

苏云金杆菌辅助蛋白 P20 对杀虫晶体蛋白 Cry1Ab 表达的影响

汤慕瑾 袁美姘 陈建武 师永霞 曾少灵 余健秀 庞 义*

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要 苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)杀虫晶体蛋白 Cry1Ab 因其 C-半端缺少了一段含 4 个半胱氨酸的氨基酸序列而导致蛋白的不稳定,报道苏云金杆菌辅助蛋白 P20 帮助 Cry1Ab 蛋白的表达及晶体的形成。利用穿梭载体 pHT3101 构建 3 个表达质粒,即 pT1B、pPIB 和 pDPIB,3 个质粒都含有 cry1Ab 基因,不同在于 pT1B 没有 p20 基因,pPIB 含有 p20 全基因,而 pDPIB 不仅含有 p20 全基因,且在 p20 基因前插入 cry1Ac 启动子。分别将这 3 个表达质粒经电转化到苏云金杆菌晶体缺陷型菌株 CryB 中,获得转化菌株 T1B、PIB 和 DPIB。Western blot 表明 cry1Ab 基因在这 3 株菌中均表达了 130 kD 的蛋白,部分降解为大约 60 kD 的蛋白。蛋白定量分析显示,3 株菌 130 kD 蛋白量的比为 1:1.4:1.5,降解后的 60 kD 蛋白量的比为 1:1.1:1.6,Cry1Ab 蛋白总量的比为 1:1:2:1.6。镜检发现,Cry1Ab 在 3 株菌中都形成典型的菱形晶体,其晶体大小为 T1B < PIB < DPIB。生物测定结果显示,3 个菌株对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)均具有明显的杀虫活性,三者的 LC₅₀ 差异不显著。研究表明,P20 对 cry1Ab 基因的表达和晶体形成均有帮助,P20 表达量的多少可能是导致 Cry1Ab 蛋白最终产量有所不同的因素。

关键词 苏云金杆菌,p20 基因,cry1Ab 基因,表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0566-06

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是目前使用最广泛的一种生物杀虫剂。Bt 具有杀虫活性主要在于它在形成芽胞的同时,能够在其营养体的另一端合成有一种或几种杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins, 简称 ICPs)组成的伴胞晶体。伴胞晶体的形成不仅能使细胞在有限的空间内包装更多的蛋白,还可以防止菌体蛋白酶对晶体蛋白的降解而使其获得大量表达^[1]。苏云金杆菌 ICPs 的表达和晶体的形成虽有许多报道,但由于 ICPs 基因的多样性,它们的表达和晶体的形成规律至今尚未明了。近年来 ICPs 晶体化研究焦点转移到伴胞晶体的辅助蛋白的作用方面。研究表明一些辅助蛋白对 ICPs 的表达和晶体形成有帮助,但同一种辅助蛋白对不同的 ICPs 及其不同亚型都显出功能差异^[2]。

某些小分子量 ICPs,如 Cry2A (71kD)、Cry11A (72kD)和 Cyt1Aa (27kD),这些蛋白晶体的形成需要某些辅助蛋白的参与,如 P20、P19、Orf2 及 Orf1 蛋白等^[3-6]。辅助蛋白基因 p20 来源于苏云金杆菌以色

列亚种(*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, Bti),定位于 cry11Aa 基因下游的一个开放读码框 orf3,编码 20-kD 蛋白。经证实,P20 蛋白可以促进 Cyt1Aa^[6,7]、Cry4Aa^[8]、Cry11Aa^[9,10]、Cry2Aa^[11]、Cry1Ac^[13] 蛋白以及截短的 Cry1C 蛋白^[12,13]的合成。但 P20 并不是对所有的杀虫晶体蛋白的表达都有帮助,例如,对 Cry4Ba、Cry20Aa 的表达没有任何影响^[8,15]。目前,P20 的作用机制还没有真正得到确定。

Cry1 类杀虫晶体蛋白在菌株中相当稳定,一般形成典型的菱形晶体,晶体的形成不需要其它辅助蛋白的参与,而是由于其保守的 C-半端富含半胱氨酸,分子间形成的二硫键有助于晶体的稳定^[2,16]。但是 Cry1Ab 蛋白与大多数 Cry1 类蛋白不同,它的 C-半端缺少了包括 4 个半胱氨酸的一段 28 个氨基酸序列,导致比其它 Cry1 类蛋白形成二硫键的数量少,因而蛋白相对不稳定^[17]。曾有报道在 Bt 晶体缺陷型菌株 BMB171 中表达 Cry1Ab,表达量很低,SDS-PAGE 几乎检测不到 Cry1Ab 的 130 kD 的产物,电镜下仅能观察到很少、极小的菱形晶体^[18]。

本研究利用辅助蛋白 P20 与 Cry1Ab 在 Bt 晶体缺陷型菌株 CryB 中的共表达,首次报道了辅助蛋白 P20 对 cry1Ab 基因的表达和晶体形成均有帮助, P20 提高了 Cry1Ab 的表达量,并使其晶体增大。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

见表 1。大肠杆菌和苏云金杆菌分别在 37℃ 和 28℃ 培养。抗生素使用浓度分别为氨苄青霉素 (Amp) 100 mg/L, 红霉素 (Erm) 25 mg/L, 四环素 (Tc)

20 mg/L。

1.2 主要试剂

限制酶均购自 Boehringer Mannheim 公司; DNA marker 和 pGEM-T Easy 载体系统购自 Promega 公司; Western 印迹试剂盒购自 Roche 公司; The DC Protein Assay 试剂盒购自 Bio-Rad 公司。

1.3 培养基

LB 培养基, G-Tris 培养基^[19], PWYE 培养基^[11]。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
Strains		
TG1	<i>E. coli</i> strain	Lab Store
CryB	Bt strain, AcrySTALLIFEROUS mutant	Dr. Wu Dong
T1B	CryB (pT1B)	This work
P1B	CryB (pP1B)	This work
DP1B	CryB (pDP1B)	This work
Plasmids		
pXI93(b)	Tc ^r and Amp ^r , carried cry1Ab gene	Dr. Wu Dong
pGEM-T Easy vector	Amp ^r	Promega Co.
pBluescript M13(-)	Amp ^r	Lab Store
pHT3101	Erm ^r and Amp ^r , shuttle vector of <i>E. Coli</i> and Bt	Dr. Wu Dong
pZB1	pHT3101 carried p20 which was controlled under own promoter and cry1Ac promoter	Constructed by our lab
pT1B	pHT3101 carried cry1Ab	This work
pP1B	pHT3101 carried cry1Ab and p20 which was controlled under own promoter	This work
pDP1B	pHT3101 carried cry1Ab and p20 which was controlled under own promoter and cry1Ac promoter	This work

1.4 供试昆虫

采用 1 龄棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*), 由本室饲养。

1.5 表达载体 pT1B、pP1B 和 pDP1B 的构建

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均按分子克隆实验手册^[20]。

1.6 电激转化

参考文献^[21]。转化条件:电压 1.5 kV, 电阻 400Ω, 电容 25 μF, 0.2 cm 的电激杯。电脉冲仪为 Bio-Rad 公司产品。受体菌为 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 的晶体缺陷型菌株 CryB。

1.7 Western 印迹

将 SDS-PAGE 凝胶电转移至硝酸纤维素膜上,

Western 印迹参照 Western 试剂盒说明书进行, 抗体为 Cry1Ab 的多克隆抗体。

1.8 Western 印迹定量分析

菌株产生的杀虫晶体蛋白按参考文献^[22]描述的方法进行 Western 印迹的蛋白分析和定量, 至少重复 3 次, 统计分析确定其平均产量。蛋白带用凝胶自动成像系统 Electrophoresis Documentation and Analysis 120 System (Eastman Kodak Co.) 扫描成像, 每条带的 ICPs 总量用 ImageMaster VDS 软件 (Amersham Pharmacia Biotech) 定量分析。

1.9 显微镜观察

光学显微镜的观察:直接取孢子脱落成熟的培养物涂布于载玻片上, 用碱性复红染色, 在 Olympus BH-2 显微镜下, 以 1000 倍油镜观察。电子显微镜

的观察 :样品的处理和晶体体积的确定参照文献 [12]

1.10 蛋白定量分析

收集 G-Tris 培养 3 ~ 4d 后成熟的菌体 ,参照试剂盒 The DC Protein Assay(Bio-Rad 公司)说明进行菌体总蛋白浓度测定。ImageMaster VDS 分析软件确定目的蛋白占总蛋白的百分比。

1.11 生物测定

参照文献 [23] 对 1 龄棉铃虫进行生测。利用本实验室研制的昆虫毒力测定分析软件^[24]进行 LC₅₀ 分析。

2 结 果

2.1 表达质粒 pT1B、pP1B 和 pDP1B 的构建

表达质粒 pT1B、pP1B 和 pDP1B 的质粒示意图见图 1。

本实验所用的 cry1Ab 基因来自质粒 pXI93 (b)^[25]。用 BamH I 和 Pst I 双酶切质粒 pXI93 (b) , 得到 cry1Ab 全基因(含启动子、编码区及终止序列) , 经两个中间载体 pBluscript M13 (-) 和自连的 pGEMT Easy vector , 从质粒 pTB 单酶切得到含 cry1Ab 全基因的 Sal I - Sal I 片段 , 亚克隆到质粒 pZB1 相应位点上 , 从而得到表达质粒 pDP1B (图 1) 。此质粒能同时表达 Cry1Ab 和 P20 , 而且 p20 基因前同时有其上游序列和 cry1Ac 的启动子控制其表达。用 Pst I 酶切质粒 pDP1B , 分别与经 Pst I 酶切的质粒 pHT3101^[26]和 pZB1 连接 , 得到表达质粒 pT1B 和 pP1B (图 1) 。因 pZB1 经 Pst I 酶切后切去了质粒上 p20 基因前的 cry1Ac 的启动子序列 , 所以质粒 pP1B 与质粒 pDP1B 的不同在于 p20 基因前没有 cry1Ac 的启动子。

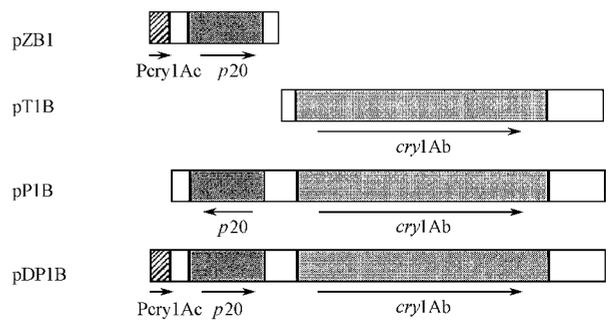


图 1 质粒 pZB1、pT1B、pP1B 和 pDP1B 示意图

Fig.1 Plasmid maps of pZB1 , pT1B , pP1B and pDP1B

2.2 cry1Ab 基因在 3 个不同菌株中的表达

将重组菌株 T1B ,P1B ,DP1B 和受体菌 CryB 分别接种于 1mL PWYE 培养基过夜培养 ,后以 1 : 100 转接至 G-tris 培养基 ,培养 72h 后 ,光学显微镜下观察发现已完全孢晶分离 ,菌株 T1B、P1B、DP1B 均产生典型菱形晶体。SDS-PAGE 结果显示 ,重组菌株产生了 130kD 晶体蛋白 ,同时此蛋白大部分降解为 60kD 左右蛋白(图 2)。

用软件 ImageMaster VDS 分析 SDS-PAGE ,结果如图 2 在菌株 T1B、P1B、DP1B 中 ,Cry1Ab 蛋白的表达量依次增加。其中 ,130kD 蛋白的蛋白量比为 1 : 1.4 : 1.5 ,降解后的 60kD 蛋白的蛋白量比为 1 : 1.1 : 1.6 ,而三株菌表达的 Cry1Ab 蛋白的总量比为 1 : 1.2 : 1.6。

2.3 电镜观察

电镜观察结果如图 3 所示。Cry1Ab 在菌株 T1B、P1B、DP1B 中都产生典型的菱形晶体。三株菌株中的晶体相比较 ,菌株 DP1B 中晶体最大 ,其次为 P1B ,菌株 T1B 的晶体最小。三株菌株晶体体积依次为(0.136 ± 0.014) μm³ (0.09 ± 0.009) μm³ 和 (0.06 ± 0.0075) μm³。

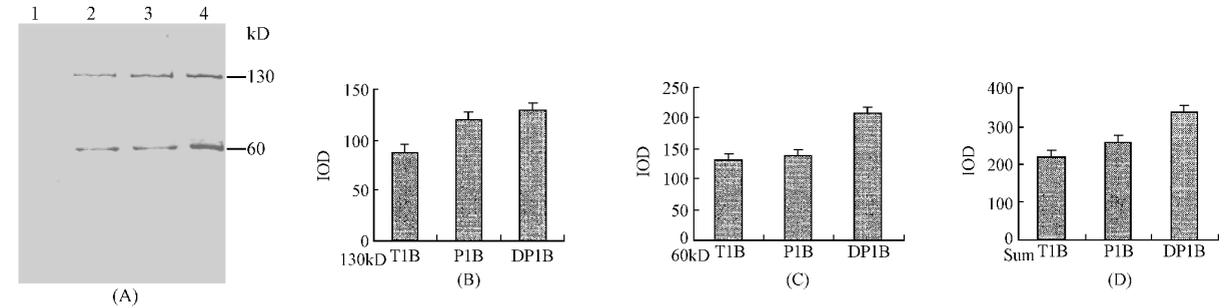


图 2 Cry1Ab 在菌株 T1B ,P1B ,DP1B 中表达的 Western blot 及定量分析

Fig.2 Western blot and protein quantification of Cry1Ab in T1B ,P1B ,DP1B strains

(A) Western blot 1. CryB ; 2. T1B ; 3. P1B ; 4. DP1B ; (B) 130 kD protein quantification of Cry1Ab ;

(C) 60 kD protein quantification of Cry1Ab ; (D) Total protein quantification of Cry1Ab

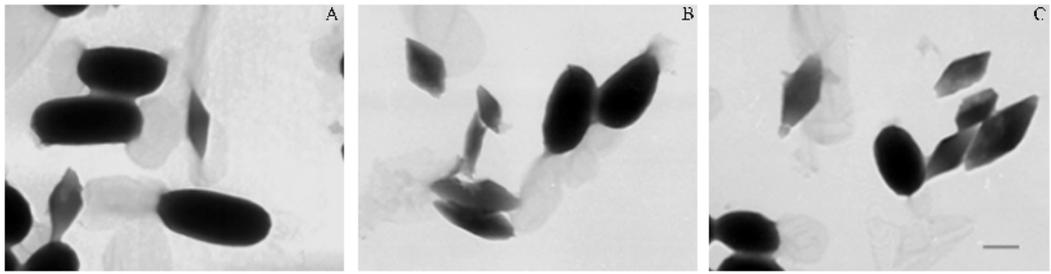


图3 T1B、P1B、DP1B 菌株伴孢晶体和芽孢的透射电子显微镜照片

Fig.3 Electron microscopy of parasporal bodies and spores of T1B, P1B and DP1B strains

Bar in C equals 500nm ;(A) T1B ;(B) P1B ;(C) DP1B

2.4 生物测定

生测结果见表 2, 表明菌株 T1B、P1B、DP1B 具有明显的杀虫活性。统计分析 3 株菌对 1 龄棉铃虫的毒力没有显著性差异。

表 2 苏云金杆菌 T1B、P1B、DP1B 对 1 龄棉铃虫幼虫的毒力

Table 2 Toxicity of T1B, P1B and DP1B strains against the first instar larvae of *Helicoverpa armigera*

Strain	LC ₅₀ (mg/L)	95% fiducial limits (mg/L)
T1B	56.6	48.2 ~ 66.4
P1B	43.6	38.44 ~ 49.34
DP1B	42.9	35.18 ~ 52.27

3 讨论

Cry1Ab 蛋白对小菜蛾、烟草天蛾有较强的杀虫活性^[27], 是一类比较特殊的 Cry1 类杀虫晶体蛋白, 与其它 Cry1 类蛋白不同的是其 C-半端缺失了一段含 4 个半胱氨酸氨基酸序列, 导致 Cry1Ab 蛋白不稳定、易被降解, 单独表达形成的晶体很小。从本研究结果看, 辅助蛋白 P20 对 cry1Ab 基因的表达和晶体形成均有帮助。P20 提高了 Cry1Ab 的表达量, 同时使其形成的晶体明显增大。

Cry1Ab 的实际分子量应该是 130kD 的蛋白质, 但在 CryB 中一部分 Cry1Ab 降解为 60 kD 左右的蛋白, 产生这种降解现象可能有 2 个原因 (1) Cry1Ab 分子的 C-半端内二硫键的缺失导致 Cry1Ab 的不稳定 (2) 受体菌 CryB 蛋白酶活性高, 降解该杀虫蛋白。

当 p20 和 cry1Ab 两者共表达时, Cry1Ab 的表达量提高, 晶体增大。Cry1Ab 的表达量的提高不仅表现在 130 kD 的蛋白量的提高, 同时, 它的降解产物 60kD 蛋白量也相应提高。Mclean 等(1987)发现 P20 不是在杀虫晶体蛋白基因的转录水平上起作用, 而应该是在蛋白合成过程中或翻译水平上起作用^[7]。

尔后, Visick 等通过 Cyt1Aa 蛋白和 P20 的免疫共沉淀反应, 确定 P20 是通过与正在合成的 Cyt1Aa 的新生肽结合而发生作用的, 对合成后的晶体蛋白没有帮助^[5]。在本研究中, 虽然 P20 帮助提高了 Cry1Ab 的总蛋白量, 但并不能阻止 Cry1Ab 合成后的降解, 其降解产物 60 kD 蛋白量也同样提高, 此现象进一步证实了 P20 对合成后的晶体蛋白没有帮助。

菌株 T1B、P1B 和 DP1B 的 Cry1Ab 蛋白的表达量和蛋白晶体的大小依次为 T1B < P1B < DP1B。这 3 株菌株分别含有质粒 pT1B、pP1B 和 pDP1B, 这 3 个质粒都含有 cry1Ab 基因, 唯一的不同在于 pT1B 无 p20 基因, pP1B 有 p20 全长基因 (p20 的上游序列、编码区以及终止序列), pDP1B 不仅有 p20 全长基因, 而且在 p20 基因前还有 cry1Ac 的双启动子。P1B 和 DP1B 都比 T1B 有更多的 Cry1Ab 蛋白的表达, 显然是因为 P1B 和 DP1B 中表达的 P20 对 Cry1Ab 蛋白的表达有促进作用。也就是表明质粒 pP1B 上的 p20 的上游序列具启动子的功能, 帮助了 P20 的表达。Dervyn 等(1995)认为 Bti 中 p20 的启动子是位于 p19 的上游序列, p19、cry11A 和 p20 三基因构成一个转录单元^[28], 其上游序列中没有启动子。但是 Adam(1989)通过序列分析和反转录酶分析表明 p20 的上游序列中有启动子^[3]。推测可能 p20 的上游序列和 p19 的上游序列都有启动子功能, 只是前者较弱。因为 pP1B 中的 p20 只有一个启动子, 而 pDP1B 中的 p20 有两个启动子, 且其中 cry1Ac 启动子是一个强启动子, 因此, P1B 中 P20 的表达量低于 DP1B 中的 P20 表达量。而菌株 P1B 和 DP1B 相比, P1B 的 Cry1Ab 的蛋白表达量和蛋白晶体都小于 DP1B, 该结果表明了 P20 表达量的多少可能导致了杀虫晶体蛋白的最终产量差异^[9]。

除了 P20 在杀虫晶体蛋白表达中起着分子伴侣的作用外, 苏云金杆菌中许多辅助蛋白对杀虫晶体

蛋白的表达都有促进作用,甚至对晶体的形成是必需的^[4,11]。本实验室已构建了含不同辅助蛋白的表达载体^[29,30],为进一步研究这些辅助蛋白的作用机制并充分利用有效的辅助蛋白奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] YU Z N (喻子牛). *Bacillus thuringiensis*. Beijing: Science Press, 1990
- [2] Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J Bacteriol*, 1995, **177**: 6027 - 6032
- [3] Adams L F, Visick J E, Whiteley H R. 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**: 521 - 530
- [4] Crickmore N, Ellar D J. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*, 1992, **6**: 1533 - 1537
- [5] Visick J E, Whiteley H R. Effect of a 20-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on production of the CytA protein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 1748 - 1756
- [6] Wu D, Federici B A. A 20-kD protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 5276 - 5280
- [7] Mclean K, Whiteley H R. Expression in *Escherichia coli* of a cloned crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 1017 - 1023
- [8] Yoshisue H, Yoshida K, Sen K, Sakai H, Komano T. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 20kD protein on production of the Bti 130-kD crystal protein in *Escherichia coli*. *Biophys Biotechnol Biochem*, 1992, **56**: 1429 - 1433
- [9] Wu D, Federici B A. Improved production of the insecticidal CryIVD protein in *Bacillus thuringiensis* using *cryIA(c)* promoters to express the gene for an associated 20-kD protein. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **42**: 697 - 702
- [10] Xu Y, Nagai M, Bagdasarian M, Smith T W, Walker E D. Expression of the p20 gene from *Bacillus thuringiensis* H-14 increases CryIIA toxin production and enhances mosquito-larvicidal activity in recombinant Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 3010 - 3015
- [11] Ge B, Bideshi D, Moar W J, Federici B A. Differential effects of helper proteins encoded by the *cry2A* and *cry11A* operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **165**: 35 - 41
- [12] Shao Z Z, Liu Z D, Yu Z N. Effects of the 20-kilodalton helper protein on CryIAc production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 5362 - 5369
- [13] Rang C, Bes M, Lullien-Pellerin V, Wu D, Federici B A, Frutos R. Influence of the 20-kD protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on the rate of production of truncated CryIC proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **141**: 261 - 264
- [14] Park H W, Bideshi D K, Federici B A. Molecular genetic manipulation of truncated CryIC protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improved stability and yield. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 4449 - 4455
- [15] Lee H K, Gill S S. Molecular cloning and characterization of a novel mosquitocidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuo-kaensis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4664 - 4670
- [16] Delecluse A, Poncet S, Kiler A, Rapoport G. Expression of cryIVA and cryIVB genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 3922 - 3927
- [17] Geiser M, Schweitzer S, Grimm C. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the kurhd1 gene of subsp. *kurstaki* HD1. *Gene*, 1986, **48**: 109 - 118
- [18] Liu Z Z, Shao Z Z, Zheng R. In: *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*. YU Z N, SUN M ed. Beijing: Science Press, 1999, **3**: 107 - 112
- [19] Arvidson H, Dunn P E, Strnad S, Aronson A I. Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae: factors involved *in vivo* and in the structure of a purified protoxin. *Mol Microbiol*, 1989, **3**: 1533 - 1543
- [20] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [21] Chang C, Dai S M, Frutos R, Federici B A, Gill S S. Properties of a 72-kilodalton mosquitocidal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 expressed in *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* by using the shuttle vector pHT3101. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 507 - 505
- [22] Park H, Ge B, Bauer L S, Federici B A. 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**: 3932 - 8
- [23] Yu J, Pang Y, Tang M, Xie R, Tan L, Zeng S, Yuan M, Liu J. Highly toxic and broad-spectrum insecticidal *Bacillus thuringiensis* engineered by using the transposon Tn917 and protoplast fusion. *Curr Microbiol*, 2001, **43**: 112 - 119
- [24] CHEN Q (陈其津), LI G H (李广宏), LIN Y K (林扬帆). Rapid statistics and analysis of insecticide bioassay data by computer. *Suppl J Sun Yatsen Univ (中山大学学报论丛)*, 2001, **21**: 39 - 43
- [25] Schurter W, Geiser M, Mathe D. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* via electroporation: transformation of acrySTALLIFEROUS strains with a cloned delta-endotoxin gene. *Mol Gen Genet*, 1989, **218**: 77 - 181
- [26] Lereclus D, Arantes O, Chauvaux J, Lecadet M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **51**: 211 - 217
- [27] Rajamohan F, Alcantara E, Lee M K, Chen X J, Curtiss A, Dean D H. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta*

- [28] Dervyn E, Ponce S, Klier A, Rapoport G. Transcriptional of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 2283 – 2291
- [29] YU J X(余健秀), ZENG S I(曾少灵), XIE R Y(谢瑞瑜), MENG G J(蒙国基), PANG Y(庞义). Cloning of the molecular chaperone gene *p19-p29* from *Bacillus thuringiensis* and construction of the Bt expression vector. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2002, **42**: 567 – 572
- [30] ZENG S I(曾少灵), YU J X(余健秀), XIE R Y(谢瑞瑜), MENG G J(蒙国基), TAN I(谭乐), PANG Y(庞义). Cloning of the molecular chaperone gene *p19* from *Bacillus thuringiensis* and construction of the Bt expression vector. *J Agricul Biotech* (农业生物技术学报), 2002, **10**: 84 – 188

Bacillus thuringiensis Helper Protein P20 Affects the Formation of Cry1Ab

TANG Mu-Jin YUAN Mei-Jin CHEN Jian-Wu SHI Yong-Xia ZENG Shao-Ling YU Jian-Xiu PANG Yi*

(State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract The Cry1Ab differs most significantly from the other related ICPs by its absence of a carboxyl terminus of 28 amino acids including four cysteines; consequently it is less stable. We report that the helper protein P20 plays a role in the expression and crystallization of Cry1Ab. Three Cry1Ab expression plasmids pT1B, pP1B, and pDP1B, were constructed based on the shuttle vector pHT3101. The vector pT1B does not contain the *p20* gene, pP1B carries *p20*, and pDP1B contains *p20* with *cry1A(c)* promoter. Transformants were obtained by electroporating the plasmids into *Bacillus thuringiensis* *acrySTALLIFERUS* mutant CryB. Western blot demonstrated that cry1Ab was expressed as a 130 kD protein in all the transformants, and some of the protein was partially degraded into a 60 kD peptide. Quantitative protein analysis indicated that the amount of the 130 kD protein varied in the transformants and was in the ratio of 1:1.4:1.5 for PT1B, pP1B and pDP1B respectively. For the 60 kD proteins, the ratio was 1:1.1:1.6. Microscopic examination revealed that the size of the typical pyramidal crystals in the three transformants was in the order of T1B < P1B < DP1B. Bioassay showed that T1B, P1B and DP1B were all toxic to the larvae of *Helicoverpa armigera* with similar LC₅₀. This study suggested that P20 plays a role in the expression and crystallization of Cry1Ab.

Key words *Bacillus thuringiensis*, *p20* gene, *cry1Ab* gene, expression

Received: 02-20-2003

This work was supported by a Grant from the National 863 Project (No. 2001AA214011) and Natural Science Foundation of Guangdong Province.

* Corresponding author. Tel: 86-20-84113860; Fax: 86-20-84037472; E-mail: ls12@zsu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>