

带 *cry3Aa* 启动子的 *aiiA* 基因在苏云金芽胞杆菌中的表达

朱晨光 孙 明* 喻子牛

(华中农业大学生命科学技术学院 教育部暨农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

摘 要 *N*-乙酰高丝氨酸内酯(*N*-acyl-homoserine lactones, AHLs) 是一类数量感知(Quorum-sensing)系统中的信号分子,它参与诱导调控许多植物病原菌致病基因的表达。苏云金芽胞杆菌的 *AiiA* 蛋白能降解这类 AHLs 分子,进而可减弱病原菌致病基因表达产生的病害。苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry3Aa* 的启动子是一种不依赖芽胞形成的启动子,它相对于其它 *cry* 类基因的启动子有启动基因转录时间早,转录时间长的优点。通过重叠延伸 PCR,用杀虫晶体蛋白基因 *cry3Aa* 启动子替换编码 *AiiA* 蛋白的基因 *aiiA* 自身的启动子,构建了融合基因 *pro3A-aiiA*。将融合基因装入穿梭载体 pHT304 的 *Bam*HI/*Sph*I 位点,得到重组质粒 pBMB686 并转化苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171,重组菌株 BMB686 的 *AiiA* 蛋白表达量在各个生长时期均高于对照菌株,对 AHLs 分子的降解活性和对胡萝卜软腐欧文氏菌感染马铃薯产生病害的抑制能力也明显优于对照菌株。

关键词 乙酰高丝氨酸内酯,苏云金芽胞杆菌,杀虫晶体蛋白

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0397-05

N-乙酰高丝氨酸内酯(AHLS)是一类广泛存在于许多革兰氏阴性细菌数量感知系统中的信号分子,又称作“自身诱导物”(Autoinducers, AIs)^[1,2]。AHLs 分子参与了许多病原菌致病基因的表达调控,其调控机理是: AHLs 分子浓度随着细菌细胞数量的增多而升高,当 AHLs 分子浓度高到一定的阈值时,就可启动病原菌致病基因的表达^[1,2]。胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)的软腐病基因调控就属于 AHLs 信号分子诱导调控^[3]。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, *Bt*)因在芽胞期产生对昆虫、螨类、动植物寄生线虫以及原生动物有毒性的杀虫晶体蛋白而被广泛应用于农林业的生物防治^[4]。最近有文献报道在苏云金芽胞杆菌的不同亚种中,广泛存在着对 AHLs 分子有降解作用的蛋白 *AiiA*,这类蛋白通过水解 AHLs 分子的内酯键,降低了 AHLs 分子的浓度,可使胡萝卜软腐欧文氏菌的软腐病基因得不到表达,从而减弱了胡萝卜软腐欧文氏菌对植物的软腐病害^[5,6]。目前许多编码 *AiiA* 蛋白的基因 *aiiA* 已被克隆并测序^[5,6]。苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry3Aa* 启动子是一种不依赖芽胞形成的启动子,它相对其它 *cry* 基

因的启动子有启动基因转录时间早,持续时间长的优点^[7],在构建苏云金芽胞杆菌基因工程菌时常被采用。本文用基因 *cry3Aa* 启动子替换基因 *aiiA* 自身的启动子,构建了融合基因 *pro3A-aiiA*,并对融合基因在苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171 的表达、重组菌株 BMB686 对 AHLs 分子的降解活性及其对胡萝卜软腐欧文氏菌感染马铃薯产生病害的抑制能力等方面进行了研究。本研究结果表明融合基因 *pro3A-aiiA* 可用于构建抗植物软腐病的苏云金芽胞杆菌基因工程菌。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

菌株 *E. coli* DH5 α 、*Bacillus thuringiensis* BMB171^[8]、*Erwinia carotovora* SCG1^[5]、质粒 pHT304^[9](*B. t* 复制子,氨苄青霉素抗性、红霉素抗性)、pHT305A^[7](含 *cry3Aa* 基因,氨苄青霉素抗性、红霉素抗性)、pGEMT-*aiiA*(含 *aiiA* 基因,氨苄青霉素抗性,本室张琼博士构建)均由本实验室保存。根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* WCF47^[10](pCF372/pCF218,含有 *PtraI-lacZ* 融合基因和 *traR* 基因,卡那霉素抗性、壮观霉素抗性、四

环素抗性)大肠杆菌 *E. coli* DH5 α (pJZ365) (含 *traI* 基因,庆大霉素抗性)由美国康奈尔大学 Stephen C Winans 教授惠赠。大肠杆菌在 37℃ 培养,苏云金芽胞杆菌、胡萝卜软腐欧文氏菌和根癌土壤杆菌均在 28℃ 培养。大肠杆菌、苏云金芽胞杆菌和胡萝卜软腐欧文氏菌用 LB 培养基培养,根癌农杆菌用 MM 培养基^[11]培养。抗生素使用浓度:氨基青霉素为 100 μ g/mL,红霉素为 25 μ g/mL,四环素为 20 μ g/mL,庆大霉素为 30 μ g/mL,壮观霉素为 100 μ g/mL,卡那霉素为 50 μ g/mL。

1.2 DNA 操作及蛋白电泳

质粒的提取、酶切、连接、转化、PCR 和蛋白 SDS-PAGE 均参照文献 [12] 的方法。蛋白定量采用上海四星生物技术公司生产的凝胶成像系统软件进行光密度测定后定量。

1.3 质粒电脉冲转化苏云金芽胞杆菌

按照文献 [13] 所述方法进行。

1.4 细菌 Aii 活性的检测

Aii (autoinducer inactivity) 活性是指使 AHLs 分子失去活性的能力。根癌农杆菌 WCF47 中含有质粒 pCF372 和 pCF218,其中质粒 pCF372 含有 *PtraI-lacZ* 融合基因,但自身缺失 *traI* 基因;质粒 pCF218 含有 *traR* 基因,其编码蛋白 TraR 受 AI 分子诱导后可激活 *PtraI-lacZ* 融合基因的表达^[10]。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α (pJZ365) 的质粒 pJZ365 含有 *traI* 基因,其编码蛋白 TraI 可以大量合成 AHLs 分子^[10]。将加有 X-gal 的平板培养基切成细条,在细条的上端加入待测的样品,在样品的下面点接指示菌 WCF47,当样品中存在 AHLs 分子时,随着分子在培养基内不断向下扩散,激活 WCF47 中 *lacZ* 基因的表达,可使 WCF47 菌落呈现蓝色,而样品中没有 AHLs 分子或在 AHLs 分子扩散不到的地方,WCF47 菌落呈现白色。

Aii 活性检测参考了文献 [14] 的方法略有改进,以加有 X-gal 的 MM 琼脂培养基为测试培养基,用无菌小刀将培养基琼脂切成间隔 3mm 的 1cm 宽的细条状。取待测菌的 16h 培养物 20 μ L,与等体积的 AHLs 分子产生菌 DH5 α (pJZ365) 的 16h 培养物混合,以 20 μ L 无菌水和 20 μ L DH5 α (pJZ365) 培养物的混合物作为对照。28℃ 作用 1h,紫外灯照射 1h。离心取上清液 10 μ L 加至检测平板上。待上清液基本被培养基吸收后,在样品下端逐个点指示菌 WCF47 ($OD_{600} \approx 0.4$),每一点 0.8 μ L。28℃ 培养 24h 后观察并记录实验结果。与对照相比,待测样品的点样处与最远的蓝色 WCF47 菌落之间的距离若小于对照,

表明该样品具有 Aii 活性,且距离越短则 Aii 活性越高,若与对照无差别,则表明该样品无 Aii 活性。

1.5 胡萝卜软腐欧文氏菌致病性实验

1.5.1 供试植物:取大小适当的马铃薯若干,用水仔细清洗,再用 70%(V/V)乙醇反复进行表面消毒。在无菌操作台上,在平板中铺入无菌滤纸,加 2mL 无菌水以保持平板湿润,用无菌刀片将马铃薯切成厚度约为 0.5cm 的片状,然后放入平板中备用。

1.5.2 感染样品:取胡萝卜软腐欧文氏菌菌株 SCG1 的 16h 培养物和其 4 倍稀释液各 20 μ L,分别与 20 μ L 苏云金芽胞杆菌菌株 BMB171、重组菌株 BMB686 的 16h 培养物混合。28℃ 作用 4h 后,各取 5 μ L 混合物接种马铃薯。同时以 SCG1 的培养物原液和稀释液与无菌水的混合物接种马铃薯作为负对照。以 BMB171 培养物和 SCG1 的培养物及其稀释液混合后接种马铃薯作为正对照。将平板放在 28℃ 培养 24h 后观察并记录马铃薯是否出现软腐病斑及感病的程度。

2 结 果

2.1 融合基因 *pro3A-aiiA* 的构建及其表达

根据质粒 pHT305A 上基因 *cry3Aa* 启动子序列设计一对引物,引物 1 5'-CGG GATCCGAAACGTAA-GATGAAACCTTAG-3';引物 2 5'-TAAAGCTTCTTTACTGTCATTTTCTTCCCTCCCTT-3'。根据质粒 pGEMT-aii 上基因 *aiiA* 序列,设计另一对引物,引物 3 5'-AAGG-GAGGAAGAAAAATGACAGTAAAGAAGCTT TA-3';引物 4: 5'-AGCTGCATGCCTATGTACTCCGGGAACA -3'。用引物 1 和 2 扩增出基因 *cry3Aa* 的启动子片段,该片段 3' 端带有基因 *aiiA* 编码区的第 1~20 个碱基;用引物 3 和 4 扩增出基因 *aiiA* 的编码区片段,该片段 5' 端带有基因 *cry3Aa* 启动子末端的 20 个碱基。纯化两个扩增产物后,将两个 DNA 片段混在一起用引物 1 和 4 做 PCR 扩增,扩增产物为融合基因 *pro3A-aiiA* (图 1),大约为 1400bps 左右,测序证明启动子 *pro3A* 与基因 *aiiA* 连接正确(结果未显示)。融合基因片段经 *Bam*HI 和 *Sph*I 酶切后,插入穿梭载体 pHT304,构建成质粒 pBMB686,经酶切验证与预计片段大小相符(图 2)。

融合基因 *pro3A-aiiA* 在苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171 中的表达见图 3A。结合蛋白定量分析(图 3B)可以看出在培养 24h(营养期末期)时,重组菌株 BMB686 表达量略高于对照菌株,对照菌株 BMB171 本身也表达 AiiA 蛋白,培养至 60h(芽胞

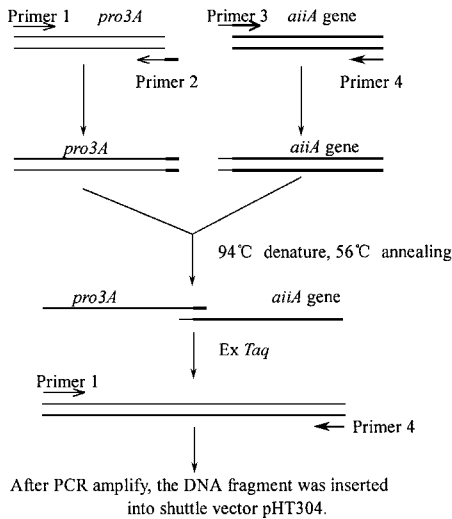


图 1 融合基因 *pro3A-aiiA* 的构建示意图

Fig.1 The construction of fusion gene *pro3A-aiiA* *pro3A*, the promoter of *cry3Aa* gene; primer 2 contains the first 20bps of 5' sequence of *aiiA* gene; primer 3 contains the last 20bps of 3' sequence of *pro3A* gene.

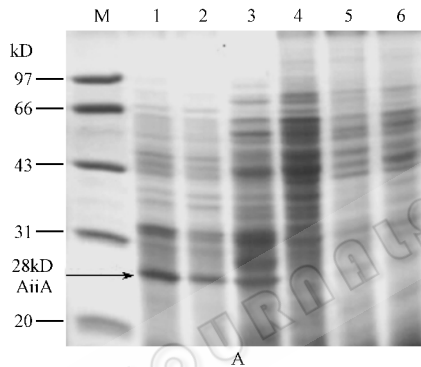


图 3 融合基因 *pro3A-aiiA* 在苏云金芽胞杆菌 BMB686 中的表达

Fig.3 The expression of the fusion gene *pro3A-aiiA* in *B. thuringiensis* BMB686

(A) 1. *B. thuringiensis* BMB686, 24h culture; 2. *B. thuringiensis* BMB171, 24h culture; 3. *B. thuringiensis* BMB686, 60h culture; 4. *B. thuringiensis* BMB171, 60h culture; 5. *B. thuringiensis* BMB686, 72h culture; 6. *B. thuringiensis* BMB171, 72h culture; M, protein molecular weight marker. From 1-6 each samples were made from 5mL bacteria cultures respectively and loaded by using the same volume.

(B) Densitometry of the 28kD protein in panel A. The values on the ordinate are relative concentrations. The abscissa 1, 2, 3 indicate the 24h cultures, 60h cultures and 72h cultures of strains BMB686 and BMB171, respectively.

期中期)时,菌株 BMB686 的 AiiA 表达量已远高于对照,表达量达到自身生长周期的最大值,此时对照菌已几乎不表达 AiiA 蛋白,培养 72h(芽胞后期)后,菌株 BMB686 的 AiiA 蛋白表达量较低,对照的表达量也很低。以上结果说明融合基因 *pro3A-aiiA* 可以在苏云金芽胞杆菌菌株 BMB171 的芽胞中期较好的表达,其表达时间可从营养期末期开始一直至芽胞期。

2.2 细菌 Aii 活性的检测

Aii 活性检测结果如图 4。可以看出阴性对照(DH5 α pJZ365)+H₂O)中含有使指示菌 WCF47 变蓝的 AHLs 分子的量最多,蓝色扩散的最远;菌株 BMB171 和 DH5 α (pJZ365)的混合物也含有使指示菌 WCF47 变蓝的 AHLs 分子,但其样品到指示菌 WCF47 蓝色最远端的距离小于阴性对照,说明菌株

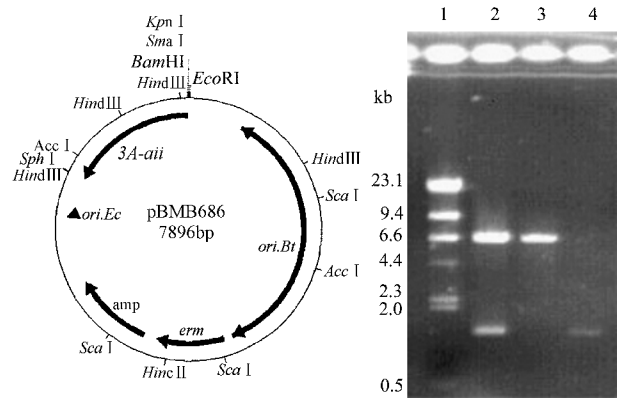
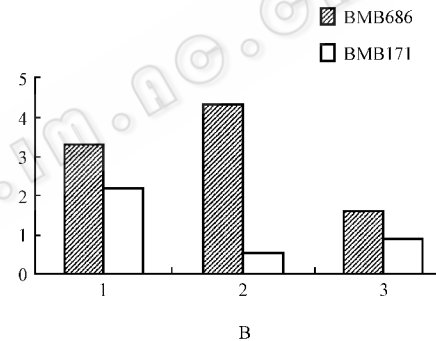


图 2 质粒 pBMB686 及其酶切电泳图谱

Fig.2 Plasmid pBMB686 and its agarose electrophoresis map Left: Plasmid pBMB686: 3A-*aii*: *aiiA* gene with promoter of *cry3Aa*; *ori.Bt*: origin of replication in *B. thuringiensis*; *erm*: *Erm*^R-encoding gene; *amp*: *Amp*^R-encoding gene; *ori. Ec*: origin of replication in *E. coli*;

Right: Agarose electrophoresis map of pBMB686: 1. λ DNA/*Hind* III Marker; 2. pBMB686/*Bam*HI-*Sph*I; 3. pHT304/*Bam*HI-*Sph*I; 4. *pro3A-aii* PCR fragment



BMB171 表现出了 Aii 活性,而菌株 BMB686 与 DH5 α (pJZ365)的混合物则几乎不使指示菌 WCF47 变蓝,说明菌株 BMB686 的 Aii 活性要高于菌株 BMB171。菌株 BMB171 与无菌水的混合物也不使指示菌 WCF47 变蓝,这说明苏云金芽胞杆菌 BMB171 不会产生 AHLs 分子,从而排除苏云金芽胞杆菌自身产生 AHLs 分子造成对结果干扰的可能。

2.3 胡萝卜软腐欧文氏菌致病性实验

从图 5 的结果可以看出:当菌株 SCG1 浓度较高时,接种 BMB171 的马铃薯上出现较明显的软腐病斑(图 5 左);当菌株 SCG1 浓度较低时,接种 BMB171 的马铃薯软腐病斑较小(图 5 右)。这说明菌株 BMB171 的抑制软腐病的能力较弱,只有当环境中菌株 SCG1 的浓度较低时才表现出对其致病性的抑

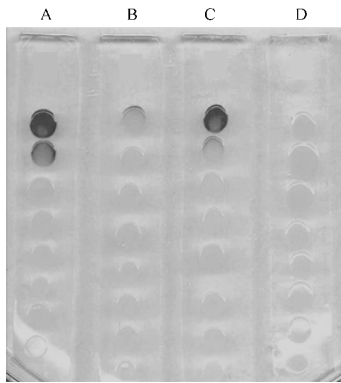


图4 苏云金芽胞杆菌 BMB171 和 BMB686 的 Aii 活性检测
Fig.4 Detection of Aii activity in *B. thuringiensis* strains BMB171 and BMB686

A. *E. coli* DH5 α (pJZ365) + sterile ddH₂O ; B. *E. coli* DH5 α (pJZ365) + *B. thuringiensis* BMB686 ; C. *E. coli* DH5 α (pJZ365) + *B. thuringiensis* BMB171 ; D. *B. thuringiensis* BMB171 + sterile ddH₂O

制。但接种重组菌株 BMB686 的马铃薯在两种 SCG1 浓度下均完全不腐烂,说明重组菌株 BMB686 抑制软腐病的能力比对照菌株 BMB171 要强得多。

3 讨 论

许多植物病原细菌中存在着数量感知(Quorum-sensing)系统,又称为细胞群体浓度依赖(Cell-density-dependent)系统,该系统调控病原菌致病基因的表达^[1,2]。自身诱导物 AHLs 分子是病原菌数量感知系统中必不可少的成分,AHLs 分子浓度降低后就不能激活病原菌致病基因的表达^[1,2,3]。2002 年 Dong 等和 Lee 等相继报道了在苏云金芽胞杆菌中广泛存在着 *aiiA* 基因,其表达蛋白可使 AHLs 分子失活,从而使胡萝卜软腐欧文氏菌对植物产生的软腐病害得以减弱^[5,6]。苏云金芽胞杆菌在上个世纪已被广泛应用于微生物杀虫剂的研究,但由于通常不能产生细菌和真菌敏感的抗生素而没有被应用于疾病防治,如能把苏云金芽胞杆菌开发成能够防治细菌或真菌病害的工程菌制剂,将使苏云金芽胞杆菌的应用领域得到大大的拓宽。

本研究目的是要构建抗植物软腐病的苏云金芽胞杆菌基因工程菌。苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry3A* 启动子是一类不依赖芽胞形成的启动子,它启动的基因转录开始于苏云金芽胞杆菌营养生长期的末期,经过稳定生长期,一直持续到芽胞后期,在芽胞中期时达到转录的高峰^[7],而苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry1*、*cry2*、*cry4* 类的启动子转录则起始于芽胞形成期,所以 *cry3A* 基因启动子相对于其它 *cry* 基因的启动子有启动转录时间

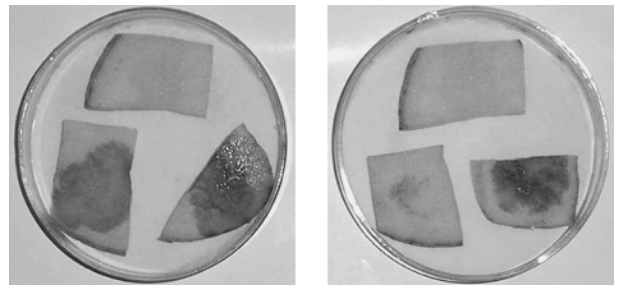


图5 苏云金芽胞杆菌 BMB686 对胡萝卜软腐欧文氏菌 SCG1 软腐病的抑制检测

Fig.5 Detection of suppression of *B. thuringiensis* BMB686 to the soft rot disease caused by *E. corotovora* SCG1

Both left and right plates : top is potato inoculated with *B. thuringiensis* BMB686 and *E. corotovora* SCG1 , bottom left is potato inoculated with *B. thuringiensis* BMB171 and *E. corotovora* SCG1 , bottom right is potato inoculated with *E. corotovora* SCG1 and sterile ddH₂O .

Left plate : Before inoculation, the *E. corotovora* SCG1 culture were not diluted by sterilized ddH₂O ; Right plate : Before inoculation, the *E. corotovora* SCG1 culture were four-times diluted by sterilized ddH₂O .

长的优点,适合于在构建工程菌时发挥好的作用。本实验所用的苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171 自身也含有 *aiiA* 基因,但从实验结果上看,该菌株 *Aii* 活性不高,对胡萝卜软腐欧文氏菌产生软腐病害的抑制能力不强。其它一些苏云金芽胞杆菌天然菌株也是类似的情况。仅凭天然菌株自身的 *AiiA* 蛋白表达量和蛋白活性还达不到工程菌的要求,因此我们设想通过体外遗传改良的手段,将高效表达的 *aiiA* 基因如带 *cry3Aa* 启动子的基因 *pro3A-aiiA* 转入天然菌株,来增强工程菌对软腐病害的抑制活性。本研究结果表明:带有 *cry3Aa* 基因启动子的 *aiiA* 基因导入苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171 后,*AiiA* 蛋白可以得到比较高的表达,重组菌株 BMB686 对 AHLs 分子的降解活性和对马铃薯感染软腐病的抑制能力也均远高于对照菌株 BMB171。有关将融合基因 *pro3A-aiiA* 导入高毒力天然苏云金芽胞杆菌菌株后对胡萝卜软腐欧文氏菌产生软腐病害的抑制活性方面,今后还将作进一步的实验研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Fuqua C, Winans S C, Greenberg E P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol*, 1996, **50**: 727-751
- [2] Robson N D, Cox A R, McGowan S J *et al.* Bacterial *N*-acyl-homoserine-lactone-dependent signaling and its potential biotechnological applications. *Trends Biotechnol*, 1997, **15**: 458-464

- [3] Dong Y H, Wang L H, Xu J L *et al.* Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 2001, **411**: 813-817
- [4] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(3): 775-806
- [5] Dong Y H, Gusti A R, Zhang Q *et al.* Identification of Quorum-Quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(4): 1754-1759
- [6] Lee S J, Park S Y, Lee J J *et al.* Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(8): 3919-3924
- [7] de Sousa M T, Lecadet M M, Lereclus D. Full expression of the *cry III A* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. *J Bacteriol*, 1993, **175**(10): 2952-2960
- [8] Li I(季林), Yang C(杨超), Liu Z I(刘子铎) *et al.* Screening of acrySTALLIFEROUS mutants from *Bacillus thuringiensis* and their transformation properties. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2000, **40**(1): 85-90
- [9] Arants O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*. 1991, **108**(1): 115-119
- [10] Zhu J, Beaber J W, More M I *et al.* Analogs of the autoinducer 3-Oxo-octanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 1998, **180**(20): 5398-5405
- [11] Zhang L H, Murphy P J, Kerr A *et al.* *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature*, 1993, **362**: 446-447
- [12] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [13] Wu I(吴岚), Sun M(孙明), Yu Z N(喻子牛). A new resolution vector with *cry1Ac10* gene based on *Bacillus thuringiensis* transposon Tn4430. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2000, **40**(3): 264-269
- [14] Dong Y H, Xu J L, Li X Z *et al.* AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2000, **97**(7): 3526-3531

Expression of Gene *aiiA* Carrying the Promoter of Gene *cry3Aa* in *Bacillus thuringiensis*

ZHU Chen-Guang SUN Ming* YU Zi-Niu

(College of Life Science and Technology, Key Laboratory of Agricultural Microbiology of Ministry of Education and Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract N-acyl-homoserine lactones (AHLs), are widely conserved signal molecules present in quorum-sensing systems of many Gram-negative bacteria. AHLs molecules mediate the expression of virulence genes of a range of bacterial pathogens. Recently, it has been reported that AiiA protein, which widely exists in *Bacillus* species, can inactivate the AHLs by hydrolyzing the lactone bond of AHLs, thus attenuate the diseases caused by the expression of virulence genes of bacterial pathogens. *Bacillus thuringiensis*, a type of Gram-positive bacteria, has been used extensively as a microbial insecticide in the last few decades. However, most of important insecticidal *B. thuringiensis* strains have not been exploited for bacterial disease control because they usually do not produce antibiotics that are effective against bacteria and fungi. The discovery of AiiA protein in *B. thuringiensis* shows the application potential of *B. thuringiensis* on biocontrol against bacterial diseases. In this study, in order to construct the *B. thuringiensis* recombinant strain that has high expression of AiiA protein, the promoter of insecticidal crystal protein coding gene *cry3Aa* of *B. thuringiensis* was selected. The promoter of gene *cry3Aa* is a non-sporulation promoter, it promotes the transcription earlier and longer than the promoters of other *cry* genes. The promoter of AiiA protein coding gene *aiiA* was replaced with the promoter of gene *cry3Aa* by overlapping PCR, resulting fusion gene *pro3A-aiiA*. The gene *pro3A-aiiA* was inserted into shuttle vector pHT304 at site *Bam*H I / *Sph* I, resulting recombinant plasmid pBMB686. The plasmid pBMB686 was introduced into *B. thuringiensis* acrySTALLIFEROUS strain BMB171, the resulting strain BMB686 had a higher and more stable expression level of protein AiiA comparing with the parental strain BMB171. Furthermore, the strain BMB686 exhibited stronger ability of AHLs inactivation and much more effective restraint to the potato's soft rot disease caused by *Erwinia carotovora* than those of the parental strain BMB171. From these results, it was concluded that the *B. thuringiensis* strain harvesting the fusion gene *pro3A-aiiA* may be utilized in the future to control bacterial diseases which are mediated by the AHL quorum-sensing signals.

Key words acyl-homoserine lactones; *Bacillus thuringiensis*; insecticidal crystal protein

Received: 01-06-2003

This work was supported by Grants from the National High Technology R&D Project of China (2001AA214011), National Natural Science Foundation (30270053) and Key Project of Ministry of Education.

* Corresponding author. Tel 86-27-87283455; Fax 86-27-87280670; E-mail: zhuzh@cau.edu.cn; http://journals.im.ac.cn