

苏云金芽胞杆菌 *sigK* 基因插入失活突变体的特点及其对 *cry3A* 基因启动子活性的影响

杜立新^{1,2,3}, 魏娟², 韩丽丽², 陈榛², 张杰², 宋福平^{2*}, 黄大昉^{4*}

¹河北农业大学植物保护学院, 保定 071001

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

⁴中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要:【目的】构建苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) *sigK* 基因插入失活突变体, 分析突变体特点并明确其对 *cry3A* 基因启动子的影响。【方法】采用同源重组技术在苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigK* 基因中插入卡那霉素抗性基因, 构建了 *sigK* 基因插入失活突变体。通过生长曲线测定、扫描电子显微镜观察晶体、芽胞形成情况和芽胞计数及 SDS-PAGE 等方法分析了突变体的特点; 构建了遗传恢复菌株对上述性状进行了功能验证; 利用启动子融合 *lacZ* 技术检测了 *cry3A* 基因启动子的转录活性。【结果】获得了苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigK* 基因突变体, 生长曲线测定表明, 突变体较出发菌株在稳定期后期生长较慢; 扫描电子显微镜观察和芽胞计数分析显示, 突变体丧失了形成芽胞和晶体的能力; SDS-PAGE 分析表明突变体中伴胞晶体蛋白的表达量明显低于出发菌株和恢复菌株。利用载体 pHT315 携带 *sigK* 基因及其启动子在突变株中表达, 所获得的遗传恢复菌株恢复了突变株产生芽胞和晶体的能力; *sigK* 基因的突变可以提高 *cry3A* 基因启动子在产胞后期的转录活性, 对 *cry3A* 启动子指导的 Cry 蛋白表达量没有显著影响。【结论】本研究证明 *sigK* 基因为苏云金芽胞杆菌芽胞形成所必需, 并影响伴胞晶体蛋白的产量; *sigK* 基因功能的丧失有利于 *cry3A* 基因启动子在产胞后期的转录。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, *sigK* 基因突变体, *cry3A* 基因启动子, 芽胞形成

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)09-1177-08

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是广泛存在于土壤中的一类特殊的革兰氏阳性细菌, 其可以在芽胞形成的同时产生对多种昆虫具有特异毒性的杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, ICPs)^[1]。苏云金芽胞杆菌芽胞的形成将

细胞分成母细胞室和前芽胞室, 进入稳定生长期后, 杀虫毒素在母细胞中积累并组装成晶体, 在芽胞形成末期杀虫晶体蛋白产量可达整个细胞干重的 20%–30%, 这种大量的杀虫晶体蛋白的产生源于它特定的转录系统且与芽胞形成因子密切相关^[2]。

基金项目: 国家“973 项目” (2009CB118902); 国家自然科学基金 (31070083)

* 通信作者。宋福平, Tel: +86-10-62896634, E-mail: fpsong@ippcaas.cn; 黄大昉, Tel: +86-10-62896113, E-mail: dfhuang@mail.caas.net.cn

作者简介: 杜立新 (1978–), 男, 河北武安人, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事害虫生物防治研究。E-mail: lxdu2091@163.com.

收稿日期: 2011-03-01; **修回日期:** 2011-03-22

芽胞形成主要是通过顺序激活 6 个 σ 因子即营养期 σ^A 因子和芽胞形成期的 σ^H 、 σ^F 、 σ^E 、 σ^G 和 σ^K 因子,有序地启动不同基因的表达,使芽胞形成基因在时间和空间上有序而准确无误地表达^[3]。苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白由 *cry* 基因编码,根据 Bt *cry* 基因启动子的转录因子不同可以将 *cry* 基因分为两类,依赖芽胞形成的 *cry* 基因和不依赖芽胞形成的 *cry* 基因,目前已知的大部分 *cry* 基因如 *cryIA*、*cry2A* 等是依赖芽胞形成的 *cry* 基因,由芽胞形成相关调节因子 σ^E 和 σ^K 调控^[4-7],其中 *cry4A*、*cry4B* 和 *cryIIA* 在生长过渡期营养体细胞中存在由 σ^H 因子调控的弱表达^[8],而 *cry3A* 基因是典型的不依赖芽胞形成的 *cry* 基因,在营养体生长阶段由 σ^A 因子调控^[9]。但关于芽胞形成的调控因子如 SigK 对不依赖于芽胞形成的 *cry* 基因表达是否有影响仍不清楚。

苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株属于库斯塔克亚种,该菌株仅含有一个 *cry* 基因——*cryIAC* 基因,位于大质粒 pHT73 上,由于 HD-73 菌株遗传背景比较

清晰^[10],因此是分析 *cry* 基因转录调控的良好材料。本研究利用同源重组技术构建了 HD-73 菌株 *sigK* 基因插入失活突变体,并且分析了突变株生长情况、形成芽胞和晶体的能力;并在该突变体基础上研究了 SigK 因子在转录水平和翻译水平对 *cry3A* 基因表达的影响,这可为今后研制更为安全高效的苏云金芽胞杆菌工程菌奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基:所用菌株与质粒见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的培养采用 LB 培养基;Bt 的培养采用 SSM 培养基(营养肉汤 8 g,1.2% MgSO₄ 10 mL,10% KCl 10 mL,1 mol/L NaOH 1 mL,定容至 997 mL,1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min,补加过滤除菌的 1 mmol/L FeSO₄ 1 mL,1 mol/L Ca (NO₃)₂ 1 mL,10 mmol/L MnCl₂ 1 mL)。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
Strains		
<i>E. coli</i> JM110	<i>rplS thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	This Lab
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rplS thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	This Lab
HD-73	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain carrying <i>cryIAC</i> gene	This Lab
HD-73 ⁻	Acrystalliferous mutant strain	This Lab
HD Δ sigK	HD-73 Mutant, sigK gene was disrupted by homologous recombination	This study
HDHFsigK	Genetically complementary strain, containing pHTHFsigK plasmid	This study
HD73 (<i>cry3A'</i> - <i>lacZ</i>)	HD-73 strain containg plasmid pHT304Pcry3A	This study
HD Δ sigK (<i>cry3A'</i> - <i>lacZ</i>)	HD Δ sigK strain containg plasmid pHT304Pcry3A	This study
HDP3Ac	HD-73 ⁻ strain containg plasmid pHTP3Ac	This study
HD Δ sigK P3Ac	HD Δ sigK strain containg plasmid pHTP3Ac	This study
Plasmids		
pRN5101	<i>Bt-E. coli</i> shuttle, temperature-sensitive plasmid, Amp ^r , Ery ^r	This Lab
pRNsigKI	pRN5101 with sigK::Kan fragment, Km ^r	This study
pDG780	Carrying kanamycin resistance gene	This Lab
pHT315	Amp ^r , Erm ^r , <i>E. coli-Bt</i> shuttle vector, 6.5 kb	This Lab
pHTHFsigK	Amp ^r , Erm ^r , pHT315 carrying <i>PsigK-sigK</i> gene	This study
pHTP3Ac	Amp ^r , Erm ^r , pHT315 carrying <i>cry3A</i> promoter and <i>cryIAC</i> gene fusion	This Lab
pHT304-18Z	Amp ^r , Ery ^r , <i>Bt-E. coli</i> shuttle, vector containg <i>lacZ</i> gene	This Lab
pHT304Pcry3A	Amp ^r , Ery ^r , pHT30418Z carrying <i>cry3A</i> promoter and <i>lacZ</i> gene fusion	This Lab

1.1.2 主要试剂和仪器:*Taq* DNA 聚合酶购自于博迈德生物技术公司;PCR 产物回收试剂盒购自于 AXYGEN 公司,PrimeSTAR HS DNA 聚合酶购、相关的内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自于宝生物工程(大连)有限公司。营养肉汤购于北京奥博星生物

技术有限责任公司。细胞破碎仪购自 BIOSPEC 公司,电子扫描显微镜为 Hitachi S-4800。

1.1.3 引物合成及序列测定:所用引物均根据 Bt 97-27 菌株基因组序列设计,引物名称及序列见表 2。引物合成和序列测定由上海生工生物工程公司完成。

表 2 引物序列
Table 2 sequences of primers

Primer name	Sequences (5'→3')
sigK-a	(<i>Bam</i> H I) CGGGATCCTTCGATACGGATTTTGAAAGTG
sigK-b	ACCTCAAATGGTTTCGCTGAGCATCACCTTGCTCCAT
Km-a	GAGCAAGGTGATGCTCAGCGAACCATTGAGGT
Km-b	AAGATTTCTCGCTTGAAATTCCTCGTAGCGGCAC
sigK-c	GCCTACGAGGAATTTCAAGCGAGAAATCTTTTAATTG
sigK-d	(<i>Sal</i> I) ACGCGTCGACTTCTCTGCCCTTACAAACTCGT
YZsigK5	TGGGAAAAGATCATCTTGTGTACT
YZsigK3	CAGATAGAATCCGTCATTTTCAACAGT
HFsigK5	(<i>Eco</i> R I) CGGAATTCCGTTATACTTTGCTGTTCTGTT- TTTCA
HFsigK3	(<i>Sal</i> I) ACGCGTCGACTTACTCTTTTCGCTTTTCTCT- TTCTCT

1.2 细菌的培养条件

苏云金芽胞杆菌在 30℃ 培养;在突变过程中苏云金芽胞杆菌的培养温度为 39℃,摇床转速为 220 r/min,红霉素和卡那霉素的使用浓度均为 5 μg/mL。大肠杆菌 *E. coli* JM110 在 37℃ 培养,摇床转速为 220 r/min,氨苄霉素使用浓度为 100 μg/mL,红霉素使用浓度为 5 μg/mL。

1.3 DNA 操作、转化、PCR

大肠杆菌质粒提取及转化,DNA 片段纯化参考文献[11]。苏云金芽胞杆菌总 DNA 提取和电击转化参考文献[12]。

1.4 突变体的构建

pRN5101 是 *E. coli*-*Bacillus* 穿梭载体,含有革兰氏阳性菌温度敏感型的复制区,用于同源重组,进行基因敲除操作,方法参考文献[13]。以 HD-73 基因组为模板,用引物 sigK-a、sigK-b 扩增突变盒 sigKA,引物 sigK-c、sigK-d 扩增突变盒 sigKD;以质粒 pDG780 为模板,用引物 Km-a、Km-b 扩增突变盒 sigKK(引物见表 2)。以 sigKA、sigKK 和 sigKD 为模板,以 sigK-a、sigK-d 为引物应用重叠 PCR 技术扩增得到重叠片段 sigKAKD。对重叠片段 sigKAKD 进行 *Bam*H I、*Sal*I 双酶切后插入到 pRN5101 质粒相应位点间构建敲除载体 pRNsigKI,将敲除载体克隆并去甲基化后电击转化进入 HD-73 菌株中,39℃ 进行高温突变插入卡那霉素抗性基因。将高温筛选的菌液稀释适当倍数后涂布于添加红霉素的 LB 平板与添加卡那霉素的 LB 平板,在 30℃ 培养,挑选有卡那霉素抗性且对红霉素敏感的菌株,并以引物 YZsigK5、YZsigK3 进行筛选鉴定。

1.5 恢复株的构建

根据 Bt 97-27 中 *sigK* 基因的序列,设计了一对引物 HFsigKF 和 HFsigKR(用于扩增 *sigK* 全长序列(含启动子)),扩增得到的 *sigK* 全长片段与穿梭载体 pHT315 连接,转化大肠杆菌 JM110,获得重组质粒 pHTHFsigK,继而转化 HD Δ *sigK* 菌株,获得恢复菌株,命名为 HDHFsigK 菌株。

1.6 生长情况分析

将各菌株接种于 SSM 培养基中 220 r/min、30℃ 培养,每 1 h 取样,利用分光光度计测定在波长 600 nm 的吸光值 *OD*₆₀₀,确定各菌株的生长曲线,并确定 T0(T0 是对数生长期结束的时间,Tn 是距离 T0 前后的时间)。

1.7 显微镜观察

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蛋白晶体的能力。光学显微镜制样:将胞晶混合液滴于载玻片上,涂抹均匀,烘干固定,石炭酸复红染液染色 3 min,清水冲洗,100 × 油镜进行镜检。扫描电镜制样:胞晶混合液均匀涂于盖玻片上,干燥,离子溅射喷金(2 nm),Hitachi S-4800 扫描电镜观察拍照。

1.8 活芽胞计数分析

取完全释放芽胞的培养液进行梯度稀释,80℃ 热处理 15 min 后涂营养平板,24 h 后记录平板上长出的单克隆,即为活芽胞数。

1.9 β-半乳糖苷酶活性分析

将菌株分别接入含有红霉素的 SSM 培养集中,30℃,220 r/min 振荡培养,由 T0 开始取样至 T12,每小时取样一次,每次 2 mL,离心后弃上清,样品立即至于 -20℃ 保存。β-半乳糖苷酶活性分析方法见参考文献[14],进行 3 次独立重复试验,取平均值。

1.10 菌株表达杀虫晶体蛋白能力分析

将各菌株接种于 SSM 培养基中 220 r/min、30℃ 培养,在菌体即将裂解之前取样,15294 × g 离心 1 min,取适量水重悬至 *OD*₆₀₀ 值一致,取相同量菌液,经破碎后,利用 SDS-PAGE 检测菌株产生的杀虫晶体蛋白,方法参见文献[11]。

2 结果

2.1 *sigK* 基因插入失活突变株 HD Δ *sigK* 的构建

克隆得到 HD-73 菌株 *sigK* 基因并测序,HD-73

sigK 基因全长 714 bp (EU370934)。通过重叠引物 PCR 得到 *sigK* 基因敲除突变盒 *sigKAKD*, 突变盒由 *sigK* 基因上游 606 bp (包括 *sigK* 基因 5' 端 141 bp)、卡那霉素抗性基因 1473 bp 和 *sigK* 基因 3' 端 551 bp 组成, 共 2630 bp, 将其插入到温敏载体 pRN5101 中得到 pRNsigKI (图 1-A), 并转化 HD-73 菌株中进行高温突变, 筛选对红霉素敏感并且有卡那霉素抗性的菌株。以突变盒外侧设计引物 YZsigK5 和 YZsigK3, 以抗卡那霉素菌株和出发菌株 HD-73 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 鉴定。出发菌株扩增得到的片段约 1.2 kb, 敏感菌株扩增片段约 2.7 kb, 较出发菌株扩增片段大约 1.5 kb, 即为插入的卡那霉素抗性基因 (图 1-B)。证明该菌株即为 *sigK* 基因突变株, 命名为 HD Δ *sigK*。

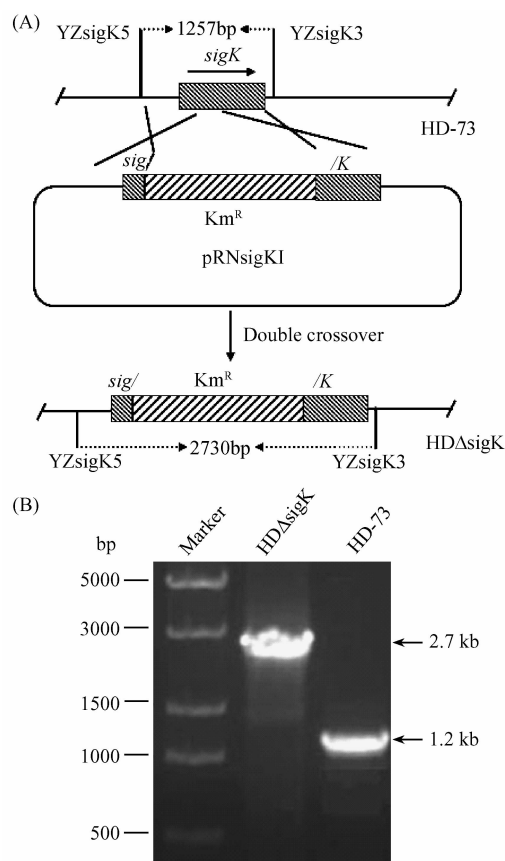


图 1 *sigK* 基因插入失活突变体的构建 (A) 和 PCR 鉴定 (B)

Fig. 1 Construction and PCR identification of *sigK* gene disruption mutant. A: Sketch map of the process for *sigK* gene disruption mutant HD Δ *sigK*; B: Identification of HD Δ *sigK* and HD-73 by PCR.

2.2 *sigK* 基因失活对菌株生长的影响

生长曲线测定结果表明 (图 2), 出发菌株、突

变株和恢复株的生长速度在对数生长期差别不大, 进入稳定期后突变株 HD Δ *sigK* 生长逐渐变缓, 这表明 *sigK* 基因的失活对菌体在稳定期后期的生长有一定的影响; 而恢复株 HDHF*sigK* 的生长情况得到了恢复, 与出发菌株 HD-73 的生长情况差别不明显。

2.3 *sigK* 基因失活对芽胞形成和杀虫晶体蛋白产量的影响

以出发菌株 HD-73 为对照, 利用 SSM 培养液培养突变株 HD Δ *sigK* 和遗传恢复株 HDHF*sigK* 至 T20, 至细胞裂解, 利用扫描电子显微镜观察发现, 出发菌株和恢复株都释放出大量卵圆形的芽胞和菱形晶体 (图 3-A 和 C), 而突变株 HD Δ *sigK* 则仍然以营养体的形式存在, 没有芽胞和伴胞晶体出现 (图 3-B), 这说明 *sigK* 基因的失活导致 HD-73 菌株丧失了产生芽胞和晶体的能力; 活芽胞计数分析也表明突变株丧失了产生芽胞的能力 (图 4-A); 利用 SDS-PAGE 检测 Cry 蛋白的表达情况, 从图 4-B 中可以发现, 出发菌株 HD-73 可以产生大量 130 kDa 的杀虫晶体蛋白, 而突变株 HD Δ *sigK* 的蛋白产量明显低于出发菌株, 这说明 *sigK* 基因失活严重影响了 Cry1Ac 的表达。恢复菌株 HDHF*sigK* 能够表达 130 kDa 的 Cry1Ac 蛋白, 并且蛋白产量明显高于突变株, 这表明突变株产生杀虫晶体蛋白的能力得到了恢复。

2.4 *sigK* 基因失活对 *cry3A* 基因启动子的影响

cry3A 基因启动子转录活性分析表明, *sigK* 基因的失活对早期 *cry3A'*-*lacZ* 的表达无明显的影响, 而从 T9 开始, 突变菌株中的转录活性显著高于出发菌株 (图 5-A)。说明 *sigK* 基因的失活有利于 *cry3A* 基因启动子后期的转录。

以突变菌株 HD Δ *sigK* 为对照, 利用 SSM 培养液培养 HD Δ *sigK*P3Ac 和 HDP3Ac 培养至 HDP3Ac 细胞裂解, 利用 SDS-PAGE 检测 Cry1Ac 的表达情况, 从图 5-B 中可以发现在 HD Δ *sigK*P3Ac 和 HDP3Ac 中 Cry1Ac 的表达量没有明显差异, 而突变体 HD Δ *sigK* 中 Cry1Ac 的表达背景也很低, 说明 *sigK* 基因失活对 *cry3A* 启动子指导的 Cry1Ac 表达量没有下降。

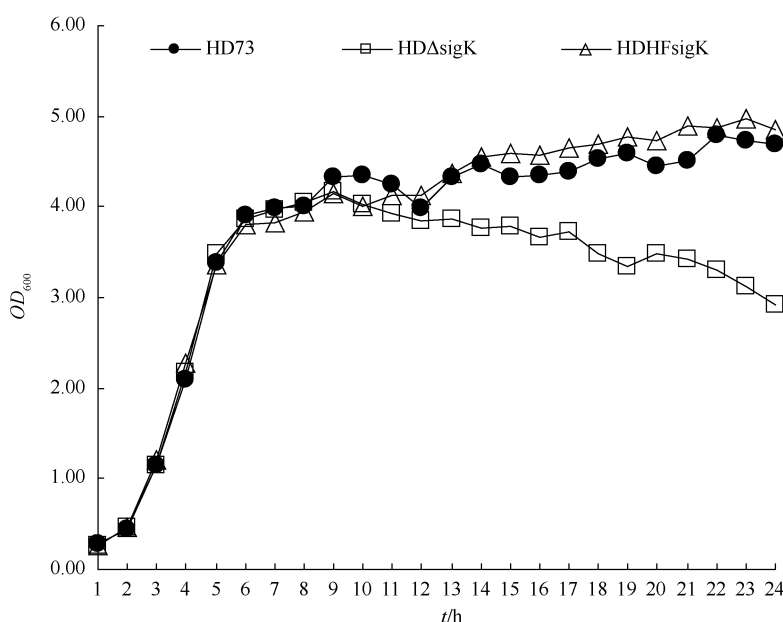


图2 菌株的生长速率比较

Fig. 2 Growth of HDΔsigK (□) in SSM medium compared with that of the HD-73 wild-type strain (●) and complemented HDHFsigK (△) strain.

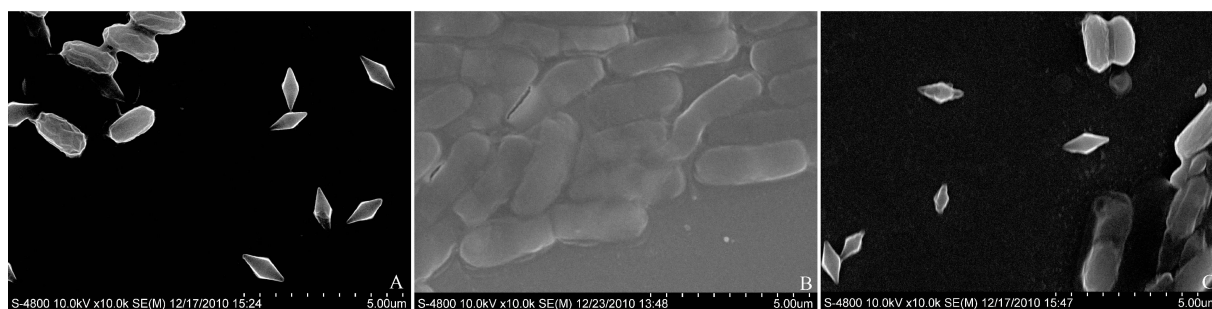


图3 不同菌株的扫描电镜观察结果

Fig. 3 Scanning electron microscopy observation of spore and crystal mixture. A: HD-73; B: HDΔsigK; C: HDHFsigK. The *sigK* gene disruption mutant HDΔsigK didn't produce spherical crystals compared with HD-73 and HDHFsigK.

3 讨论

在枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis* 168) 中, SigK 调控存在于 71 个转录单位中的 111 个基因^[15], 如 DNA 结合蛋白 GerE 的编码基因 *gerE* 与 DPA 合成积累有关的基因 *spoVA* 和 *spoVK*, 芽胞成熟所需的 *spoVD* 基因以及 14 个与芽胞衣蛋白的合成和积累相关的基因。而在苏云金芽胞杆菌中, SigK 因子可能调控更多、独有的基因, 并参与 *cry* 基因表达和晶体形成的调控网络。因此, 苏云金芽胞杆菌 *sigK* 基因突变株的获得对研究 *cry* 基因的表达调控、晶体形成机制及其与芽胞形成间的关系具有重要的

意义。

本研究通过同源重组方法构建了 *sigK* 基因插入失活突变体, 发现突变体不能正常产生芽胞和伴胞晶体。通过遗传互补, 使突变体重新恢复了产生芽胞和伴胞晶体的能力, 证明 *sigK* 基因是 Bt 产生芽胞和伴胞晶体所必需的。SDS-PAGE 发现突变菌株产生晶体蛋白的能力受到很大的影响, 蛋白产量明显低于出发菌株和恢复株。研究表明 *cryIAc* 基因的转录由 SigE、SigK 识别其双启动子 BtI 和 BtII 来调控^[4, 16], *sigK* 基因失活将会直接影响 BtII 启动子的转录从而导致 CryIAc 蛋白产量的下降。Bravo 等也构建了 Bt 407 菌株的 *sigK* 基因突变体^[16], 由于该菌株不携带任何 *cry* 基因, 通过

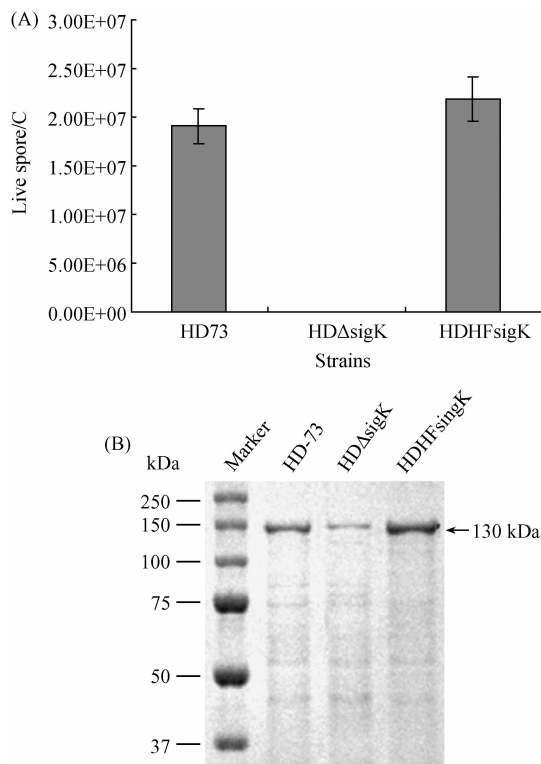


图4 *sigK* 基因突变体产芽胞 (A) 和蛋白 (B) 能力分析

Fig. 4 Analysis of live spores and protein production of *sigK* gene mutant. A: Spore production of the HD-73 wild-type, HDΔ*sigK* and complemented HDHfsigK strains. The number of colony forming units (CFU) indicates the number of live spores per mL. Each value represents the mean of at least three replicates; B: SDS-PAGE analysis of Cry1Ac protein in the HD-73 wild-type, HDΔ*sigK* and complemented HDHfsigK strains.

导入携带 *cry1Aa* 基因的质粒 pHT410 来分析 *sigK* 基因失活对 Cry 蛋白产量的影响,并且发现在 407 菌株和 *sigK* 基因突变体中 Cry 蛋白产量相似,这一点是与本文得到的结果是不同的。由于本研究中 Cry1Ac 蛋白产量的分析是 HD-73 和 *sigK* 基因突变体中自身携带的 *cry* 基因,能更真实反映 *cry1Ac* 基因的表达方式。本研究所用试验材料为苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种 HD-73 菌株,该菌株仅含有一个 *cry* 基因 *cry1Ac*,该基因的转录调控方式相对清楚,本课题组以 HD-73 为出发菌株已经先后构建获得了 *sigE* 基因、*sigL* 基因和 *spoIIID* 基因突变体^[17-19],因此该菌株一系列突变体的获得将为分析杀虫晶体蛋白形成机制提供宝贵的试验材料。

苏云金芽胞杆菌制剂是目前应用范围最广、产量最大的生物杀虫剂之一,在农林害虫防治中发挥着重要的作用。但是 Bt 制剂存在持效期短以及大

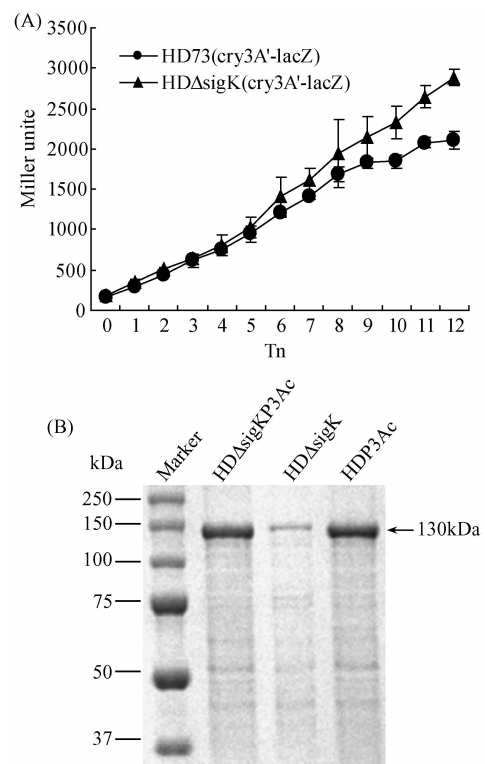


图5 *sigK* 基因失活对 *cry3A* 基因启动子在转录水平 (A) 和翻译水平 (B) 的影响

Fig. 5 Influence of *sigK* gene disruption on *cry3A* gene promoter on transcription and translation level. A: *cry3A'*-directed synthesis of β-galactosidase in HD-73 (●) and HD Δ*sigK* (▲) was determined at the indicated times after growing the cells in SSM medium at 30 °C. Each value represents the mean of at least three replicates; B: SDS-PAGE analysis of the Cry1Ac protein initiated by *cry3A* promoter.

量活芽胞的释放可能带来生态和健康风险等缺点,因而研制无芽胞的 Bt 制剂可以将杀虫蛋白包裹在细胞内从而保护杀虫蛋白免受紫外线的照射而延长持效期,也有益于环境安全。本研究发现在 *sigK* 突变体中 *cry3A* 启动子转录活性在芽胞形成晚期高于野生型,其原因可能是:*cry3A* 启动子由 SigA 控制,芽胞杆菌中 SigK 因子对 SigA 因子具有反馈抑制作用^[20],从而 *sigK* 基因缺失导致这种反馈抑制作用丧失,因此在 *sigK* 突变体中依赖 SigA 的 *cry3A* 基因启动子转录活性增强。本文构建的无芽胞 *sigK* 突变体中 *cry1Ac* 启动子指导的 Cry 蛋白产量明显低于野生型,而 *cry3A* 启动子指导的 Cry 蛋白产量与野生型相比没有下降,由此我们设想利用 *cry3A* 基因启动子在 *sigK* 基因突变体中表达不同的 *cry* 基因,同时由于 *sigK* 基因突变体不产生芽胞,杀虫晶体蛋白被

保护包裹在细胞内,而达到延长持效期和环境安全的目的。此研究结果为构建新型 Bt 工程菌株、改善 Bt 制剂的持效期和安全性提供了一种新的策略。

参考文献

- [1] Raymond B, Johnston PR, Nielsen-leroux C, Lereclus D, Crickmore N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen. *Trends Microbiology*, 2010, 18(5): 189-194.
- [2] Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(21): 6027-6032.
- [3] Schmalisch M, Maiques E, Nikolov L, Camp AH, Chevreux B, Muffler A, Rodriguez S, Perkins J, Losick R. Small genes under sporulation control in the *Bacillus subtilis* genome. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(20): 5402-5412.
- [4] Komano T, Takabe S, Sakai H. Transcription of the insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Annual Review*, 2000, 5: 131-154.
- [5] Mohamed AI, Natalya G, Matthew J, Lee AB. *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1(1): 31-50.
- [6] Kant S, Kapoor R, Banerjee N. Identification of a catabolite-responsive element necessary for regulation of the *cry4A* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(14): 4687-4692.
- [7] Zhang J, Schairer HU, Schnetter W, Lereclus D, Agaisse H. *Bacillus popilliae* *cry18Aa* operon is transcribed by δ^E and δ^K forms of RNA polymerase from a single initiation site. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(5): 1288-1293.
- [8] Poncet S, Dervyn E, Klier A, Rapoport G. Spo0A represses transcription of the *cry* toxin genes in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, 1997, 143(8): 2743-2751.
- [9] Agaisse H, Lereclus D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* *cryIIIA* toxin gene is not dependent on a sporulation specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(15): 4734-4741.
- [10] Germán PG, Regina B, Jorge EI. Potential effect of a putative σ^H -driven promoter on the over expression of the *CryIAc* toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 104(2): 140-146.
- [11] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Lereclus D, Arantes O, Chauvaux J, Lecadet M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 51(1): 211-218.
- [13] Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-Positive bacteria. *Applied and Environment Microbiology*, 2004, 70(11): 6887-6891.
- [14] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- [15] Eichenberger P, Fujita M, Jensen ST, Conlon EM, Rudner DZ, Wang ST, Ferguson C, Haga K, Sato T, Liu JS, Losick R. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): e328.
- [16] Bravo A, Agaisse H, Salamon S, Lereclus D. Analysis of *cryIAa* expression in *sigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular and General Genetics*, 1996, 250: 734-741.
- [17] 魏娟, 孙长坡, 宋福平, 张杰, 高继国, 黄大昉. 苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigE* 基因突变体的构建与特点. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2008, 35(10): 1581-1586.
- [18] 彭琦, 朱莉, 宋福平, 张杰, 高继国, 黄大昉. 苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigL* 基因突变体的特性分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(9): 1147-1153.
- [19] 张茜茜, 束长龙, 张杰, 黄大昉, 宋福平. 苏云金芽胞杆菌 *spoIID* 基因缺失突变株的特点. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(9): 1165-1170.
- [20] Wang L, Perpich J, Driks A, Kroos L. Maintaining the transcription factor SpoIID level late during sporulation causes spore defects in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(20): 7302-7309.

Characterization of *Bacillus thuringiensis sigK* disruption mutant and its influence on activation of *cry3A* promoter

Lixin Du^{1,2,3}, Juan Wei², Lili Han², Zhen Chen², Jie Zhang², Fuping Song^{2*}, Dafang Huang^{4*}

¹College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

²State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

³Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding 071000, China

⁴Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [**Objective**] To construct and characterize a *sigK* gene disruption mutant of *Bacillus thuringiensis* and to study influence of *sigK* gene disruption on the activation of *cry3A* gene promoter. [**Methods**] We constructed the *sigK* gene disruption mutant HD Δ *sigK* by inserting kanamycin resistance gene via homologous recombination. Scanning electron microscopy and spore formation analysis were used to detect the abilities of sporulation and crystal protein formation of both the mutant and the wild-type strain. SDS-PAGE analysis was used to detect the expression of crystal protein. Beta-galactosidase assay of *cry3A'-lacZ* gene fusion was performed to analyze the influence of *sigK* gene disruption on the activation of *cry3A* promoter. [**Results**] The growth curve showed that mutant grew slowly in late stationary phase compared to the wild-type strain. Scanning electron microscopy and spore formation analysis indicated that no spore was produced in *sigK* disruption mutant. SDS-PAGE results exhibited that the expression of *cry* gene was significantly decreased in the mutant. Beta-galactosidase assay showed that the activation of *cry3A* promoter was stronger in the mutant than that in HD-73 during late stationary phase, but the disruption of *sigK* gene had no significant influence on the production of Cry1Ac which was initiated by *cry3A* gene promoter. [**Conclusion**] These results indicated that *sigK* gene was one of the essential genes during the sporulation of *Bacillus thuringiensis*, and influenced the expression of crystal protein. The expression of crystal protein which was initiated by *cry3A* gene promoter in *sigK* disruption mutant could be used to develop high-efficiency and safe biological pesticides.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *sigK* gene mutant, *cry3A* gene promoter, sporulation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2009CB118902) and by the National Natural Science Foundation of China (31070083).

* Corresponding authors. Fuping Song, Tel: +86-10-62896634, E-mail: fpsong@ippcaas.cn; Dafang Huang, Tel: +86-10-62896113, E-mail: dfhuang@mail.caas.net.cn

Received: 1 March 2011/ Revised: 22 March 2011