

水稻密码子优化的 *cry2A** 基因在大肠杆菌中的表达及其表达产物的纯化

秦伟, 黄昆仑, 贺晓云, 李欣, 许文涛, 林希瑾, 罗云波*
(中国农业大学食品科学与营养工程学院食品生物技术实验室, 北京 100083)

摘要: 通过 PCR 从克隆载体 pUC18-3Z/*Cry2A** 上扩增水稻偏爱型密码子优化的抗虫基因 *cry2A**, 经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切定向插入到原核表达载体 pET-28a(+), 成功构建了在表达蛋白的 N 端只带有 6 个组氨酸标签的融合蛋白表达载体 pET-28a(+)/*Cry2A**, 并转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中。通过对其表达条件进行优化, 发现在 IPTG 浓度为 0.05 mmol/L、诱导时间为 3h、诱导温度为 20℃ 的表达条件下目的蛋白大部分以可溶形式进行表达。采用 Ni-NTA 亲和柱纯化得到高纯度目的蛋白, 薄层扫描分析蛋白纯度达到 95%。

关键词: 抗虫基因; *cry2A**; 转基因水稻; 表达; 纯化

Expression of Rice Codon Optimized *cry2A** Gene in *Escherichia coli* and Purification of Its Expressed Proteins

QIN Wei, HUANG Kun-lun, HE Xiao-yun, LI Xin, XU Wen-tao, LIN Xi-jin, LUO Yun-bo*
(Laboratory of Food Biotechnology, College of Food Science and Nutritional Engineering,
China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The coding sequence of rice preferable codon optimized *cry2A** gene was amplified via polymerase chain reaction (PCR) from recombinant plasmid pUC18-3Z/*Cry2A**. Then the PCR products of *cry2A** gene were inserted into expression vector pET-28a(+) using restriction endonucleases *Nde* I and *Bam*H I, resulting in the recombinant expression plasmid pET-28a(+)/*Cry2A** expressing *Cry2A** proteins with only 6 His-tags attached to its N-terminus. Subsequently, the expression vector pET-28a(+)/*Cry2A** was introduced into *E. coli* BL21 (DE3). The *Cry2A** protein was expressed mainly in soluble form in the presence of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) with final concentration 0.05 mmol/L by inducing for 3 h at 20 °C. The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography, and the purity is up to 95% according to thin layer scanning analysis.

Key words: insecticidal gene; *cry2A**; transgenic rice; expression; purification

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0267-05

自 1987 年比利时的 Vacek 等^[1]首次报道将 Bt 毒蛋白基因转入烟草获得转 Bt 基因的抗虫植株以来, 国内外已有不同的 Bt 毒蛋白基因和转化方法获得转基因烟草、棉花、玉米、油菜、马铃薯、水稻等多种抗虫作物^[2-4]。截至 2006 年底, 转基因抗虫作物在全球种植面积已经达到 3264 万公顷, 占当年全球转基因作物种植面积的 32%^[2]。转基因作物的飞速发展在带来巨大经济利益的同时, 其安全性也越来越被人们重视, 尤其是转基因水稻的出现, 使人们对转基因食品的安全性更加关

注。因此对转基因水稻进行安全性评价是十分必要的。

在进行转基因生物致敏性安全评价时, 需要一定量的外源蛋白质, 而转基因植物中外源蛋白的表达水平极低。Bt 毒蛋白 *cry* 基因在转基因植物中的表达量一般占全部可溶性蛋白的 0.001% 以下^[3,5], 因此从转基因植物中提取外源蛋白是不切实际的。人们转向利用基因工程方法让目的基因在高效表达系统如大肠杆菌中表达以获得足够的目的蛋白来进行安全性评价^[6]。

为了使来源于原核生物的 *cry* 基因能在植物中高效

收稿日期: 2007-05-11

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10Z440); 农业部 948 项目(2005-Z32)

作者简介: 秦伟(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术及转基因食品安全研究。E-mail: qw618@163.com

* 通讯作者: 罗云波(1960-), 男, 教授, 博士, 主要从事功能食品、果蔬加工工艺与新技术的研究。

E-mail: yunbol@public3.bta.net.cn

表达, 研究者通过改变密码子的偏爱性及基因中 TA 碱基含量来达到目的。但研究报道经过修饰的 *cry* 基因在大肠杆菌中却是不能够高效表达的, 有的甚至不表达。Strizhov 等利用 T7 启动子在原核中没有表达出人工合成的 *cry1C* 基因^[7]; Khanna 将经过修饰的 *cry1Ac* 基因转入 pQE30 载体中, 其表达量也很低^[8]; Okumura 等研究者发现 *cry45Aa* 在大肠杆菌中以包涵体形式表达^[9]; Kumar 等研究者利用 Nus-A 标签与 *Cry1Ac* 融合使 *cry1Ac* 以可溶的形式表达, 但其表达量较低^[10]; 国内学者陈中义等^[11]利用 T7 启动子在大肠杆菌中表达 *cry2Ab3* 基因, 发现表达量也很低; 李海涛等^[12]利用 pET21 载体在大肠杆菌中表达野生型的 *cy2Aa* 基因的结果也是表达量低, 且形成了不溶的包涵体。

本实验研究的 *cry2A** 基因是基于水稻植物中密码子的偏爱性人工合成的, 其基因序列与野生型 *cry2Aa* 基因的序列同源性仅为 69%^[3], 但其编码蛋白的氨基酸序列与苏云金芽胞杆菌野生型 *cry2Aa* 基因编码的氨基酸序列一致。*cry2A** 基因已经成功克隆在 pUC18-3Z 载体中, 命名为 pUC18-3Z/*Cry2A**。本实验主要是通过优化 *cry2A** 基因的表达条件让其在在大肠杆菌中实现高效可溶性表达, 并采用亲和层析方法来分离纯化目的蛋白, 为以后抗体的制备、进一步开展水稻外源蛋白 *Cry2A** 的安全性研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 BL21(DE3) 和原核表达载体 pET-28a(+) 本实验室保存; DH5 α 感受态细胞 北京 Trans 技术有限公司; 含 *cry2A** 基因的质粒 pUC18-3Z/*Cry2A** 华中农业大学林拥军老师惠赠。

1.1.2 酶与试剂

限制性内切酶 *NdeI* 和 *BamHI*、Ex TaqTM DNA 聚合酶 大连宝生物有限公司; T4 DNA 连接酶 Promega 公司; DNA Marker DL2000、DNA 回收试剂盒 TIANGAN 公司; DNA Marker III Trans 技术有限公司; 低分子量蛋白质 Marker 中国科学院上海生物化学研究所、Trans 技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 亚克隆

根据 *cry2A** 基因全编码区序列同时考虑了 pET-28a(+) 载体上多克隆位点、阅读框和 T7 启动子的作用方向设计了一对引物。在引物上设计的终止密码子采用目的基因上的两个终止密码子 TAA、TGA, 并在其后加上 TAA 以增强终止信号。

上游引物为 5'-GG A A T T C C A T A T G A A CAACGTGCTGA ACAG 3', 下划线部分为 *NdeI* 酶切位点; 下游引物为 5'-G C G G A T C C A T T A T C A T T A G T A G A G T G G C G G C A G -3', 下划线部分为 *BamHI* 酶切位点。

PCR 扩增程序为 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 45s, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 2min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的条带。

1.2.2 *cry2A** 基因表达载体构建

*cry2A** 基因的 PCR 产物和表达载体 pET-28a(+) 均用 *NdeI* 和 *BamHI* 切成双黏性末端, 通过 T4 DNA 连接酶于 4℃ 连接过夜, 然后转化大肠杆菌 BL21(DE3)。通过卡那霉素(Kan)抗性培养基筛选, 挑取单菌落培养, 提取质粒, 经 *NdeI* 和 *BamHI* 双酶切鉴定外源片段的插入情况。将经 PCR 和酶切正确的重组子送上海生工生物公司测序。方法均参照 Sambrook 的方法^[13]进行。

1.2.3 表达条件优化

挑取带有重组质粒 pET-28a(+)/*Cry2A** 的 *E.coli* BL21 (DE3) 分别接种至含有 Kan (50 μ g/ml) 的 LB 液体培养基 (1% 胰化蛋白胨、0.5% 酵母提取物、1% NaCl) 中, 37℃ 振荡培养 12 h 后按 1% 的接种量接种到新鲜的含 Kan (50 μ g/ml) 的 LB 液体培养基中培养 2~3h, 直到 OD₆₀₀ 在 0.5~0.8 之间。然后加入 IPTG 诱导剂, 通过优化不同表达条件来诱导 *Cry2A** 融合蛋白的表达。收集菌体, 以菌液十分之一体积的裂解液 (含 50mmol/L (pH8.0) Tris base、2mmol/L EDTA、100mmol/L NaCl) 悬浮菌体, 超声破碎细胞直到菌悬液澄清为止, 然后取样用 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.2.3.1 IPTG 诱导剂加入量的优化

当菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 时向 6 个无菌小三角瓶中等量分装一定体积的菌液, 然后依次向各瓶中加入 IPTG 至终浓度为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1mmol/L。空载对照 (即将 pET-28a(+) 质粒直接转入 BL21(DE3) 菌株中) 加入 IPTG 终浓度为 1mmol/L。于 37℃ 诱导表达 3h。

1.2.3.2 诱导时间的优化

当菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 时向 6 个无菌小三角瓶中等量分装一定体积的菌液, 然后加入 IPTG 终浓度为 0.05mmol/L 进行诱导表达。于 37℃ 诱导 6h, 每隔 1h 取样检测蛋白表达情况。

1.2.3.3 培养基条件的优化

采用 LB、LB+M9、TB 三种培养基 (培养基配方见参考文献 [13]) 优化 *Cry2A** 蛋白的表达。由于培养基不同, 菌体生长速度也不一样, 随时检测 OD₆₀₀ 值, 当三者 OD₆₀₀ 一样时进行诱导表达。诱导条件: 温度 37℃, 0.05mmol/L IPTG, 诱导 3h。

1.2.3.4 诱导温度的优化

当菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 时等量分装于 4 个无菌三角瓶中, 加入 0.05mmol/L IPTG, 分别于 15、20、28、37℃ 下诱导表达 3h 后收集菌体电泳检测表达情况。

1.2.4 cry2A* 表达蛋白的 SDS-PAGE

电泳方法参照文献[14]进行。取超声破碎后的菌体上清液(冰冻的或新鲜的)100μl 和 25μl 5 × 上样缓冲液(10% SDS、40% 甘油、0.33mol/L Tris-HCl(pH6.8)、5% β-巯基乙醇、0.05% 溴酚蓝)充分混合, 煮沸 5min 后电泳检测。

1.2.5 cry2A* 表达蛋白的纯化^[15]

收集菌体, 以 1 × 结合缓冲液(50mmol/L pH8.0 NaH₂PO₄、300mmol/L NaCl、10mmol/L 咪唑)重悬细胞(每克菌体加 2~5ml 结合缓冲液), 加入溶菌酶至 1mg/ml, 冰上孵育 30min, 超声波破碎(功率 300W, 每次 4s, 间隔 4s, 共 30 次)。10000r/min 离心 5min 去除沉淀, 保留上清裂解液。向 20μl 的上清液中加入 5μl 的 5 × 上样缓冲液(同上), 煮沸 5min, 在 -20℃ 留样检测。在 4 × 上清液中加入 1 × 介质悬浮液, 轻轻混合, 让介质沉降, 用吸管吸去 4 × 上清液, 加 4 × 结合缓冲液和介质悬浮液轻轻混合, 4℃ 摇床柱下结合 1h。将结合缓冲液和介质混合物装柱, 底部出口封闭, 让树脂在重力作用下自然沉降。待结合缓冲液缓慢流出后, 用 4 × 洗涤缓冲液(50mmol/L pH8.0 NaH₂PO₄、300mmol/L NaCl、30mmol/L 咪唑)洗介质两次, 收集柱液, 供 SDS-PAGE 分析。用 0.5 × 洗脱缓冲液(含 50mmol/L pH8.0 NaH₂PO₄、300mmol/L NaCl、250mmol/L 咪唑)洗脱介质上的蛋白 4 次, 分 4 管收集柱液, 用 SDS-PAGE 分析样品。

1.2.6 透析

将过柱获得的液体用 pH7.4、含 0.15mol/L NaCl 的 PBS(磷酸盐缓冲液)连续透析 48h, 每 12h 换一次透析液, 取出透析液冷冻干燥后置于 -20℃ 保存。

2 结果与分析

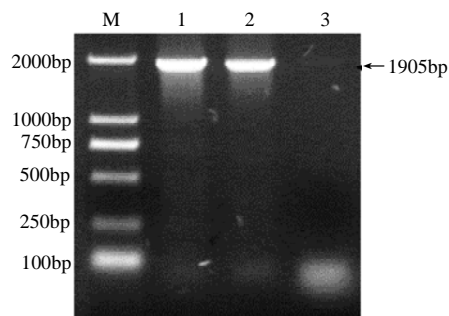
2.1 重组表达载体 pET-28a(+)/Cry2A* 的鉴定

经 PCR 初步鉴定, 有 1905bp 的目的条带扩增出来, 与预期结果相符(图 1)。用限制性内切酶 *NdeI* 和 *BamHI* 对重组质粒进行双酶切鉴定, 得到大小为 5000bp 左右(pET-28a(+))原质粒和 1905bp(目的条带)两个片断(图 2), 进一步证实目的基因已经成功构建到 pET-28a(+)载体中。测序的结果与原始序列同源性为 100%, 可以进行下一步的原核表达。

2.2 Cry2A* 蛋白表达条件的优化

2.2.1 诱导剂 IPTG 添加量对蛋白表达的影响

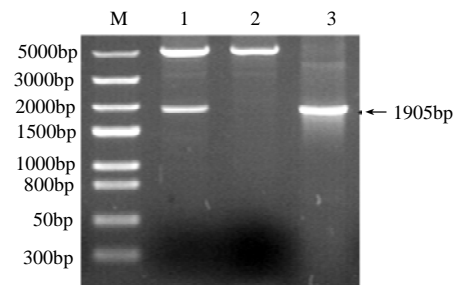
从图 3 可以看出, IPTG 终浓度对目的蛋白表达量影



M.DL2000 Marker; 1.重组质粒 PCR 产物; 2.阳性对照; 3.阴性对照。

图 1 重组质粒的 PCR 鉴定电泳图

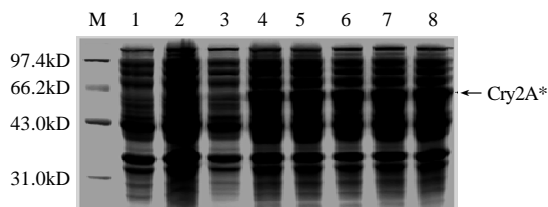
Fig.1 Agarose gel electrophoresis for identification of PCR products of recombinant plasmid



M.DNA Marker; 1.重组质粒双酶切产物; 2.空载双酶切对照; 3.目的基因 PCR 产物对照。

图 2 重组质粒的酶切鉴定电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis for identification of recombinant plasmid digested with *NdeI* and *BamHI*



M.低分子量标准蛋白; 1~2.空载表达菌 BL21(DE3)-pET28a(+)诱导前、后菌体总蛋白; 3~8.IPTG 浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0mmol/L 的重组表达菌 BL21(DE3)-pET28a(+)/Cry2A* 诱导表达菌体总蛋白。

图 3 IPTG 对 Cry2A* 重组蛋白表达影响的 SDS-PAGE 分析

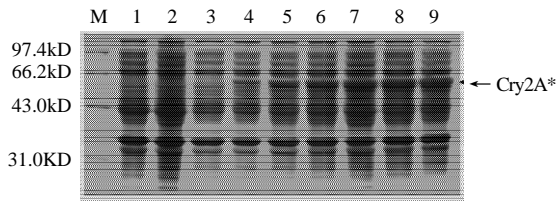
Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant Cry2A* proteins expression affected by IPTG

响不大。在低浓度的 IPTG 诱导下(0.05mmol/L), 目的蛋白已经有大量表达, 随着 IPTG 浓度的增加, 蛋白表达量增加不明显。通过优化确定 IPTG 终浓度为 0.05 mmol/L 来进行诱导。

2.2.2 诱导时间对蛋白表达量的影响

从图 4 可以看出, 目的蛋白的诱导表达量随着诱导时间的增加而增加, 当诱导时间达到 3h 后目的蛋白的表达量已经趋于稳定, 经薄层扫描分析显示, 表达量

达到菌体总蛋白的 20%。因此, 诱导表达时间最终确定为 3h(表达时间可以适当延长)。

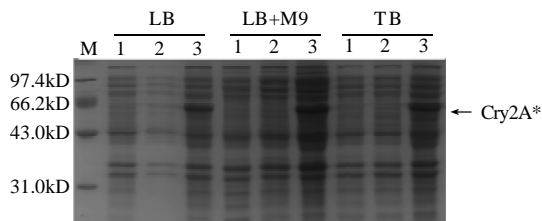


M.低分子量标准蛋白; 1~2.空载表达菌 BL21 (DE3)-pET28a(+)诱导前、后菌体总蛋白; 3~9.诱导时间分别为 0、1、2、3、4、5、6h 时重组表达菌 BL21(DE3)-pET28a(+)/Cry2A* 诱导表达菌体总蛋白。

图4 诱导时间对 Cry2A* 重组蛋白表达影响的 SDS-PAGE 分析
Fig.4 SDS-PAGE analysis of recombinant Cry2A* proteins expression affected by time

2.2.3 不同培养基对蛋白表达量的影响

本实验用三种不同培养基(LB、LB+M9、TB)来优化目的蛋白的表达(图5)。通过薄层扫描分析, 在三种不同培养基条件下, 目的蛋白的表达量分别是 30.3%、25.7%、21.6%。可见目的蛋白 Cry2A* 在普通 LB 中的表达量最高, 因此, 采用 LB 培养基进行目的蛋白的诱导表达。



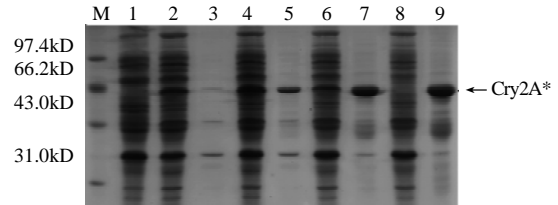
M.低分子量标准蛋白; 1.空载表达菌 BL21(DE3)-pET28a(+)诱导后菌体总蛋白(对照); 2.重组表达菌 BL21(DE3)-pET28a(+)/Cry2A* 诱导前菌体总蛋白; 3.重组表达菌 BL21(DE3)-pET28a(+)/Cry2A* 诱导后菌体总蛋白。

图5 不同培养基对 Cry2A* 重组蛋白表达影响的 SDS-PAGE 分析
Fig.5 SDS-PAGE analysis of recombinant Cry2A* proteins expression affected by different media

2.2.4 诱导温度对蛋白可溶性的影响

有文献报道低温有利于蛋白的可溶性表达^[16], 本实验研究了在两个较低温度(15、20℃)及较高温度(28、37℃)下目的蛋白的表达情况(图6)。当诱导温度为 15℃时, Cry2A* 蛋白几乎都以可溶形式表达(泳道 2); 当诱导温度为 20℃时, Cry2A* 蛋白大部分以可溶形式表达(泳道 4), 仅有少部分形成了不溶的包涵体(泳道 5); 诱导温度为 28℃时, 大多数目的蛋白以包涵体形式存在(泳道 7), 可溶蛋白相对较少(泳道 6); 而诱导温度为 37℃时, 目的蛋白几乎均以包涵体的形式存在(泳道 9)。在超声的上清液中, 诱导温度为 20℃时, 目的蛋白的表达量最高。诱导温度为 15℃时, 虽然蛋白主要以可溶的形式表达,

但由于过低温度影响了微生物的生长, 造成蛋白表达量降低。综合以上分析, 确定最终表达条件为 20℃来诱导 Cry2A* 蛋白表达。

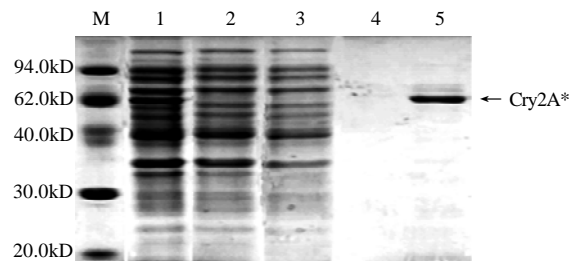


M.低分子量标准蛋白; 1.空载表达菌 BL21(DE3)-pET28a(+)诱导后菌体总蛋白; 2~3.诱导温度为 15℃时重组表达菌超声后上清液、沉淀; 4~5.诱导温度为 20℃时重组表达菌超声后上清液、沉淀; 6~7.诱导温度为 28℃时重组表达菌超声后上清液、沉淀; 8~9.诱导温度为 37℃时重组表达菌超声后上清液、沉淀。

图6 诱导温度对 Cry2A* 重组蛋白表达可溶性影响的 SDS-PAGE 分析
Fig.6 SDS-PAGE analysis of solubility of recombinant Cry2A* proteins affected by temperature

2.3 Cry2A* 蛋白亲和层析纯化结果

将 IPTG 终浓度为 0.05mmol/L、20℃诱导 3h 的菌体超声破碎后, 12000 × g 离心 20min, 取上清液过柱纯化。从图 7 可以看出, 用洗脱缓冲液洗脱下的样品中得到了较纯的 Cry2A* 蛋白。经薄层扫描分析, 其纯度达到 95%。



M.低分子量标准蛋白; 1.上柱前总蛋白; 2.结合缓冲液过柱样品; 3~4.漂洗缓冲液过柱柱末样品; 5.洗脱缓冲液洗脱样品。

图7 亲和层析纯化 Cry2A* 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图
Fig.7 SDS-PAGE analysis of recombinant Cry2A* proteins purified by affinity chromatography

3 讨论

本实验通过对基于水稻密码子的偏爱性人工合成的抗虫基因 cry2A* 在大肠杆菌中的表达条件进行优化, 发现在 IPTG 浓度为 0.05mmol/L、诱导时间为 3h、诱导温度为 20℃的表达条件下, Cry2A* 蛋白大部分以可溶的形式进行表达。在该蛋白的 N 端带有 6 个组氨酸标签, 能够与 Ni-NTA 树脂的 Ni²⁺ 特异性螯合, 利用这一特性, 可以采用 Ni-NTA 亲和柱纯化出高纯度的蛋白。

实验中发现低浓度的 IPTG 能大量诱导目的蛋白的表

达。当诱导剂浓度超过0.05mmol/L时, Cry2A*蛋白的表达量不再增加。可能IPTG是一种强诱导剂, 当浓度很低时就能够强烈地诱导蛋白表达。Cry2A*蛋白诱导3h后, 蛋白表达量已经趋于稳定。实验中还发现三种培养基对Cry2A*蛋白的表达量几乎没有影响。

诱导温度对Cry2A*蛋白的可溶性影响较显著。一般情况下低温易形成可溶的蛋白, 高温易形成包涵体蛋白。当诱导温度为20℃时, Cry2A*蛋白大部分是以可溶形式表达的, 仅有少部分形成了不溶的包涵体; 而当诱导温度为37℃时, 几乎看不到可溶蛋白的形成, 几乎都是包涵体。在实验中还发现菌体超声条件对蛋白的可溶性也有一定的影响, 菌体第一次超声离心后的沉淀再次超声的上清中也有一定浓度的目的蛋白。

Bt毒蛋白的可溶性与它自身的特性有关。Bt毒蛋白来源于苏云金芽胞杆菌, 在其宿主内以不溶的晶体形式存在, 在大肠杆菌中Bt基因的表达一般都是形成不溶的包涵体, 大多需要在强碱性溶液中才能溶解, 但其溶解度还是很低。Okumura等发现在大肠杆菌中表达形成包涵体形式的Cry45Aa蛋白在强酸中(10mmol/L HCl)也能够使该蛋白有效地溶解^[9]; Kumar等研究者利用Nus-A标签与Cry1Ac融合使Cry1Ac以可溶的形式表达, 但其表达量较低^[10]。

大肠杆菌原核表达系统表达外源蛋白时, 表达条件不一样时, 目的蛋白的表达情况也会不一样。由于大肠杆菌表达系统是一种高效的外源蛋白表达系统, 大多数情况下表达的蛋白质易以不溶的没有活性的包涵体形式存在, 在进行后续的蛋白活性实验时必须对包涵体进行变性、复性等一系列复杂处理。进行表达条件的优化使重组蛋白以可溶的有活性的形式存在, 使分离纯化该蛋白也变得简单容易, 大大简化和减轻了后续工作。

本实验通过对表达条件进行优化, 在大肠杆菌中成功表达了基于水稻密码子的偏爱性人工合成的抗虫基因cry2A*, 为这类蛋白的可溶性表达提供了思路, 并为以后的安全性评价工作奠定了基础。

参考文献:

- [1] VAECK M, REYNAERTS A, HOFTE H, et al. Transgenic plants protected from insect attack[J]. Nature, 1987, 328: 33-37.
- [2] JAMES C. Global status of commercialized biotech/GM Crops[R]. Ithaca: ISAAA, 2006.
- [3] 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[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(7): 1330-1337.
- [4] 胡华刚, 王慧, 张凤清. 几种植物抗虫基因研究进展[J]. 热带农业科技, 2006, 29(4): 18-21.
- [5] 李海燕, 朱延明, 马凤鸣. 植物抗虫基因工程的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2006, 31(4): 399-405.
- [6] FUCHS R L, HEEREN R A, GUSTAFSON M E, et al. Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein and its equivalence to the plant expressed protein[J]. Biotechnology (N Y), 1993, 11(13): 1537-1542.
- [7] STRIZHOV N, KELLER M, MATHUR J, et al. A synthetic cryIC gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin, confers spodoptera resistance in alfalfa and tobacco[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93: 15012-15017.
- [8] KHANNA H K, RAINA S K. Elite Indica transgenic rice plants expressing modified Cry1Ac endotoxin of *Bacillus thuringiensis* show enhanced resistance to yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*) [J]. Transgenic Research, 2002, 11(4): 411-423.
- [9] OKUMURA S, SAITOH H, WASANO N, et al. Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of *Bacillus thuringiensis* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2006, 47(1): 144-151.
- [10] KUMAR S, BIRAH A, CHOUDHARY B, et al. Plant codon optimized cry genes of *Bacillus thuringiensis* can be expressed as soluble proteins in *Escherichia coli* BL21 codon plus strain as NusA-Cry protein fusions [J]. J Invertebrate Pathology, 2005, 88(1): 83-86.
- [11] 陈中义, 李长友, 刘加宝, 等. 苏云金芽胞杆菌沉默基因 cry2Ab3 在大肠杆菌中表达及杀虫活性研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(5): 561-566.
- [12] 李海涛, 姚江, 郭巍, 等. 苏云金芽胞杆菌 cry2Aa 基因的克隆、表达与活性[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(6): 787-791.
- [13] SAMBROOK J, RUSSEL D. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [14] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [15] 许文涛, 黄昆仑, 罗云波. bar 基因在大肠杆菌中的高效表达及其表达产物的分离和纯化[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 583-588.
- [16] 巩艳, 叶治家, 甘立霞, 等. sIL-16 在大肠杆菌中的表达及活性分析 [J]. 生命科学研究, 2002, 6(4): 318-321.