

苏云金芽孢杆菌的 *cry2A* 芽孢期启动子和分子伴侣 ORF1-ORF2 对 Cry11Aa 蛋白表达的影响

师永霞^{1,2}, 曾少灵^{1,3}, 袁美姝¹, 孙钊¹, 庞义^{1*}

(¹ 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

(² 广东检验检疫技术中心卫生检疫实验室, 广州 510700)

(³ 深圳出入境检验检疫局动植中心, 深圳 518010)

摘要:【目的】分析苏云金芽孢杆菌的 *cry2A* 型芽孢期启动子对晶体蛋白 Cry11Aa 的协调作用和分子伴侣 ORF1-ORF2 对 Cry11Aa 表达的促进功能。【方法】3 个包括 *cry11Aa* 编码区的重组质粒 pHcy1、pHcy2 和 pHcy4 被构建并电激转化到苏云金芽孢杆菌晶体缺陷株 4Q7 中, 其中 pHcy1 质粒携带 *cry11Aa* 基因自身启动子和分子伴侣 *p19* 基因, pHcy2 携带 *cry2A* 型芽孢期启动子和分子伴侣 *orf1-orf2* 基因, pHcy4 质粒在 pHcy1 的上游插入了 *cry2A* 型芽孢期启动子和分子伴侣 *orf1-orf2* 基因。SDS-PAGE 分析了 Cry11Aa 蛋白在各重组苏云金菌株中的表达情况, 并通过生物测定确定了其对蚊虫的生物活性。【结果】SDS-PAGE 结果表明, Cry11Aa 蛋白在 4Q7(pHcy1)和 4Q7(pHcy4)均获得了表达, 在 4Q7(pHcy2)中未检测到 Cry11Aa 蛋白, 推测晶体蛋白 Cry11A 不能利用 *cry2A* 型启动子进行表达调控; Cry11Aa 蛋白在等体积 4Q7(pHcy4)培养液中的表达量是 4Q7(pHcy1)菌株的 1.25 倍, 暗示着分子伴侣 ORF1-ORF2 在某种程度上能提高 Cry11Aa 的蛋白表达量。4Q7(pHcy1)和 4Q7(pHcy4)形成的 Cry11Aa 蛋白晶体的形状和大小相似, 两者对致倦库蚊的生物活性没有明显差异, LC_{50s} 分别为 59.33 ng/mL 和 66.21 ng/mL。【结论】推测晶体蛋白 Cry11A 能否成功表达与其使用启动子的类型和两者的协调配合有关。分子伴侣 ORF1-ORF2 虽然在某种程度上能提高 Cry11Aa 的蛋白表达量, 但对提高 Cry11Aa 蛋白的杀蚊毒力没有显著性帮助。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 分子伴侣; *p19* 基因; *orf1-orf2* 基因; 晶体蛋白 Cry11Aa

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 05-0672-05

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 在其芽孢生长阶段能产生多种杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, ICPs), 广泛用于防治直翅目、鞘翅目、双翅目、膜翅目, 特别是鳞翅目的多种作物害虫, 对人、畜、植物等非目标生物十分安全。

ICP 的高效表达与其相应的启动子类型和分子伴侣基因有关。*cry11Aa* 启动子区、*p19* 基因和 *cry11Aa* 基因共同组成 *cry11Aa* 操纵子, *p19* 基因编码蛋白的

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^[1,2], 因此有人估计 *p19* 基因很可能是 Cry11Aa 蛋白结晶的根本原因^[2-4], 但已有证据证明 Cry11Aa 蛋白的表达和晶体形成与 *p19* 基因无关^[5]。*cry2A* 启动子区、*orf1-orf2* 串联基因和 *cry2Aa* 基因共同组成 *cry2Aa* 操纵子, *orf1* 编码的 ORF1 蛋白既不是晶体形成所必需的, 自身也不产生任何毒力^[6]; *orf2* 编码的 ORF2 蛋白能够提高

基金项目: 国家“973 项目”(G2000016209); 广东省自然科学基金

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

作者简介: 师永霞(1976-), 女, 河南安阳人, 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: 2007-10-16; 修回日期: 2008-02-03

Cry2 类蛋白的产量和结晶程度^[6,7]。

本研究利用 *cry2A* 型芽孢期启动子和分子伴侣基因 *orf1-orf2* 表达晶体蛋白 Cry11Aa, 分析苏云金芽孢杆菌的不同启动子类型和分子伴侣基因对晶体蛋白的协调作用, 为进一步寻找分子伴侣基因与 ICP 基因的最佳搭配形式, 以及利用分子伴侣基因构建高效杀虫工程菌提供了重要参考。

表 1 本研究中的菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids in this study

Plasmids and Strains	Characterization	Sources or references
Strains		
<i>E. coli</i> TG1	<i>SupE hsdΔ5 thi Δ (lac-proAB) F⁺[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	Stored in this lab
<i>E. coli</i> K12	McrA ⁺ , McrBC ⁺ , EcoK ⁺	NEB Company
<i>B. thuringiensis</i> 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	[5]
4Q7(pHcy2)	4Q7 containing the plasmid pHcy2	In this study
4Q7(pHcy4)	4Q7 containing the plasmid pHcy4	In this study
Plasmids		
pHT3101	Erm ^r and Amp ^r , shuttle vector of <i>E. coli</i> and <i>B. thuringiensis</i>	[4]
pWF26	pHT3101 carrying <i>p19</i> gene, <i>cry11Aa</i> gene and <i>p20</i> gene	[4]
pHY2P	pHT3101 carrying <i>cry2A</i> promoter and <i>orf1-orf2</i> genes	[8]
pHcy1	pHT3101 carrying <i>cry11A</i> promoter, <i>p19</i> gene and <i>cry11Aa</i> gene	[5]
pHcy2	pHT3101 carrying <i>cry2A</i> promoter, <i>orf1-orf2</i> and <i>cry11Aa</i> genes	In this study
pHcy4	pHT3101 carrying <i>cry11A</i> promoter, <i>p19</i> gene, <i>cry2A</i> promoter, <i>orf1-orf2</i> and <i>cry11Aa</i> genes	In this study

1.1.2 主要试剂和仪器: 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。电转仪和蛋白电泳装置为 Bio-Rad 公司, 透射电子显微镜为 JEOL 公司。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等分子生物学操作参考文献[9]。

1.1.3 培养基: LB 培养基参考文献[9], G-Tris 培养基和 PWYE 培养基配方见文献[7, 10]。

1.2 重组质粒 pHcy2 和 pHcy4 的构建

以重组质粒 pWF26 为模板, 以 *cry11A-5Sa2* 与 *cry11A-3Sp* 为引物^[5], 用高保真 PCR 试剂盒扩增 *cry11Aa* 基因的 2.0 kb 编码区, PCR 产物经 *Sac* /*Sph* 双酶切后, 连接至同样双酶切的 pHY2P 质粒上, 构建重组质粒 pHcy2。

pHcy1 质粒经 *Sac* /*Sph* 双酶切, 回收约 3.0 kb 片段, 连接至同样双酶切的 pHY2P 质粒上, 构建重

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验中使用的菌株和质粒见表 1, 其中大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和苏云金杆菌 (*B. thuringiensis*) 分别在 37 和 28 培养, 抗生素的使用浓度为氨苄青霉素 (Amp^r) 100 μg/mL 和红霉素 (Erm^r) 25 μg/mL。

组质粒 pHcy4。

1.3 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 [11], 电激采用 0.2 cm 电激杯, 参数设定: 电阻 400~800 Ω、电容 25 μF 和电压 1.5~1.75 kV。

1.4 蛋白定量分析

Bt 菌株在 1 mL PWYE 培养基中过夜培养, 次日以 1:100 的比例转接到 50 mL G-Tris 液体培养基中, 30 振荡培养 4~5 d 至芽孢脱落, 4000×g 离心 15 min, 收集沉淀并悬于 1 mL 双蒸水中, 取 5 μL 进行 SDS-PAGE 电泳分析和定量^[5,7]。SDS-PAGE 凝胶用 Image Master VDS 系统进行扫描处理, 对 Cry11Aa 蛋白带的积分光密度值 (IOD 值) 进行定量分析, 比较相同的培养条件各重组 Bt 菌株在等体积的培养液中产生 Cry11Aa 蛋白量的比值。

1.5 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, 菌液直接滴在铜网上, 置于透

射电子显微镜下观察。

1.6 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 Beegel 等^[12]方法进行。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, 24 h 后统计蚊幼虫存活数, 使用 Probit 软件计算 Bt 重组菌株的 LC_{50} 。

2 结果和分析

2.1 重组质粒的构建

构建的重组质粒 pHcy1、pHcy3 和 pHcy4 的线性示意图见图 1-A, 3 个重组质粒均携带 *cryIIAa* 基因, 但该基因上游的启动子和分子伴侣基因不同。pHcy1 质粒上携带 *cryIIAa* 基因自身启动子和分子伴侣 *p19* 基因; pHcy2 质粒上携带 *cry2Aa* 型芽孢期启动子和分子伴侣 *orf1-orf2* 基因; pHcy4 质粒在 pHcy1 的上游插入了 *cry2Aa* 型芽孢期启动子和分子伴侣 *orf1-orf2* 基因。重组质粒的酶切鉴定结果见图 1-B。

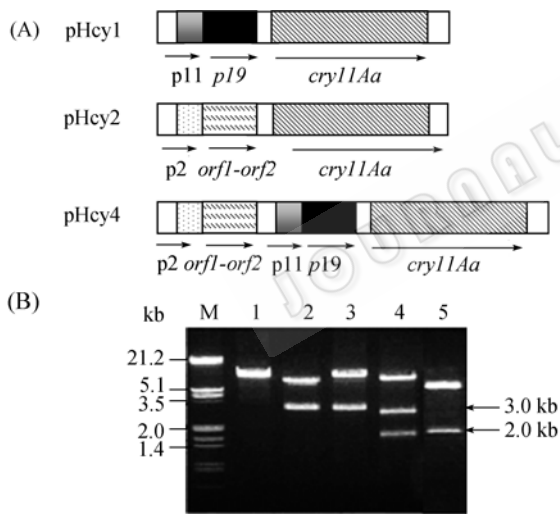


图 1 重组质粒 pHcy1、pHcy2 和 pHcy4 的线性示意图(A) 及其酶切鉴定(B)

Fig. 1 The physical maps of the recombinant plasmids pHcy1, pHcy2 and pHcy4 (A) and their restriction analysis (B). A: p11 and p2 correspond to the promoters of *cryIIA* and *cry2A* genes respectively and arrows represent the transcription direction of genes. B: M. Lambda DNA/*Hind*⁺*EcoR*; 1. pHcy2/*Sac*⁺*Sph*; 2. pHcy1/*Sac*⁺*Sph*; 3. pHcy4/*Sac*⁺*Sph*; 4. pHcy4/*EcoR*⁺*Sac*; 5. pHcy2/*Sac*⁺*Sph*.

2.2 Cry11Aa 蛋白在重组 Bt 菌株中的表达

分别将构建的重组质粒 pHcy2 和 pHcy4 电激至 Bt 晶体缺陷型菌株 4Q7 中, 获得的 Bt 重组菌株分别

命名为 4Q7(pHcy2) 和 4Q7(pHcy4), 同时以载体 pHT3101 和 pHY2P 的电激转化作为阴性对照, 以质粒 pHcy1 的电激转化作为阳性对照。SDS-PAGE 分析结果表明, Cry11Aa 蛋白在重组菌株 4Q7(pHcy1) 和 4Q7(pHcy4) 均获得了表达, 且在等体积的 4Q7(pHcy4) 培养液中的表达量是 4Q7(pHcy1) 菌株的 1.25 倍, 在重组菌株 4Q7(pHcy2) 中未检测到 Cry11Aa 蛋白 (图 2)。

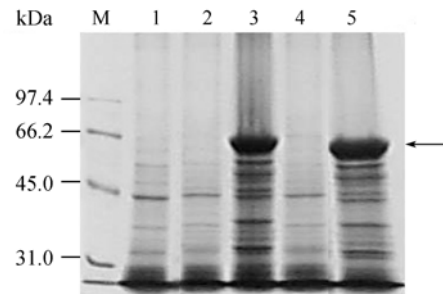


图 2 重组菌株中 Cry11Aa 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of Cry11Aa protein in Bt recombinant strains. M. Protein molecular weight marker; 1-5. Represent 4Q7(pHT3101), 4Q7(pHY2P), 4Q7(pHcy1), 4Q7(pHcy2) and 4Q7(pHcy4) respectively. Arrow points to the expressed 68kDa Cry11Aa protein.

2.3 晶体形成

4Q7(pHT3101)、4Q7(pHY2P) 和 4Q7(pHcy2) 中仅出现芽孢, 而在表达 Cry11Aa 蛋白的 4Q7(pHcy1) 和 4Q7(pHcy4) 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)。

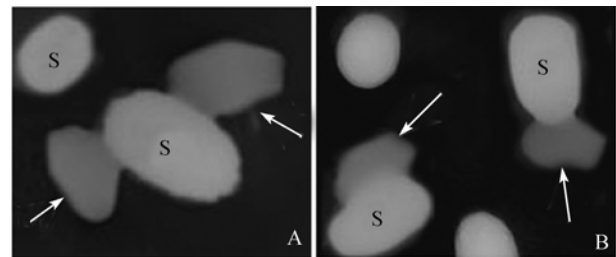


图 3 表达 Cry11Aa 蛋白的重组菌株的透射电镜照片(8000×)

Fig. 3 Transmission electron micrographs of Bt recombinant strains expressing Cry11Aa protein ($\times 8000$). Arrows point to Cry11Aa crystals and S represents spores of Bt strains. A: 4Q7(pHcy1); B: 4Q7(pHcy4).

2.4 Bt 重组菌株的杀蚊活性

对重组菌株 4Q7(pHcy1) 和 4Q7(pHcy4) 进行 Cry11Aa 蛋白的杀蚊生物测定, 同时设立 4Q7(pHT3101) 和 4Q7(pHY2P) 阴性对照。生物测定结果表明, 表达 Cry11Aa 蛋白的 4Q7(pHcy1) 和 4Q7

(pHcy4)重组菌株均具有杀蚊活性, 对三龄致倦库蚊的 LC_{50} 分别为 59.33 ng/mL 和 66.21 ng/mL, 彼此之间的毒力没有明显差异(表 2)。

表 2 表达 Cry11Aa 蛋白的重组菌株对库蚊三龄幼虫的生物测定

Table 2 Bioassay of Cry11Aa protein from Bt recombinant strains against 3rd-instar larvae of *Culex quinquefasciatus*

Bt recombinant strains	LC_{50} /(ng/mL) ^a	95% fiducial limits
4Q7(pHcy1)	59.33	44.13–71.89
4Q7(pHcy4)	66.21	51.06–85.86
4Q7(pHT3101)	NA ^b	NA
4Q7(pHY2P)	NA ^b	NA

^a The LC_{50} values represent the average of at least three repetitions after 24 h of larvae exposure.

^b NA: no activity.

3 讨论

在苏云金芽孢杆菌中, 许多因素如强启动子、稳定的 mRNA、质粒高拷贝数和蛋白晶体化等都与 ICP 基因的高水平表达有关, 而 ICP 基因转录的时序性调控又主要靠强启动子及识别相应启动子序列的 mRNA 聚合酶的 σ 因子共同作用来完成^[13]。*cry11Aa* 操纵子的启动子是双启动子结构, 即 pBt₁ 和 pBt₂, 分别由 RNA 聚合酶辅助因子 σ^{35} 和 σ^{28} 识别^[1]; 而 *cry2Aa* 操纵子的启动子则是单一启动子结构, 只由一种 σ 因子识别^[14]。*cry11A* 基因在其本身启动子的控制下 (pHcy1), 能够正常表达^[5]; 但若不保留 *cry11A* 基因本身启动子区, 直接将 *cry2A* 型启动子和 *orf1-orf2* 分子伴侣基因与 *cry11A* 基因的编码区相连, 在 4Q7(pHcy2) 中则没有检测到 Cry11A 蛋白的表达(图 2), 推测 Cry11A 蛋白不能利用 *cry2A* 型启动子进行表达可能是由于该基因不能识别 *cry2A* 型单启动子结构的 σ 因子造成的。这说明 Bt 菌株 ICP 基因能否成功表达与使用的启动子类型有关, 基因与启动子之间存在着是否协调配合的问题。

Bt 分子伴侣的一个重要作用就是它们对 ICPs 的蛋白表达量的影响^[13]。已经证明研究最为清楚得 P20 蛋白可以促进 Cyt1Aa^[3]、Cry4Aa^[15]、Cry11Aa^[4, 16]、Cry2Aa^[7] 以及 Cry1Ab 和 Cry1Ac^[17] 多个蛋白的合成和提高它们的蛋白表达量。本研究在 pHcy1 质粒的上游添加 *cry2A* 型启动子和 *orf1-orf2* 分子伴侣基因构建了 pHcy4 质粒, SDS-PAGE 结果表明 Cry11Aa 蛋白在 Bt 重组菌株 4Q7(pHcy4) 的表达量高于 4Q7(pHcy1)

(图 2), 两重组菌株晶体形成大小和形状以及杀蚊毒力相似(图 3, 表 2)。这表明, 分子伴侣 ORF1-ORF2 在某种程度上能提高 Cry11Aa 的蛋白表达量, 但是它对晶体蛋白表达量的影响并不象 P20 那么明显。至于分子伴侣 ORF1-ORF2 以何种方式实现对 *cry11A* 基因的表达调控, 其确切的机理还有待深入的研究和探讨。

参 考 文 献

- [1] Dervyn E, Poncet S, Klier A, *et al.* Transcriptional Regulation of the *cry* D Gene Operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol*, 1995, 177(9): 2283–2291.
- [2] Hofte H, Whitely HR. Insecticidal crystals proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, 1989, 53(2): 242–255.
- [3] 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.
- [4] Wu D, Federici BA. Improved production of the insecticidal Cry D protein in *Bacillus thuringiensis* using *cryIA(c)* promoters to express the gene for an associated 20-kDa protein. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 42(5): 697–702.
- [5] 师永霞, 曾少灵, 袁美娟, 等. 苏云金杆菌辅助蛋白 P19 对杀虫晶体蛋白 Cry11Aa 表达的影响. *微生物学报(Acta Microbiological Sinica)*, 2006, 46(3): 353–357.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 余健秀, 曾少灵, 谢瑞瑜, 等. 苏云金芽孢杆菌分子伴侣串联基因 *orf1-orf2* 的克隆和表达载体的构建. *微生物学报(Acta Microbiological Sinica)*, 2002, 42(5): 567–572.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] 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.
- [11] Belliveau BH, Trevors JT. Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(6): 1649–1652.
- [12] Beegel CC, Rose RI. *Bacillus thuringiensis* bioassay methodology. In: *Bacillus thuringiensis* biotechnology and environmental

- benefit (Feng TY eds). Taipei, Hua Shiang Yuan Publishing Co., 1995, pp. 349–362.
- [13] Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J Bacteriol*, 1995, 177(21):6027–6032.
- [14] William RW, Whitely HR. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J Bacteriol*, 1989, 171(2): 965–974.
- [15] Yoshisue H, Yoshida K, Sen K, *et al.* Effect of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 20 kDa protein on production of the Bti 130 kDa crystal protein in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56(9): 1429–1433.
- [16] Xu Y, Nagai M, Bagdasarian M, *et al.* Expression of the *p20* gene from *Bacillus thuringiensis* H-14 increases Cry11Aa toxin production and enhances mosquito-larvicidal activity in recombinant gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 3010–3015.
- [17] Shao ZZ, Liu ZD, Yu ZN. Effects of the 20-kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(12): 5362–5369.

Influence of *cry2A* sporulation-dependent promoter and molecular chaperone ORF1-ORF2 from *Bacillus thuringiensis* on Cry11Aa protein

Yongxia Shi^{1,2}, Shaoling Zeng^{1,3}, Meijin Yuan¹, Fan Sun¹, Yi Pang^{1*}

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

⁽²⁾Health Quarantine Lab, Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510700, 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: [Objective] To analyze the coordination function of *cry2A* sporulation-dependent promoter and the enhanced expression of molecular chaperone ORF1-ORF2 to crystal protein Cry11Aa. **[Methods]** We constructed three recombinant plasmids pHcy1, pHcy2 and pHcy4 containing *cry11Aa* gene. pHcy1 carried *cry11Aa* own promoter and *p19* gene, and pHcy2 carried *cry2A* sporulation-dependent promoter and *orf1-orf2* gene. pHcy4 inserted *cry2A* promoter and *orf1-orf2* gene upstream pHcy1 plasmid. The recombinant plasmids were introduced into an acrySTALLIFEROUS mutant 4Q7 of *Bacillus thuringiensis* sub sp. *israelensis*. We performed SDS-PAGE to analyze Cry11Aa protein expression in the recombinant Bt strains and carried out the mosquitocidal bioassay. **[Results]** SDS-PAGE showed that Cry11Aa protein was detected in 4Q7(pHcy1) and 4Q7(pHcy4), but not in 4Q7(pHcy2). The *cry11Aa* gene could not be regulated under *cry2A* promoter. Cry11Aa protein had a 1.25 fold expression amount in the equal volume culture of 4Q7(pHcy4) to that of 4Q7(pHcy1), which indicated that molecular chaperone ORF1-ORF2 could enhance Cry11Aa expression amount to a certain extent. Both 4Q7(pHcy1) and 4Q7(pHcy4) formed Cry11Aa crystals in a similar size and shape during sporulation under the transmission electron microscope. Their LC_{50} s against 3rd-instar *Culex quinquefasciatus* were 59.33 ng/mL and 66.21 ng/mL respectively. **[Conclusion]** Whether crystal protein from *B. thuringiensis* could successfully express might relate to the type of the used promoter and their coordination. Molecular chaperone ORF1-ORF2 could enhance Cry11Aa expression amount to a certain extent with an unknown mechanism, but did not have an effect on high mosquitocidal toxicity of Cry11Aa protein. This research might play an important role to search the best collocation between ICP promoter or chaperone gene and ICP gene and to construct high-toxic *Bacillus thuringiensis* engineering strain by chaperone gene.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; molecular chaperone; *p19* gene, *orf1-orf2* gene; crystal protein Cry11Aa

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G2000016209) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province

*Corresponding author. Tel: +86-20-84113860; Fax: +86-20-84037472; E-mail: pangy@mail.sysu.edu.cn

Received: 16 October 2007/Revised: 3 February 2008