

Bt 群体信号应答因子 *nprR* 基因的缺失对 *cry1Ac* 基因表达的影响

王焱¹, 邓超¹, 彭琦¹, 陈榛¹, 张杰¹, 黄大昉², 宋福平^{1*}

(¹ 中国农业科学院植物保护研究所农业病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

(² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】研究群体信号应答蛋白编码基因 *nprR* 在苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) HD-73 菌株晶体蛋白形成过程中的作用。【方法】通过同源重组, 构建了 HD-73 *nprR* 基因缺失突变菌株 HD73 ($\Delta nprR$)。利用启动子-*lacZ* 融合、SDS-PAGE 方法, 测定不同培养基中 *nprR* 基因转录活性及 *nprR* 基因缺失对 *cry1Ac* 转录及表达的影响。【结果】启动子转录活性分析表明, 在 LB 和 SSM 培养基中 *nprR* 基因从对数期结束 (T₀) 开始表达, 稳定期持续表达。在 LB 培养基中, *nprR* 基因的缺失使 *cry1Ac* 基因在生长过渡期和稳定期前期转录活性显著提高, 同时 HD73 ($\Delta nprR$) 菌株 Cry 蛋白生成量也明显高于出发菌株 HD-73, 但是在芽胞形成释放后, Cry 蛋白的表达没有明显的区别。【结论】在丰富培养基中苏云金芽胞杆菌 *nprR* 基因的缺失在生长过渡期和稳定期前期能够提高 *cry1Ac* 基因转录和表达, 从而缩短了 *cry* 基因表达时间, 并且 Cry 蛋白总产量与出发菌株相当。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 群体效应; *nprR* 基因; *cry1Ac* 基因

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1550-06

群体效应 (Quorum Sensing, QS) 是细菌群体行为调节机制, 菌体通过胞外信号分子浓度感知群体密度的变化进而调控一系列基因的表达。细菌的许多行为, 诸如毒力、抗生素的产生、生物膜的形成、芽胞的生成、共生现象等均与 QS 作用的调节有关^[1-5]。QS 的调控机制在枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*, Bs) 中研究较为深入, 研究表明由 Phr 蛋白 (Phosphatase Regulatory Protein) 加工成熟的五肽担当胞外信号分子, 随着菌体的生长, 胞外信号分子累积, 信号肽进入胞内, 通过抑制胞内应答蛋白 Rap 蛋白 (Receptor Aspartyl Phosphatase) 的去磷酸化作用调控一系列基因表达, 从而调控包括菌体芽胞及感受态形成等诸多生理生化过程^[6-7]。

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 与

Bs 同属芽胞杆菌属, 能够在产生芽胞的同时生成对多种昆虫幼虫具有毒杀活性的晶体蛋白。研究表明 Bt 中的 NprR、PlcR 与 Rap 蛋白结构极为类似, 都含有可以介导蛋白质间相互作用的串联重复 TPR 结构域^[8-9]。2003 年, Pottathil 及 Lazazzera 等人以生物信息学的方法在 Bt 中发现 *nprR* 基因下游, 存在与 *phr* 基因相类似基因 *nprRB* 并预测出 NprRB 加工成熟的五肽信号分子 SKPDT, 推测 *nprR-nprRB* 可能与 *rap-phr* 基因具有相类似的功能^[4]。2007 年 Angel E. Aceves-Diez 等人研究表明在 Bt 培养基中加入人工合成的 SKPDT, 可以大大提高 Bt 菌株 *cry1Aa* 启动子转录活性^[10]。但是对于信号分子胞内的应答蛋白 NprR 在 Cry 蛋白表达过程中的作用仍不清楚。

基金项目: 国家“973 项目” (2009CB118902)

* 通信作者。Tel: +86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

作者简介: 王焱 (1984 -), 黑龙江绥化人, 硕士研究生, 主要从事苏云金芽胞杆菌功能基因组的研究。E-mail: wangyao918@hotmail.com

收稿日期: 2010-04-22; **修回日期:** 2010-06-18

本研究首次构建了苏云金芽胞杆菌 *nprR* 基因缺失菌株 HD73 ($\Delta nprR$)。在不同营养条件下分别测定了在 HD-73 及 HD73 ($\Delta nprR$) 菌株中 *cry1Ac* 基因启动子转录活性,分析了 *nprR* 基因缺失对晶体蛋白产量的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基:表 1 为本研究所用菌株和质粒。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 采用 LB 培养

基培养;苏云金芽胞杆菌的培养基分别采用 LB 培养基、SSM 培养基(8%营养肉汤,0.1% KCl,0.12% MgSO₄,0.01 mol/L NaOH,0.01 mol/L Ca(NO₃)₂,0.1 mmol/L MnCl₂,0.01 mmol/L FeSO₄)培养。

1.1.2 主要酶和生化试剂:Taq DNA 聚合酶购自北京博迈得生物技术有限公司;KOD DNA 聚合酶、相关内切酶和 T₄DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 回收、质粒提取及 PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen 公司。其他生化试剂和抗生素均为进口或国产生化级或分析纯级试剂。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
Strains		
<i>E. coli</i> JM110	<i>RpsL thr leu endA dem supE44 proAB</i>	This Lab
<i>E. coli</i> SCS110	<i>RpsL thr leu endA dem supE44 proAB</i>	This Lab
HD-73	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-73, carrying <i>cry1Ac</i> gene	This Lab
HD73 ($\Delta nprR$)	HD-73 mutant type, <i>nprR</i> gene was deleted by homologous recombination	This study
HD(<i>nprR'</i> - <i>lacZ</i>)	HD-73 strain containing plasmid pHTnprRp	This study
HD(<i>cry1Ac'</i> - <i>lacZ</i>)	HD-73 strain containing plasmid pHTery1Acp	This study
HD $\Delta nprR$ (<i>cry1Ac'</i> - <i>lacZ</i>)	HD73 ($\Delta nprR$) strain containing plasmid pHTery1Acp	This study
Plasmids		
pHT304-BZ	<i>Bt-E. coli</i> shuttle, vector containing <i>lacZ</i> gene, <i>Erm</i> ^r , <i>Amp</i> ^r	[11]
pMAD	<i>Bt-E. coli</i> shuttle, temperature-sensitive plasmid, <i>Amp</i> ^r , <i>Ery</i> ^r	[12]
pMAD- <i>nprRAB</i>	<i>Amp</i> ^r , <i>Ery</i> ^r , pMAD with <i>nprR</i> gene deletion box	This study
pHTnprRp	<i>Amp</i> ^r , <i>Erm</i> ^r , pHT304-BZ carrying <i>nprR</i> promoter and <i>lacZ</i> gene fusion	This study
pHTery1Acp	<i>Amp</i> ^r , <i>Erm</i> ^r , pHT304-BZ carrying <i>cry1Ac</i> promoter and <i>lacZ</i> gene fusion	This lab

1.1.3 引物合成及序列测定:所用引物均根据 Bt 97-27 菌株基因组序列设计,引物名称及序列见表 2。引物合成和序列测定由上海生工生物工程公司完成。

表 2 引物序列

Table 2 Sequences of primers

Primer name	Sequence(5'→3')	Restriction site
nprRA-1	ACGCGTTCGACCAACGAGAAAGACGC ACTT	<i>Sal</i> I
nprRA-2	CACTCCGTGAGCAATCAATTCGCAT TGTCCTCCTCCATTC	—
nprRB-1	GAATGGAGGAGGACAATGCGAATT GATTGCTCACGGAGTG	—
nprRB-2	TCCCCGGGGCTTTCTTGCCAGTTG CTTC	<i>Sma</i> I
PnprR-F	TCCCCGGGGCTTTGTCATTGTCCTC CTCC	<i>Sma</i> I
PnprR-R	GGAAGATCTTTATTAACACAACCTT CACCTC	<i>Bgl</i> II

1.2 细菌的培养条件

苏云金芽胞杆菌在 30℃ 培养,摇床转速为 220 r/min,红霉素使用浓度为 5 mg/L。大肠杆菌在

37℃ 培养,摇床转速为 230 r/min,氨苄青霉素使用浓度为 100 mg/L。

1.3 DNA 操作和转化

大肠杆菌质粒提取及转化,DNA 片段纯化参见试剂盒说明。苏云金芽胞杆菌总 DNA 提取和电击转化参考文献^[13]。序列比对和搜索使用美国国立生物技术信息中心(NCBI)的 PSI-BLAST 及 BLASTX。

1.4 *nprR* 缺失突变株 HD73 ($\Delta nprR$) 的构建

利用 *E. coli*-*Bacillus* 穿梭载体 pMAD 质粒进行基因敲除操作。引物 nprRA-1、nprRA-2 扩增突变盒 nprRA,引物 nprRB-1、nprRB-2 扩增突变盒 nprRB(引物见表 2)。以 nprRA、nprRB 为模板,以 nprRA-1、nprRB-2 为引物应用重叠 PCR 技术扩增得到重叠片段 nprRAB。对重叠片段 nprRAB 进行 *Sal* I、*Sma* I 双酶切后插入到 pMAD 质粒 *Sal* I、*Sma* I 位点间构建敲除载体 pMAD-nprRAB,将敲除载体克隆并去甲基化后电击转化入 HD-73 菌株中,37℃ 进行高温突变筛选将 *nprR* 基因敲除。将高温筛选菌液稀释适当的倍数同时涂布于添加红霉素的

LB 平板与无抗生素的 LB 平板上,在 30℃ 培养,挑取红霉素敏感菌株,并以引物 *nprRA*-1、*nprRB*-2 进行筛选鉴定。

1.5 *nprR* 基因启动子与 *lacZ* 融合表达载体的建立及各转化菌株的获得

1.5.1 PCR 扩增:设计 *nprR* 启动子扩增引物 P*nprRF*、P*nprRR* (引物见表 2),以 HD-73 菌株的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增得到 DNA 片段为 *nprR* 基因启动子,大小为 531 bp。PCR 反应采用 50 μL 体系。反应条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min;56℃ 1 min;72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。

1.5.2 表达载体的构建及转化菌株的获得:将扩增得到的 *nprR* 基因启动子片段分别经 *Sma* I、*Bgl* II 双酶切后插入到含有 *lacZ* 基因的载体 pHT304-BZ *Sma* I、*Bgl* II 位点之间,转入 *E. coli* JM110 获得重组质粒 pHT*nprRp*。将重组质粒电击转入 *E. coli* SCS110,使质粒去甲基化,提取重组质粒电击转化入出发菌株 HD-73,获得转化子命名为 HD(*nprR'*-*lacZ*)。将重组质粒 pHT*cry1Acp* 电击转化入出发菌株 HD-73 和突变菌株 HD73(Δ *nprR*),获得转化子命名为 HD(*cry1Ac'*-*lacZ*) 和 HD Δ *nprR*(*cry1Ac'*-*lacZ*)。

1.6 β -半乳糖苷酶活分析

将 HD(*nprR'*-*lacZ*)、HD(*cry1Ac'*-*lacZ*)、HD Δ *nprR*(*cry1Ac'*-*lacZ*) 菌株分别接入含有红霉素的 SSM、LB 培养基中,30℃,220 r/min 震荡培养。HD(*nprR'*-*lacZ*) 菌株在 SSM 与 LB 培养基中均由 T0 (对数生长期结束点为 T0) 开始取样,分别取至 T8

和 T15;HD(*cry1Ac'*-*lacZ*) 和 HD Δ *nprR*(*cry1Ac'*-*lacZ*) 菌株在 SSM 培养基中由 T0 开始取样,至 T8, LB 培养基中由 T6 开始取样,至 T15。每小时取样一次,每次 2 mL,离心后去上清,样品立即置于 -20℃ 保存。 β -半乳糖苷酶活分析活性测定方法见参考文献^[14]。进行 3 次独立重复试验。

1.7 Cry 蛋白表达分析

将 HD-73 及 HD73(Δ *nprR*) 菌株分别接入 LB 培养基中,于 T7、T19、T31 及 T55 (Cry 蛋白全部释放)取样 1 mL,18514 × g,离心 1 min,弃上清,样品立即置于 -20℃ 保存。进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果和分析

2.1 *nprR* 缺失突变株 HD73(Δ *nprR*) 的构建

克隆得到 HD-73 菌株 *nprR* 基因并测序,HD-73 *nprR* 基因全长 1275 bp。通过重叠 PCR 得到 *nprR* 缺失片段突变盒 *nprRAB*,突变盒由 *nprR* 基因上游 967 bp、*nprR* 基因 3'端 292 bp 和 *nprR* 基因下游 661 bp 的核苷酸序列组成,共 1920 bp,该突变盒使 *nprR* 基因缺失 983 bp,并将其插入到 pMAD 温敏突变载体中得到 pMAD-*nprRAB*,将构建好的载体 pMAD-*nprRAB* 转入 HD-73 菌株中进行高温突变筛选,获得红霉素敏感菌株(图 1-A)。以敏感菌株及 HD-73 出发菌株基因组 DNA 为模板,以 *nprRA*-1、*nprRB*-2 为引物进行鉴定。出发菌株扩增得到片段约 2.9 kb,敏感菌株扩增片段约 1.9 kb,较出发菌株扩增片段小约 1 kb,即为 *nprR* 基因缺失片段(图 1-B)。证明该敏感菌株即为 *nprR* 基因缺失突变菌株,命名为 HD73(Δ *nprR*)。

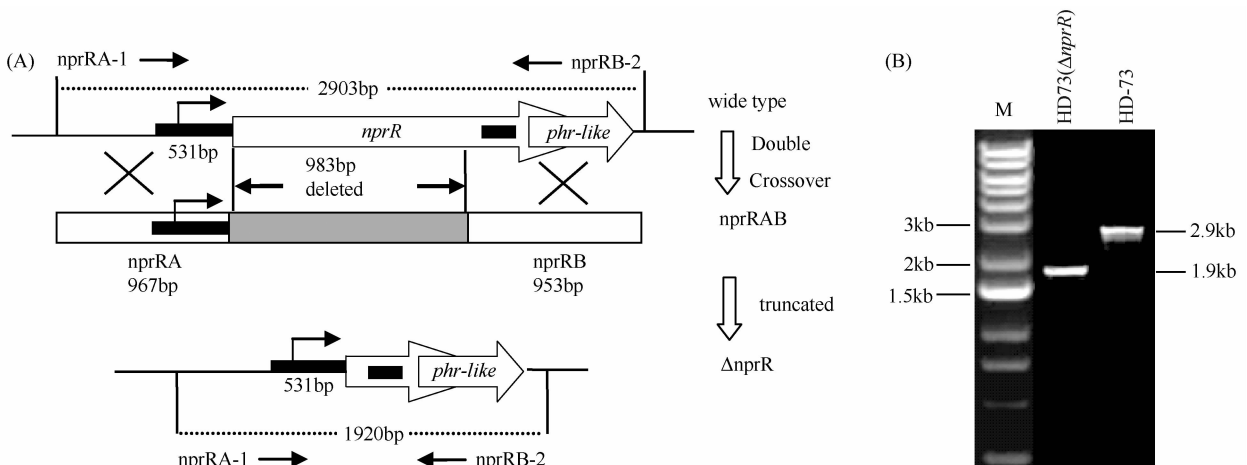


图 1 HD-73 *nprR* 基因敲除突变体的构建

Fig. 1 Construction of *nprR* gene knock-out mutant in HD-73. A: Sketch map of the process for *nprR* gene knock-out mutant HD73(Δ *nprR*); B: PCR amplification of HD-73 wide and HD73(Δ *nprR*).

2.2 *nprR* 基因启动子转录活性分析

在 LB 培养基中, *nprR* 基因的缺失不影响菌株的生长(图 2), 菌株在进入生长过渡期后 7 h 进入稳定期, 而 *nprR* 基因在对数期结束(T0)即开始表达, 至进入稳定期 5 h 后(T12)表达量达到最高值。在有利于芽胞形成的 SSM 培养基中, 菌株对数期结束后 1-1.5 h 就进入芽胞期, 之后 *nprR* 基因表达持续稳定上升(图 3)。以上结果说明 *nprR* 基因在对数期结束后开始表达, 并在稳定期持续表达。

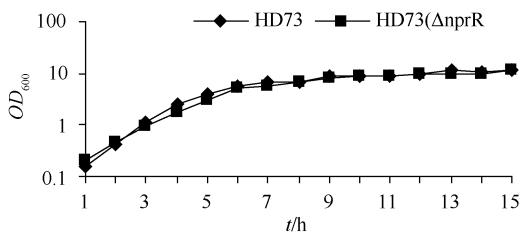


图 2 HD73 和 HD73($\Delta nprR$) 菌株在 LB 培养基中的生长曲线比较

Fig. 2 Comparison of the growth curve between HD73 and HD73($\Delta nprR$) strains in LB medium.

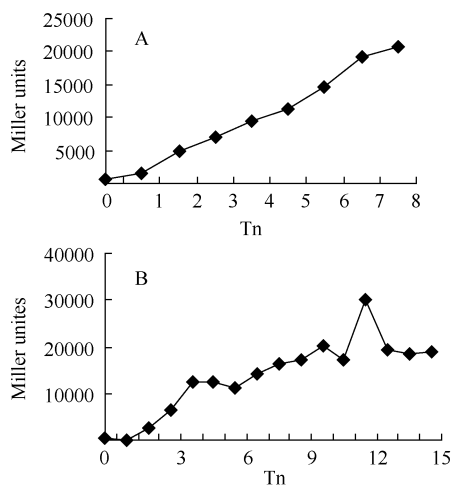


图 3 不同培养基中 *nprR* 基因启动子转录活性分析

Fig. 3 Analysis of the β -galactosidase activity of *nprR'*-*lacZ* fusion in SSM and LB medium. A: HD(*nprR'*-*lacZ*) in SSM; B: HD(*nprR'*-*lacZ*) in LB

2.3 *nprR* 基因缺失对 Cry 蛋白表达的影响

启动子转录活性分析表明, 在 SSM 培养基中, *nprR* 基因的缺失对 *cry1Ac'*-*lacZ* 的表达无明显影响。而在 LB 培养基中, 两菌株中 *cry1Ac'*-*lacZ* 均由 T7 开始表达, 但在突变菌株中表达强度显著高于出发菌株, 至 T14 突变株表达强度升至最高, 而出发菌株 *cry1Ac'*-*lacZ* 表达升高速度放缓, 至 T22 时达到最高(图 4)。说明 *nprR* 基因的缺失有利于 Cry1Ac 蛋白的提前高表达。

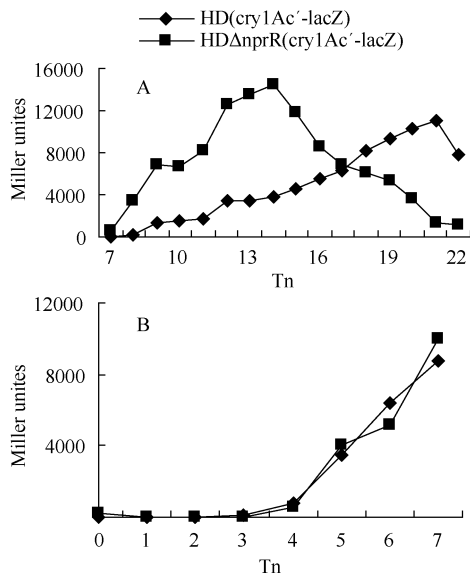


图 4 *cry1Ac'*-*lacZ* 在不同菌株不同营养条件下 β -半乳糖苷酶活性分析

Fig. 4 Analysis of the β -galactosidase activity of *cry1Ac'*-*lacZ* in different strains and nutrition conditions. A: LB medium; B: SSM medium.

SDS-PAGE 分析表明, 在蛋白表达前期(T7-T19), HD73($\Delta nprR$) 菌株晶体蛋白产量显著高于 HD-73, 这与酶活性分析结果相符。同时观察到, 蛋白表达前期菌体的总蛋白量也显著增加。说明 *nprR* 基因的缺失使包括 Cry 蛋白在内的菌体前期总体蛋白表达量升高(图 5)。T31 和 T55 突变株和出发菌株 Cry 蛋白表达量没有明显的差异(图 5)。此结果也进一步证明 *nprR* 基因的缺失可以缩短 Cry 蛋白的表达时间, 并且对 Cry 蛋白最终的产量影响不大。

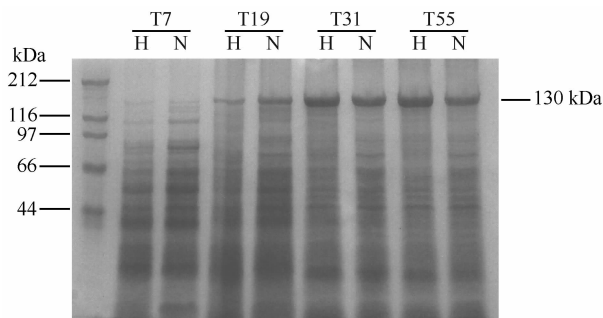


图 5 HD-73 和 HD73($\Delta nprR$) 菌株晶体蛋白表达的比较分析

Fig. 5 Comparison of expression of Cry protein between HD-73 and HD73($\Delta nprR$) strains. H: HD-73 N: HD73($\Delta nprR$).

3 讨论

本研究首次发现了在丰富培养基中苏云金芽胞

杆菌编码群体信号应答蛋白 *nprR* 基因缺失在生长过渡期和稳定期前期可以显著提高 Cry 蛋白的转录及表达,但在相对贫瘠的 SSM 培养基中, *nprR* 基因缺失并不影响 *cry1Ac* 基因的转录和表达。Angel E. Aceves-Diez 等人将 NprRB 蛋白添加入 Bt 培养液中使晶体蛋白表达有所增加^[10],与本试验结果相符,表明 Bt 中 NprR- NprRB 蛋白可能与枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 中 Rap-Phr 蛋白的作用模式相似^[4]。Bs 在生长过程中产生群体信号前体肽并分泌出胞外加工形成成熟的寡肽信号分子 Phr,当菌体密度达到一定水平,通过 Phr 进入胞内抑制了 Rap 蛋白的去磷酸化活性,提高 Spo0F 的磷酸化水平,进而使 Spo0A 的磷酸化水平增加,导致菌体起始生成芽胞^[15-16]。据此推测 Bt 中 *nprR* 的缺失使菌体在过渡期丧失了 NprR 对 Spo0F 的磷酸化抑制作用,从而使菌体更快的进入芽胞期,而 *cry1Ac* 基因启动子是芽胞依赖型启动子,因此提高了 Cry 蛋白前期的转录和表达。SSM 是有利于芽胞形成的培养基,在此培养条件下菌株生长从对数期到芽胞期过渡期很短只有 1 小时左右,因此在 SSM 培养基中很难看到 NprR 蛋白的影响。下步实验我们将分析突变株和出发菌株在生长过渡期和稳定期早期种群中细胞进入芽胞期的比例,从而分析 NprR 蛋白对芽胞形成的影响,明确其在芽胞形成过程中的作用;同时分析与其作用的寡肽信号分子对 Cry 蛋白表达的影响。

苏云金芽胞杆菌是应用最成功的生物杀虫剂之一,在农林害虫防治中发挥着重要作用,但是由于生物发酵生产过程较长,使其生产成本高于化学杀虫剂,难以与化学农药竞争,因此如果能够有效降低其生产成本将十分有利于 Bt 制剂的扩大应用,本研究发现一种群体信号蛋白 *NprR* 基因的缺失在营养丰富条件下可以加快菌体进入芽胞期的速度,且对 Cry 蛋白总量影响较小,这一发现为探索如何缩短 Bt 生产发酵时间提供了一种新的思路。

参考文献

[1] Grossman AD, Losick R. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(2): 4369-4373.

[2] Burbulys D, Trach, Kathleen A, Hoch JA. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, 1991, 64(2): 545-552.

[3] Fujita M, Losick R. Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes&Development*, 2005, 19: 2236-2244.

[4] Pottathil M, Lazazzera B A. The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Frontiers Bioscience*, 2003, 8: 32-45.

[5] Camilli A, Bassler B L. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science*, 2006, 31(24): 1113-1116.

[6] Perego M, Hoch J A. Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(4): 1549-1553.

[7] Bongiorno C, Ishikawa S, Stephenson S, Ogasawara N, Perego M. Synergistic regulation of competence development in *Bacillus subtilis* by two Rap-Phr systems. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13): 4353-4361.

[8] Core L, Perego M. TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*, *Molecular Microbiology*, 2003, 49(6): 1509-1522.

[9] Lereclus D, Agaisse H, Gominet M, Salamitou S, Sanchis V. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(10): 2749-2756.

[10] Angel E, Aceves-Diez. Refugio Robles-Burgue? o. Mayra de la Torre. SKPDT is a signaling peptide that stimulates sporulation and *cry1Aa* expression in *Bacillus thuringiensis* but not in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(1): 203-209.

[11] Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6887-6891.

[12] de Souza MT, Lecadet MM, Lereclus D. Full expression of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(10): 2952-2960

[13] T. Stobda, Kaur S, Singh A. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry* gene from *Bacillus thuringiensis*, *Biotechnology letters*, 2004, 26(14): 1153-1156.

[14] Miller, J H. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972.

- [15] Jiang M, R Grau, M Perego. Differential processing of propeptide inhibitors of Rap phosphatases in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(2): 303-310.
- [16] Ilka B. Bischofs, Joshua A. Hug, Aiwen W. Liu, Denise M. Wolf, Adam P. Arkin. Complexity in bacterial cell-cell communication: Quorum signal integration and subpopulation signaling in the *Bacillus subtilis* phosphorelay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(16): 6459-6464.

Effect of Quorum Sensing response regulator *nprR* deletion on expression of Cry protein in *Bacillus thuringiensis*

Yao Wang¹, Chao Deng¹, Qi Peng¹, Zhen Chen¹, Dafang Huang², Jie Zhang¹, Fuping Song^{1*}

(¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pest, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

(² Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [**Objective**] The role of Quorum Sensing response regulator *nprR* on the expression of Cry protein in *B. thuringiensis* HD-73 was studied. [**Methods**] The *nprR* gene deletion mutant HD73 ($\Delta nprR$) was constructed by using of homologous recombination. Beta-galactosidase assay of *cry1Ac'*-*lacZ* gene fusion and SDS-PAGE in both HD-73 and HD73 ($\Delta nprR$) strains were performed to analyze the effect of *nprR* gene deletion on expression of *cry1Ac* gene. [**Results**] Beta-galactosidase assay of *nprR'*-*lacZ* in both LB and Schaeffer's sporulation medium showed *nprR* gene in *B. thuringiensis* was initially transcribed at T0 (end of Logarithmic growth phase) and keeping expression in stationary phase. Beta-galactosidase assay of *cry1Ac'*-*lacZ* and SDS-PAGE indicated that expression of *cry1Ac* gene in HD73 ($\Delta nprR$) was stronger than that in HD-73 during transition phase and early stationary phase. However, Cry expressed product between HD-73 and HD73 ($\Delta nprR$) in LB medium has no significant difference when crystal and spore were released. [**Conclusion**] The deletion of *nprR* increased expression and transcription activity of *cry1Ac* during transition and early stationary phase in rich media.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Quorum Sensing; *nprR* gene; *cry1Ac* gene

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(2009CB118902)

* Corresponding author. Tel: +86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

Received: 22 April 2010/Revised: 16 June 2010