

对鳞翅目害虫高毒力的 Bt *cry1Aa* 基因的分离克隆及表达

姚江¹, 张杰¹, 陈中义¹, 宋福平¹, 李长友¹, 胡玉琴¹, 黄大昉^{2*}

(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. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: Bt 菌 Ly30 株是我国自行分离的对多种害虫具有高毒力的苏云金芽孢杆菌, 经 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) 系统鉴定, 它含有 *cry1Aa* 基因。以全长基因 PCR 产物的粘端定向克隆的方法, 设计一对特异引物, 分别引入 *Nco*I 和 *Bam*H I/*Nco*I 酶切位点。以 Ly30 质粒 DNA 为模板扩增 *cry1Aa* 全长基因, 与表达载体 pKK233-2 相应酶切产物连接, 转化大肠杆菌, 获得含有 *cry1Aa* 基因重组质粒 pKKLy1Aa。完成了该基因的亚克隆和序列测定, 结果表明, 该基因的编码区为 3 531 bp, 编码蛋白分子量为 133.2 kD, 含 1 176 个氨基酸, 等电点 pI 为 4.99。该基因序列已在 GenBank 中登记注册, 登录号为 AF384211, 并被国际 Bt 杀虫晶体蛋白基因命名委员会正式命名为 *cry1Aa12*。对重组菌 KKLy1Aa 进行诱导表达研究。在 0.6 mmol/L IPTG、37℃、8 h 培养条件下, 该基因获得高效表达, SDS-PAGE 电泳检测到明显的 133.2 kD 蛋白带。室内生测结果表明, *Cry1Aa* 蛋白对不同的青菜蛾品系均有较高的杀虫活性, 其 LC_{50} 值分别为 0.203 μ g/mL 和 0.554 μ g/mL。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; Ly30 菌株; *cry1Aa* 基因; 克隆; 表达; 杀虫活性

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2003) 02-0150-06

Cloning and expression of a Bt *cry1Aa* gene with high toxicity against lepidopterous pests

YAO Jiang¹, ZHANG Jie¹, CHEN Zhong-Yi¹, SONG Fu-Ping¹, LI Chang-You¹, HU Yu-Qin¹, HUANG Da-Fang^{2*}

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Insect Pests and Diseases, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: *Bacillus thuringiensis* strain Ly30, isolated from Lianyungang, Jiangsu Province, was highly toxic to several kinds of insect pests. Results of CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) analysis indicated that Ly30 contained the *cry1Aa* gene. According to the 5' and 3' end nucleotide sequence of the known *cry1Aa* gene, one pair of primers was designed and the full-length *cry1Aa* gene (3.5 kb) was thereby obtained by PCR amplification from strain Ly30. Sequencing analysis showed that this *cry1Aa* gene contained one open reading frame of 3 531 bp, and encoded 1 176 amino acid residues deduced from its nucleotide sequence with molecular mass of 133.2 kD. This gene was registered in GenBank (Accession number is AF384211) and designated as *cry1Aa12*, a novel *cry* gene, by the International Nomenclature Committee of Bt δ -endotoxin genes. Expression of *cry1Aa12* had been performed by inserted it into *E. coli* expression vector pKK233-2, and a 133.2 kD protein band could be easily detected by SDS-PAGE. Results of bioassays proved that the expression products of *cry1Aa12* gene had high toxicity against two *Plutella xylostella* colonies, with LC_{50} of 0.203 μ g/mL, 0.554 μ g/mL respectively.

Key words: *Bacillus thuringiensis* Ly30; *cry1Aa* gene; clone; expression; pesticidal activity

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 制剂是目前国内外应用最广泛的微生物杀虫剂, 其杀

虫的主要活性成分是由杀虫蛋白基因 (又称 *cry* 基因) 编码, 并于营养期或芽孢形成期产生的杀虫晶

基金项目: 国家转基因植物产业化专项资助项目 (J99-A-033)

作者简介: 姚江, 男, 1963 年 3 月生, 博士, 副教授, 现任职于连云港师范高等专科学校, 主要从事 Bt 生物学及分子生物学研究, E-mail: Jiangyao@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: dfh313@public.bta.net.cn

收稿日期 Received: 2002-03-12; 接受日期 Accepted: 2002-09-12

体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs) (黄大困和林敏, 2001)。到目前为止, 国际上已有 220 余种杀虫蛋白基因得到克隆并进行了序列分析, 根据 Crickmore 等 (1998, 2002) 确立的新的分类规则, 它们被分别确立为 37 群、71 亚群、114 类、222 个亚类杀虫蛋白基因。其中 *cry1* 类基因对鳞翅目害虫具有特异毒性, 因此被较为广泛地应用于微生物和植物的抗虫基因工程研究中, 工程微生物和转基因植物均已获得较强的抗虫性, 展示了良好的应用前景 (黄大困和林敏, 2001)。

自 1981 年 Schnepf 和 Whiteley 首次从苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) HD-1 中克隆并于 1985 年报道了第一个 Bt *cry* 基因 (即新的命名系统中的 *cry1Aa1*) 以来 (Schnepf *et al.*, 1985), 国际上已有 11 个 *cry1Aa* (*cry1Aa1* - 11) 基因被陆续克隆和测序, 且大多数来自于苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种的不同株系 (Crickmore, 2002)。中国科学院遗传研究所于 2000 年报道了国内首例分离克隆的 *cry1Aa* (命名为 *cry1Aa10*) 基因, 该基因同样来自于苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种 (HD-1-02 株系) (侯丙凯等, 2000)。随着研究和应用的深入, 从不断发现的新的毒力菌株中分离克隆杀虫蛋白基因已成为 Bt 研究热点之一。

Bt 新菌株 Ly30 是作者从江苏省连云港市云台山赤松林区自然死亡的膜翅目昆虫——日本弓背蚁 *Componotus japonicu* Mayr 幼虫体内分离获得的一株能产生菱形、不规则形及镶嵌形等多种形态伴孢晶

体的 Bt 菌, 属鲎泽亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*)。生测结果表明, 该菌株对多种鳞翅目害虫如赤松毛虫 *Dendrolimus spectabilis* Butler、玉米螟 *Ostrinia furnacalis*、水稻二化螟 *Chilo suppressalis* Walker、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner、小菜蛾 *Plutella xylostella* Linnaeus、菜青虫 *Pieris rapae* Linnaeus 等具有相当高的毒力 (姚江和李士玉, 2001)。本文作者以该菌为原始菌株, 从中分离克隆了 *cry1Aa* 全长基因, 构建表达载体导入大肠杆菌 *E. coli* 中, 其表达产物对多种鳞翅目昆虫具较高的杀虫活性, 为构建杀虫工程菌和培育抗虫转基因植物提供高毒力的候选基因。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 菌株与质粒: 本实验所用菌株和质粒见表 1。(2) 培养基: LB 培养基用于大肠杆菌及苏云金芽孢杆菌培养。(3) 酶及生化试剂: dNTPs 购自北京鼎国公司, 高保真 Taq Plus DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶购自北京六合通公司或 GIBCO 公司, 其它试剂均为市售分析纯或电泳纯。(4) 供试虫: 小菜蛾北京品系、海南品系由本组提供, 试虫分别采自北京郊区和海南省海口市郊区甘蓝菜地, 按常规方法 (张杰, 2000) 室内饲养。海南品系对 Bt 的抗性水平约是北京品系的 5 倍。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characterization	来源 Resource
菌株 strains		
JM110	<i>RpsI thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	Lab. store
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B m_B) gal dcm (DE3)</i>	Lab. store
Bt Ly30	wild type	Lianyungang Education College
KKLy1Aa	JM110 containing <i>cry1Aa12</i>	This work
质粒 plasmids		
PKK233-2	Amp ^R	Lab. store
PBlue SK (+)	Amp ^R	Lab. store
PKKLy1Aa	pKK233-2 carried <i>cry1Aa12</i>	This work
PKKLy1Aa(1)	pBlue SK(+)carried 2 185 bps of <i>cry1Aa12</i>	This work
PKKLy1Aa(2)	pBlue SK(+) carried 1 452 bps of <i>cry1Aa12</i>	This work

1.2 表达产物

(1) SDS-PAGE 检测等均参照文献(金冬雁和黎孟枫译, 1989)进行。

(2) Bt 质粒 DNA 提取参照 Narva 等(1991)方法进行。CAPS 体系鉴定 Bt *cry* 基因和阳性转化子的筛选参照宋福平等(1998)方法进行。

(3) *cry* 基因的扩增和克隆: 参照 GenBank 中公布的 *cry1A* 类基因编码区的 N 端和 C 端序列同源性, 设计并合成一对引物。5'端上游引物:

5'-CTAGCCATGGATAACAATCCGAACATC-3'

Nco I

3'端下游引物:

5'-CTAG CCATGG ATCCTGAGACTATTCCTCCATAAG-3'

Nco I + *Bam*H I

在 5'端上游引物和 3'端下游引物的 5'端分别引入 *Nco* I 和 *Nco* I + *Bam*H I 酶切位点(下划线所示)。以 Bt Ly30 质粒为模板, 利用高保真 Taq Plus DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为: 94℃预处理 3 min; 94℃变性 1 min, 53℃复性 3 min, 72℃延伸 1 min, 29 个循环; 72℃延伸 10 min。回收 PCR 产物, 按目的片段:载体 = 8:1 的比例, 将 PCR 产物和 pKK233-2 载体混合, 并加入 *Nco* I 进行酶切。抽提并回收酶切产物, 在适当的连接体系中加入 *T*₄ DNA Ligase, 4℃连接过夜。连接产物转化常规 *CaCl*₂ 方法制备的感受态大肠杆菌 JM110, 涂布在氨苄青霉素的 LB 平板上, 37℃培养 10 h 以上, PCR 筛选阳性克隆。

(4) *cry1Aa* 基因的测序由北京六合通公司完成。采用 BLAST 软件进行 DNA 序列分析。

(5) *cry1Aa* 基因原核表达载体的构建: 选择其中一个阳性重组质粒, 分别用 *Nco* I 和 *Bam*H I 酶切, 以确保所扩增的 *cry1Aa* 全长基因正向连接在 pKK233-2 载体 *P*_{trc} 启动子下, 定名为 pKKLy1Aa。

(6) *cry1Aa12* 基因的诱导表达及表达产物的 SDS-PAGE 检测和生物测定: 转接阳性克隆子 KKLy1Aa 于 LB 培养基中, 在 210 r/min、37℃培养条件下, 加入 0.6 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 分别于 2 h、4 h、6 h、8 h 和过夜培养收集诱导培养物, 离心获得菌体, 加入 10 mmol/L Tris-HCl (pH

8.0) 重悬, 超声波(200 kHz)破碎 15 min, 离心收集沉淀, 再用 1/10 体积的 Na₂CO₃ (50 mmol/L, pH 9.5) 溶解, 于 4℃冰箱保存备用。按常规 SDS-PAGE 方法检测表达产物。

(7) 生物测定: 选用对 Bt 敏感的小菜蛾北京品系和对 Bt 具有较强抗性的海南品系作为供试昆虫。两类品系的小菜蛾由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组养虫室提供。抗性依据参照宋福平等(2001)。采用浸叶法进行生物活性测定, 即将甘蓝叶片用清水洗净晾干, 选取鲜嫩一致的甘蓝叶片, 在稀释好的待测样品中浸泡 10 min, 晾干, 放入生测瓶中, 每瓶接 2~3 龄幼虫 20 头, 每个处理重复 3 次, 25℃生化培养箱中保温, 培养 72 h 后调查死、活虫数, 运用 polo 软件计算 LC₅₀。分别以原始菌株 Bt Ly30 和高毒力菌株 HD-1 作为阳性, 以大肠杆菌 JM110 为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 Bt Ly30 菌株 *cry1A* 基因的鉴定

提取 Bt Ly30 质粒, 经 CAPS 方法鉴定发现该菌株含有 *cry1Aa* 和 *cry1Ac* 两种 *cry1A* 类基因。鉴定结果见图 1 与图 2。

2.2 *cry1Aa* 全长基因的克隆

以 Bt Ly30 质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 得到一条约 3.6 kb 的扩增带。柱回收该产物, 经抽提纯化后用 *Nco* I 酶切, 以适当的体系与 pKK233-2 的 *Nco* I 酶切产物连接, 转化大肠杆菌 JM110。转化子用 PCR 扩增筛选获得 7 个阳性克隆, 通过 CAPS 体系鉴定确定均含有 *cry1Aa* 基因, 将其中一个转化子命名为 KKLy1Aa。 *Nco* I 酶切该重组质粒(命名为 pKKLy1Aa)得到 4.6 kb 和 3.6 kb 两种片段, 与相对应的载体和插入片段大小一致, 其 CAPS 分析和酶切结果见图 3 与图 4。

2.3 *cry1Aa* 基因的亚克隆和测序

选用 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切重组质粒 pKKLy1Aa (图 4), 回收大小分别为 2.2 bp、1.5 bp 的酶切片段分别与载体 pBluescript SKII (+) 的 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切产物连接, 转化 JM110, 得到 2 个亚克隆。对其重组质粒 pKKL1Aa (1) 和 pKKL1Aa (2), 分别进行序列测定, 结果表明该基因编码区长 3 531 bp。按同样的方法获得另外 2 个阳性重组质粒进行亚克隆和测序, 得到完全一致的核苷酸序列。

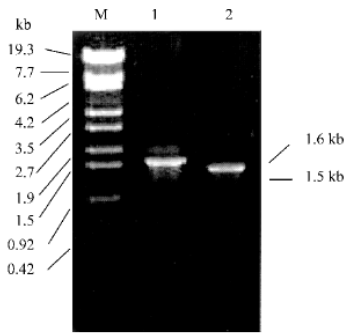


图 1 Bt Ly30 菌株 *cry1* 类基因的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of *cry1*-type gene from Ly30 isolate

M: λ DNA/*Eco130* I ;

1: 3'端 PCR product; 2: 5'端 PCR product

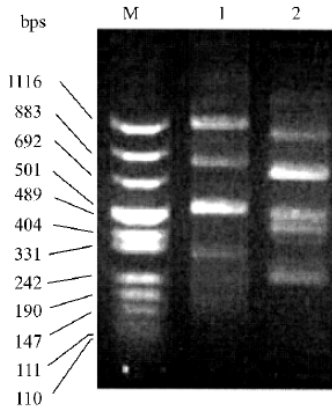


图 2 *cry1* 类基因的 CAPS 鉴定结果

Fig. 2 Results of *cry1* gene identification by CAPS

M: pUC-Mix; 1: 3'端 PCR product/*Pst* I + *Xba* I ;

2: 5'端 PCR products/*Pst* I + *EcoR* I

2.4 *cry1Aa* 基因的序列分析

由 DNA 序列推导的氨基酸为 1 176 个, 其蛋白质分子量为 133.2 kD, 等电点 pI 为 4.99, 为弱酸性蛋白质。应用 BLAST 软件网上比较同源性显示, 该基因与 *cry1Aa3* 的同源性最高, 达 99.9%, 仅存在 3 个核苷酸的差异, 然而由于密码子的简并, 并未导致编码氨基酸的变化。与 *cry1Aa10* 的核苷酸同源性为 99%, 存在 12 个核苷酸的差异, 由此引起如下位置 6 个氨基酸残基的变化: 第 27 位由 G 变为 E, 75 位由 T 变为 A, 128 位由 L 变为 F, 432 位由 G 变为 S, 879 位由 I 变为 R, 1 077 位由 S 变为 P。该基因已在国际基因库 GenBank 中注册, 登录号为 AF384211 (该基因全序列可依此查询, 本文从略), 并经 Bt 毒蛋白基因国际命名委员会正式命名为 *cry1Aa12*。

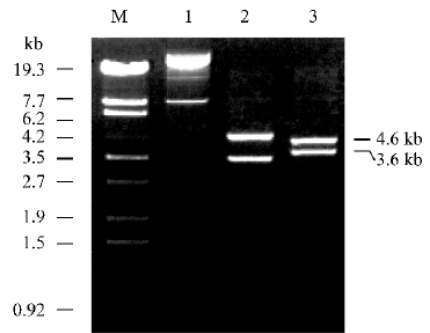


图 3 阳性克隆的酶切分析

Fig. 3 Restriction analysis of positive clone

M: 核酸分子量标准 λ DNA/*Eco130* I ;

1: pKKLy1Aa; 2: pKKLy1Aa/*Nco* I ; 3: pKKLy1Aa/*BamH* I

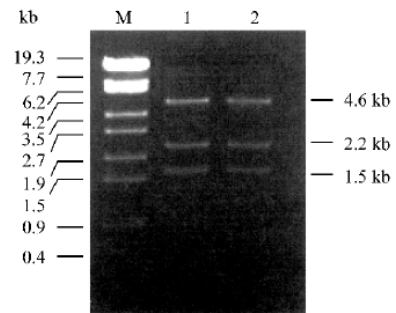


图 4 阳性克隆的亚克隆分析

Fig. 4 Subclone restriction analysis of positive clone

M: 核酸分子量标准 λ DNA/*Eco130* I ;

1, 2: pKKLy1Aa/*BamH* I + *Sac* I

2.5 *cry1Aa12* 基因的表达

用 *BamH* I 酶切阳性重组质粒 pKKLy1Aa, 电泳检测呈 4.5 kb 和 3.5 kb 两条带, 确定 *cry1Aa* 基因与 *P*_{trc} 启动子正确连接, 从而保证有效表达。将该阳性克隆子 KKLy1Aa, 转接在含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 210 r/min, 37°C 培养 2 h 后加入 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导, 每隔 2 h 取样, 一般培养 8 h 以上。各样品进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果表明 *cry1Aa12* 基因能通过表达载体 pKK233-2 在大肠杆菌中高效表达 133.2 kD 蛋白, 且在诱导 2 h 后已经开始表达, 4~6 h 就已达到最大表达量 (结果见图 5)。

2.6 *cry1Aa12* 基因表达产物的生物活性

用 2~3 龄小菜蛾 (北京品系和海南品系) 幼虫作杀虫试验, 将经超声波处理过的 *cry1Aa12* 基因表达产物配成一定浓度的母液后作二倍梯度稀释, 25°C 感染 72 h, 测定 LC₅₀。以 Ly30 和 HD-1 菌株的毒蛋白为阳性对照。结果 (表 2) 表明 *cry1Aa12* 基因编码的毒蛋白具有相当强的杀虫活

性, 对北京品系和海南品系小菜蛾的 LC_{50} 值分别为 $0.203 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0.554 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。但均低于原始菌株

Ly30 和高毒力菌株 HD-1。

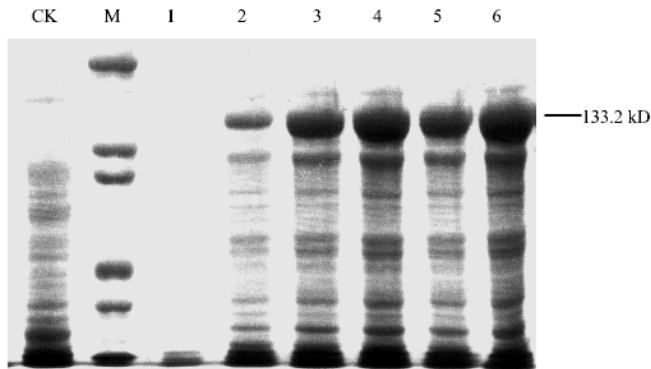


图 5 KKLy1Aa 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of KKLy1Aa expression products

M: 蛋白分子量标准 protein marker (212, 116, 97, 66, 40 kD)

1: 未诱导 (not induced); 2: 诱导 2 h (induced for 2 h);

3: 诱导 4 h (induced for 4 h); 4: 诱导 6 h (induced for 6 h);

5: 诱导 8 h (induced for 8 h); 6: 过夜 (induced over night); CK: JMI10 (pKK233-2)

表 2 表达产物的生物活性测定结果

Table 2 Bioassay results of expression products

毒蛋白 Toxin	小菜蛾种群 <i>P. xylosteella</i> colonies	LC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	95%置信限 95% confidence
Cry1Aa	北京品系 Beijing strain	0.203	0.135 ~ 0.297
Cry1Aa	海南品系 Hainan strain	0.554	0.379 ~ 0.771
Ly30	北京品系 Beijing strain	0.022	0.017 ~ 0.022
Ly30	海南品系 Hainan strain	0.039	0.032 ~ 0.045
HD-1	北京品系 Beijing strain	0.103	0.065 ~ 0.207
HD-1	海南品系 Hainan strain	0.154	0.089 ~ 0.271

3 讨论

Bt 菌 Ly30 株是我国自行分离的对小菜蛾等多种鳞翅目害虫高毒力的 Bt 菌株 (表 2)。基因类型的 CAPS 鉴定结果表明该菌株拥有 *cry1Aa*、*cry1Ac* 以及 *cry2* 类基因 (结果另文报道), 可以推断该菌株的高毒力与它拥有的多种基因有关。比较 *cry1Aa*12 基因表达产物及 Bt Ly30 株对小菜蛾的 LC_{50} 值, *cry1Aa*12 基因表达产物对不同品系小菜蛾具有相当高的毒力, 但低于原始菌株 Bt Ly30 株的毒力。推测原始菌株 Ly30 对小菜蛾的高毒力尚存在其它基因的作用。

我们采用 PCR 产物的粘端定向克隆法克隆 *cry1Aa* 全长基因。为克服使用普通 Taq 酶进行 PCR 扩增时引起的误差 (约为 1/5 000), 本研究使用了高保真的 Taq Plus DNA 聚合酶, 其扩增误差只有 1/1 600 000, 加之同时测定并比较了另两个阳性克隆子的序列, 从而保证 *cry1Aa* 全序列结果的正确可信。序列分析表明 *cry1Aa* 与 *cry1Ac* 基因的 5' 端和 3' 端序列高度保守, 所以以本研究使用的引物进行全长基因克隆时, 应能从 Bt Ly30 菌株中同时获得 *cry1Aa* 和 *cry1Ac* 基因, 但本研究得到的 7 个阳性克隆均含有 *cry1Aa*, 而未筛选到含有 *cry1Ac* 阳性克隆子, 这可能是由于在菌株中 *cry1Ac* 位于拷贝数非常低的质粒上而很难得到大量 PCR 产物所致。

启动子的种类和功能强弱是影响基因表达效率的关键因素。表达载体 pKK233-2 拥有 IPTG 强诱导的 *trp/lac* 融合启动子 *P_{trc}*。据 Ge 等 (1990) 报道, 该载体可使晶体蛋白基因的表达量占整个细胞蛋白质的 48%。本研究结果表明 *cry1Aa* 在 pKK233-2 中能够实现高效表达。鉴于大肠杆菌体系以其低廉性、高效性和稳定性而在生产中广泛应用, pKK233-2 在高效表达 *cry1Aa* 中的成功应用不仅为研究 Bt 毒蛋白基因的表达提供了更高效的载体, 而且为探讨直接应用大肠杆菌系统生产杀虫剂提供了新的线

索。

cry1Aa12 基因系从自行分离且已申报专利保护的 Bt Ly30 菌株 (专利申请号: 01108274.7) 中克隆的, 该基因产物对鳞翅目多种害虫具有高毒力。上述结果将为以提高杀虫活力和扩大杀虫谱为目的的基因组合研究创造条件, 并为构建高效杀虫工程微生物和转基因植物, 提供良好的具有自主知识产权的基因材料。

参 考 文 献 (References)

- Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, Schnepf E, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean D H, 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 807–813.
- Crickmore N, 2002. “*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature” <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt/index.html>
- Ge A Z, Pfister R M, Dean D H, 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. *Gene*, 93: 49–54.
- Hou B K, Dang B Y, Zhang Y M, Chen Z H, 2000. Cloning and sequence analysis of *cry1Aa10* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1-02 and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 8 (3): 289–293. [侯丙凯, 党本元, 章银梅, 陈正华, 2000. 苏云金芽孢杆菌 *cry1Aa10* 杀虫晶体蛋白基因的克隆序列分析以及在大肠杆菌中的表达. 农业生物技术学报, 8 (3): 289–293]
- Huang D F, Lin M, 2001. *Gene Engineer of Agricultural Microbiology*. Beijing: Science Press. 4–9. [黄大困, 林敏, 2001. 农业微生物基因工程. 863 生物高科技丛书. 北京: 科学出版社. 4–9]
- Narva, Kenneth E, Payne J M, Schwab G E, Hickie L A, Galasan T, Sick A J, 1991. Novel *Bacillus thuringiensis* microbes active against Nematodes, and genes encoding novel nematode-active toxins cloned from *Bacillus thuringiensis* isolates. EP 0462721 A2.
- Sambrook J E, Fritsch F, Maniatis T, 1989. *A Laboratory of Molecular Cloning* (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 16–340. [J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁, 黎孟枫译, 1989. 分子克隆试验指南 (第二版). 北京: 科学出版社. 16–340]
- Schnepf H E, Wong H C, Whiteley H R, 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J. Biol. Chem.*, 260: 6 264–6 272.
- Song F P, Zhang J, Huang D F, 1998. Establishment of PCR-RFLP identification system of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 31 (3): 13–18. [宋福平, 张杰, 黄大困, 1998. 苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立. 中国农业科学, 31 (3): 13–18]
- Yao J, Li S Y, 2001. The fermentation technique of Bt Ly30 strain and its application in pest control. Patent of China, Patent Number: 01108274.7. [姚江, 李士玉, 2001. 苏云金芽孢杆菌 Ly30 菌株发酵工艺及杀虫用途. 中国发明专利, 专利申请号: 01108274.7]
- Zhang J, 2000. Cloning of Insecticidal *cry* Genes to Coleopteran Pests and Construction of Genetically Engineered Bacteria. Ph. D. Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences. [张杰, 2000. 对鞘翅目害虫高毒力的 Bt *cry* 基因分离克隆和工程菌的构建. 中国农业科学院博士学位论文]