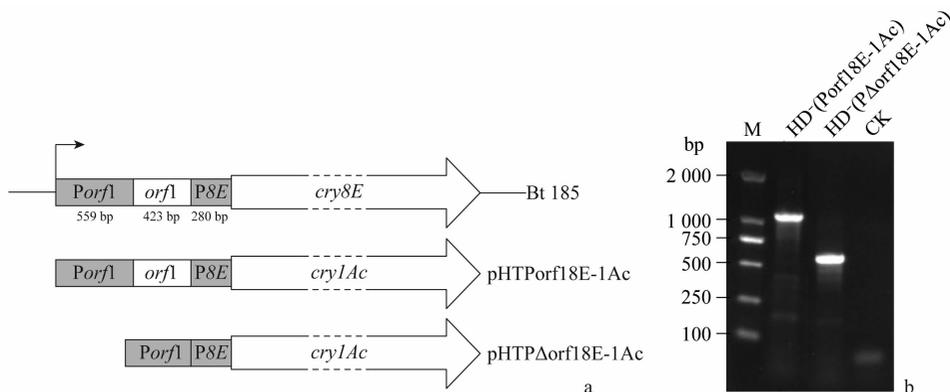
缺失 *orf1* 基因的启动子转录活性 PΔorf18E 高于全长的 Porf18E 启动子转录活性, 为了比较两个启动子指导的 Cry 蛋白的表达量, 构建了 Porf18E 和 PΔorf18E 指导 Cry1Ac 表达载体 (详见方法 1.4), 构建流程见图 2a, 将表达载体转入 HD73⁻ 无晶体突变

体株, 获得用于表达 Cry1Ac 蛋白的菌株 HD⁻ (Porf18E-1Ac) 和 HD⁻ (PΔorf18E-1Ac)。在 *cry1Ac* 基因内部设计 3' 端引物 (8E-1Ac-R), 在 Porf1 片段上游设计 5' 端引物 (8E-1Ac-R), 经 PCR 鉴定 (图 2b), 以 HD⁻ (Porf18E-1Ac) 菌株为模板, 扩增得到 1 04 bp 的片段; 以 HD⁻ (PΔorf18E-1Ac) 菌株为模板, 扩增得到 681 bp 的片段, 两个 PCR 产物大小相差 423 bp, 与缺失的 *orf1* 基因的大小一致, 说明菌株构建正确。



a: pHTPorf18E和pHTPΔorf18E重组质粒的构建; b: β -半乳糖苷酶活性分析
a: Construction of pHTPorf18E and pHTPΔorf18E; b: β -galactosidase assay

图 1 Porf18E 和 PΔorf18E 启动子转录活性分析
Fig. 1 Analysis of transcriptional activities of Porf18E and PΔorf18E



a: 重组质粒 pHTPorf18E-1Ac 和 pHTPΔorf18E-1Ac 的构建; b: HD⁻(Porf18E-1Ac) 和 HD⁻(PΔorf18E-1Ac) 菌株 PCR 鉴定
a: Construction of pHTPorf18E-1Ac and pHTPΔorf18E-1Ac; b: Identification of HD⁻(Porf18E-1Ac) and HD⁻(PΔorf18E-1Ac)

图 2 Porf18E 和 PΔorf18E 指导 Cry1Ac 表达菌株的构建

Fig. 2 Expression of Cry1Ac directed by Porf18E and PΔorf18E promoters

2.3 Cry1Ac 晶体形态学观察

在光学显微镜下观察 HD⁻ (Porf18E-1Ac) 和 HD⁻ (PΔorf18E-1Ac) 菌株产生的 Cry1Ac 晶体蛋白形态,以野生型 HD73 和无晶体突变株 HD73⁻ 作为对照,结果(图 3)表明,在 T₂₀、T₂₂、T₂₄ 这 3 个时

期,HD⁻ (Porf18E-1Ac)和 HD⁻ (PΔorf18E-1Ac)菌株均可以正常表达 Cry1Ac 晶体蛋白,与野生型 HD73 一样,形成双锥形晶体蛋白,而 HD73⁻ 菌株无晶体蛋白产生。说明 Porf18E 和 PΔorf18E 均可指导表达 Cry1Ac 蛋白。

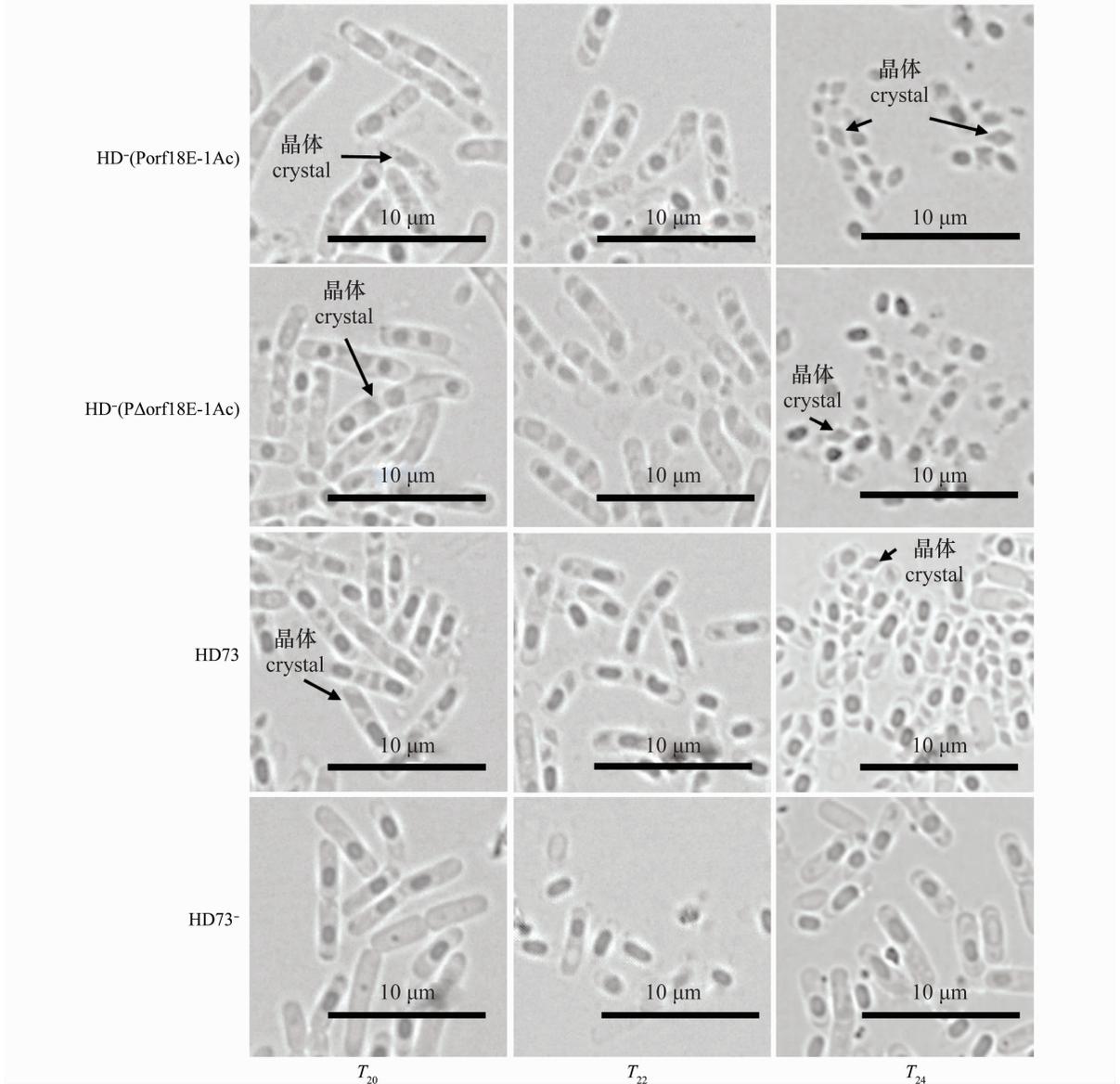


图 3 Cry1Ac 晶体形态学观察

Fig. 3 Scanning microscope image of Cry1Ac crystal protein

2.4 菌体 Cry1Ac 晶体蛋白产量分析

为了比较 Porf18E 和 PΔorf18E 指导表达的 Cry1Ac 蛋白产量,以 HD73 为阳性对照,HD73⁻ 为阴性对照,应用 Pierce660[®] nm Protein Assay Kit 对 HD⁻ (Porf18E-1Ac) 和 HD⁻ (PΔorf18E-1Ac) 菌株进行总蛋白定量,取相同量的总蛋白进行 SDS-PAGE 检测,结果表明(图 4),HD⁻ (Porf18E-1Ac) 和 HD⁻ (PΔorf18E-1Ac) 菌株均可表达出约 130 kD

的 Cry1Ac 蛋白,而 HD73⁻ 无晶体突变体无蛋白表达;利用 Image J 软件分析 Cry1Ac 蛋白的表达量,发现在总蛋白量相同的条件下,HD⁻ (PΔorf18E-1Ac) 菌株表达的 Cry1Ac 的量约为 HD⁻ (Porf18E-1Ac) 菌株的 1.5 倍,这与 PΔorf18E 和 Porf18E 启动子的酶活数据趋势相一致(图 1b),说明强活性的 PΔorf18E 启动子,指导表达的 Cry1Ac 蛋白的产量也提高。

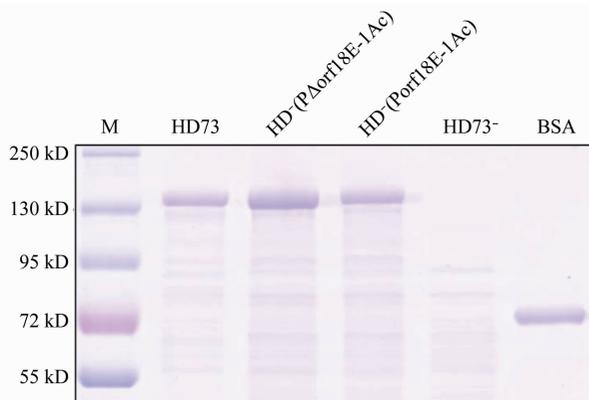


图 4 SDS-PAGE 分析 Cry1Ac 蛋白

Fig. 4 Analysis of Cry1Ac protein by SDS-PAGE

2.5 生物活性分析

为了比较 *Porf18E* 和 *PΔorf18E* 指导表达的 Cry1Ac 蛋白的活性, 选取相同生物量的 HD⁻ (*Porf18E-1Ac*) 和 HD⁻ (*PΔorf18E-1Ac*) 菌株对小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫进行生物活性测定, 以 HD73 为阳性对照, HD73⁻ 为阴性对照。接种幼虫 48 h 后计算成活率, 并计算 LC₅₀, 结果表明 (表 3) HD⁻ (*PΔorf18E-1Ac*) 菌株对小菜蛾的杀虫活性最高, 说明缺失 *orf1* 基因的启动子 *PΔorf18E* 指导表达 Cry1Ac 蛋白的菌株具有较高的杀虫活性, 这与启动子酶活结果 (图 1b) 和 Cry1Ac 蛋白表达量结果 (图 4) 一致。

表 3 Bt 菌株对小菜蛾的杀虫活性¹⁾Table 3 Bioassay of Bt strains against *Plutella xylostella*

样品 Sample	LC ₅₀ /μg · mL ⁻¹	95%置信限/μg · mL ⁻¹ 95% Confidence
HD73	15.42	8.95~24.35
HD ⁻ (<i>Porf18E-1Ac</i>)	24.56	16.37~36.50
HD ⁻ (<i>PΔorf18E-1Ac</i>)	12.94	8.34~18.77
HD73 ⁻	NA	NA

1) NA: 无活性。

NA: No activity.

3 讨论

前期研究中, 通过比较不同转录调控机制的 *cry1Ac*、*cry3A*、*cry4A* 和 *cry8E* 基因的启动子的转录活性, 发现转录活性由高到低依次为: *Pcry8E* > *P1Ac* > *Pcry4A* > *Pcry3A*^[2,6,12]。*cry8E* 基因的启动子 *Pcry8E* 可以正确地指导 Cry1Ac 的表达, 并且可以形成双锥形晶体, 同时对小菜蛾有杀虫活性^[2,12]。本研究发现, 缺失 *orf1* 基因的启动子 *PΔorf18E* 的转录活性高于已报道的最高活性的 *cry* 基因启动子 *Porf1-cry8E*, 因此 *PΔorf18E* 启动子是目前发现的最高活性的 *cry* 基因的启动子。*PΔorf18E* 可正确指导表达 Cry1Ac 蛋白, 并具有杀虫活性, 该启动子可用于构建高效表达载体, 从而实现杀虫蛋白的高

效表达, 在研制更为高效广谱的苏云金芽胞杆菌工程菌中发挥重要的作用。

苏云金芽胞杆菌在表达大量的杀虫晶体蛋白的同时还表达一些小分子量蛋白质, 它们自身不具有杀虫活性, 但可以影响某些杀虫晶体蛋白的表达和晶体形成。这些 *cry* 基因通常与这些小分子量蛋白质基因组成转录单元共同转录^[13]。这些小分子量蛋白本身没有杀虫活性, 不是伴胞晶体的主要成分, 但对某些杀虫晶体蛋白的正常表达或晶体形成有促进作用, 甚至是必需的, 因此被称为辅助蛋白 (accessory protein)。目前已知的辅助蛋白主要有 5 个, 即 *cry11Aa* 操纵子中的 P19 和 P20^[14]; *cry2Aa* 操纵子中的 ORF1 和 ORF2^[15]; 以及 *cry19A* 转录单元下游 *orf2* 编码的 60 kD 蛋白 (ORF2-60k)^[13]。P19 对 *cry11A* 基因的表达略有帮助; P20 作为分子伴侣能够促进多种 Bt 杀虫晶体蛋白的产量和/或晶体形成^[16]; 而 ORF1 对晶体蛋白产量或蛋白晶体化的影响尚不明确。ORF2 和 ORF2-60k 蛋白对于 Cry2A 和 Cry19A 的晶体形成是必需的^[13,17]。此外, *cry6Aa2* 基因下游的 ORF2 蛋白对其表达存在负调控作用, 但作用机制尚不明确^[18]。本研究中的 *cry8E* 操纵子中 *orf1* 基因编码的 ORF1 氨基酸序列, 与 *cry9Ec1* 基因操纵子中的 ORF1 相似性为 66%; 与 *cry9Ca1* 基因操纵子中的 ORF1 相似性为 65%; 与 *cry2A* 基因操纵子中的 ORF1 具有 64% 的相似性; 与 *cry11A* 操纵子中的第一个 *orf*—P19 有 40% 的相似性; 与 Cry18A 操纵子中 ORF1 具有 39% 的相似性。转录调控研究表明, *orf1* 基因缺失导致 *cry8E* 基因启动子 *PΔorf18E* 的转录活性上升, 同时可以提高 Cry1Ac 蛋白的表达量, 这些结果与前人报道的关于辅助蛋白 *p19* 基因和 *orf1* 基因的功能是不同的, 说明 *cry8E* 操纵子中的 ORF1 存在一种新的功能, 可能对 *cry8E* 基因的转录存在调控功能, 但其作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] SCHNEPF E, CRICKMORE N V, VAN RIE J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775 - 806.
- [2] 李朝睿, 杜立新, 彭琦, 等. 苏云金芽胞杆菌高效表达载体的构建 [J]. *微生物学通报*, 2013, 40(2): 350 - 361.
- [3] 郑庆云, 王冠男, 张喆, 等. 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 [J]. *微生物学报*, 2014, 10: 005.
- [4] ZHANG Xin, GAO Tantan, PENG Qi, et al. A strong promoter of a non-cry gene directs expression of the *cry1Ac* gene in *Bacillus thuringiensis* [J]. *Applied Microbiology and Bio-*

- technology, 2018, 102(8):3687-3699.
- [5] DU Lixin, QIU Lili, PENG Qi, et al. Identification of the promoter in the intergenic region between *orf1* and *cry8Ea1* controlled by sigma H factor [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(12): 4164-4168.
- [6] ZHOU Changmei, ZHENG Qinyun, PENG Qi, et al. Screening of *cry*-type promoters with strong activity and application in Cry protein encapsulation in a *sigK* mutant [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(18): 7901-7909.
- [7] SCHAEFFER P, MILLET J, AUBERT J P. Catabolic repression of bacterial sporulation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1965, 54(3): 704-711.
- [8] SHU Changlong, YU Hong, WANG Rongyan, et al. Characterization of two novel *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* strain BT185 [J]. Current Microbiology, 2009, 58(4): 389-392.
- [9] AGAISSE H, LERECLUS D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* [J]. Molecular Microbiology, 1994, 13(1): 97-107.
- [10] LIU Guiming, SONG Lai, SHU Changlong, et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73 [J]. Genome Announcements, 2013, 1(2): e00080-13.
- [11] PERCHAT S, DUBOIS T, ZOUHIR S, et al. A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group [J]. Molecular Microbiology, 2011, 82(3): 619-633.
- [12] 王新梅, 杜立新, 彭琦, 等. 四种 *cry* 基因启动子在 *spoIIID* 基因突变株中的活性比较[J]. 微生物学报, 2012, 52(9): 1075-1084.
- [13] BARBOZA-CORONA J E, PARK H W, BIDESHI D K, et al. The 60-kilodalton protein encoded by *orf2* in the *cry19A* operon of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* functions like a C-terminal crystallization domain [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(6): 2005-2012.
- [14] DERVYN E, PONCET S, KLIER A, et al. Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* [J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(9): 2283-2291.
- [15] WIDNER W R, WHITELEY H R. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities [J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(2): 965-974.
- [16] DENG Chao, PENG Qi, SONG Fuping, et al. Regulation of *cry* gene expression in *Bacillus thuringiensis* [J]. Toxins, 2014, 6(7): 2194-2209.
- [17] STAPLES N, ELLAR D, CRICKMORE N. Cellular localization and characterization of the *Bacillus thuringiensis* Orf2 crystallization factor [J]. Current Microbiology, 2001, 42(6): 388-392.
- [18] YU Ziquan, BAI Peisheng, YE Weixing, et al. A novel negative regulatory factor for nematocidal Cry protein gene expression in *Bacillus thuringiensis* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(6): 1033-1039.
- (责任编辑: 田 喆)
-
- (上接 29 页)
- [21] CHI H, SU H Y. Age-stage, two-sex life tables of *Aphidius gifuensis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and its host *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) with mathematical proof of the relationship between female fecundity and the net reproductive rate [J]. Environmental Entomology, 2006, 35(1): 10-21.
- [22] CHI H. TWOSEX-MSChart: a computer program for the age-stage, two-sex life table analysis. National Chung Hsing University [DB/OL]. <http://140.120.197.173/Ecology/Download/TWosex-M Chart. rat/>. 2016.
- [23] 杜光玲, 赤国彤. 种衣剂及其发展应用的研究[J]. 中国农学通报, 2002, 18(1): 52-57.
- [24] 党志红, 李耀发, 潘文亮, 等. 吡虫啉包衣防治小麦蚜虫技术及安全性研究[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(6): 1676-1681.
- [25] 高占林, 党志红, 李耀发, 等. 吡虫啉包衣量对小麦蚜虫的防治效果及其在小麦籽粒中的残留研究[J]. 河北农业科学, 2011, 15(10): 57-59.
- [26] 李耀发, 党志红, 潘文亮, 等. 新烟碱类杀虫剂噻虫胺拌种防治麦蚜的田间药效及安全性评价[J]. 农药, 2013, 52(9): 689-691.
- [27] 都振宝, 苗进, 武予清, 等. 新烟碱类杀虫剂拌种对麦蚜田间药效及药剂残留动态分析[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(6): 1682-1687.
- [28] 刘爱芝, 韩松, 梁九进. 新烟碱类杀虫剂拌种防治麦蚜效果及安全性研究[J]. 河南农业科学, 2012, 41(12): 94-97.
- [29] 高志山, 张学峰, 刘海涛, 等. 新烟碱类杀虫剂种子包衣防治麦蚜的可行性评价[J]. 植物保护学报, 2016, 43(5): 864-872.
- [30] ZHANG Peng, ZHANG Xuefeng, ZHAO Yunhe, et al. Effects of imidacloprid and clothianidin seed treatments on wheat aphids and their natural enemies on winter wheat [J]. Pest Management Science, 2016, 72(6): 1141-1149.
- [31] 范文超, 程志, 党志红, 等. 吡虫啉包衣对麦长管蚜控制机制的初步探讨[J]. 河北农业大学学报, 2013, 36(1): 90-94.
- [32] LU Y H, ZHENG X S, GAO X W. Sublethal effects of imidacloprid on the fecundity, longevity, and enzyme activity of *Sitobion avenae* (Fabricius) and *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2016, 106(4): 551-559.
- [33] RIX R R, AYYANATH M R, CUTLER G C. Sublethal concentrations of imidacloprid increase reproduction, alter expression of detoxification genes, and prime *Myzus persicae*, for subsequent stress [J]. Journal of Pest Science, 2016, 89(2): 581-589.
- [34] RIX R R, CUTLER G C. Does multigenerational exposure to hormetic concentrations of imidacloprid precondition aphids for increased insecticide tolerance? [J]. Pest Management Science, 2018, 74(2): 314-322.
- [35] WEBER G. On the ecological genetics of *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera, Aphididae) [J]. Journal of Applied Entomology, 1985, 100: 451-458.
- (责任编辑: 田 喆)