

苏云金杆菌辅助蛋白 P19 对杀虫晶体蛋白 Cry11Aa 表达的影响

师永霞^{1,2}, 曾少灵^{1,3}, 袁美姝¹, 孙 钊¹, 庞 义^{1*}

(¹中山大学生命科学学院 有害生物控制与资源利用国家重点实验室 广州 510275)

(²南方医科大学基因工程研究所 广州 510515)

(³深圳出入境检验检疫局动植中心 深圳 518010)

摘 要 苏云金杆菌以色列亚种的 *p19* 基因、*cry11Aa* 基因和 *p20* 基因位于同一操纵子上, 据推测辅助蛋白 P19 可能与 Cry11Aa 蛋白的晶体化相关。本研究利用穿梭载体 *pHT3101* 构建了两个重组质粒 *pHcy1* 和 *pHcy3*, 两质粒均携带 *cry11Aa* 基因, 但后者完全缺失了 *cry11Aa* 基因上游的 *p19* 基因。将重组质粒电激转化至苏云金杆菌无晶体突变株 4Q7 中进行蛋白表达, SDS-PAGE 结果表明在 4Q7(*pHcy1*) 和 4Q7(*pHcy3*) 中均能检测到正常表达的 Cry11Aa 蛋白, 但单位体积培养液的 Cry11Aa 蛋白在辅助蛋白 P19 存在时的表达量明显高于其单独表达的表达量, 透射电镜观察显示两菌株中的 Cry11Aa 蛋白形成了大小相近、形状相似的双梯形晶体; 另外, 生物测定结果表明重组菌株 4Q7(*pHcy1*) 和 4Q7(*pHcy3*) 对三龄致倦库蚊的杀虫活性没有显著性差异。该现象说明辅助蛋白 P19 的缺失对 Cry11Aa 蛋白的晶体形成和杀虫活性没有影响, 但 P19 作为分子伴侣在一定程度上帮助提高了 Cry11Aa 蛋白的表达水平。

关键词: 苏云金杆菌 辅助蛋白 P19 晶体蛋白 Cry11Aa 生物测定

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)03-0353-05

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 在芽孢生长阶段能产生具有专一杀虫活性的晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, ICPs), 且对人、畜、植物等非目标生物十分安全^[1], 因此被广泛用于鳞翅目的多种作物害虫、双翅目的蚊虫以及鞘翅目的马铃薯甲虫等的生物防治。

苏云金杆菌不同 ICPs 的晶体化机制不尽相同。分子量约为 135kDa 的 Cry 类蛋白 (Cry1Ab 类除外), 如 Cry1A 和 Cry4A, 由于具有富含半胱氨酸的 C-端半部, 能自主形成双硫键, 最终促进典型双金字塔型晶体的形成^[2-4]; Cry3 类蛋白是通过分子间盐桥自主形成晶体^[4]。还有一类蛋白, 如 Cry2、Cry11A 和 Cyt1A, 由于缺乏如 Cry1 类蛋白中富含半胱氨酸的 C-端半部, 必须依靠某些分子伴侣 (或称辅助蛋白) 的作用才能形成晶体^[4-8]。所谓 Bt 的分子伴侣, 是指一些与毒素蛋白晶体化相关的小分子量蛋白, 它们本身不具有杀虫活性, 但能帮助某些杀虫晶体蛋白正常表达和形成晶体, 这种作用有时候甚至是必需的。到目前为止, 已在 Bt 中发现了一些具有特殊功能的辅助蛋白基因, 如 *p20*, *p19*, *orf1*, *orf2* 等。*cry11Aa* 启动子区、*p19* 基因、*cry11Aa* 基因和 *p20* 基

因共同组成 *cry11Aa* 操纵子, 已有的研究证实辅助蛋白 P20 不是 Cry11Aa 蛋白在 Bt 中高水平表达和晶体形成所必需的^[9]。辅助蛋白 P19 蛋白的氨基酸组成中富含半胱氨酸残基, 能有效形成二硫键, 这个特点与 ICPs 晶体化密切相关^[2,1], 因此有人估计 *p19* 基因很可能是 Cry11Aa 蛋白结晶的根本原因^[2,10-12], 但是至今仍没有将 *p19* 基因完全缺失的具体实验能够证明以上的推论。

本研究将位于 *cry11Aa* 操纵子中、*cry11Aa* 基因上游的 *p19* 基因完全缺失, 构建了重组质粒 *pHcy3*, 并电激转化至 Bt 晶体缺陷型菌株 4Q7 中进行 Cry11Aa 蛋白的表达, 分析了辅助蛋白 P19 对 Cry11Aa 的表达量、形成的晶体形状、晶体大小和杀虫活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 表 1 为本研究涉及的菌株和质粒, 其中大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和 Bt 分别在 37℃ 和 30℃ 培养, 使用的抗生素浓度分别为氨苄青霉素 (Amp^r) 100μg/mL 和红霉素 (Erm^r) 25μg/mL。

基金项目: 国家 973 项目 (G2000016209); 广东省自然科学基金研究团队项目资助

* 通讯作者。Tel: 86-20-84113860; Fax: 86-20-84037472; E-mail: js12@zsu.edu.cn

作者简介: 师永霞 (1976-), 女, 河南省安阳人, 博士研究生, 研究方向为杀虫微生物及基因工程。E-mail: syx0817@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-07-18; 接受日期: 2005-10-25; 修回日期: 2005-09-07

表 1 本研究中的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids in this study

Bacteria and plasmids	Characterization	Sources or references
Strains		
4Q7	AcrySTALLIFEROUS mutant of <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	Ohio State University, Columbus, USA
4Q7 (pHT3101)	4Q7 containing the plasmid pHT3101	In this study
4Q7 (pHcy1)	4Q7 containing the plasmid pHcy1	In this study
4Q7 (pHcy3)	4Q7 containing the plasmid pHcy3	In this study
<i>E. coli</i> TG1	<i>SupE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	Lab store
<i>E. coli</i> K12	McrA ⁺ , McrBC ⁺ , EcoK ⁺	NEB Company
Plasmids		
pMD18-T	Amp ^r , the vector used to ligate PCR product	Takara Company
pHT3101	Erm ^r and Amp ^r , shuttle vector of <i>E. coli</i> and <i>B. thuringiensis</i>	Dr. Wu Dong
pWF26	pHT3101 carrying gp19 gene, gcry11gAa gene and gp20g gene	[12]
pHcy1	pHT3101 carrying p19 gene and cry11Aa gene	In this study
pHcy3	pHT3101 carrying cry11Aa gene	In this study

1.1.2 培养基 :LB 培养基见分子克隆实验手册^[13], G-Tris 培养基和 PWYE 培养基配方见参考文献^[8,14]。

1.1.3 主要试剂 :限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司 ;高保真 PCR 试剂盒购自 Roche 公司 ;质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司 ;蛋白定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司 ;Cry11Aa 的抗血清由中国科学院武汉病毒研究所袁志明研究员惠赠。

1.2 分子生物学操作

质粒抽提、酶切反应、电泳鉴定、DNA 片段回收、连接反应和大肠杆菌的转化参考分子克隆实验手册^[13]。

1.3 引物和 PCR

根据 Bt 杀虫晶体蛋白基因 *cry11Aa* 全长操纵子的序列 (GenBank Accession No. S78174, No. M31737, No. J03510), 设计了 5 条引物, 如表 2 所示, 其中方框表示引物中引入的酶切位点。PCR 体系和 PCR 反应参照 Roche 公司的高保真 PCR 试剂盒进行。

表 2 扩增 ICP 基因的引物组合

Table 2 Combination of PCR primers for amplifying ICP genes

Primers	Primer sequences(5' - 3')	The expected amplified fragments	The fragment length/kb	Restriction enzyme sites
cry11A-5PE	ACTAGGTAT GAATTC TACGTTTTGATA	p-11 ^a	0.35	<i>Eco</i> R I
cry11A-3PS	AATTCATATTCATA GAGCTC TTCTCTCC			<i>Sac</i> I
cry11A-5Sa2	GAGCTC ATGAATTATATGGAAGATAGT	<i>cry11Aa</i>	2.0	<i>Sac</i> I
cry11A-3Sp	GATTTTCTACAATTGCAT GCTTATAACTTTTT			<i>Sph</i> I
cry11A-5Sa1	AT GAGCTC TAATTTAAGAGTATGTAT	p-11 + p19 + <i>cry11Aa</i>	3.0	<i>Sac</i> I
cry11A-3Sp	GATTTTCTACAATT GCATGC TTATAACTTTTT-3'			<i>Sph</i> I

^a p-11 represents *cry11Aa* promoter upstream p19 gene on the *cry11Aa* operon. Boxed nucleotides represent the introduced restriction enzyme sites in the PCR primers.

1.4 Bt 菌株的电激转化

Bt 4Q7 感受态的制备和电激转化见参考文献^[15]电激采用 0.2cm 电激杯 (Bio-Rad 公司), Bio-Rad 公司的电激仪, 参数设定: 电阻 400 ~ 800 Ω , 电容 25mF 和电压 1.5 ~ 1.75kV。

1.5 蛋白浓度的测定

Bt 菌株产生的杀虫晶体蛋白按照参考文献^[8,16]描述的方法进行 SDS-PAGE 分析和对比。参照蛋白

定量试剂盒 (DC Protein Assay, Bio-Rad 公司产品) 的使用手册, 以牛血清蛋白 (BSA) 为标准蛋白制作蛋白浓度标准曲线, 测定 Bt 重组菌株中总蛋白的浓度。结合 ImageMaster VDS 软件分析 SDS-PAGE 中目的蛋白所占比例, 计算目的蛋白的浓度。

1.6 透射电镜观察

收集培养至芽孢脱落成熟的 Bt 菌株, 以无菌 ddH₂O 反复洗涤多次, 尽量去除培养杂质, 只留下晶

体和芽孢。菌液稀释于无菌 ddH₂O 中,直接滴在铜网上,置于透射电子显微镜(JEM-100CX II)下观察。

1.7 生物测定

致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)由本室饲养,具体的生物测定方法参照文献[17],以24孔细胞培养板作为生测容器,每个样品设5个不同的浓度,每个浓度组使用25头致倦库蚊三龄幼虫,24h后统计蚊幼虫存活数,使用Probit软件计算Bt重组菌株的LC₅₀。

2 结果和分析

2.1 重组质粒 pHcy1 和 pHcy3 的构建

图1为重组质粒 pHcy1 和 pHcy3 的线性示意图,质粒 pHcy3 与质粒 pHcy1 的不同之处在于 cry11Aa 基因前缺失了辅助蛋白 P19 的编码区。

以质粒 pWF26 为模板,以 cry11A-5Sa1 与 cry11A-3Sp 为引物,扩增 cry11Aa 全长操纵子,经过中间载体 pMD18-T 和穿梭载体 pHT3101,得到重组 Bt 穿梭质粒 pHcy1;以质粒 pWF26 为模板,以 cry11A-5PE 与 cry11A-3PS 为引物,扩增 cry11Aa 操纵子中 p₁₉ 基因上游的启动子区,经过中间载体 pMD18-T 和穿梭载体 pHT3101,得到重组质粒 pHPd,将扩增的 cry11Aa 基因的 orf 区连接至该质粒的 Sac I / Sph I 双酶切位点,得到重组 Bt 穿梭质粒 pHcy3。为保证 cry11Aa 基因的正确转录终止和高效翻译,重组质粒 pHcy1 和 pHcy3 均携带 cry11Aa 基因 ORF 下游的末端终止序列。

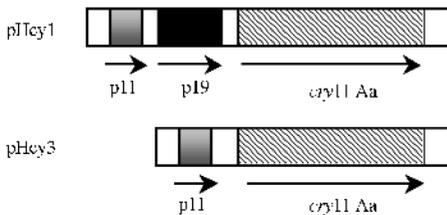


图1 重组质粒 pHcy1 和 pHcy3 的线性示意图

Fig.1 The physical maps of the recombinant plasmids pHcy1 and pHcy3.

2.2 Cry11Aa 蛋白在重组 Bt 菌株中的表达

将重组质粒 pHcy1 和 pHcy3 电激转化至 Bt 晶体缺陷型菌株 4Q7 中,同时以穿梭质粒 pHT3101 作为阴性对照。分别将重组 Bt 菌株在 1mL PWYE 培养基中过夜培养,使细胞生长同步。次日以 1:100 的比例转接到 50mL G-Tris 液体培养基中,30°C、230 r/min 振荡培养至孢晶分离,取等体积的 4Q7(pHcy1) 和 4Q7(pHcy3) 培养液进行 SDS-PAGE 分

析。蛋白电泳结果表明,在重组菌株 4Q7(pHcy1) 和 4Q7(pHcy3) 中均能检测到正常表达的 Cry11Aa 蛋白,但单位体积培养液的 Cry11Aa 蛋白在前者(辅助蛋白 P19 存在时)中的表达量比在后者(无辅助蛋白 P19)提高了约 37%(图2)。

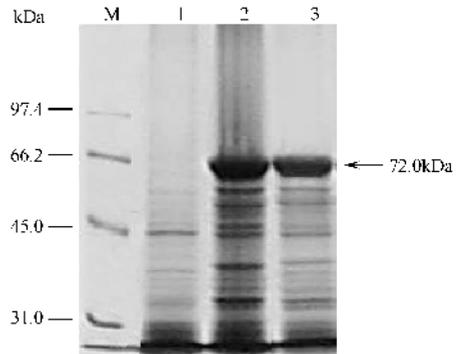


图2 重组菌株中 Cry11Aa 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of Cry11Aa protein in Bt recombinant strains. M, Protein molecular weight marker; 1, 4Q7(pHT3101); 2, 4Q7(pHcy1); 3, 4Q7(pHcy3). Arrow points to the expressed 72kDa Cry11Aa protein.

2.3 电镜观察晶体的形成

将 4Q7(pHT3101)、4Q7(pHcy1) 和 4Q7(pHcy3) 培养至芽孢脱落,进行透射电镜观察。4Q7(pHT3101) 中仅出现芽孢,而在表达 Cry11Aa 蛋白的 4Q7(pHcy1) 和 4Q7(pHcy3) 重组菌株中均能观察到芽孢和晶体,而且形成的晶体大小相近、形状相似,均为典型的双梯形结构(图3)。这说明不论 cry11Aa 操纵子中编码辅助蛋白的 p₁₉ 基因是否存在,Cry11Aa 蛋白的正常表达和晶体化形成均不受影响。

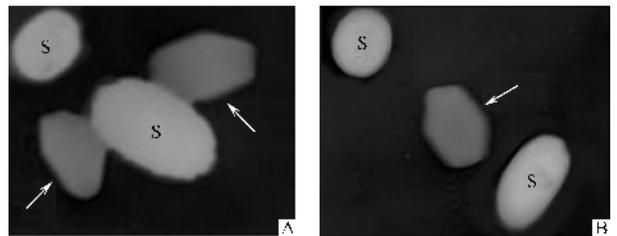


图3 表达 Cry11Aa 蛋白的重组菌株的透射电镜照片(8000×)

Fig.3 Transmission electron micrographs of Bt recombinant strains expressing Cry11Aa protein(8000×). Arrows point to Cry11Aa crystals and S represents spores of Bt strains. A: 4Q7(pHcy1); B: 4Q7(pHcy3).

2.4 Cry11Aa 蛋白的杀蚊活性生物测定

生物测定结果表明,4Q7(pHcy1) 和 4Q7(pHcy3) 重组菌株表达的 Cry11Aa 蛋白均具有杀蚊活性,对三龄致倦库蚊的 LC₅₀ 为 59.33ng/mL 和 62.56ng/mL,彼此之间的毒力都没有明显差异(表3),说明辅助蛋白 P19 并没有改变 Cry11Aa 蛋白的毒性。

表3 表达 Cry11Aa 蛋白的重组菌株对
库蚊三龄幼虫的生物测定

Table 3 Bioassay of Cry11Aa protein from recombinant Bt
against 3rd-instar larvae of *Culex quinquefasciatus* larvae

Bt recombinant strains	LC ₅₀ (ng/mL) ^a	95% fiducial limits
4Q7 (pHcy1)	59.33	44.13 ~ 71.89
4Q7 (pHcy3)	62.56	42.94 ~ 75.57
4Q7 (pHT3101)	NA ^b	NA

^a The LC₅₀ values represent the average of at least three repetitions after 24h of larvae exposure. ^b NA: no activity.

3 讨论

苏云金杆菌分子量相对较小的蛋白(如 Cry2A、Cry11Aa 和 Cyt1 蛋白)由于缺乏 Cry1 类蛋白的富含半胱氨酸的 C 末端,所以要在某些辅助蛋白的作用下才能形成晶体^[4-8]。到目前为止,已在 Bt 中发现了一些具有特殊功能的辅助蛋白基因,如 *p19*、*p20*、*orf1* 和 *orf2* 等。*cry2A* 启动子区、*orf1-orf2* 串联基因和 *cry2A* 类基因共同组成 *cry2A* 型操纵子,已有的研究表明辅助蛋白 ORF2 能够提高 Cry2Aa 蛋白的产量和帮助 Cry2 类蛋白形成晶体,但 ORF1 蛋白并不是 Cry2 类蛋白的高效表达和晶体形成所必需的^[7,8]。Dervyn 等^[18]研究发现,*cry11Aa* 启动子区、*p19* 基因、*cry11Aa* 基因和 *p20* 基因共同组成 *cry11Aa* 操纵子,是一个完整的转录单位,也就是说 *cry11Aa* 基因的转录很可能依赖于 *p19* 基因首先转录。辅助蛋白 P20 不是 Cry11Aa 蛋白在 Bt 中高水平表达和晶体形成所必需的^[9]。此外,P19 蛋白与 ORF1 蛋白在组成上有 33% 的相似性;P19 蛋白的氨基酸组成富含半胱氨酸残基,能有效形成二硫键,这个特点与 ICPs 晶体化密切相关^[2]。因此有人估计 *p19* 基因很可能是 Cry11Aa 蛋白结晶的根本原因^[2,10-12]。

由本实验中重组菌株 4Q7 (pHcy1) 和 4Q7 (pHcy3) 表达 Cry11Aa 蛋白的情况分析(图 2),不论 *cry11Aa* 操纵子中的 *p19* 基因是否存在,*cry11Aa* 基因均能正常表达,当辅助蛋白 P19 存在时,单位体积培养液的 Cry11Aa 蛋白表达水平相对提高了 37%。该现象表明,虽然 *p19* 与 *cry11Aa* 两个基因在结构上是串联转录的,但实际上 *cry11Aa* 基因的转录和表达并不依赖于 *p19* 基因;*p19* 基因可能作为分子伴侣,引发、促进和稳定晶体的形成,一定程度上帮助提高了 Cry11Aa 的蛋白表达量,这也是 Bt 中其他类型分子伴侣基因(如 *p20* 基因)的基本功能之一。

透射电子显微镜结果表明在表达 Cry11Aa 蛋白的 4Q7 (pHcy1) 和 4Q7 (pHcy3) 中,均能观察到由

Cry11Aa 蛋白形成的典型的双梯形形状的晶体,两菌株中晶体的大小相近、形状相似、数量和分布密度也接近(图 3)。这说明 Cry11Aa 蛋白能够形成结晶的根本原因并不在于 *p19* 基因的存在,而是其自身的芽孢期启动子类型、mRNA 的高度稳定性和晶体化等因素所导致的。

上述研究结果为分子伴侣基因 *p19* 对 Cry11Aa 蛋白在表达和结晶方面的功能做出了定论,结束了多年来对于分子伴侣基因 *p19* 在 *cry11Aa* 操纵子中所起作用的种种猜测。但是,这并不意味着 *p19* 基因是无功能的,根据它的广泛存在性、基因结构的保守性和组成成分的特征,它在 Bt 中必然是有存在的理由的。也许它是在蛋白与蛋白之间的相互作用中起着关键的作用,如导致表达的杀虫蛋白最终形成一种特殊网格状结构或者引起 Cry11Aa 类型的包涵体与以色列亚种中的其它包涵体共集聚^[10]。若在能产生所有以色列亚种的各种 ICPs 的某菌株中缺失 P19 蛋白,其效应也许才能体现出来。

参 考 文 献

- [1] 龙蔡新, 庞义. 昆虫细菌病. 见: 蒲蛰龙主编. 昆虫病理学. 广州: 广东科技出版社, 1994, 217-338.
- [2] Hofte H, Whitely HR. Insecticidal crystals proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, 1989, **53**(2): 242-255.
- [3] Delecluse A, Poncet S, Klier A, et al. Expression of *cryIV A* and *cryIV B* genes independently or in combination in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(11): 3922-3927.
- [4] Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J Bacteriol*, 1995, **177**(21): 6027-6032.
- [5] Adams LF, Visick JE, Whitely HR. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1989, **171**(1): 521-530.
- [6] Wu D, Cao X, Bai Y, et al. Sequence of an operon containing a novel δ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, **65**(1): 31-35.
- [7] Crickmore N, Ellar DJ. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned Cry2A δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*, 1992, **6**(11): 1533-1537.
- [8] Ge B, Bideshi D, Moar WJ, et al. Differential effects of helper proteins encoded by the *cry2A* and *cry11Aa* operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **165**(1): 35-41.
- [9] Chang C, Yu Y, Dai S, et al. High-level *cryIV D* and *cyt A* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 815-821.

- [10] Ibarra JE , Federici BA. Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are similar in protein composition and toxicity. *FEMS Microbiol Lett* , 1986 , **34** (1) :79 – 84.
- [11] Wu D , Federici BA. A 20-kilodalton protein preserves cell viability and promotes cytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis* . *J Bacteriol* , 1993 , **175** (16) :5276 – 5280.
- [12] Wu D , Federici BA. Improved production of the insecticidal CryIV D protein in *Bacillus thuringiensis* using cryI(Ac) promoters to express the gene for an associated 20-kDa protein. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1995 , **42** (5) :697 – 702.
- [13] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [14] Arvidson H , Dunn PE , Strnad S , et al. Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae : factors involved *in vivo* and in the structure of a purified protoxin. *Mol Microbiol* , 1989 , **3** (11) : 1533 – 1543.
- [15] Belliveau BH , Trevors JT. Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation. *Appl Environ Microbiol* , 1989 , **55** (6) :1649 – 1652.
- [16] Park HW , Ge B , Bauer LS , et al. Optimization of Cry3A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** (10) :3932 – 3938.
- [17] Beegel CC , Rose RI. *Bacillus thuringiensis* bioassay methodology. In : Feng TY. eds. *Bacillus thuringiensis* biotechnology and environmental benefit. Taipei : Hua Shiang Yuan Publishing Co. , 1995 , 349 – 362.
- [18] Dervyn E , Poncet S , Klier A , et al. Transcriptional Regulation of the cry IV D Gene Operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* . *J Bacteriol* , 1995 , **177** (9) :2283 – 2291.

Influence of accessory protein P19 from *Bacillus thuringiensis* on insecticidal crystal protein Cry11Aa

SHI Yong-xia^{1,2} , ZENG Shao-ling^{1,3} , YUAN Mei-jin¹ , SUN Fan¹ , PANG Yi^{1*}

(¹ State Key Laboratory for Biocontrol , Zhongshan(Sun Yat-sen) University , Guangzhou 510275 , China)

(² Institute of Genetic Engineering , Southern Medical University , Guangzhou 510515 , China)

(³ Animals and Plant Quarantine Institute , Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People 's Republic of China , Shenzhen 518010 , China)

Abstract : p19 gene , cry11Aa gene and p20 gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are organized as a single operon. It is reported that P20 polypeptide is not required for high-level expression of Cry11Aa and crystal formation in *B. thuringiensis*. It is deduced that P19 might relate to Cry11Aa crystallization. In this study , two recombinant plasmids pHcy1 and pHcy3 containing cry11Aa gene were constructed , the latter absent from p19 gene encoding a possible accessory protein between cry11Aa promoter and cry11Aa gene. The recombinant plasmids were introduced into an acrySTALLIFEROUS mutant 4Q7 of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. SDS-PAGE showed that Cry11Aa protein per unit of culture medium had a higher expression level in 4Q7(pHcy1) with p19 and cry11Aa genes than in 4Q7(pHcy3) with only cry11Aa gene. Both two *B. thuringiensis* strains formed Cry11Aa crystals in a similar size and shape during sporulation. Toxicity bioassay showed 4Q7(pHcy1) and 4Q7(pHcy3) exhibited a comparable mosquito-larvicidal activity against 3rd-instar *Culex quinquefasciatus*. It indicated that accessory protein P19 did not have an effect on cry11Aa crystallization and high mosquitocidal toxicity. However , it could enhance Cry11Aa expression amount to a certain extent.

Keywords : *Bacillus thuringiensis* ; Accessory protein P19 ; Crystal protein Cry11Aa ; Bioassay