

苏云金芽胞杆菌鮎泽亚种 HD-133 *cry1D* 的表达调控*

张利莉^{1 2} Arthur Aronson³ 喻子牛^{1 **}

(¹ 华中农业大学农业部农业微生物重点实验室 微生物农药国家工程研究中心 武汉 430070)

(² 塔里木农垦大学植物科学技术学院 阿拉尔 843300) (³ 美国 Purdue 大学生物系 IN47906)

摘 要 :利用 PCR 扩增基因 *cry1D* 启动子及上游区片段 ,在测序的基础上构建含 *cry1D-lacZ* 融合基因穿梭质粒 ,导入不同遗传背景的苏云金芽胞杆菌菌株中 ,并以 *cry1Ab-lacZ* 融合基因为对照测定 β -半乳糖苷酶活性 ,检测启动子上游区的作用。结果表明 ,*cry1D-lacZ* 和 *cry1Ab-lacZ* 融合基因在不同遗传背景的菌株中表达完全不同 ,也许一些宿主专一性的因子参与了转录调控 ,而在同一菌株中 *Cry1D-lacZ* 和 *cry1Ab-lacZ* 的表达差异是由于上游区的不同以及竞争有限的 σ 因子所致。利用 PCR 定点诱变技术突变其 SD 序列 GGGGA 为 GGAGG 后 ,*cry1D-lacZ* 融合基因的表达提高了 1.0 ~ 1.6 倍。表明 GGAGG 是苏云金芽胞杆菌合适的 SD 序列 ,也揭示了不合适的 SD 序列是 *cry1D* 表达量低的原因之一。

关键词 :苏云金芽胞杆菌 ,杀虫晶体蛋白基因 ,表达调控

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2002)06-0662-08

苏云金芽胞杆菌鮎泽亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*)HD-133 菌株中含有 *cry1Ab*、*cry1C* 和 *cry1D* 三种具有代表性的 *cry1* 类基因 ,它们位于拷贝数相当的质粒上。*cry1D* 和 *cry1C* 基因位于 110MD 质粒上 ,*cry1Ab* 基因单独位于 45MD 的质粒上 ,并共同形成一个菱形蛋白晶体^[1]。Masson 等^[2]测定了此菌株纯化的晶体中三种蛋白含量分别为 *Cry1Ab* 60% ,*Cry1C* 37% 和 *Cry1D* 3% ,*Cry1D* 与 *Cry1Ab* 相差 20 倍。表达调控涉及转录和翻译两个层次 ,张利莉^[3]检测了此菌株 *cry1D* 和 *cry1Ab* 转录量及其稳定性发现 *cry1D* mRNA 比 *cry1Ab* mRNA 具有更高的稳定性 ,但转录量又远远低于 *cry1Ab*。因此两者转录量的差异可能与其转录启动强度有关。*cry1D* 和 *cry1Ab* 基因均具有完全相同的双重叠启动子 Bt I 和 Bt II ,在芽胞形成的不同时期通过 σ^E RNA 聚合酶和 σ^K RNA 聚合酶分别识别 Bt I 强启动子和 Bt II 弱启动子 ,以保证 *cry* 基因持续地转录^[4,5]。已有许多报道启动子上游区在表达调控中起重要作用^[6-8] ,这个区域可能是它们表达不同的原因之一。另外 *cry1D* 和 *cry1Ab* 的 SD 序列明显不同 ,而翻译调控与核糖体结合序列密切相关^[8-11]。目前国内外尚未见相关报道。故本研究利用 PCR 定点诱变技术突变 *cry1D* 基因的 SD 序列 ,利用 *cry1D* 基因和 *cry1Ab* 启动子及上游区与报告基因 *lacZ* 融合 ,测定在不同遗传背景菌株中 β -半乳糖苷酶活性 ,研究启动子上游区以及翻译起始效率对表达的影响。

* 国家“863”计划和攻关计划项目(101-03-01-01)资助课题

** 通讯联系人 Tel (027) 87396030 , E-mail :yz41@public.wh.hb.cn

作者简介 张利莉(1963 -) ,女 ,河南商丘市人 ,现工作于塔里木农垦大学植物科学技术学院副教授 ,博士 ,主要从事芽胞杆菌分子生物学研究。

收稿日期 2002-02-19 ,修回日期 2002-07-04

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

见表 1。

表 1 供试菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids tested

Strain or plasmid	Descriptions	Sources or references
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA</i>	Offered by Aronson
HD-133-5	Derived from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> HD-133, with a 110 MD plasmid harbouring only <i>cry1C</i> and <i>cry1D</i> , lack of the 45MD plasmid with <i>cry1Ab</i>	Offered by Aronson
4Q7	<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> , <i>cry</i> ⁻	Offered by Aronson
HD-1-80-21	Derived from <i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1, having only four protoxin genes <i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry2Aa</i> , <i>cry2B</i> , lack of the 44MD plasmid with <i>cry1Ab</i>	Offered by Aronson
4Q7/ <i>cry1Awt-lacZ</i>	Strain 4Q7 containing <i>cry1Awt-lacZ</i>	Offered by Aronson
HD-1-80-21/ <i>cry1Awt-lacZ</i>	Strain HD-1-80-21 containing <i>cry1Awt-lacZ</i>	Offered by Aronson
HD-133-5/ <i>cry1Awt-lacZ</i>	Strain 5 containing <i>cry1Awt-lacZ</i>	Offered by Aronson
pSGMU37	<i>E. coli</i> expressing vector, having Amp ^r , Cm ^r , <i>lacZ</i> ⁺ 7.6kb	Errington ^[12]
pHT3101	<i>E. coli</i> - <i>Bacillus thuringiensis</i> shuttling vector, having Amp ^r , Em ^r , 6.7kb	Lereclus <i>et al.</i> ^[12]
pHT3101- <i>cry1D</i>	Plasmid derived from pHT3101, having promoter and upstream region of <i>cry1D</i>	Offered by Aronson
pUC18	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp ^r 2.7kb	Norlander <i>et al.</i> ^[14]
pHT/pSGMU-P	A plasmid containing promoter of <i>cry1Ab</i> and a <i>Hind</i> III, <i>Xba</i> I fragment of 251bp from the upstream of <i>cry1Ab</i> which was cloned to pSGMU37; owning <i>Bt</i> ori	Sedlak <i>et al.</i> ^[15]
pSGDWZ-1	Without mutation of SD sequence of <i>cry1D</i> , containing the promoter and the upstream fragment of 1kb which were cloned to pSGMU37	In this research
pSGDMZ-1	A plasmid in which SD sequence of <i>cry1D</i> was mutagenized, the promoter and the upstream fragment of 1kb were cloned to pSGMU37	In this research
pSGDWZ-2	With <i>Bt</i> ori cloned to pSGDWZ-1	In this research
pSGDMZ-2	With <i>Bt</i> ori cloned to pSGDMZ-1	In this research

1.2 质粒 DNA 操作

大肠杆菌质粒 DNA 按小量碱法提取^[16], 苏云金芽胞杆菌则在菌体悬于溶液 I 后, 加入 10 μ L 溶菌酶 (50mg/mL), 于冰上 1~2h, 其余操作相同。质粒 DNA 的酶切、连接等均按文献 [6] 方法进行。回收按 QIA quick Gel Extraction Kit protocol 进行。

1.3 质粒 DNA 的转化

采用电转化法。用于电转化的大肠杆菌细胞的制备方法见文献 [16]。使用 Gene-pulser™ 型电脉冲仪 (Bio-Rad 产品) , 0.2cm 电转化杯, 电脉冲参数为 25 μ F, 200 Ω , 2.5kV, 电脉冲一次, 在含 50 μ g/mL Amp 的 LB 平板培养基上, 筛选转化子。苏云金芽胞杆菌电转化则用 SG Buffer (蔗糖 272mmol/L, 甘油 15%) 洗涤菌体 4 次, 电脉冲参数为 25 μ F, 200 Ω , 1.25kV, 在含 7 μ g/mL Cm 的 G·Tris^[17] 平板上筛选转化子。

1.4 重组菌株的筛选与鉴定

采用快检法^[18]初筛大肠杆菌转化子。苏云金芽胞杆菌重组菌通过将相应抗性平板上的转化子菌落再次划线点种到 100 μ L 1% MUG (MUG 即 4-methylumbelliferyl β -D-galactoside 溶于二甲基甲酰胺中) 表面涂抹的相同抗性平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 16~24h 后, 在长波紫外灯下寻找发出荧光的菌落进行初筛。初筛的转化子按碱法小量提取质粒 DNA, 电泳检测质粒谱带以验证转化子。

1.5 β -半乳糖苷酶活性的测定

将携带 *cryID-lacZ* 和 *cryIA-lacZ* 融合基因的不同苏云金芽胞杆菌菌株按 1% 接种量接种于 30mL 含相应抗生素的 G·Tris 培养液中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养。当芽胞开始形成第一次取样, 每隔 2h 取样一次, 每次取样 200 μ L, 以后按文献 [3, 19] 方法操作。

1.6 PCR 扩增

根据 *cryID* 基因及 5' 不翻译区的已知核苷酸序列设计引物。

5'-端引物 1Dup 为 5'-GCTATGACCAAGCTTACGAATTCGAGCTCG-3' ,

3'-端引物 1DPro-1 为 5'-CATTGGCTCTAGATTATTTATTTCCATAAACTATCCCCTT-3' ,

3'-端引物 1Dpro-2 为 5'-CATTGGCTCTAGATTATTTATTTCCATAAACTACCTCCTT-3'。

5'-端引物加入 *Hind*III 酶切位点, 3'-端引物 1DPro-1 和 1Dpro-2 加入 *Xba*I 酶切位点并保证不改变阅读框架, 1Dpro-2 加入 *Xba*I 酶切位点的同时也将 *cryID* 的 SD 序列 GGGGA 突变为 GGAGG。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 30 个循环。

1.7 DNA 序列测定

将 PCR 扩增的 *cryID* 上游区及启动子片段以 *Xba*I 位点克隆至 pUC18。使用试剂盒按 QLAquick™ Spin Handbook 方法抽提质粒, 获得 280ng/ μ L 质粒 DNA。使用引物 M13 for : 5'-CACGACGTTGTAACACGAC3' , M13 rev : 5'-GGATAACAATTTACACAGG3' , 利用自动测序仪进行测序。

2 结果和分析

2.1 苏云金芽胞杆菌 *cryID-lacZ* 融合基因表达载体的构建

2.1.1 *cryID* 启动子及其上游区的扩增、鉴定和测序 利用特异性引物 1Dup 和 1DPro-1 以及 1Dup 和 1DPro-2 以 pHT3101-*cryID* 质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增的 1.8kb 片段用 *Hind*III 和 *Xba*I 双酶切, 出现 1kb 和 0.8kb 两条带; 分别用 *Hind*III、*Xba*I 酶切确证此 1.8kb 片段内还存在一个 *Xba*I 位点; 已知靠近启动子处有 *Bgl*II 位点, 进一步用 *Xba*I 和 *Bgl*II 双酶切验证确认 1kb 的 *Xba*I 大片段为 *cryID* 启动子和上游区片段 (未列照片), 分别命名为 1DWt 和 1DWu。

将以上 *Xba* I 片段 1DWt 和 1DWu 分别插入 pUC18 多克隆位点。酶切验证后,使用引物 M13for 和 M13rev 测序。结果显示:PCR 扩增的 1DWt 片段的 SD 序列为 GGGGA,1DMu 的 SD 序列为 GGAGG,两者除 SD 序列有别外其余序列相同,扩增片段正确。

2.1.2 pSGDWZ-1 和 pSGDMZ-1 的构建:回收来自 pUC18-1DWt 和 pUC18-1DWu 的 1kb *Xba* I 片段,分别与 pSGMU37 表达载体连接,并酶切验证筛选转化子(图 1)。当 *Hind* III 和 *Bgl* II 双酶切时可得到 5.1kb、2.9kb 和 0.7kb 的片段,确证 *cryID* 启动子及上游区片段 1DWt 和 1DMu 分别正向连接于 *lacZ* 基因前。重组质粒分别命名 pSGDWZ-1 和 pSGDMZ-1。(pSGDWZ-1 和 pSGDMZ-1 大小相同,酶切图谱验证照片未列出,下同)。

2.1.3 pSGDWZ-2 和 pSGDMZ-2 的构建:回收来自于 pHT3101 3.5kb 含 *Bt ori* 的 *Bam* HI 片段,分别与 pSGDWZ-1 和 pSGDMZ-1 *Bam* HI 载体片段连接,并酶切验证筛选转化子(图略)。*Bam* HI 酶切得到 8.6kb 和 3.5kb 的片段;*Hind* III 酶切得到 5.8kb、5.0kb 和 1.3kb 的片段;*Xba* I 酶切得到 6.3kb、4.8kb 和 1.0kb 的片段。确证苏云金芽胞杆菌的复制子已克隆至 pSGDWZ-1 和 pSGDMZ-1 上。获得的重组质粒分别命名为 pSGDWZ-2 和 pSGDMZ-2,重组质粒的构建如图 2。

2.2 *cryID-lacZ* 融合基因的表达

将携带 *cryID-lacZ* 融合基因的重组质粒 pSGDWZ-2 和 pSGDMZ-2 电转化至无晶体突变株 4Q7、库斯塔克亚种 HD-1 的衍生菌株 80-21 和鲎泽亚种 HD-133 的衍生菌株 5 中,以含 *cryIA-lacZ* 融合基因的相应菌株为对照,定期取样测 β -半乳糖苷酶活性,结果如图 3。

以上结果可以看出:1)同一菌株中 *cryID-lacZ* 和 *cryIAb-lacZ* 表达完全不同。在无晶体突变株 4Q7 中(图 3.A),*cryID-lacZ* 的融合表达的活性很低,*cryIDwt-lacZ* 比 *cryIAb-lacZ* 融合表达低 15 倍。突变 *cryID* SD 序列后,当 *cryID* 与 *cryIAb* 的 SD 序列相同时,*cryIDMu-lacZ* 融合表达活性比 *cryIAb-lacZ* 低 4.8 倍,这种差异是启动子上游区的不同而导致融合表达不同。

在含有 *cryIAa*、*cryIAc*、*cry2A* 和 *cry2B* 基因的库斯塔克亚种 HD-1 的衍生菌株中(图 3.B),*cryIAb-lacZ* 仅比 *cryIDwt-lacZ* 高 1.2 倍;当突变 *cryID* 基因 SD 序列后,*cryIDMu-lacZ* 的表达反而比 *cryIAb-lacZ* 还高 20%。与在无晶体突变株中的结果不同,可能是竞争有限的 σ 因子所致或有其它的调节蛋白参与。

在鲎泽亚种 HD-133-5 中(图 3.C),*cryID-lacZ* 融合表达反而比 *cryIAb-lacZ* 融合表达量高。含有野生型 SD 序列的 *cryIDwt-lacZ* 融合表达比 *cryIAb-lacZ* 高 1.5 倍;两者为相同 SD 序列时,突变了 SD 序列的 *cryIDMu-lacZ* 比 *cryIAb-lacZ* 高 3.1 倍。这一结果与在 HD-133 菌株中 mRNA 浓度结果不相符^[3],这里必然还存在着其它的调控机制。

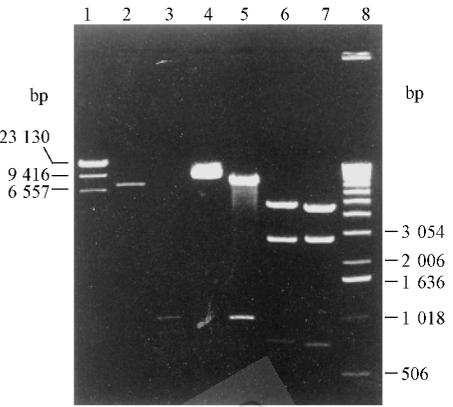


图 1 重组质粒 pSGDWZ-1 的酶切图谱

Fig. 1 The banding pattern of pSGDWZ-1
 1. λ DNA/*Hind* III 2. pSGMU37/*Xba* I;
 3. PCR product/*Xba* I 4. pSGDWZ-1/*Bam* HI;
 5. pSGDWZ-1/*Xba* I 6. pSGDWZ-1/*Hind* III + *Bgl* II;
 7. pSGDWZ-1/*Xba* I + *Bgl* III 8. 1 kb DNA ladder.

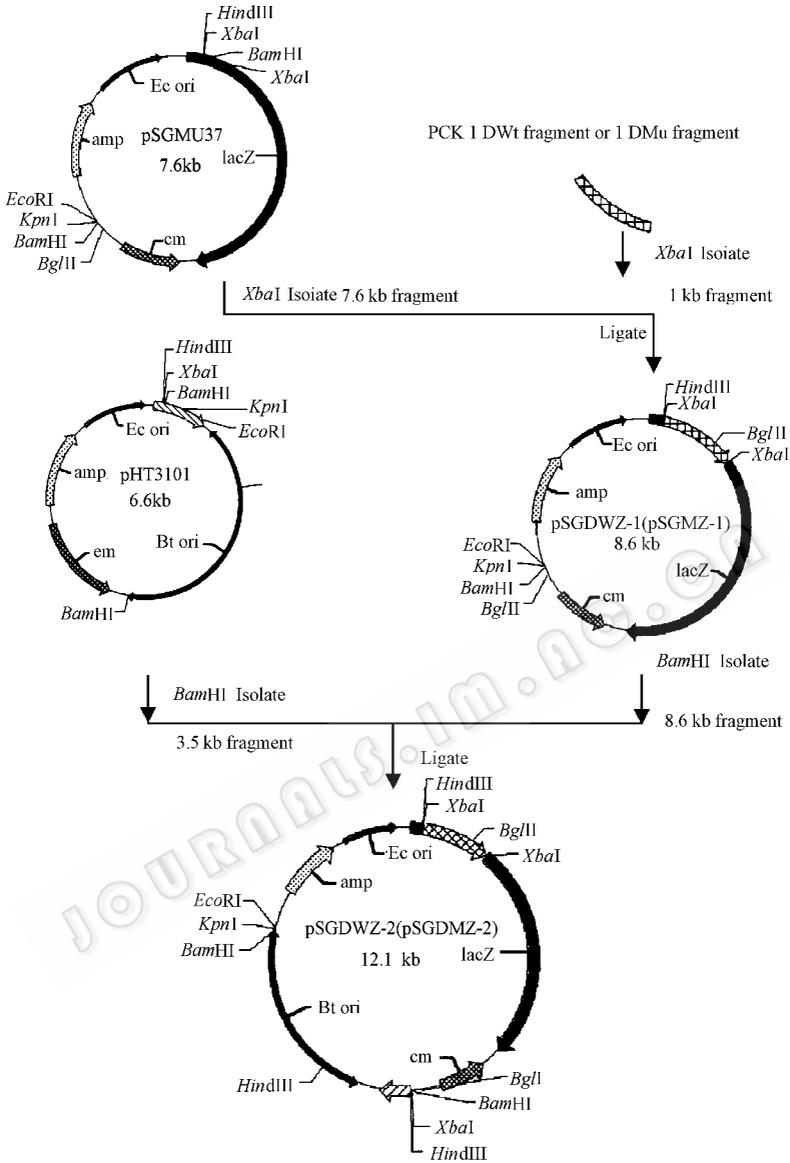


图2 重组质粒 pSGDWZ-2 和 pSGDMZ-2 的构建

Fig.2 Construction of recombinant plasmids pSGDWZ-2 and pSGDMZ-2

2) 同一基因在不同遗传背景的菌株中表达完全不同。 *cry1D-lacZ* 融合表达在 HD-1-80-21 中最高, 在无晶体突变株中最低, 在 HD-133-5 中表达量居中。 *cry1Dwt-lacZ* 和 *cry1DMu-lacZ* 在 HD-133-5 中的表达量比在 HD-1-80-21 中分别低 26.5% 和 20.8%。而 *cry1Ab-lacZ* 融合表达的情况与 *cry1D-lacZ* 完全不同, 在无晶体突变株 4Q7 中表达量最高, 在 HD-180-21 中居中, 但比在 4Q7 中低 5 倍; 而在 HD-133-5 中表达量最低, 比 HD-1-80-21 中的表达低 3.2 倍。

3) 突变 *cryID* 的 SD 序列 GGGGA 为 GGAGG 后, 在不同遗传背景的苏云金芽胞杆菌中 *cryID-lacZ* 的表达量均有提高。在无晶体突变株中, 表达量提高了 1.6 倍, 在含有 *cry* 基因的菌株 HD-1-80-21 和 HD-133-5 中, 表达量提高的程度相同均为 1 倍。因此, 在苏云金芽胞杆菌中, GGAGG 同样是有有效的合适的 SD 序列, 且较低的翻译起始效率是导致 *cryID* 表达量低的原因之一。

4) *cryID-lacZ* 和 *cryIA-lacZ* 在 HD-133-5 中持续稳定地表达, 尤其是 *cryID-lacZ* 在后期依然保持较高的表达水平。

3 讨论

3.1 启动子上游区的作用

cry 基因转录水平的调控涉及启动子及其上游区、调节蛋白以及 σ 因子的竞争。在无晶体突变株中克隆的原毒素基因不存在与其它 *cry* 基因竞争有限的 σ 因子问题, 可以充分表达比在含有 *cry* 基因的野生型菌株表达量高^[1, 13]。当 *cryIAb* 和 *cryID* 具有相同的 SD 序列时, 在无晶体突变株 4Q7 中, *cryIAb-lacZ* 比 *cryID-lacZ* 融合表达高得多, 说明 *cryIAb* 和 *cryID* 启动子上游区对 *cry* 基因所起的作用不同。Walter^[20]报道 *cryID* 和 *cryIAb* 上游区明显不同, *cryID* 上游区具有以转录起始位点 - 61 为中心涉及 62bp 的 113° 的弯曲, 无反向重复区, 但 *cryIAb* 上游区具有以转录起始位点 - 236 为中心涉及 60bp 的 62° 的弯曲和一个反向重复区。一般认为有活性的启动子都含有曲线的 DNA 上游区^[21]。这个弯曲允许结合蛋白结合, 而形成蛋白质 - DNA 复合物, 再与启动子之间定向连接为 RNA 聚合酶在启动子上转录起始创造一个框架, 使其有效地起始转录^[22]。如果某种调节蛋白可以结合到弯曲区, 而 *cryID* 弯曲区太接近 RNA 聚合酶的结合位点, 导致两者冲突。这种冲突可能减少了由此调节蛋白引起的转录加强甚至抑制了 RNA 聚合酶的结合从而抑制转录。

然而, 在丢失了 *cryIAb* 所在质粒的 HD-1-80-21 和 HD-133-5 中, *cryID-lacZ* 融合表达比 *cryIAb-lacZ* 融合表达高。值得注意的是在 HD-133-5 中, *cryIDMu-lacZ* 融合转录比 *cryIAb-lacZ* 高 2.1 倍。Cheng 等^[5]研究也表明在 HD-133-5 中, *cryIC272-lacZ* 的融合转录也比 *cryIA272-lacZ* 融合转录高 1.4 倍。即在 HD-133-5 中, *cryIC* 和 *cryID* 由上游区所带来的

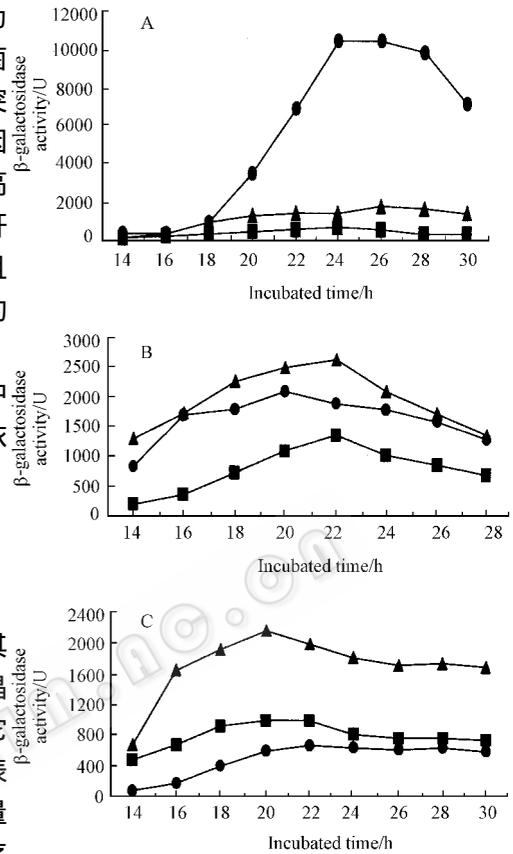


图 3 *cryID-lacZ* 和 *cryIA-lacZ* 在不同遗传背景苏云金芽胞杆菌中的表达

Fig. 3 The expression of *cryID-lacZ* and *cryIA-lacZ* in *Bacillus thuringiensis* strains with different genetic backgrounds

- A. Fusion gene in acrySTALLIFEROUS strains 4Q7;
 B. Fusion gene in subsp. *kurstake* HD-1-80-21;
 C. Fusion gene in subsp. *aizawai* HD-133-5.
 ■ *cryID*wt-*lacZ*; ▲ *cryID*Mu-*lacZ*;
 ● *cryIA*wt-*lacZ*.

融合转录均比 *cry1Ab* 高。一般而言,蛋白质的合成与 mRNA 的含量成正比,而本研究的结果与 Masson^[2]报道的 HD-133 菌株 *Cry1Ab*:*Cry1C*:*Cry1D* = 20:12:1 相矛盾,也与张利莉^[3]报道的 HD-133 *cry1Ab* mRNA 和 *cry1D* mRNA 量结果不相符。HD-133-5 菌株与 HD-133 菌株的唯一区别是只含有 *cry1D* 和 *cry1C* 基因,丢失了 *cry1Ab* 基因。因此推测 *Cry1Ab* 蛋白本身可能是一个正调节蛋白,结合到自身 *cry* 基因的上游区而起调控作用。由于携带 *cry1D-lacZ* 和 *cry1Ab-lacZ* 的质粒未能电转化进 HD-133 菌株,目前还没有直接的证据验证这一推测。另外,在不同遗传背景的菌株中上游区所起的作用不同,那么必然有某种未知的因子在调控基因的表达。

3.2 *cry* 基因的翻译起始效率与表达量的关系

分析已报道的各种 *cry* 基因的 SD 序列发现除了 *cry1D* 基因外,其余的 *cry* 基因的 SD 序列均为 GGAGG,与枯草芽胞杆菌的最佳 SD 序列一致^[1]。本研究表明 GGAGG 不仅是枯草芽胞杆菌也是苏云金芽胞杆菌的合适的 SD 序列,SD 序列是影响基因表达重要因素。Park 和 Hwang 等^[22~25]已证实使用 *cry3A* 的 STAB-SD 和采用多重 SD 序列使表达水平显著提高,加强了原毒素的产生。*cry1D* 的 SD 序列及侧翼序列为 AAAAGGGGATAG,当突变后成为 AAAAGGAGGTAG 后,有 9 个碱基 100% 地与 30S 核糖体 16S rRNA 的 3'端 3'-UCUUU-CCUCCACUAG-5'互补,稳定地形成 mRNA-核糖体复合体,在翻译水平上加强合成。这一结果也启发我们通过提高 *cry* 基因 SD 序列与 16S rRNA 3'端的互补程度,可以进一步加强原毒素的合成,这为我们构建基因工程菌提供了一个新思路。

参 考 文 献

- [1] Aronson A I. *FEMS Microbiol Lett* ,1994 ,**117** :21 ~ 28.
- [2] Masson L ,Erlandson M ,Puzatal-carey M , et al. *Appl Environ Microbiol* ,1998 ,**64** :4782 ~ 4788.
- [3] 张利莉 ,Arthur Aronson ,喻子牛.微生物学报,2002 **42** (3) :335 ~ 340.
- [4] Baum J A ,Malvar T. *Mol Microbiol* ,1995 ,**18** :1 ~ 12.
- [5] Bravo A , Agaisse H , SaLamiton S , et al. *Mol Gen Genet* , 1996 ,**250** :734 ~ 741.
- [6] Cheng P ,Wu L , Yu Z N , Aronson A. *Appl Environ microbial* ,1999 ,**65** (5) :1849 ~ 1853.
- [7] De-Souza M T , Lecadet M-M ,Lereclus D. *J Bacteriol* ,1993 ,**175** :2952 ~ 2960.
- [8] Walter T , Aronson A. *J Biol Chem* ,1999 ,**12** :7901 ~ 7906.
- [9] 喻子牛 ,张 杰 ,庞 义,等.重组杀虫细菌.见:黄大昉主编.农业微生物基因工程.第四章.北京:科学出版社,2001.175 ~ 270.
- [10] Band L , Henner D J. *DNA* ,1984 ,**3** :17 ~ 21.
- [11] Vellanoweth R L , Rabinowitz J C. *Mol Microbiol* ,1992 ,**6** :1105 ~ 1114.
- [12] Errington J. *J Gen Microbiol* ,1986 ,**132** :2953 ~ 2966.
- [13] Lereclus D , Arantes O , Chaufaux J. et al. *FEMS Microbiol Lett* ,1989 ,**60** :211 ~ 218.
- [14] Norrander J , Kempe T , Messing J. *Gene* ,1983 ,**26** :101 ~ 106.
- [15] Sedlak M , Walter T , Aronson A. *J Bacteriol* ,2000 ,**182** (3) :734 ~ 741.
- [16] J 萨姆布鲁克 ,E F 弗里奇 ,T 曼尼阿蒂斯主编(金冬雁 ,黎孟枫等译).分子克隆实验指南.第二版.北京:科学出版社,1992.
- [17] Aronson A I , Angelo W , Holt S C. *J Bacteriol* ,1971 ,**106** :1016 ~ 1025.
- [18] 张利莉 ,Arthur Aronson ,喻子牛.遗传,2002 **24** (3) :301 ~ 304.
- [19] Miller J H. Assay of β -galactosidase. In :Willer J H. *Experiments in Molecular Genetics* . cold spring Harbor , New York :Cold

Spring Harbor Laboratory Press ,1972. 352 ~ 355.

- [20] Walter T. Regulation of cry gene transcription in *Bacillus thuringiensis* by DNA Binding protein which recognizes DNA elements upstream of the *cryIAb*, *cryIC* and *cryID* gene promoter. (PhD dissertation). West Lafayette :Purdue University ,1995.
- [21] Perez-Mrtin J , Rojo F , Loranzo V. *Microbiol Rev* ,1994 **58** 268 ~ 290.
- [22] 程 萍 , Arthur Aronson , 喻子牛. 农业生物技术学报. 1999 **7** (4) 358 ~ 362.
- [23] Hwang S H , Federici B A. Analysis and manipulation of mRNA/Ribosome stabilizing sequences to enhance erdotoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis*. Abstract , 32nd Annual Meeting of Invertebrate Pathology , 1999 Irvine , California , USA.
- [24] Park H W , Ge B-X , Bauer L S , et al. *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** 3932 ~ 3938.
- [25] Park H , Bideshi D K , Johnson J J , et al. *FEMS Microbiol Lett* ,1999 **181** 319 ~ 327.

Regulation of Expression of the *cryID* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-133 *

Chang Lili^{1 2} Arthur Aronson³ Yu Ziniu¹

(¹ Huazhong Agricultural University , Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Ministry of Agriculture ,
National Engineering Research Center of Microbial Pesticides , Wuhan 430070 , China)

(² College of Plant Science and Technology , Tarim University of Agricultural Reclamation , Alar , Xinjiang 843300 , China)

(³ Department of Biological Science Purdue University , West Lafayette , IN47906 , USA)

Abstract : Influence of the promoter and upstream region on expression of *cryID* was tested. Firstly , the PCR products of *cryID* promoter and its upstream were obtained followed by the construction of shuttle plastid containing *cryID-lacZ*. Then the *cryID-lacZ* was introduced into different hosts. Analysis of activity of β -galactosidase showed that the *cryID* and *cryIAb* expressed differently in different hosts. Comparison of expression of *cryID* with *cryIAb* in the same host revealed that different upstream and competition for σ -factor were involved in the difference of *cryID* and *cryIAb* expression. Influence of transnational initiation efficiency on expression of *cryID* was studied here. Analysis of SD sequence of *cryID* showed that it was obviously different from that of other cry genes published. After site-mutation using PCR was introduced into *cryID* SD sequence (GGGGA \rightarrow GGAGG) , *cryID-lacZ* expressed higher 1.0 ~ 1.6 times than that before mutation , suggesting that GGAGG might be most effective SD sequence for *Bacillus thuringiensis* , meanwhile , low transnational initiation efficiency caused by improper SD sequence might lead to low expression of *cryID* in HD133.

Key words : *Bacillus thuringiensis* , Insecticidal crystal protein gene , Expression regulation

* Supported by Chinese National Programs for Science and Technology Development (101-03-01-01)