

# 苏云金芽孢杆菌 B-Pr-88 菌株中 *cry2Ab4* 基因的表达和杀虫活性研究

## Expression and Insecticidal Activity of a Novel Gene *cry2Ab4* from *Bacillus thuringiensis* Strain B-Pr-88

李长友<sup>1,2</sup>, 张 杰<sup>1</sup>, 宋福平<sup>1</sup>, 韩岚岚<sup>1</sup>, 李国勋<sup>2</sup>, 黄大昉<sup>3\*</sup>

LI Chang-You<sup>1,2</sup>, ZHANG Jie<sup>1</sup>, SONG Fu-Ping<sup>1</sup>, HAN Lan-Lan<sup>1</sup>, LI Guo-Xun<sup>2</sup> and HUANG Da-Fang<sup>3\*</sup>

1 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 100094

2 莱阳农学院植保学院, 青岛 266109

3 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

1 State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China

2 Laiyang Agricultural College, Qingdao 266109, China

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

**摘 要** 以我室自行分离的对鳞翅目夜蛾科害虫具有高毒力的 Bt 菌株 B-Pr-88 为材料, 用 PCR-RFLP 方法从其质粒 DNA 文库中筛选到含 *cry2Ab* 基因的一个阳性克隆 pZF858, 序列测定发现, 该片段含有 *cry2Ab* 全长基因, 开放读码框为 1902bps, 编码由 633 个氨基酸组成的 70.7kD 蛋白, 氨基酸同源性与已公布的 *cry2Ab* 基因同源性均为 99.8%。经 Bt 基因国际命名委员会正式命名为 *cry2Ab4*。根据 *cry2Ab4* 基因开放阅读框(ORF)两端序列, 设计合成一对特异引物 L2ab5 和 L2ab3, PCR 扩增获得 *cry2Ab4* 完整 ORF, 与大肠杆菌表达载体 pET-21b 连接, 构建了重组表达质粒 pET-2Ab4, 质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳证实该基因表达了 60kD 的蛋白, 生物测定表明, Cry2Ab4 对棉铃虫和大豆食心虫具有高毒力, 同时对小菜蛾和二化螟有一定的杀虫活性, 而对亚洲玉米螟和甜菜夜蛾没有杀虫活性。

**关键词** 苏云金芽孢杆菌, *cry2Ab4* 基因, 基因克隆, 蛋白表达, 杀虫活性

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0634-05

**Abstract** The full length *cry2Ab* gene was cloned by PCR-RFLP method from Bt strain B-Pr-88, which was isolated in China with high toxicity to the Lepidopteran insect pests. Nucleic acid sequence analysis showed that this gene was 1902 base pairs encoding 633 amino acids. This *cry* gene was named *cry2Ab4* as a novel gene by *Bacillus thuringiensis* Delta Endotoxin Nomenclature Committee. The full open reading frame sequence of the *cry2Ab4* gene was amplified with a pair of PCR primers L2ab5/L2ab3 designed according to its DNA sequence, and inserted into the *Bam*H I / *Eco*R I sites of *E. coli* expression vector pET21b to obtain the recombinant plasmid pET-2Ab4. The result of SDS-PAGE proved that Cry2Ab4 could be expressed as a 60kD protein in *E. coli* BL21(DE3) strain induced by IPTG. Bioassay of the expressed product of the *cry2Ab4* gene showed that Cry2Ab4 was highly toxic to the larvae of *Helicoverpa armigera* and *Leguminivora glycinivorella*, moderately active to the larvae of *Plutella xylostella* and *Chilo suppressalis*, but not insecticidal to the larvae of *Spodoptera exigua* and *Ostrinia furnacalis*. Our result indicated that *cry2Ab4* gene could be used as a novel gene for generation of transgenic plants and engineered microorganism.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*, *cry2Ab4* gene, gene cloning, protein expression, insecticidal activity

Received: November 22, 2006; Accepted: December 31, 2006.

This work was supported by the grants from the National Significant Basic Project( No. 2003CB114201 ) and the National Natural Science Foundation( No. 30571252 ).

\* Corresponding author. Tel: + 86-10-62896113; Fax: + 86-10-62894642; E-mail: dfhuang@ippcaas.cn

国家 973 项目( No. 2003CB114201 ) 和国家自然科学基金项目( No. 30571252 ) 资助。 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一类包括许多亚种并对多种昆虫具有高毒力的产晶体芽孢杆菌, 在害虫的防治中发挥了巨大的作用, 是近年来发展最快、应用最广的微生物杀虫剂。其中杀虫晶体蛋白的研究与应用最为广泛和深入, 主要用于培育转基因抗虫植物和构建工程微生物杀虫剂等, 因此分离具有特异杀虫活性的新型杀虫基因是国际 Bt 研究的热点之一<sup>[1]</sup>。1981 年 Schnepf 和 Whiteley 分离克隆了第一个 Bt *cry* 基因, 随着研究的不断深入, 一些具有特殊活性的杀虫晶体蛋白基因陆续被分离出来<sup>[2,3,4]</sup>。为了在研究、开发和应用等方面领先, 目前各国都在竞相寻找对新的害虫有活性的 Bt 菌株及相关特异性新基因, 到目前为止, 世界上分离克隆的 Bt 杀虫晶体蛋白基因已超过三百种<sup>\*(Bacillus thuringiensis Toxin Nomenclature Website, 2006)</sup>。

国内外第一代转基因植物所用的 Bt 基因多为单基因, 主要是 *cry1A* 类基因, 目前面临着目标害虫对抗虫植物的适应以及抗性风险等问题<sup>[5]</sup>。研究发现 *Cry2A* 类蛋白在结构和杀虫机制上不同于 *Cry1A* 类, 可用于害虫抗性的治理, 国外转双价基因(*cry1Ac* 和 *cry2Ab*) 的棉花可有效提高杀虫效果和延缓抗性的产生, 有利于延长转基因抗虫作物的有效使用期<sup>[6,7,8]</sup>。因此, 新型 *cry2A* 类基因的发掘及其

杀虫机理作用引起人们的普遍重视<sup>[9,10]</sup>。目前国内外已克隆多个 *cry2A* 类基因, 主要分为 *cry2Aa*、*cry2Ab*、*cry2Ac*、*cry2Ad* 和 *cry2Ae*, 其中以 *cry2Aa* 基因的研究较多<sup>[11,12]</sup>。*cry2Ab* 本身是一个“沉默基因”, 没有芽孢杆菌特异的启动子序列, 需借助其他基因的启动子来表达, 分离沉默基因并研究其表达和杀虫活性可以有效发掘新的杀虫基因资源, 而对 *cry2Ab* 基因的克隆和表达研究在国内还鲜见报道。

B-Pr-88 是我室从患病昆虫体内分离的对多种重要鳞翅目害虫高毒力的菌株, 其中至少包括 6 种不同的杀虫晶体蛋白基因<sup>[13]</sup>。利用 PCR-RFLP 方法从质粒 DNA 文库中筛选到一个含 *cry2Ab* 基因的阳性克隆, 分析该基因的序列并在大肠杆菌中进行了基因的表达, 测定了基因表达产物对几种主要农业害虫的活性, 发现该基因对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*) 和大豆食心虫(*Leguminivora glycinivorella*) 具有高毒力, 同时对二化螟(*Chilo suppressalis*) 和小菜蛾(*Plutella xylostella*) 等害虫也有一定的杀虫效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌株及质粒: 菌株与质粒见表 1。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Origin
Bt B-Pr-88	Bt wild strain of <i>Bacillus thuringiensis</i>	This lab
<i>E. coli</i> JM110	<i>Dam dcm supE44 hsdR17 th leu rpsL</i>	This lab
<i>E. coli</i> BL21( DE3 )	<i>hsdS gal( <math>\lambda</math> cIts857 ind1 Sam7 ini5 )</i>	This lab
<i>E. coli</i> BL21( 2Ab4 )	<i>E. coli</i> BL21( DE3 )carried pET-2Ab4	This research
pUCP19	clone vector ,Amp <sup>R</sup>	This lab
pBluescript II SK( + )	clone vector ,Amp <sup>R</sup>	This lab
pET-21b	T7 expression vector ,Amp <sup>R</sup>	This lab
pZF858	pUCP19 carried <i>cry2Ab</i> full length gene ,Amp <sup>R</sup>	This research
pZF858E	pBluescript carried <i>cry2Ab4</i> full length gene ,Amp <sup>R</sup>	This research
pET-2Ab4	pET-21b carried <i>cry2Ab4</i> full length gene ,Amp <sup>R</sup>	This research

1.1.2 培养基: Bt 和 *E. coli* 培养基均使用 LB 培养基, 参见文献 [14]。

1.1.3 试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、1kb DNA Ladder 和琼脂糖购自 Invitrogen 公司, 高分子量标准蛋白、dNTP、Taq DNA 聚合酶购自北京鼎国生物技术发展中心, Bt *cry2Ab4* 基因特异扩增引物 L2ab5/L2ab3 由上海生物工程公司合成。其它化学试剂均

为市售分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 PCR 筛选阳性克隆: PCR-RFLP 鉴定体系筛选阳性克隆方法参见宋福平等<sup>[15]</sup>。

1.2.2 其它 DNA 操作方法: 大肠杆菌质粒提取、DNA 酶切、片段回收以及连接转化等方法参见文献 [14]。

**1.2.3 序列测定及分析** :DNA 序列由 TaKaRa 公司进行测定,采用分子生物学软件 BLAST 和 DNASTAR 进行序列分析。

**1.2.4 蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析** :活化含重组表达质粒的菌株,1%接种 LB 培养液,37℃培养至  $OD_{600} = 0.5$ ,加入 IPTG 终浓度 0.5mmol/L 进行诱导,蛋白电泳样品制备与 SDS-PAGE 电泳检测方法参见文献 [14]。

**1.2.5 室内杀虫生物活性测定** :棉铃虫、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 和亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 初孵幼虫分别由中国农科院植保所棉花害虫组和玉米害虫组提供,本实验室提供二化螟(初孵幼虫)和小菜蛾(二龄幼虫),大豆食心虫成虫由田间采集,产卵孵化后取二龄幼虫进行生测。棉铃虫、甜菜夜蛾、二化螟和亚洲玉米螟均为人工饲料饲养。小菜蛾和 大豆食心虫的生测方法是以稀释不同倍数的蛋白表达产物分别浸泡甘蓝叶片和大豆幼嫩籽粒源饲料 10s,取出自然晾干后接入待测幼虫,25℃条件培养,分别于 48h 和 96h 调查结果,计算校正死亡率和  $LC_{50}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 含 *cry2Ab* 基因大片段的克隆

用引物 S5un2/S3un2 进行 PCR 扩增,从建立的菌株 B-Pr-88 质粒 DNA 文库中筛选 *cry2* 基因阳性转化子,获得了 1 个含有 *cry2Ab* 基因的重组质粒 pZF858。pZF858 经不同的限制性内切酶酶切分析后,构建出该大片段的物理图谱,分析可知 *EcoR* I 酶切重组质粒 pZF858 后,产生的 3.3kb 片段中包括全长的 *cry2Ab* 基因。因此,采用 *EcoR* I 消化质粒 pZF858,回收其中的 3.3kb 片段与载体 pBluescript II SK(+) 连接,转化 *E. coli* JM110,获得的重组质粒命名为 pZF858E。

### 2.2 *cry2Ab* 基因序列测定及分析

将重组质粒 pZF858E 进行序列测定,结果分析表明,该 3.3kb 片段中含有 *cry2Ab* 完整基因,编码区为 1902bp。该基因含有典型的芽孢杆菌核糖体结合位点(Ribosome Binding Site)序列,但基因上游没有发现启动子的存在,在基因的 3'末端有一个起终止子作用的反向重复序列,这些与国外已报道的一致<sup>[16,17]</sup>,说明该基因是一个“沉默”基因。

通过 DNA 序列同源性比较发现,该基因与 GenBank 中公布的 3 个 *cry2Ab* 基因(*cry2Ab1*、*cry2Ab2*、*cry2Ab3*)在编码区内有 7 个核苷酸发生了

变化,其中有 2 个核苷酸的差异导致编码的蛋白中第 110 位氨基酸由亮氨酸(Leucine)变为缬氨酸(Valine),第 414 位由天冬酰胺(Asparagine)变为异亮氨酸(Isoleucine),其余 5 个核苷酸的变化并没有引起氨基酸序列的改变。与已公开的 3 个 *cry2Ab* 基因的氨基酸序列同源性均为 99.8%,该基因是一个新的 Bt 杀虫晶体蛋白基因。已将该序列在 GenBank 登记,序列注册号为 AF336115,并提交 Bt 基因国际命名委员会,于 2000 年被正式命名为 *cry2Ab4*。

该基因编码的 *Cry2Ab4* 蛋白由 633 个氨基酸残基组成,推导的理论分子量为 70.7kD,等电点为 9.11,为弱碱性蛋白。蛋白由 39.5%的疏水氨基酸、43.8%的亲水氨基酸、9.6%的碱性氨基酸和 7.1%的酸性氨基酸组成,其中天冬酰胺(Asparagine)、亮氨酸(Leucine)、丝氨酸(Serine)和苏氨酸(Threonine)等氨基酸含量高,分别占氨基酸总数的 10.9%、10.3%、9.5%和 8.1%;半胱氨酸(Cysteine)的含量最低,只有 3 个,占氨基酸总数 0.5%。

### 2.3 *cry2Ab4* 基因在大肠杆菌中的表达

分析 *cry2Ab4* 基因序列,根据大肠杆菌 T7 表达载体 pET21b 克隆位点设计了一对引物 L2ab5/L2ab3(序列如下,L2ab5:CGCGGATCCGATGAATAGTGTA TTGAATAGC;L2ab3:CCGGAATTCAAACTTTAATAAA GTGGTG),并在两条引物上分别引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。以重组质粒 pZF858(含 *cry2Ab4* 全长基因)为模板,用 L2ab5/L2ab3 引物扩增 *cry2Ab4* 全长基因,*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 PCR 产物和载体 pET-21b,回收后连接转化 JM110,酶切检测筛选含 *cry2Ab4* 基因的转化子,命名为 pET-2Ab4。

将重组表达质粒 pET-2Ab4 转化大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导,SDS-PAGE 检测(见图 1),表达的

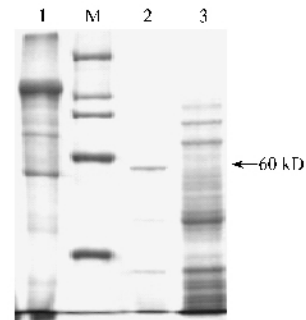


图 1 *cry2Ab4* 在大肠杆菌中表达产物的 SDS-PAGE 检测

Fig.1 SDS-PAGE analysis of *cry2Ab4*

gene expressed in *E. coli* strain

M: protein molecular weight marker (212, 116, 97, 66, 40kD); 1: B-Pr-88; 2: BL21 (pET-2Ab4); 3: BL21 (pET-21b).

*Cry2Ab4* 蛋白主要存在于包涵体中, 蛋白分子量约为 60kD, 比由该基因氨基酸序列推导的 *Cry2Ab4* 理论分子量小( 70.7kD )。

#### 2.4 *Cry2Ab4* 蛋白杀虫活性测定

提取含有 *Cry2Ab4* 蛋白的包涵体, SDS-PAGE 分析定量后, 分别测定对几种主要农业害虫的杀虫活性。结果见表 2。*Cry2Ab4* 对棉铃虫和大豆食心虫具有高毒力, 96h 的校正死亡率分别为 75.9% 和 100%。对小菜蛾和二化螟有一定的毒力, 96h 的校正死亡率分别为 40.0% 和 13.3%, 虽对二化螟的致死率不高, 但能明显抑制二化螟的生长, 对二化螟二龄和三龄幼虫处理 5 天后体重抑制率分别是 54.4% 和 61.5%( 表略); 而 *Cry2Ab4* 对甜菜夜蛾和亚洲玉米螟没有表现出杀虫活性。在此基础上, 测定了 *Cry2Ab4* 蛋白对大豆食心虫二龄幼虫的致死中浓度  $LC_{50}$  为 206.7 $\mu$ g/mL, *Cry2Ab4* 蛋白对棉铃虫初孵幼虫的致死中浓度  $LC_{50}$  为 23.7 $\mu$ g/g 饲料, 而来自 HD-73 中的 *Cry1Ac* 蛋白  $LC_{50}$  为 15.2 $\mu$ g/g 饲料, 两者毒力为同一水平。

表 2 *Cry2Ab4* 蛋白对六种农业害虫的毒力测定

Table 2 Bioassay result of *Cry2Ab4* against six species of insect pests

Species	Instar	Concentration ( $\mu$ g/g)	Mortality after 96h/%	Corrected mortality after 96h/%
<i>H. armigera</i>	1	25	76.7	75.9
<i>L. glycinivorella</i>	2	25	33.3	30.4
<i>P. xylostella</i>	2	25	40.0	40.0
<i>C. suppressalis</i>	2	25	13.3	13.3
<i>O. furnacalis</i>	1	25	0	0
<i>S. exigua</i>	1	25	0	0

### 3 讨论

国外研究报道 *cry2Ab*( *cry II B* ) 基因在 *Bt* 中的表达产物对鳞翅目的舞毒蛾( *Lymantria dispar* )、烟芽夜蛾( *Helicoverpa virescens* )、粉纹夜蛾( *Trichoplusia ni* )、美洲棉铃虫( *Helicoverpa zea* )等多种害虫具有活性<sup>[18]</sup>。本研究克隆的 *cry2Ab4* 基因与已报道的 *cry2Ab* 基因中有两个氨基酸发生了变化, 是一个新的杀虫晶体蛋白基因, 首次测定了该基因在大肠杆菌中的表达产物对我国几种重要农业害虫的杀虫活性, 发现对棉铃虫、大豆食心虫、二化螟和小菜蛾等具有较高的活性, 因此该基因可以作为培育抗虫转基因作物( 包括棉花、大豆和水稻 ) 以及构建工程微生物杀虫剂的新基因来源。另外, *Cry2Ab4* 中氨基

酸的变化是否会对其杀虫活性产生影响以及该基因对其他的害虫毒力测定等还需进一步研究。

国内外第一代转基因抗虫作物所用 *Bt* 基因主要是 *Cry1* 类基因, 存在基因品种比较单一、害虫易产生抗性等问题<sup>[5, 49]</sup>。由于 *Bt* 杀虫晶体蛋白对昆虫的作用与中肠上的受体有关, 不同的杀虫蛋白在昆虫中肠细胞膜上的结合位点和作用机制可能不同, 因此将多价基因转入作物可有效增强毒力或延缓抗性的产生。目前国外已将 *cry2Ab* 与 *cry1Ac* 基因同时转入棉花中, 该双价转基因棉花对美洲棉铃虫、草地夜蛾( *Spodoptera frugiperda* )、甜菜夜蛾、大豆尺蠖( *Pseudoplusia includens* ) 和棉红铃虫( *Pectinophora gossypiella* ) 等害虫的毒力均显著高于单基因棉( 转 *cry1Ac* 基因 ) 和常规棉<sup>[3, 4, 51]</sup>。国内主要是转 *Bt cry1* 类基因和豇豆胰蛋白酶抑制剂( Cowpea Trypsin Inhibitor, CPTI ) 基因的双价转基因棉花<sup>[19]</sup>。有关 *cry2Ab* 基因和 *cry1* 基因相互作用对我国一些重要害虫, 如棉铃虫、大豆食心虫等的杀虫效果以及抗性治理等还未见报道, 因此, 在此方面还需要进一步深入研究。

有报道 *cry2Ab*( *cry II B* ) 一般在 *Bt* 中不表达, 不形成晶体, 为沉默基因, 可以通过与 *cytA*、*cry3Aa* 和 *cry2Aa* 操纵元( Operon ) 的启动子融合实现了其在 *Bt* 无晶体突变株的有效表达, 且后者形成了蛋白晶体<sup>[16, 17]</sup>。本文研究了该基因在 T7 强启动子的作用下通过原核表达载体 pET-21b 在大肠杆菌中实现了高效表达, 并表现出杀虫活性。分析 *Cry2Ab4* 的氨基酸组成, 发现其中只有 3 个半胱氨酸, 含量只占氨基酸总数的 0.5%, 由于蛋白中的二硫键少, 不能形成正确的折叠, 同时形成的蛋白不够稳定, 容易受蛋白酶的消化, 这可能是 SDS-PAGE 检测到的蛋白分子量小于理论分子量的原因。

#### REFERENCES( 参考文献 )

- [ 1 ] Schnepf A, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein. *Microbiol and Mol Biol Rev* 1998, 62( 3 ): 775 - 806.
- [ 2 ] Chen H, Tang W, Xu C, et al. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A\** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. *TAG Theor Appl Genet* 2005, 111( 7 ): 1330 - 1337.
- [ 3 ] Donovan WP, Engleman JT, Donovan JC, et al. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl Microbiol*

- [ 4 ] Ruiz de Escudero I, Sujatha K, Estela A, et al. Molecular and insecticidal characterization of a Cry1 I protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl Environ Microbiol* 2006 **72**( 7 ): 4796 – 4804.
- [ 5 ] Akhurst RJ, James W, Bird LJ, et al. Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* ( Lepidoptera : Noctuidae ). *J Econ Entomol*, 2003 **96**( 4 ): 1290 – 1299.
- [ 6 ] Stewart SD, Adamczyk JJ, Knighten KS, et al. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid ( Lepidoptera ) larvae. *J Econ Entomol* 2001 **94**( 3 ): 752 – 760.
- [ 7 ] Tabashnik BE, Dennehy TJ, Sims MA, et al. Control of resistant pink bollworm ( *Pectinophora gossypiella* ) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. *Appl Environ Microbiol* 2002 **68**( 8 ): 3790 – 3794.
- [ 8 ] Chitkowski RL, Turnipseed SG, Sullivan MJ, et al. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid ( Lepidoptera ) pests. *J Econ Entomol* 2003 **96**( 3 ): 755 – 762.
- [ 9 ] Gore J, Adamczyk Jr, Blanco CA, et al. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm ( Lepidoptera : Noctuidae ) on meric diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. *J Econ Entomol* 2005 **98**( 1 ): 88 – 94.
- [ 10 ] Jain D, Udayasuriyan V, Arulselvi PI, et al. Cloning, characterization and expression of a new *cry2Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* strain 14 – 1. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, **128**( 3 ): 185 – 194.
- [ 11 ] Han M( 韩明 ), Yu ZN( 喻子牛 ). Cloning and expression of *cryII* gene of *Bacillus thuringiensis*. *Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ), 1995, **11**( 2 ): 167 – 172.
- [ 12 ] Yao J( 姚江 ), Zhang J( 张杰 ), Chen ZY( 陈中义 ), et al. Function of protein coded by *Bacillus thuringiensis cry2Aa10* operon on ICPs crystallization. *Acta Microbiologica Sinica*( 微生物学报 ), 2004 **44**( 1 ): 115 – 118.
- [ 13 ] Li CY( 李长友 ), Zhang J( 张杰 ), Huang DF( 黄大昉 ), et al. Biological characteristics of isolate B-Pr-88 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Phytophylacica Sinica*( 植物保护学报 ), 2004, **31**( 1 ): 21 – 25.
- [ 14 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 15 ] Song FF( 宋福平 ), Zhang J( 张杰 ), Huang DF( 黄大昉 ), et al. Establishment of identification method for *cry* gene from *Bacillus thuringiensis* isolates. *Agricultural Sciences in China*( 中国农业科学 ), 1998, **31**( 3 ): 13 – 18.
- [ 16 ] Crickmore N, Wheeler VC, Ellar DJ. Use of an operon fusion to induce expressing and crystallization of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin encoded by a cryptic gene. *Mol Gen Genet*, 1994, **242**: 365 – 368.
- [ 17 ] Widner WR, Whiteley HR. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J of Bacteriology*, 1989, **171**( 2 ): 965 – 974.
- [ 18 ] Dankocsik C, Donovan WP, Jany CS. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* . subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *Mol Microbiol*, 1990 **4**( 12 ): 2087 – 2094.
- [ 19 ] Guo SX( 郭三堆 ), Cui HZ( 崔洪志 ), Xia LQ( 夏兰芹 ), et al. Development of bivalent insect resistant transgenic cotton plants. *Agricultural Sciences in China*( 中国农业科学 ), 1999, **32**( 3 ): 1 – 7.