

全长 δ -内毒素 cryIA(c)基因在三种原核细胞中的表达*

杨远征 齐义鹏** 黄永秀

(武汉大学病毒研究所 武汉 430072)

摘要 采用随机引物法标记苏芸金芽孢杆菌 δ -内毒素 cryIA(b)基因,从苏芸金芽孢杆菌 HD-73 质粒基因文库中筛选到了分别包含 δ -内毒素 cryIA(c)基因 5'端和 3'端的 6.5kb 和 4.3kb 两个片段,然后分别缺失其非编码区,重连得到全长 3.92kb 的 cryIA(c)基因,用穿梭载体 pHT3101 亚克隆后分别转化大肠杆菌 NM522、枯草杆菌 AS1176 及苏芸金芽孢杆菌晶体缺陷型 4D10(H3ab),得到了具有同一质粒的三种工程菌。SDS-PAGE 电泳表明此基因在三个宿主系统中均表达了分子量为 133 300 的原毒素,分子量大小与苏芸金芽孢杆菌 HD-73 晶体蛋白完全相同,免疫检测表明表达蛋白和天然晶体蛋白具有相同的免疫原性。用提取的粗表达产物对二龄小菜蛾幼虫作杀虫试验,证明三种细胞产生的表达蛋白均具有杀虫活性,测得它们的 LD₅₀ 分别为 0.311 μ g/cm²、0.024 μ g/cm² 和 0.017 μ g/cm²。

关键词 基因表达, δ -内毒素, 苏芸金芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, 大肠杆菌

在过去的十多年中,苏芸金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)由于其特有的昆虫致病特性而得到了广泛深入的研究,其产生的伴孢晶体对鳞翅目、双翅目和鞘翅目等昆虫具有杀伤活性。根据其杀虫特异性,晶体蛋白(δ -内毒素)可以分为 cry I、II、III 和 IV 四类^[1]。编码 δ -内毒素的许多基因已在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中得到了克隆^[1],这些基因一般定位于苏芸金芽孢杆菌的大质粒上,几种不同的毒素基因可以共存于一个菌株中。毒素基因在大肠杆菌中不同水平的表达已得到了研究^[2],发现了几种表达调节系统^[3,4]。但目前尚无在三种原核细胞中表达同一个 Bt δ -内毒素基因的比较研究。虽然 Adang 等^[5]已经在大肠杆菌中克隆了苏芸金芽孢杆菌 HD-73 的毒素基因 cryIA(c),但用于进一步的遗传操作比较困难,因此本文仍以苏芸金芽孢杆菌 HD-73 作为原始出发菌株,分别克隆带有毒素基因 5'端和 3'端的两个片段,通过缺失其非编码区后重连得到 cryIA(c)全基因,亚克隆到穿梭载体上后分别转化大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和苏芸金芽孢杆菌,研究其在三个宿主系统中的表达,并希望最终将其克隆到昆虫病毒转移载体上,构建重组病毒杀虫剂。

穿梭质粒载体 pHT3101^[6]是基于苏芸金芽孢杆菌残缺质粒 pHT1030 构建的一个具

* 国家“八五”攻关项目资助课题。

** 负责与联系作者。

本文于 1995 年 2 月 28 日收到。

有遗传稳定性的新型穿梭质粒,携带有苏芸金芽孢杆菌质粒复制区 ori.1030 和红霉素抗性基因 (Em^r),因而能在 Bt 和枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*, 简称 Bs) 中高拷贝复制^[6,7],由于采用了质粒 pUC19 的大部分功能区,所以大肠杆菌重组子可以在氨苄青霉素/红霉素/IPTG/X-gal 平板上用白色标记进行筛选。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

所用细菌、质粒详见表 1。

表 1 所用菌株和质粒

Table 1 Strains and Plasmids in this work

菌株与质粒 Strains and plasmids	基因型 Genotypes	来源 Sources
Bt HD-73	cryIA(c)	中科院武汉病毒研究所李荣森研究员赠送 Kindly provided by Prof.Li R.S, Inst. Virol., CAS
pBluscript SK+	Ap^r	购于 Stratagene 公司 Stratagene Co.
pXI93	Ap^r ;cryIA(b)	美国加州大学 Wu D 博士赠送 Provided by Dr.Wu D, Univ.California, USA
pHT3101	Bt ori1030	法国巴斯德研究所 Lereclus D 博士赠送 Provided by Dr.Lereclus D, Inst.Pasteur, France
<i>E.coli</i> NM522	Em^r ; Ap^r	购于 Stratagene 公司 Stratagene Co.
Bs AS 1176		南开大学蒋如璋教授赠送 Kindly provided by Prof.Jiang R.Z, Univ. Nankai
Bt 4D10(H3ab)	cry-	华中农业大学刘子铎先生赠送 Provided by Mr.Liu Z D, Huazhong Agric. Univ.

限制性内切酶、随机引物标记试剂盒购于 Promega 公司, T4 DNA 连接酶购于 GIBCO-BRL 公司, α -³²P dATP 购于北京福瑞公司。小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 幼虫由本所昆虫病毒研究室提供。

1.2 质粒 DNA 的提取、消化、片段回收和连接

按常规方法^[8]提取纯化质粒 DNA、酶切消化和 DNA 片段的连接,采用 DE81 膜回收 DNA 片段。

1.3 重组质粒的转化

1.3.1 大肠杆菌:用常规 $CaCl_2$ 法^[8]制备感受态细胞,重组 DNA 转化后用合适的抗菌素平板筛选转化子。

1.3.2 枯草杆菌:溶菌酶处理枯草芽孢杆菌细胞得到游离原生质体,重组 DNA 转化后在 DM3 平板上再生,再转移到红霉素抗性平板上筛选转化子^[9]。

1.3.3 苏芸金芽孢杆菌:用 4℃ 蒸馏水洗涤菌体后再悬浮于一定体积的 4℃ 无菌 PEG6000(40%)中,加入 1 μ g 质粒 DNA,用 Bio-Rad Gene Pulser 电转移仪电转化

(2.5KV, 25 μ F, 10ms)^[6], 用 LB 稀释 10 倍后于 28℃ 振荡培养 1h, 涂于红霉素抗性平板上筛选转化子。

1.4 菌落的原位杂交和 DNA 的 Southern 杂交

按 Promega 公司随机引物标记试剂盒说明书制备放射性探针。原位杂交中菌落的影印、裂解、预杂交、杂交以及 Southern 杂交中的转膜、预杂交和杂交均按常规方法进行^[8]。

1.5 表达产物的分离纯化

1.5.1 大肠杆菌: 根据表达产物的特性, 采用改进的表达产物纯化方法。将 *E.coli* 工程菌株接种 100ml LB, 37℃ 振荡培养 48h, 4000g 离心收集菌体, 重悬于 2ml 溶液 I (50mmol/L Tris/HCl, pH8.5, 50mmol/L EDTA, 15% 蔗糖, 2mg/ml 溶菌酶) 中, 4℃ 过夜, 再将菌液用超声波处理 3×5min, 12000g 离心 15min, 沉淀用溶液 II (0.5mol/L NaCl, 1% Triton X-100) 洗涤三次, 再用 0.5mol/L NaCl 洗 5 次, 蒸馏水洗 2 次, 再用溶液 III (50mmol/L Na₂CO₃/HCl, pH9.5, 10mmol/L 二巯基苏糖醇) 悬浮, 15000g 离心 3~5min, 上清即可作为上样样品。

1.5.2 枯草芽孢杆菌: 与大肠杆菌方法基本相同, 但在超声波处理前于 37℃ 作用 1~2h。

1.5.3 苏芸金芽孢杆菌野生型及基因工程菌: 按照文献^[10]的方法提取纯化表达的晶体蛋白。

1.6 表达产物的 SDS-PAGE 电泳

按常规方法制备垂直板电泳, 分离胶浓度 10%, 用考马斯亮兰 R-250 染色, 甲醇-冰醋酸脱色。

1.7 晶体蛋白抗血清制备与免疫检测

取纯化的晶体蛋白 20mg 加完全福氏佐剂, 分 4 次免疫家兔, 动脉采血, 血清加少量叠氮钠后保存备用。免疫测定使用双相扩散免疫法。

1.8 表达产物的生物测定

将 LB 摇瓶培养 4d 的菌液离心, 蒸馏水洗抽干, 用蒸馏水配成一定浓度的母液, 用超声波处理三次, 每次 2min, 再用蒸馏水作梯度稀释, 均匀涂布于洗净的 16cm² 白菜叶上, 25℃ 饲养小菜蛾 72h, 每个稀释点使用幼虫 20 头, 重复三次。

2 实验结果

2.1 苏芸金芽孢杆菌 δ -内毒素 cryIA(c)基因片段的定位与筛选

从苏芸金芽孢杆菌库斯塔克亚种 HD-73 中提取、纯化、回收 75kb 大质粒, 用 Hind III 完全酶切后, 以 pUC18 为载体构建了 75kb 大质粒的基因文库, 覆盖率为 98%。cryIA (b) 基因与 cryIA (c) 基因同属 cryI 基因, 二者的同源性高达 86%^[11], 可以用作探针筛选 cryIA (c) 基因。因此用 BamHI 和 PstI 完全酶切质粒 pXI93DNA, 回收包含 cryIA (b) 基因全序列的 4.3kb 片段^[11], 用随机引物法标记作为探针, 与 75kb 质粒基因文库作原位杂交, 从杂交阳性的菌落中提取纯化质粒, 发现阳性克隆的外源片段有两种, 一种大小为 6.5kb, 一种大小为 4.3kb, Southern 转移杂交证明这两种片段确实与 cryIA (b) 同源[图 1a.b.c], 根据 Adang 等^[5]的报道, 这两个片段分别包含了 cryIA (c) 基因的 5'端编码区和 3'端编码区。

2.2 cryIA(c)全长基因的克隆

为了进一步获得 cryIA(c)全长基因,分别把 6.5kb 和 4.3kb 两个片段亚克隆到 pBluescript SK+上得到 pYZA4 和 pYZB2,将 pYZA4 DNA 用 HincII 完全消化后自身环化得到携带有 5'端 3.0kb cry 基因的 pYZC1,再用 HincII 和 Sma I 完全消化后重连,取反向克隆,消除了一个 Sma I 位点和一个 HincII 位点,并在 cry 基因的 5'端引入了一个 BamH I 位点,获得 pYZCR14;pYZB2 DNA 用 Cla I 完全酶切后自身环化得到携带有 3'端 cry 基因 0.9kb 片段的 pYZD4,用 EcoRV 和 HincII 完全酶切后重连,筛选出反向克隆 pYZDR2,同时消除了 EcoRV 和 HincII 两个位点,并在 0.9kb 片段 3'端引入了一个 BamH I 和一个 Sma I 位点;用 BamH I、HindIII 分别消化 pYZCR14 和 pYZDR2,回收 cry 基因 5'端 3.0kb BamH I-HindIII 片段和 3'端 0.9kb HindIII-BamH I 片段后克隆于 pBluescript SK+的 BamH I 位点,这样就得到了包括 cryIA(c)5'端启动区 152bp、3'端大部分终止区 198bp 和全部编码区的 3.92kb 全长基因,命名为 pYZT3,并分别在 cryIA(c)基因的两端各引入了一个 BamH I 和 Sam I 位点,为进一步将其亚克隆到穿梭表达载体和昆虫病毒转移载体上提供了条件(见图 2-A、图 3)。

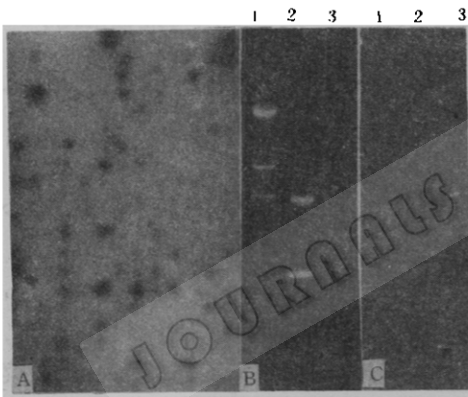


图1 苏芸金芽孢杆菌 δ -内毒素 cryIA(c)基因的筛选

Fig.1 Selection of δ -endotoxin cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis*

A.用 cryIA(b) 基因对 HD-73 质粒基因文库的原位杂交筛选

In situ hybridization selection to HD-73 plasmids gene pool using cryIA(b) gene as probe:

B.杂交阳性的两种重组子的酶切

Digestion of two kinds of positive recombinant

1. λ DNA / HindIII ; 2.pYZA4 / HindIII

3.pYZB2 / HindIII;

C.重组子的 Southern 杂交结果: 6.5kb 和 4.3kb 片段分别包含了 cryIAc 基因的 5'和 3'端

Southern hybridization of recombinant: 6.5 kb and 4.3kb fragments encoding 5'end and 3'end of cryIA(c) gene, respectively.

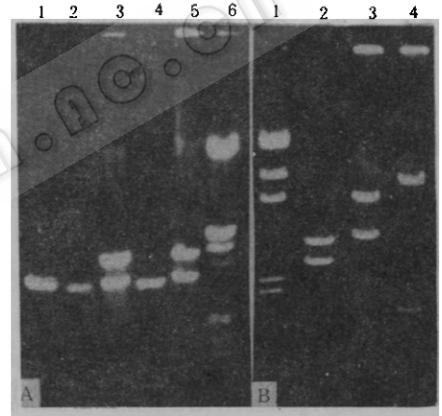


图2 CryIA(c)全长基因 3.92kb 片段的克隆和亚克隆

Fig.2 Clone and subclone of full-length cryIA(c) gene fragment

A. 1.pYZCR14 / BamHI+HindIII;

2.pYZDR2 / BamHI+HindIII;

3.pYZT3 / BamHI;

4.pYZT3 / BamHI+HindIII;

5.pYZT3 / SmaI;

6. λ DNA / HindIII+EcoRI.

B. 1. λ DNA / HindIII;

2.pYZT3 / SmaI;

3.pHTY1 / SmaI;

4.pHTY1 / KpnI.

2.3 用穿梭载体 pHT3101 克隆 cryIA(c)基因

分别用 Sma I 对 pHT3101 和 pYZT3 完全酶切, 回收 pYZT3 的 3.92kb cryIA(c) 全长片段, 克隆于 pHT3101 的 Sma I 位点, 得到 pHTY1(图 2-B、图 3), 转化大肠杆菌 NM522 后再分别用原生质转化和电转化方法转化枯草芽孢杆菌 AS1176 和苏芸金芽孢杆菌晶体缺陷型 4D10。从筛选出的抗性菌落中提取质粒, 酶切检测表明 pHTY1 确实转入了三个宿主系统。

2.4 cryIA(c)基因在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和苏芸金芽孢杆菌中的表达

分别提取、纯化 cryIA(c) 基因在三个宿主系统中的表达产物, 进行 SDS-PAGE 电泳, 发现 cryIA(c) 基因在三个宿主系统中均表达了分子量为 133 300 的蛋白分子, 与原始出发菌 HD-73 晶体蛋白分子大小完全相同(图 4), 由于采用了改进的表达蛋白纯化方法, 因而在电泳图谱上几乎看不到宿主细胞的蛋白带, 这是由于 cryIA(c) 基因在三个宿主系统中表达后形成了包涵体、类晶体和晶体结构, 因而可以尽量地去除宿主细胞的蛋白污染而得到相当纯净的表达产物。另外, 在 SDS-PAGE 图谱中还发现, 枯草芽孢杆菌 AS1176(pHTY1)和苏芸金芽孢杆菌 4D10(pHTY1)除了有一 133 300 的主蛋白带以外, 还有一分子量约为 67 000 的次蛋白带, 而在大肠杆菌 NM522(pHTY1)中却没有发现, 我们认为这一蛋白带是 133 300 原毒素蛋白的次级降解产物。

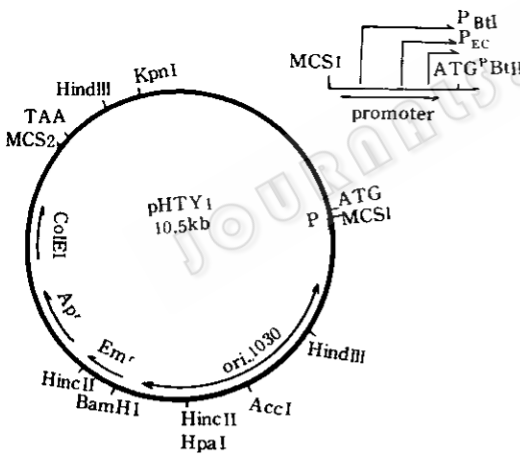


图3 重组质粒 pHTY1 图谱(右上角为毒素基因启动区的结构)

Fig.3 Map of recombinant plasmid pHTY1

MCS1: BamH I -SmaI-BamH II -Xba I -Sal I -Pst I -Sph I -HindIII;

MCS2: Cla I -EcoR I -Pst I -Sma I -Kpn I -Sst I -EcoR I .

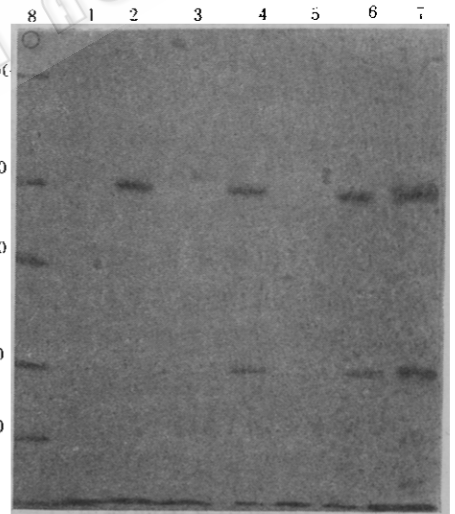


图4 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳

其中大肠杆菌(6 和 7)上样浓度

为其原液的十倍。

Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis of expression products

1. *E.coli* NM522; 2. *E.coli* NM522(pHTY1);

3. *Bs* AS 1176; 4. *Bs* AS1176(pHTY1);

5. *Bt* 4D10; 6. *Bt* 4D10 (pHTY1);

7. *Bt* HD-73(3ab); 8. MW marker.

2.5 表达产物的免疫活性

免疫检测表明, *cryIA(c)* 基因在三个宿主系统中的表达产物均能和 HD-73 晶体蛋白一样与 HD-73 晶体蛋白抗体产生明显的免疫沉淀反应, 形成沉淀线。

2.6 *cryIA(c)* 基因表达产物的生物活性

用二龄小菜蛾幼虫作杀虫试验, 将经超声波处理过的粗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 72h, 测定 LD₅₀, 结果见表 2。

表 2 表达产物的生物活性测定结果
Table 2 Bioassays of expression products

菌株 Strain	LD ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	95%置信限 95% Confidence
<i>E.coli</i> NM522 (pHTY1)	0.311	0.177~0.566
Bs AS 1176 (pHTY1)	0.024	0.012~0.055
Bt 4D10 (pHTY1)	0.017	0.009~0.032

3 讨论

芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭载体 pHT3101 具有广泛的芽孢杆菌和大肠杆菌宿主范围, 由于其具有苏芸金芽孢杆菌质粒复制区 *oriI030*, 因此它不仅能够高效率地转化大肠杆菌和苏芸金芽孢杆菌晶体缺陷型 (*cry-*), 而且也能够转化大多数芽孢杆菌^[7], 并能高拷贝地复制。但由于质粒的不相容性, pHT3101 不能转化其正常的原始宿主苏芸金芽孢杆菌。Baum 等^[14, 15] 也获得七种非同源的苏芸金芽孢杆菌质粒复制子, 构建了三种苏芸金芽孢杆菌质粒载体, 这三种穿梭载体除了能高效地转化其原始宿主的苏芸金芽孢杆菌晶体缺陷型以外, 均能不同水平的转化枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*) 和球状芽孢杆菌 (*B. sphaericus*), 并能稳定地复制, 这说明苏芸金芽孢杆菌质粒复制子具有广泛的芽孢杆菌宿主特异性, 所以我们采用穿梭载体 pHT3101 克隆全长的 δ -内毒素 *cryIA(c)* 基因, 其中包括 5'端 ATG 上游 152bp 的启动区和 3'端 TAG 下游 198bp 的大部分终止区。分别转化大肠杆菌 NM522、枯草杆菌 ASI176 和苏芸金芽孢杆菌晶体缺陷型 4D10 后得到了三种宿主菌的重组子, 不同水平表达了与原始出发菌晶体蛋白具相同免疫活性和分子量的毒蛋白分子, 并具有杀虫活性。根据生物测定的结果, 我们同样观察到 *cryIA(c)* 基因在大肠杆菌中的表达水平较低, 相对其在枯草芽孢杆菌和苏芸金芽孢杆菌中的表达量要低一个数量级左右。而其后两种宿主中的表达水平比较接近。

基因表达水平的高低受转录和翻译两个方面的调控, 宿主 RNA 聚合酶能否正常地识别特异性的启动区并启动高水平的转录则是基因表达的一个关键。早在 1981 年 Schnepf 和 Whiteley 已经在大肠杆菌中克隆和表达了第一个苏芸金芽孢杆菌 δ -内毒素基因, 但对大肠杆菌 RNA 聚合酶如何识别毒素基因启动子并启动表达的机理并不清楚, 更没有找到低水平表达的原因^[12]。由于晶体毒素蛋白仅仅产生于芽孢期, 因此一般认为晶体蛋白的表达受控于芽孢形成过程, 营养细胞中的 RNA 聚合酶不能识别其特异的启

动子。Wong 等于 1983 年通过 S1 核酸酶图在毒素基因的启动区发现了两个相邻的转录起始区,第一个(Bt I)在芽孢形成初期起始转录,另一个(Bt II)在芽孢形成中期起始转录。另外在这两个转录起始区中间还发现了一弱的大肠杆菌 RNA 聚合酶识别位点,并且这个位点微弱的转录起始功能与芽孢形成无关^[13],因此 δ -内毒素基因虽然能在大肠杆菌中表达,但其表达量只能维持在一个相当低的水平。两个苏芸金芽孢杆菌转录启动区与枯草芽孢杆菌成孢期基因的启动子(SpoVG 和 SpoVC)比较发现,它们具有很高的同源性^[13, 16, 17],对苏芸金芽孢杆菌 δ -内毒素两个转录调节因子 δ^{35} 和 δ^{28} 的克隆分析也发现,它们与枯草芽孢杆菌芽孢特异转录调节因子 δ^E (Spo II G)和 δ^K (Spo III C94)的氨基酸顺序同源性高达 88%和 85%^[17],因此它们能够识别苏芸金芽孢杆菌 δ -内毒素的两个转录起始区并启动高水平的转录。 δ -内毒素基因的 SD 序列与枯草芽孢杆菌成孢期基因比较也发现了很高的同源性^[13, 16],11 个碱基中的 9 个能与枯草芽孢杆菌 16sRNA3'端互补,从而有效地起始翻译。因此 δ 内毒素基因能够在枯草芽孢杆菌中获得接近其原始出发菌的表达水平。

枯草芽孢杆菌随着近十年不断地深入研究已成为除革兰氏阴性大肠杆菌以外遗传背景最为清楚的革兰氏阳性细菌,已经采用枯草芽孢杆菌表达系统表达了很多种分泌蛋白和非分泌蛋白。由于枯草芽孢杆菌遗传稳定性好,质粒不易丢失,基因操作技术比较成熟,并且与苏芸金芽孢杆菌的生物特性很为接近,因此克隆有 δ -内毒素基因的枯草芽孢杆菌作为一种很好的表达系统,可能成为生物杀虫剂工业化生产的一种新菌型。

致谢 感谢华中农业大学生物工程中心刘子铎讲师提供了从大肠杆菌中提取纯化 Bt 表达蛋白的方法。

参 考 文 献

- [1] Hofte H, Whiteley H R. *Microbiol Rev*, 1989, **53**: 242~255.
- [2] Yamamoto T, Ehmann A, Gonzalez J M et al. *Curr Microbiol*, 1988, **17**: 5~12.
- [3] Schnepf H E, Wong H C, Whiteley H R. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 4110~4118.
- [4] Adams L F, Visick J E, Whiteley H R. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 521~530.
- [5] Adang M J, Staver M J, Rocheleau T A et al. *Gene*, 1985, **36**: 289~300.
- [6] Lerechus D, Arantes O, Chaufaux J et al. *FEMS Microbiol letters*, 1989, **60**: 211~218.
- [7] Arantes O, Lerechus D. *Gene*, 1991, **108**: 115~119.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.3~6.60.
- [9] Chang S D, Cohen S N. *Mol Gen Genet*, 1979, **168**: 111~119.
- [10] 王瑛,白成,温洁.微生物学报,1980,**20**(3):285~288.
- [11] Schurter W, Geiser M, Mathe D. *Mol Gen Genet*, 1989, **218**: 177~181.
- [12] Schnepf H E, Whiteley H R. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, **78**(5): 2893~2897.
- [13] Wong H C, Schnepf H E, Whiteley H R. *J Biol Chem*, 1983, **258**(3): 1960~1967.
- [14] Baum J A, Coyle D M, Gilbert M P et al. *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**(11): 3420~3428.
- [15] Baum J A, Gilbert M P. *J Bacteriol*, 1991, **173**(17): 5280~5289.
- [16] Schnepf H E, Wong H C, Whiteley H R. *J Biol Chem*, 1985, **260**(10): 6264~6272.
- [17] Adams L F, Brown K L, Whiteley H R. *J bacteriol*, 1991, **173**(12): 3846~3854.

CLONING AND EXPRESSION OF FULL-LENGTH δ -ENDOTOXIN CryIA(c) GENE IN THREE KINDS OF PROKARYOTIC SYSTEMS USING SHUTTLE VECTOR pHT3101

Yang Yuanzheng Qi Yipeng Huang Yongxiu

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract Two fragments, 6.5kb and 4.3kb encoding 5'end and 3'end of δ -endotoxin cryIA(c) gene, respectively, were selected from the *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-73 75kb plasmid gene pool using random primer labelling δ -endotoxin cryIA(b) gene probe. The full-length 3.92kb cryIA(c) gene including 5'end 152bp promoter sequence and 3'end 198bp terminator sequence was rebuilt after uncoding sequences were deleted. Three kinds of engineering strains harbouring the same recombinant plasmid pHTY1 were obtained after the cryIA(c) gene had been subcloned in shuttle vector pHT3101 and transformed to *E. coli* NM522, *Bacillus subtilis* AS1176 and *Bacillus thuringiensis* crystal-deficient 4D10(H3ab). SDS-PAGE electrophoresis patterns reveal that the cryIA(c) gene expressed the same 133 300 protoxin proteins in all three host systems with the same molecular weight to the crystal protein from the *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-73. Immuno-assays indicate that the expression proteins can react with antiserum of HD-73 paraspore crystal protein in the same pattern as the natural crystalprotein. Bioassays using crude expressed products from three hosts reveal that they all showed toxicities to second instar larvae of *Plutella xylostella*, and their LD₅₀ were calculated to be 0.311 μ g / cm², 0.024 μ g / cm² and 0.017 μ g / cm², respectively.

Key words Gene expression, δ -Endotoxin, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *E.coli*