

携带苏云金芽胞杆菌 *cryIAc10* 基因重组杆状病毒的 构建及其杀虫活性

乔红, 姚伦广, 德格晶, 齐义鹏**, 周文科, 王志民

(武汉大学病毒研究所, 湖北武汉 430072)

Construction and Bioactivity of Recombinant Baculovirus with *cryIAc10* Gene of *Bacillus thuringensis*

QIAO Hong, YAO Lun-guang, DE Ge-jin, QI Yi-peng **, ZHOU Wen-ke, WANG Zhi-min
(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Using Bac-to-Bac system, the transfer vector pFCP with full-length *cryIAc10* gene of *Bacillus thuringensis* driven by the very late expressed gene *ph* promoter and intact polyhedra gene was constructed successfully. The recombinant virus vFcp, with complete polyhedra and *cryIAc10* gene, was obtained by transfection of the transfer vector pFCP DNA into insect Sf9 cells and *cryIAc10* protein can be expressed in insect cells. Meanwhile, a new shuttle vector pHTC with *cryIAc10* gene was constructed. Three kinds of engineered bacteria produced by transformation of *Bacillus thuringensis*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* all expressed protoxin with the molecular weight of 133.3kDa. The expression of the protoxin in *Bacillus thuringensis* was the highest. Bioassay indicated that the expressing product can increase virulence and killing speed of baculovirus. The results indicated that it is feasible to enhance the effectiveness of baculovirus by inserting an insecticide crystal protein gene into baculovirus controlled by the promoter of very late expressed gene.

Key words: *Bacillus thuringensis*; *CryIAc10* gene; Bac-to-Bac system; Recombinant baculovirus; Gene expression

摘要: 用 Bac-to-Bac 系统, 构建了包含极晚期基因 *ph* 启动子驱动的带有全长苏云金芽胞杆菌 *cryIAc10* 基因和完整多角体基因的重组质粒 pFCP, 用该重组质粒感染昆虫 Sf9 细胞, 得到了带有多角体和能够表达 *cryIAc10* 基因的重组杆状病毒 vFcp, 并在昆虫细胞中表达了 *CryIAc10* 蛋白。同时构建了含 *cryIAc10* 的穿梭载体 pHTC, 并分别转化大肠杆菌、枯草杆菌和苏云金杆菌晶体缺陷型菌株, 结果表明此三种工程菌均表达了分子量为 133.3kDa 的原毒素蛋白, 其中在苏云金芽胞杆菌中的表达量最高。生物测定表明重组杆状病毒 vFcp 的表达产物具有杀虫活性, 能增加杆状病毒力, 加快杆状病毒杀虫速度, 说明利用杆状病毒极晚期基因启动子驱动苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白表达, 从而改善杆状病毒的杀虫特性是可行的。

关键词: 重组杆状病毒; 苏云金芽胞杆菌; *cryIAc10* 基因; Bac-to-Bac 系统; 基因表达

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0043-06

昆虫杆状病毒 (Insect baculovirus, IBV) 作为防治农林害虫的有效制剂由来已久, 但由于其杀虫速度慢、宿主范围窄等缺点, 从而限制了它的广泛

应用。随着基因工程技术的发展和杆状病毒表达系统的广泛应用, 在昆虫杆状病毒基因组中插入外源毒素基因, 特别是苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基

收稿日期: 2003-07-29, 修回日期: 2003-10-24

作者简介: 乔红 (1968-), 女, 河南南阳籍, 主管药师, 硕士生, 从事分子病毒学研究, 现工作单位: 河南省南阳市药品检验所。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 027-87661831. E-mail: qiyipeng@whu.edu.cn

因来构建重组杆状病毒杀虫剂已成为提高昆虫杆状病毒杀虫毒力或缩短杀虫时间的一个重要策略^[1]。

苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cryIac10* 是孙明等^[2]从高毒力的苏云金杆菌 YBT-1520 菌株中克隆到的一种新的杀虫晶体蛋白基因, 由于其杀虫毒性高, 得到了广泛的关注。本文应用 Bac-to-Bac 系统构建了包含极晚期基因 *ph* 启动子驱动的带有全长苏云金芽胞杆菌基因 *cryIac10* 和完整多角体基因的重组苜宿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV), 由于该重组病毒保持有完整的多角体, 可以被昆虫口服造成有效的感染。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

pFastBac1 穿梭载体由本室提供; pBMB-k *cryIac10* gene inserted into pUC19、Bt.4D10(H3ab) 及 Bs.AS1176 为华中农业大学赠送; pBlueph 为含 1.3kb 多角体基因的质粒(由本室刘子夜博士构建); pHT3101 由法国巴斯德研究所 D.Lereclus 博士赠送; *E.coli* DH10Bac 由本实验室保存; 多角体蛋白基因完整的野生型 AcNPV 和 Sf9 昆虫细胞来自美国加州大学 Federici 博士; 小菜蛾幼虫、甜菜夜蛾幼虫为本室喂养; 所用限制性内切酶和连接酶等均购自华美公司; 扩增 *cryIac10* 的引物设计时加入 *Sal*I 酶切位点下划线处, 由上海基康公司合成。

Primer1: 5'-GCGTCGACATGGATAACAATCCGAA
CATCAATGAA-3',

Primer2: 5'-GCGTCGACCTATTCCTCCATAAGGA
GTAATTCCACG-3'。

1.2 重组质粒的构建

质粒 DNA 的提取、酶切、连接等操作方 法见文献^[3]。

用 *Pst*I/*Sal*I 双酶切质粒 pBlue-ph, 回收含有完整多角体基因的 1.3kb 片段, 插入 pFastBac I 的同 一位点构建成 pFastph。将 3.77kb 的 *cryIac10* PCR 产物经 *Sal*I 酶切回收后, 插入用 *Sal*I 消化的 pFastph 中, 得到重组转座载体 pFCP。它具有两个同向 *ph* 基因启动子 (Pph), 其一为 pFastBac I 中的 Pph, 驱动 *cryIac10* 基因表达; 另一个是 *ph* 基因的自身启动子。将重组转座载体 pFCP 转化 *E.coli* DH10Bac 感受态细胞, 转座载体 pFCP 中的 Pph-*cryIac10*-*ph* 表达盒通过转座插入到该菌的质粒 Bacmid 基因组中, 在含 X-gal 和 IPTG 的三抗 (Kan^r, Tet^r 和 Gm^r)LB 平板上挑取白色单菌落, 即得阳性重组 Bacmid。用 *Sal*I 单酶切质粒 pFCP, 回收

cryIac10 基因片段, 插入 pHT3101 的同 一位点, 构建成原核表达载体 pHTC。酶切鉴定表明所有载体构建是成功的。本文所使用的各种载体的构建见图 1。

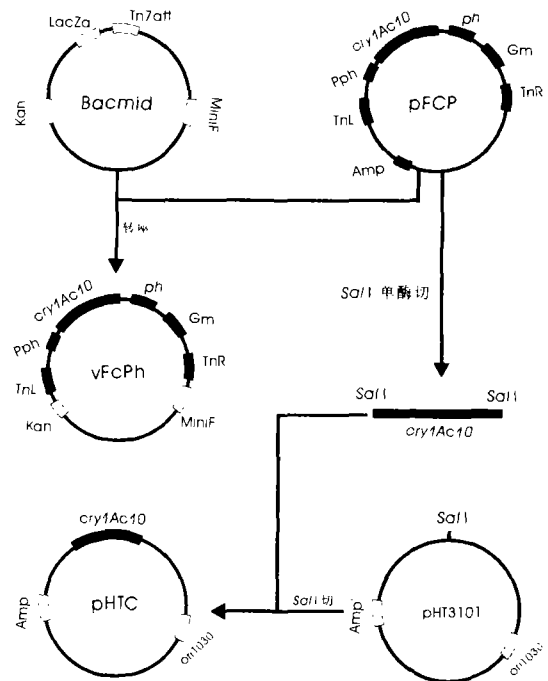


图 1 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids

MiniF: repton of Phage F; *ph*: polyhedrin gene of AcMNPV; Pph: the promoter of *ph* gene; ori1030: replication origin of a *B. thuringensis* plasmid.

1.3 昆虫细胞的转染

用磷酸钙共沉淀技术将克隆有外源基因的穿梭载体 DNA 转染 Sf9 昆虫细胞, 从被感染的 Sf9 细胞提取病毒 DNA, 接着进行限制性内切酶分析。重组病毒的滴度用空斑法在 Sf9 细胞中测定^[4,5]。

1.4 质粒转化

常规法转化大肠杆菌 DH10Bac 菌株和电脉冲转移法转化 Bt 菌株的操作方法见文献^[3]; PEG 介导原生质体法转化 Bs 菌株操作方法见文献^[6,7]。

1.5 SDS-PAGE 电泳

重组病毒接种 Sf9 细胞及外源表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳制样方法见文献^[8], SDS-PAGE 电泳方法见文献^[3]。

1.6 生物测定

将重组病毒接种于一定量的 Sf9 细胞中, 27℃ 培养 4d, 吹起细胞, 转入离心管, 2500×g 离心, 细胞沉淀用同样体积 PBS 重悬; 取部分上清, 于

10 0000×g 离心, 细胞沉淀用同样体积 PBS 重悬, 则可得到 (1) 未离心悬浮液, (2) 低速离心沉淀悬浮液, (3) 低速离心上清, (4) 高速离心沉淀悬浮液, (5) 高速离心上清, 五种含有不同组分的测试样品。分别取各样品 10 μ L 加于 990 μ L PBS 中混匀, 取混匀后的稀释液 160 μ L 涂于 16cm² 菜叶上凉干, 再放入 2 龄小菜蛾幼虫 20 头, 饲养 72h, 统计各样品的死亡数。同时设置野生型 AcNPV (小菜蛾对 AcNPV 不敏感) 病毒感染 Sf9 细胞悬液、BT 晶体蛋白、细胞悬液对照, 各设三次重复。将重组病毒与野生型 AcNPV 的多角体悬液分别混入人工饲料, 使两种病毒多角体成梯度浓度分组饲养 3 龄甜菜夜蛾幼虫, 每组 48 头幼虫, 各设三次重复。从感染后 3d 起, 每天检查病毒感染死亡率, 非病毒死亡幼虫不计在内, 感染后 9d 结束试验。统计分析按文献^[9]进行。

2 结果与分析

2.1 *cryAc10* 基因在三种原核细胞中的表达

用原核表达载体 pHTC 转化大肠杆菌 DH10Bac, 再分别用原生质体 PEG 介导转化和电脉冲转移法转化枯草杆菌 AS1176 和 BT 晶体缺陷型菌株 4D10(H3ab)。用氨苄青霉素(100 μ g/mL)作筛选标记, 从筛选出的抗性菌落中提取质粒酶切检测表明, pHTC 转入了三个宿主系统。

将三株工程菌分别在不含氨苄青霉素的 LB 液管中, 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 摇床过夜, 依次按 0.5% 接种传 20 代, 取合适的稀释度涂于不加抗生素的 LB 平板上, 使生长菌落数不高于 10³, 再将菌落转接于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 平板上。三种转化菌液分别涂五次无抗板, 重复试验, 计算抗性菌落数与接种菌落数的比值即为遗传稳定性百分率 (表 1)。

表 1 含 *cryAc10* 基因的质粒的遗传稳定性及其表达水平比较

Table 1 Expression and genetic stability of recombinant plasmid with *cryAc10*

Host	Genetic stability after 20 generation (%)	Expression (mg/mL)
<i>E.coil</i>	100	0.18
<i>B.subtilis</i> .As1176	98 \pm 0.91	2.14
<i>B.thuringensis</i> .4D10	95 \pm 0.87	2.87

从表 1 可以看出, 重组质粒在三种受体菌中均具有很好的遗传稳定性, 在大肠杆菌中的遗传稳定

性达 100%, 在 BT 中也达到 95%。分别用三个宿主菌的上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 发现 *cryAc10* 基因在三个宿主系统中均表达了分子量为 133.3kDa 的蛋白分子 (图 2)。

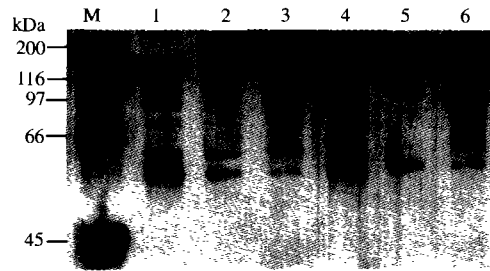


图 2 *cryAc10* 基因在三种原核系统中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expression products of *cryAc10* gene in three prokaryotic

1, In *Bacillus thuringiensis*; 2, In *Escherichia coli*; 3, In *Bacillus subtilis*; 4-6, Control of their host not transformed; M, Marker.

由于 *cryAc10* 基因表达蛋白的纯度高, 故用 Folin 酚法测出的碱溶性蛋白量即为 *cryAc10* 基因的表达量 (表 1)。从表 1 可以看出, 基因在其天然宿主苏云金杆菌中的表达量最高, 达到 2.87mg/mL, 在枯草杆菌中的表达量只为其天然宿主的 75%, 而在大肠杆菌中的表达量比 Bt 中低约 15 倍。可见, *cryAc10* 基因的自身启动子能很好地利用天然宿主的转录系统 (如 RNA pol, σ 因子和其他转录因子) 实现高水平表达, 枯草杆菌也属于芽孢杆菌属, 因此, *cryAc10* 基因也有接近于天然宿主的表达水平。而大肠杆菌属于无芽孢细菌, 其在正常情况使用的 σ 因子与苏云金杆菌不同, 因而 *cryAc10* 基因的表达量很低。

2.2 重组杆状病毒 vFcpH 的产生及鉴定

将重组 Bacmid DNA 转染 Sf9 细胞, 3d 后显微镜观察, 结果发现细胞中有多角体病毒产生 (图 3), 经分离纯化获得能形成多角体和表达 *cryAc10* 基因的重组杆状病毒 vFcpH。进一步以 *cryAc10* 引物进行重组病毒 vFcpH 的 PCR 鉴定 (图 4), 证明 3.77kb 的 *cryAc10* 基因整合到了 AcNPV (通过 Bacmid) 的基因组中。

将纯化的重组杆状病毒 vFcpH 扩大培养, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。将 vFcpH 原液 10 倍梯度稀释后, 根据 Summers 和 Smith(1987)采用的 Reed-Muench 测定法, 接种 96 孔细胞培养板, 测出重组病毒 vFcpH

的 $TCID_{50}$, 并换算成空斑形成单位 (plaque formation unit, pfu)。测出 $TCID_{50}$ 值为 1.58×10^8 $TCID_{50}/mL$, pfu 值为 1.09×10^8 pfu/mL , 说明重组病毒 vFcpH 有较高的滴度。

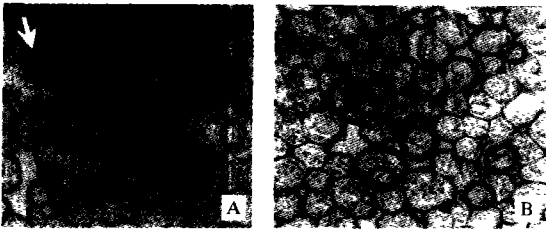


图 3 重组病毒 vFcpH 在 Sf9 细胞中形成的包涵体

Fig.3 Occlusion bodies in Sf9 cells formed by the recombinant virus vFcpH 72 hpi.

A, Sf9 cell infected with vFcpH (polyhedra show by the arrow); B, Normal Sf9 cell.

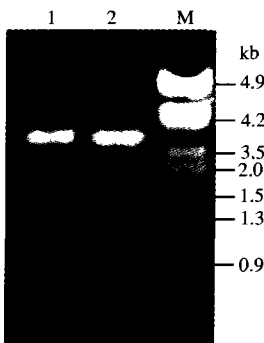


图 4 PCR 鉴定重组病毒 vFcpH

Fig.4 Identification of the recombinant virus vFcpH by PCR
1, Positive control; 2, vFcpH; M, Marker.

2.3 *cryIac10* 在昆虫细胞中的表达

将重组杆状病毒 vFcpH (10^7) 接种于含 2.0×10^6 细胞的 $25cm^2$ 培养瓶中, $27^\circ C$ 培养 4d, 大部分细胞已产生明显的 CPE (Cytopathic effect) 特征, 即细胞膨大, 特别是细胞核膨大, 与正常细胞相比直径增加 25%~50%, 细胞核占总细胞的三分之二以上, 细胞膜与质膜间只剩下狭小的空间, 大多数细胞核内有多角体 (图 3)。收集细胞, 进行 SDS-PAGE 分析, 可见 130kDa 的蛋白带与推导的 CryIac10 蛋白分子量相当 (图 5), 说明重组杆状病毒中的 *cryIac10* 得到了表达。

2.4 重组病毒 vFcpH 的杀虫活性

用重组病毒 vFcpH 感染 Sf9 细胞, 离心收集五个类型样品进行生物毒力测定, 结果如表 2 所示, 重组病毒感染的昆虫细胞悬液和低速离心沉淀悬液毒达的不溶于水的 Bt 蛋白具有较高杀虫活性;

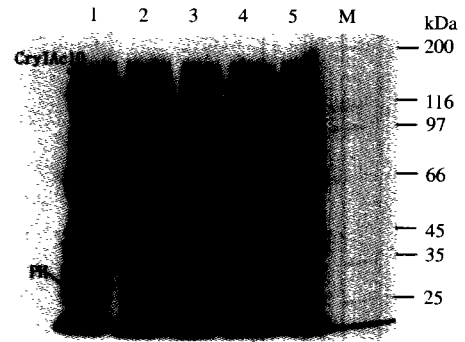


图 5 重组病毒 vFcpH 在真核细胞 Sf9 中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of expression product in Sf9 cell of recombinant virus vFcpH.

1-2, 48hpi and 72hpi by vFcpH; 3-4, 48hpi and 72hpi by wtAcNPV; 5, Normal Sf9 cell; M, Marker. (130kDa CryAc10 protein is indicated by the arrow)

表 2 重组杆状病毒 BT 基因表达蛋白的毒力测定

Table 2 Bioassay of the toxicity of CryIac10 protein expressed by recombinant virus vFcpH

Samples	Concentration ($\mu L/cm^2$)	Insect tested (heads)	Dead insects 72 h pi.(heads)	Mortality(%)
A	0.1	20	15	75 ± 1.84
B	0.1	20	16	80 ± 1.97
C	0.1	20	3	15 ± 0.47
D	0.1	20	2	10 ± 0.47
E	0.1	20	0	0
F	0.1	20	3	15 ± 0.82
G	$20ng/cm^2$	20	20	100
H	0.1	20	0	0

Note: A, Uncentrifuged suspension; B, Pellet after low-speed centrifuging; C, Supernant after low-speed centrifuging; D, Pellet suspension after high-speed centrifuging; E, Supernant after high-speed centrifuging; F, Cell suspension infected by wtAcNPV; G, Bt crystal protein; H, Suspension of normal cell.

低速或高速离心后的上清, 毒力很低, 死亡率不超过 15%, 与对照 AcNPV 病毒的感染死亡率基本相同, 说明杀虫毒力主要来源于所表达的不溶于水的 Bt 蛋白。

用 3 龄甜菜夜蛾幼虫测定重组病毒与野生型 AcNPV 的毒力, 记载幼虫感染 9d 后的死亡率, 结果见表 3。根据表 3 数据计算重组病毒的 LC_{50} 为 1754PIB/g, 其 95% 置信范围为 964-2544PIB/g; 野生型病毒的 LC_{50} 为 3614PIB/g, 其 95% 置信范围为 2050-5178PIB/g。经 t 检验, 二者 LC_{50} 相差显著 ($t=2.21$, $p<0.05$)。

当感染剂量为 3×10^4 PIB/g 时, 重组病毒 vFcpH 及野生型 AcMNPV 的死亡历程见表 4。

根据表 4 数据计算重组病毒的 LT_{50} 为 5.5d, 其 95% 置信范围为 5.0d~6.0d; 野生型 AcMNPV 的 LT_{50} 为 7.4d, 其 95% 置信范围为 7.0d~7.8d, 经 t 检验, 二者 LT_{50} 相差极显著 ($t=4.91, p<0.01$)。

表 3 重组病毒毒力生物测定

Table.3 Bioassay of toxicity of recombinant virus vFcph

Concentration (PIB/g)		Larvae amount (Heads)		Mortality (%)		Adjusted mortality (%)	
vFcph	wtAc	vFcph	wtAc	vFcph	wtAc	vFcph	wtAc
3×10^5	3×10^5	48	48	87.4 ± 1.1	82.5	87.1 ± 0.83	82
1×10^5	1×10^5	48	48	80.7 ± 0.79	76.5	80.2 ± 0.97	75.9
3×10^4	3×10^4	48	48	73.6 ± 0.83	69.7	72.9 ± 0.78	68.9
1×10^4	1×10^4	48	48	65.5 ± 0.44	61.4	64.6 ± 0.64	60.4
3×10^3	3×10^3	48	48	56.4 ± 0.51	48.6	55.3 ± 0.67	47.3
0		48		2.5 ± 0.21			

表 4 重组病毒 LT_{50} 测定Table. 4 Mortality rate of recombinant virus vFcph under 3×10^4 PIB/g of diet (%)

Days	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	9th
vFcph	19.9 ± 0.41	38.1 ± 0.37	52 ± 0.49	54.2 ± 0.74	59.3 ± 0.52	64.4 ± 0.91	72.9 ± 0.89
wtAc	0	9.5 ± 0.24	24.7 ± 0.42	43.9 ± 0.69	50.6 ± 0.45	53.0 ± 0.72	68.9 ± 0.97

3 讨论

Bacmid 是携带有 AcNPV 的全基因组与转座一穿梭盒的穿梭载体, 它既能在大肠杆菌中以质粒的形式复制, 又能在昆虫细胞中形成感染性病毒粒子。由于转座一穿梭盒被插入 NPV 的多角体基因位相, 所以 Bacmid 感染细胞后不形成多角体。在自然条件下, 多角体的存在对于病毒的传染和流行传播是至关重要的, 所以我们在转座载体 pF_{ast}BacI 的 MCS 中插入两个外源基因: *cryIAc10* 和 *ph*, 使重组病毒得到了另一拷贝的多角体基因, 该基因源于 AcNPV 的 *EcoRI*-I 片段, 带有自身启动子及终止信号。结果证明异源多角体基因可以在细胞中高效表达, 并使病毒粒子包装成多角体。外源基因在昆虫中肠中表达这一事实表明, 肠毒素基因可在昆虫感染的晚期得到表达, 这对重组杆状病毒杀虫剂具有较为重要的意义。

直到目前为止, 杆状病毒杀虫剂并未得到广泛应用, 究其原因主要是野生型的杆状病毒杀虫速度慢, 所需时间长, 用于防治害虫往往会造成难于承受的经济损失。近年来国内外很多实验室均致力于利用基因工程构建重组病毒, 使其更为实用。本研究表明这种思路在理论上是可行的。目前构建的重组病毒如表达蝎神经毒素的重组病毒^[9]、表达昆虫激素的重组病毒^[9]、表达昆虫特异性酶如保幼激素酶^[10]、缺失蜕皮甾醇 UDP 糖基转移酶(*egt*)的重组病毒^[11]等, 大多数较野生性杆状病毒杀虫效率并没有明显提高。携带 *Bacillus thuringiensis cryIAb* 和 *cryIAc* 基因的重组杆状病毒其杀

虫活性也未明显改善^[12-14], 其原因可能是多方面的, 如外源蛋白被宿主细胞蛋白酶降解; 或外源蛋白表达后不能被定向运输到靶细胞而发挥功能等。目前, 普遍认为 *cryIAb* 和 *cryIAc* 基因的作用位点位于昆虫中肠, *Cry1Ab* 和 *Cry1Ac* 蛋白随杆状病毒在昆虫其它组织细胞中表达后, 或因不能被切割、释放出活化的毒性肽, 或因无作用受体位点而影响其杀虫的活性^[12-14]。基于此, Chang 等 (2003)^[15] 构建了含 *cryIAc* 和 *ph* 融合基因的重组病毒, 由于 *Cry1Ac* 蛋白随多角体蛋白包被在病毒多角体外层, 当病毒多角体在昆虫中肠中溶解后, *Cry1Ac* 蛋白即可发挥杀虫作用, 因此该重组病毒较野生型病毒, 其杀虫速度和致病力有明显提高。本研究采用苏芸金杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cryIAc10* 构建的重组病毒, 经初步试验, 显示出了改善杆状病毒杀虫活性的潜力。虽然均系苏芸金杆菌杀虫晶体蛋白基因, 但 *cryIAc10* 与 *cryIAc* 和 *cryIAb* 还是存在一些差异^[16], 如基因序列的差异引起对宿主的毒力差异等, 至于是否存在作用受体的差异和原毒素加工激活的差异, 还有待进一步研究。

构建集几方面优点于一体的重组杆状病毒, 从而提高其杀虫效果, 扩大杀虫谱, 代表着当今生物杀虫剂研究的新方向。本文构建的重组杆状病毒 vFcph 含有昆虫特异性的毒素基因和完整多角体, 获得了多重特性, 生物活性测定超过野生型病毒。研究表明, 构建实用型多功能的重组病毒是可行的。

参考文献

- [1] Bonning B C, Hammock B D. Development of Recombinant Baculovirus for Insect Control[J]. *Annual Review of Entomology*, 1996, 41: 191-210
- [2] 吴 岚, 孙 明, 喻子牛. 利用苏云金芽孢杆菌转座子 Tn4430 构建含 cry1Ac10 基因的解离载体[J]. *微生物学报*, 2000, 40 (6) : 264-269.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*[M]. 2nd ed, NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedure[J]. *Texas Agric Exp Station Bull*, 1987, 155: 51-57.
- [5] King L A, Possee R D. *The Baculovirus Expression System* [M] , London: Chapman&Hall, 1992.
- [6] 郭兴华. 芽孢杆菌原生质体作为质粒 DNA 转化的受体 [J]. *微生物学报*, 1982, 22(3): 263-268.
- [7] Chang S, Cohen S N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA [J]. *Molecular General Genetics*, 1979 168: 111-115.
- [8] 黎路林. 杆状病毒表达载体系统[M]. 武汉: 华中师范大学出版社 1996.
- [9] 张宗炳. 杀虫药剂的毒力测定[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [10] Maeda S, Volrath S L, Hanzlik T N, *et al*. Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus[J]. *Virology*, 1991, 184:777-780.
- [11] Hammock B C, Bonning, B C Possee R, D. *et al*. Expressed and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector[J]. *Nature*, 1990, 334: 4458-461.
- [12] O' Reilly D R, Miller L K. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene[J]. *Bio-technology*, 1992, 9: 1086-1089.
- [13] Merryweather A T, Weyer U, Harris M P G, *et al*. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin[J]. *Gen Virol*, 1990, 71: 1535-1544.
- [14] Ribeiro B M, Crook N.E. Expression of full-length and truncated forms of crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses[J]. *J. Invert Pathol*, 1993, 62: 121-130.
- [15] Martens, J W M, Knoester M, Weijts F, *et al*. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* CryIA (b) crystal proteins[J]. *J. Invertebr. Pathol*. 1995, 66: 249-257.
- [16] Chang J H, Choi J Y, Jin B R, *et al*. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin[J]. *J Invert Pathol*, 2003, 84: 30-37.
- [17] 孙 明, 吴 岚, 刘子铎, 等. 利用苏云金芽孢杆菌非芽胞特异性的启动子表达 cry1Ac10 和 cry1C 基因[J]. *农业生物技术学报*. 2000, 8 (3) : 229-232.