

형질전환된 *Bacillus thuringiensis* NT0423 균주에 의해 생산된 두가지 형태의 내독소 단백질의 특성

박현우 · 김호산 · 유용만 · 김상현¹ · 서숙재² · 강석권*

서울대학교 농업생물신소재연구센터, ¹농촌진흥청 잠업시험장
²경상대학교 자연과학대학 생물학과

Characterization of Two Type Crystal Proteins Produced by Transformed *Bacillus thuringiensis* NT0423

Park, Hyun-Woo, Ho-San Kim, Yong-Man Yu,
Sang-Hyun Kim¹, Sook-Jae Seo² and Seok-Kwon Kang

Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

¹Sericultural Experiment Station, R.D.A., Suwon 441-100, Korea

²Department of Biology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract — Cloning and expression of two different crystal protein genes from transformed *Bacillus thuringiensis* were investigated. *B. thuringiensis* NT0423 is toxic to both Lepidopterous and Dipterous larvae. The pCG5 vector carrying crystal protein genes (mosquitocidal and hemolytic activity) of *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 was transformed into *B. thuringiensis* NT0423. Transformant has expressed two type crystals of bipyramid from NT0423 and ovoid from pCG5 in one cell. Analysis of total plasmid DNA pattern showed that 13.57 kb pCG5 DNA fragment existed in transformant. SDS-PAGE analysis of crystal proteins from transformant has shown three major polypeptides, 72 and 27 kDa from pCG5, and 130 kDa from NT0423. The synergistic effect of crystal proteins produced by transformant has the higher mosquitocidal activity than that of NT0423 strain. On the other hand, transformant also has been toxic against *Bombyx mori* and *Hyphantria cunea*.

*Bacillus thuringiensis*는 토양세균으로서 성장조건이 악화되면 포자를 형성하면서 동시에 강력한 살충 효과를 가진 다이아몬드형, 사각형, 원형 혹은 부정형 등의 내독소 단백질 결정체(crystal)를 생성하는데(1), 이 내독소 단백질은 인체나 가축, 야생조류 및 수생 생물 등에 대해서는 전혀 독성이 없는 것으로 알려져 있다. 이러한 *B. thuringiensis* 내독소 단백질은 숙주 특이성의 차이에 따라서 나비목, 파리목 및 딱정벌레목에 대하여 각각 독성을 갖는 것들이 보고되었다(2, 3). 반면에 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 균주의 경우에 있어서는 하나의 내독소 결정체가 나

비목에 독성을 가지는 P1 독소단백질과 파리목에 독성이 있는 P2 독소단백질을 동시에 생성한다고 보고되었다(4). 한편, *B. thuringiensis*는 다른 세균에 비하여 세포벽의 재생이 어렵기 때문에 효율적인 형질 전환이 곤란하여 최근까지 내독소 단백질 유전자의 발현조절 기작 등에 대한 연구가 활발하지 못했다(5). 따라서, *B. thuringiensis*의 내독소 단백질 유전자의 기능을 분자생물학적으로 연구하기 위하여 *E. coli*나 *B. subtilis* 등의 세균을 이용하여 왔으며(6-8), 연구 방향은 기주 범위가 다른 두 균주의 유전자의 translational fusion, 형질전환, transgenic plant의 제작 등 다양하게 연구되고 있다(9-11).

그러나, 최근에 *B. thuringiensis* 자체로의 형질전환을 위해 electroporation system을 적용시킬 수 있게 됨에 따라서 이에 대한 연구가 활발하게 되었으며

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, transformation, electroporation, *cryIVD* and *cytA* gene, synergistic effect

*Corresponding author

(12), 또한 *B. thuringiensis*의 기주범위를 넓히기 위해 *in vivo* genetic recombination을 사용하거나(13), 형질도입과 형질전환에 의해 나비목과 딱정벌레목 해충에 독성을 갖는 서로 다른 두개의 내독소 단백질 유전자인 *cryIA(a)*와 *cryIIIA*를 한 plasmid내에 도입하여 단일 균주에서 동시에 생산토록 하는 새로운 *B. thuringiensis* 균주의 개발에 관한 연구도 행하여지고 있다(14).

이에 본 연구에서는 양잠농가 토양에서 새로 분리된 균주로서 나비목 및 파리목 유충에 강한 독성을 보이는 *B. thuringiensis* NT0423(15) 균주에 파리목인 모기유충에 강력한 독성을 보이는 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 내독소 단백질 유전자인 *cryIVD* 및 *cytA* 유전자가 들어있는 pCG5 벡터(16)를 electroporation 방법을 이용하여 새로운 형질전환체를 만들고 생산된 내독소 단백질의 몇가지 특성에 대하여 연구 조사한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

형질전환의 수용체로 사용된 *B. thuringiensis* 균주 NT0423은 서울대학교 농업생명과학대학 곤충병리학 연구실에서 새로 분리한 것으로서, 나비목과 파리목 유충의 양쪽에 독성을 보이는 것이다. 공여체로 사용된 벡터는 모기 유충에 강한 독성을 보이는 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 내독소 단백질 유전자인 *cryIVD*와 *cytA*를 가지고 있으며, *B. thuri-*

*ngiensis*와 *E. coli*의 replication origin을 모두 가진 shuttle 벡터로, 미국 California대학(Riverside)의 Gill박사로부터 얻은 pCG 계열 벡터 중의 하나이다 (Fig. 1). 비교 균주로 사용된 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*는 일본 Kyushu대학의 Ohba박사로부터 분양받은 것을 사용하였다.

형질전환

Electroporation은 Schurter 등의 방법(17)을 일부 수정하여 사용하였다. 세균의 증식배지인 Brain Heart Infusion(Biolife)에서 37°C, 18시간 진탕배양된 NT 0423 배양액을 100분의 1로 같은 배지에 동일 조건으로 OD₆₀₀에서 0.2가 될 때까지 재배양한 후, 4500 g에서 10분간 원심분리하여 집균된 균체를, 4°C의 멸균된 3차 증류수로 1회 세척하였다. 모아진 균체를 electroporation buffer(400 mM Sucrose, 1 mM MgCl₂, 7 mM K₂HPO₄, pH 6.0) 400 μl에 재현탁하여 세포농도 10⁹ cells/ml가 되도록 한 뒤 10 μl의 pCG5 DNA(50 mM Tris, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8.0)를 첨가하여 얼음속에 10분간 정치하였다. 이를 0.2 cm cuvette에 옮겨 Bio-Rad Gene Pulser apparatus의 안전장치에 넣고 25 μF, 1.3 kV, 200 Ω의 조건하에서 1회 전기충격을 가한 후 시료를 다시 얼음속에 10분간 정치한 다음 1 ml의 LB배지에 넣어 37°C에서 1시간 진탕배양하였다. 이를 erythromycin(12.5 μg/ml)이 포함된 선택평판배지에 250 μl씩 깔고 37°C에서 2일 배양하여 형성된 콜로니를 형질전환체로 선발하였다.

Plasmid DNA의 분리

실험에 사용된 *B. thuringiensis*로부터 plasmid DNA의 추출은 alkaline lysis 방법(18)을 일부 수정하여 실시하였다. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 및 NT0423 균주의 경우 50 ml의 LB 배지에 접종하여 27°C, 12시간 배양한 후, 250 ml의 SPY 배지에 100분의 1이 되도록 재접종하여 30°C, OD₆₀₀에서 0.7이 될 때까지 배양하였으며, 형질전환체의 경우는 동일 조건으로 12.5 μg/ml erythromycin을 첨가, 배양하여 같은 방법으로 분리하였다.

SDS-PAGE

실험에 사용된 각각의 *B. thuringiensis*를 250 ml의 GYS 배양액에 단일 콜로니를 접종하여 27°C에서 150 rpm으로 5일간 배양하여 위상차 현미경으로 내독소 단백질 결정체 생성을 확인한 뒤 12,000 g, 10분간

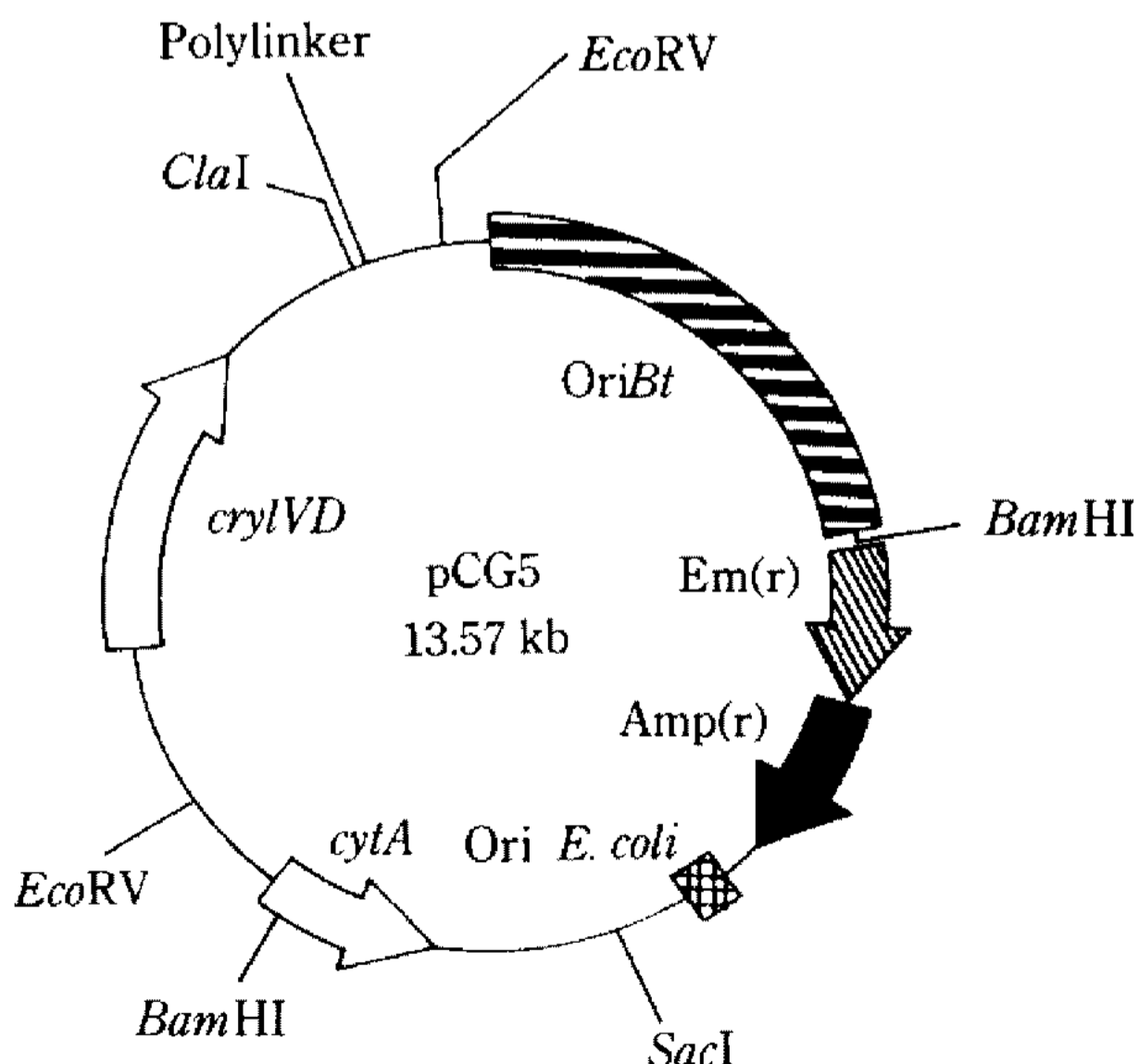


Fig. 1. Restriction map of pCG5(16).

원심분리하여 집균하였다. 이를 일부 수정된 Thomas의 방법(19)을 사용하여 sucrose step gradient(45% 10 ml, 67% 10 ml, 87% 10 ml)로 80,000 g에서 2시간 초원심 분리하여 내독소 단백질 결정체를 순수 분리한 뒤, Laemmli 방법(20)에 의거 10% SDS-PAGE를 행하였다. 여기서 형질전환체와 pCG5가 들어있는 *B. thuringiensis*는 12.5 µg/ml의 erythromycin을 넣어 배양하였다.

독성 검정

실험에 사용된 각각 *B. thuringiensis*의 단일 콜로니를 250 ml GYS 배양액에 접종하여 27°C에서 150 rpm으로 5일간 배양하여 내독소 단백질 결정체와 포자생성을 확인한 후 샘플로 사용하였다. 이를 각각 처리 농도로 희석한 뒤 파리목의 경우, 빨간집모기 (*Culex pipiens*) 2~3일 유충을 20 ml 물에 20마리씩 넣고 48시간 사육하면서 12시간 간격으로 치사효과를 관찰하였다. 또한 나비목의 경우에 있어서는 누에(*Bombyx mori*)와 흰불나방(*Hyphantria cunea*) 각각 3령 유충을 대상으로 처리 농도의 희석액 500 µl씩을 뽕나무 잎과 벗나뭇잎에 고루 도말하여 건조시킨 뒤 처리구당 누에의 경우 5마리, 흰불나방은 20마리를 넣고 48시간 사육한 후 치사효과를 관찰하였다.

결과 및 고찰

*B. thuringiensis*의 내독소 단백질 유전자에 대한 연구는 *B. cereus* phage CP-51에 의한 형질도입으로 처음 보고되었다(21). 그 후 Gonzalez 등에 의해 plasmid 전환의 conjugation-like process가 시도되면서 이에 대한 연구의 전환기를 맞이하게 되었다(22). 그러나 이는 plasmid DNA의 크기와 공여체 및 수용체 균주에 따라 전이 효율이 가변적이었기 때문에 내독소 단백질 유전자를 자기 숙주인 *B. thuringiensis* 자체에 발현시키는 것은 어려운 문제이었다. 그러나, *B. thuringiensis*의 내독소 단백질을 담배 등과 같은 식물체내에서 발현시켜 내충성을 갖는 transgenic plant의 개발을 시도하기도 하고(10, 11), 혹은 이를 이용하여 살충성 형질전환체인 *Pseudomonas* 균주(23)나 형질전환된 cyanobacteria 균주(24)를 개발하는 분자생물학적인 방향으로 많은 연구가 되었다. 그러나 이러한 형질전환체는 한가지의 내독소 단백질만을 만들기 때문에 기주범위가 제한될 뿐만 아니라, 빠른 시일내에 해충이 저항성을 나타낼 수 있다는 단점이

있다(25). 이와 같은 문제를 해결하기 위해서 Honée 등(9)은 서로 다른 두가지 내독소 단백질 유전자의 N-terminus의 독소부분만을 이용한 융합 단백질을 만들어 기주 범위가 확장된 것을 보고했다. 한편 최근에 새로운 형질전환법인 electroporation system이 개발됨에 따라 *B. thuringiensis*의 분자유전학적 연구 방법에 있어서 획기적인 수단을 제공했을 뿐만 아니라(12, 26), 본래의 자체 숙주에서 클로닝된 내독소 단백질 유전자의 기능을 연구가능하게 했다. Lecadet 등(14)은 형질도입 phage인 CP-54 Ber를 이용하여 *B. thuringiensis* 균주간에 재조합 plasmid를 상호전환할 수 있음을 밝힘과 동시에 electroporation에 의한 형질전환을 통해 *B. thuringiensis* 균주내에서 클로닝된 유전자의 발현 수준이 숙주와 벡터에 따라 달라짐을 보였으며, 한편, Lereclus 등(13)은 *B. thuringiensis*내의 IS232 homologous region을 이용하여 생체내 재조합을 통해 기주범위를 넓히는데 이 실험 방법을 사용하였다.

본 연구실에서는 경기도 화성군 일대에서 새로 분리한 *B. thuringiensis* NT0423 균주가 전자현미경 하에서 내독소의 형태가 단일의 bipyramidal형만이 관찰되는 것임에도 불구하고, 독성검정에 있어서는 나비목 뿐 아니라 파리목 유충에도 독성이 있음을 관찰하였다(15). 이와 유사한 연구로서, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1의 내독소 단백질의 경우에 있어서 나비목과 파리목에 대하여 동시 독성을 보이는데 반하여 P1 단백질은 나비목에만 독성을 보이는 bipyramidal형인 반면, P2 단백질은 cuboidal 형태의 내독소 단백질로서 분자량이 65 kDa이며 나비목 및 파리목에 대하여 이중독성을 가지고 있기 때문에 분자유전학적으로 많은 관심이 집중되어 왔다(6). 한편 모기 유충에 독성을 나타내면서 또한 용혈현상을 나타내는 독소단백질의 상호관계에 대한 연구보고도 있다. 즉, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*(27)와 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14(28)가 생산하는 26 kDa 단백질은 용혈현상을, 65 kDa 단백질은 모기에 대하여 독성이 있음이 밝혀졌으며, 또한 상호 단백질간에 독성의 상승작용이 있다고 보고되었다.

따라서, 본 연구실에서는 NT0423 균주가 나비목과 파리목에 대하여 이중활성을 보이면서 모기유충에 대해서는 HD-1 균주보다 높은 독성을 나타내는 것으로 밝혀져 이의 활성을 보다 상승시키면서 하나의 세포에서 두가지 내독소 단백질 결정체의 생성가능을 확인하기 위하여 본 연구를 수행하였다. *B. thuringie-*

nsis subsp. *morrisoni* PG-14의 wild type보다 독성이 다소 떨어지기는 하지만, 파리목에 강력한 독성을 생산하는 *cryIVD*와 *cytA* 유전자가 삽입된 pCG5 벡터를 *B. thuringiensis* NT0423의 세포내에 electroporation의 방법으로 한세포에서 두 유전자를 동시에 발현시키고 이에 대한 살충력을 비교 조사하였다. 형질전환에 사용된 pCG5 벡터의 *cryIVD* 유전자는 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 내독소 단백질의 모기 살충성 성분인 72 kDa 단백질을 coding하며, 다른 *cry* 유전자의 단백질과는 다르게 용해되며, 약 30 kDa의 활성 polypeptide로 전환된다. 한편, *cytA* 유전자에 의해 coding되는 27 kDa 단백질은 다른 *B. thuringiensis* 균주의 내독소 단백질 유전자와 sequence상 유사성을 전혀 보이지 않으며, 포유류를 포함한 척추와 무척추 동물의 세포에 대하여 cytotoxicity 현상을 나타내고, 또한 동물의 적혈구세포에 대해서는 용혈 현상을 일으키는 것으로 알려져 있으나, 생체내에서의 살충력은 명확하게 규명되어 있지 않았다(19, 29).

형질전환체에 대한 조사는 electroporation한 뒤에 erythromycin이 포함된 선택 평판배지상에서 생성된

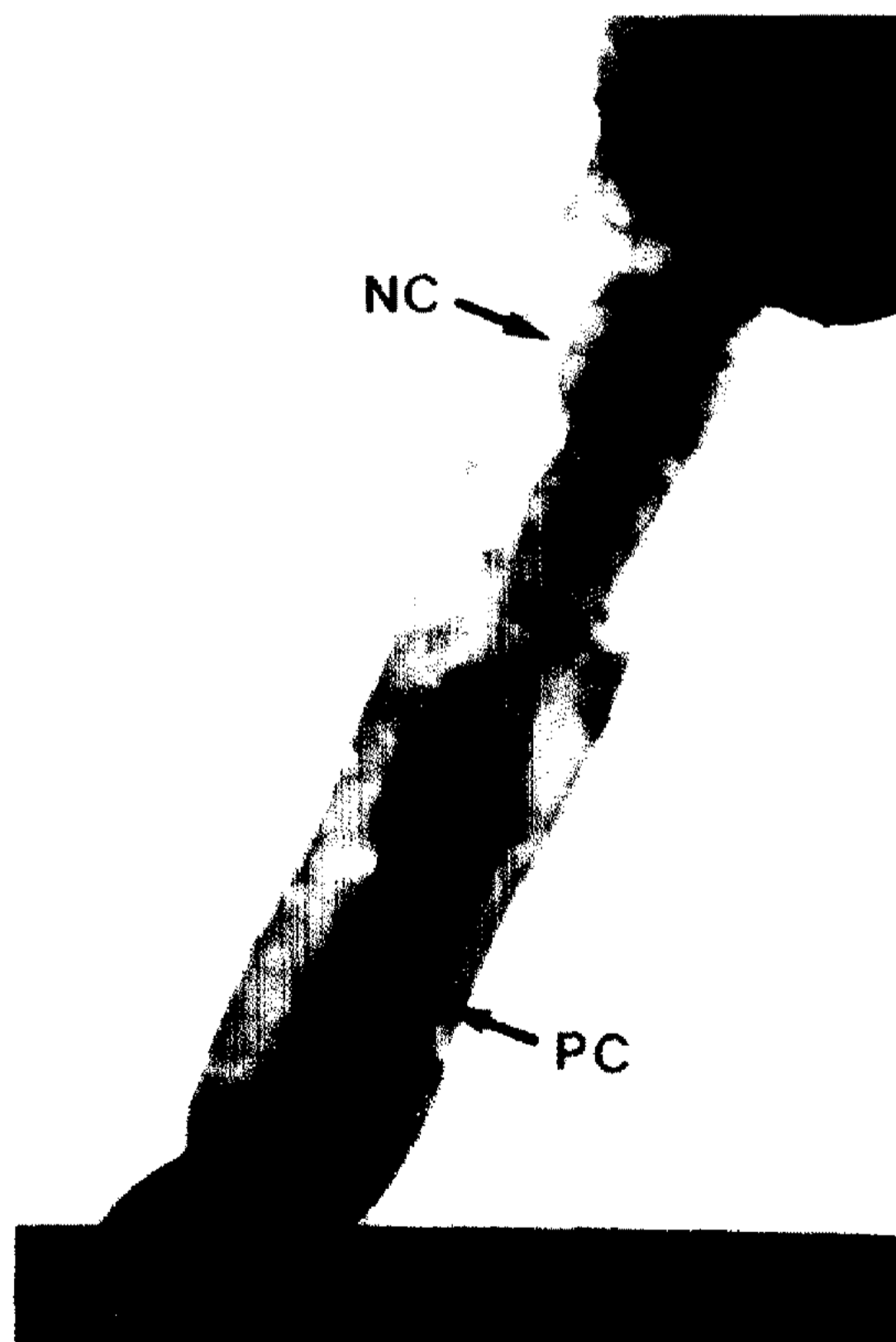


Fig. 2. Transmission electron micrograph of *B. thuringiensis* NT0423 transformed by pCG5.

NC: *B. thuringiensis* NT0423 crystal, PC: pCG5 crystal, $\times 10,000$)

콜로니들을 위상차 현미경으로 관찰하여 하나의 세포내에서 bipyramidal 및 ovoidal의 두가지 형태의 내독소 단백질 결정체를 동시에 생산하는 콜로니를 선발하였다. 그리고 형질전환된 세포내에서 두가지 형태의 crystal을 보다 세밀하게 관찰하기 위하여 투과전자현미경을 사용하였다. Fig. 2에서 볼 수 있는 것 같이 NT0423 균주가 생산하는 bipyramidal 모양과 pCG5 plasmid로부터 유래되는 ovoidal 모양의 내독소 단백질 결정체를 관찰할 수 있다. 또한, 이를 autolysis가 일어나도록 배양하여 주사전자현미경으로 관찰한 형질전환체에서 bipyramidal과 ovoidal형의 내독소 단백질 결정체를 동시에 모두 확인하였다(Fig. 3). 그러나 현미경에 의한 관찰에서 형질전환체의 내독소 단백질 결정체는 wild type이 생산하는 내독소 단백질 결정체보다 조금 작게 나타났다.

또한 이 형질전환체에서 plasmid 상호간의 안정성을 확인하기 위하여 액체배지 배양 후 erythromycin이 포함된 배지에서 6세대를 계대한 결과 독성 및 두가지 형태의 내독소 단백질 결정체 생성은 안정하게 유지되었음이 확인되었다. Plasmid DNA에 대한 안정성 조사에 있어서는 wild type 균주의 총 9개의 plasmid와 비교하여 형질전환체에서는 약 8 kb와 7.3 kb band가 소실되었음이 확인되었다(Fig. 4(A) lane 4). 이는 electroporation시 전기충격이 가해지고 세포내로 pCG5 벡터가 삽입됨에 따라 wild type 본래의 plasmid와 불화합성에 의해 이들이 방출되었거나, 형질

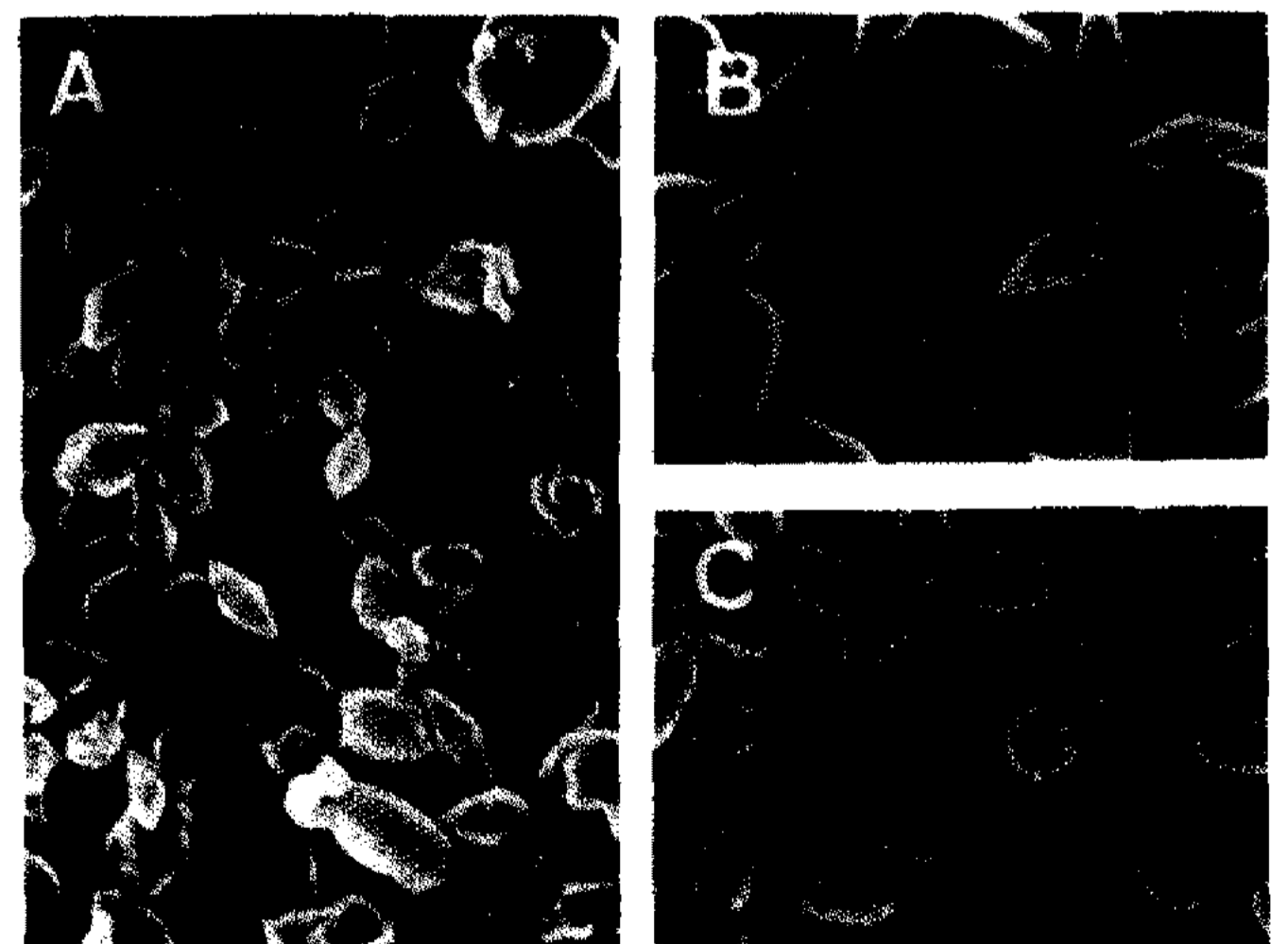


Fig. 3. Crystals of three *B. thuringiensis* strains observed by scanning electron micrographs

NC: *B. thuringiensis* NT0423 crystal, PC: pCG5 crystal, S: spore, $\times 10,000$)

(A) Transformant, (B) *B. thuringiensis* NT0423, (C) *B. thuringiensis* acrySTALLIFEROUS mutant, *cryB*(pCG5)

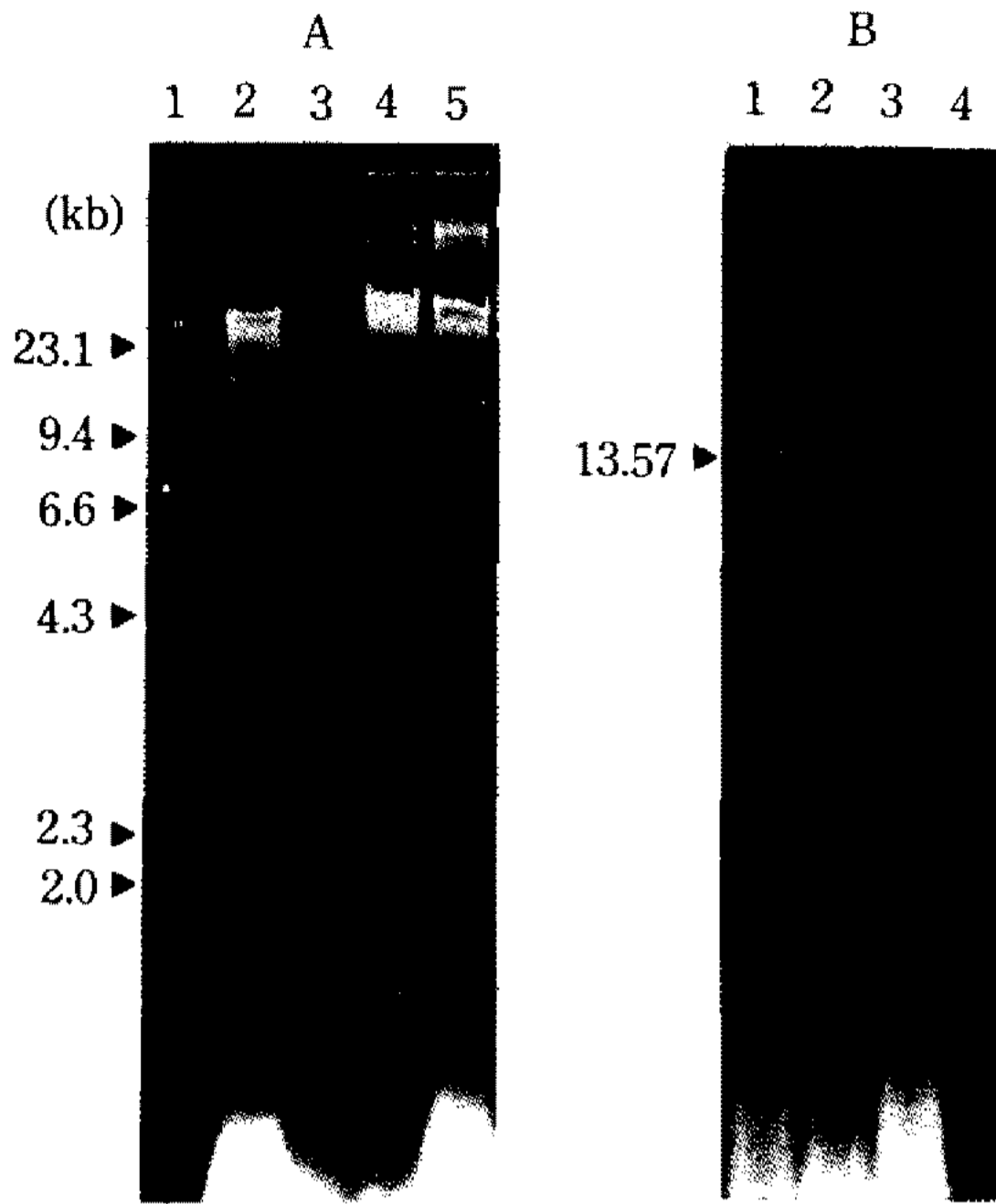


Fig. 4. Plasmid DNA analysis of *B. thuringiensis* on a 0.7% agarose gel.

(A) Intact plasmid DNA pattern of four *B. thuringiensis* strains.

Lane 1: λ -DNA digested with *Hind*III, lane 2: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, lane 3: pCG5, lane 4: Transformant, lane 5: *B. thuringiensis* NT0423

(B) Plasmid DNA of three *B. thuringiensis* digested with *Cla*I.

Lane 1: pCG5, lane 2: Transformant, lane 3: *B. thuringiensis* NT0423, lane 4: λ -DNA digested with *Hind*III

전환시 pCG5 벡터와 *B. thuringiensis* NT0423내에 존재하는 이들 plasmid와의 재조합이 발생하였을 가능성도 배제할 수 없다. 대다수 *B. thuringiensis*에 존재하는 plasmid의 역할에서 내독소 단백질을 coding하는 유전자는 45~225 kb의 큰 plasmid에 존재하고 있는 것으로 보고되었으며(30), β -exotoxin을 생산하는 plasmid 역할도 보고되었다(31). 그러나 그 밖의 *B. thuringiensis* plasmid의 역할에 대해서는 아직까지 밝혀진 것이 거의 없다. 또한, 형질전환체의 총 plasmid 중에서 pCG5의 존재를 확인하기 위하여 벡터의 단일 부위인 *Cla*I site를 제한효소로 처리하였을 때 13.5 kb의 DNA가 존재함을 확인하였다(Fig. 4 (B) lane 2).

한편, 형질전환체가 생산하는 내독소 단백질의 SDS-PAGE 분석에서 pCG5에 의한 72 kDa 모기 살충성 단백질과 27 kDa 용혈활성 단백질 및 NT0423 균주의 130 kDa 나비목 및 파리목 독소단백질의 주요 3개 단백질을 함께 가지고 있었다(Fig. 5). 생물 검정에

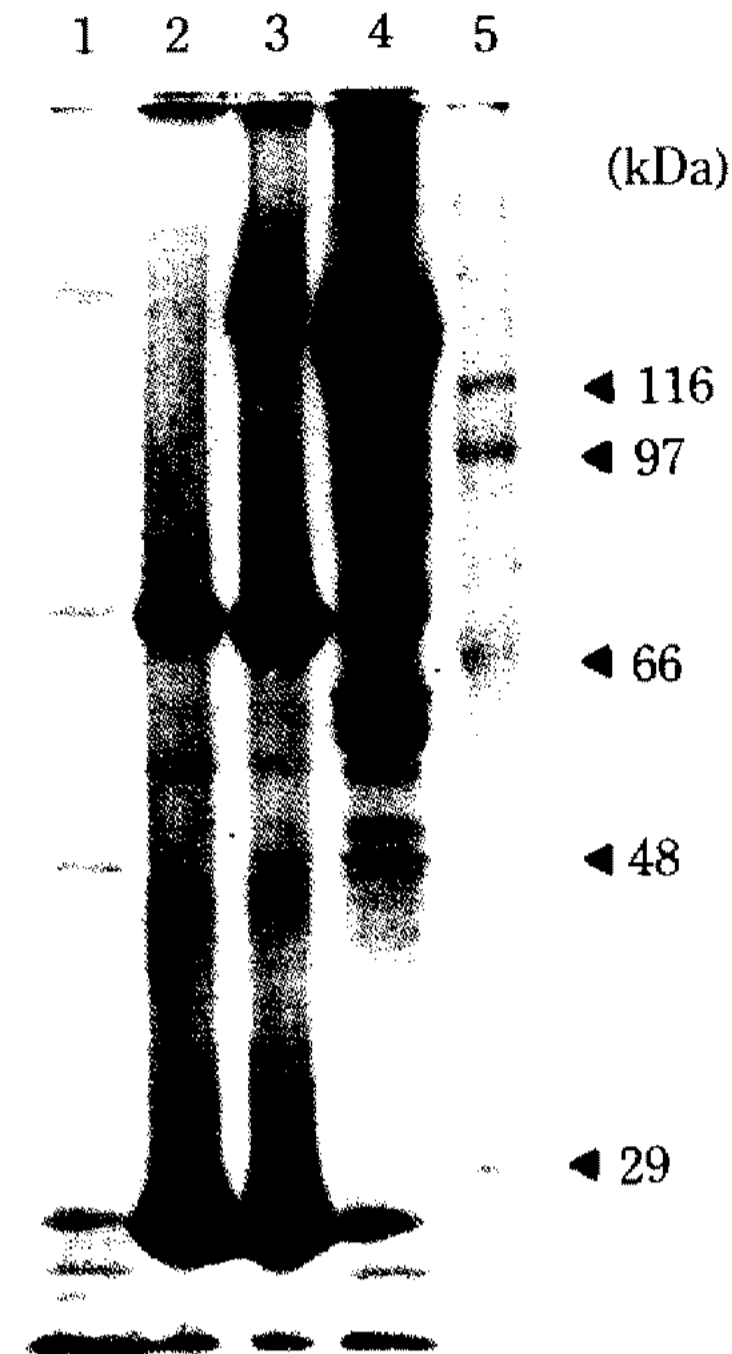


Fig. 5. SDS-PAGE of crystal proteins of four *B. thuringiensis* strains.

Lane 1: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, lane 2: *B. thuringiensis* acrySTALLIFEROUS mutant, *cryB*(pCG5), lane 3: Transformant, lane 4: *B. thuringiensis* NT0423, lane 5: Molecular weight marker

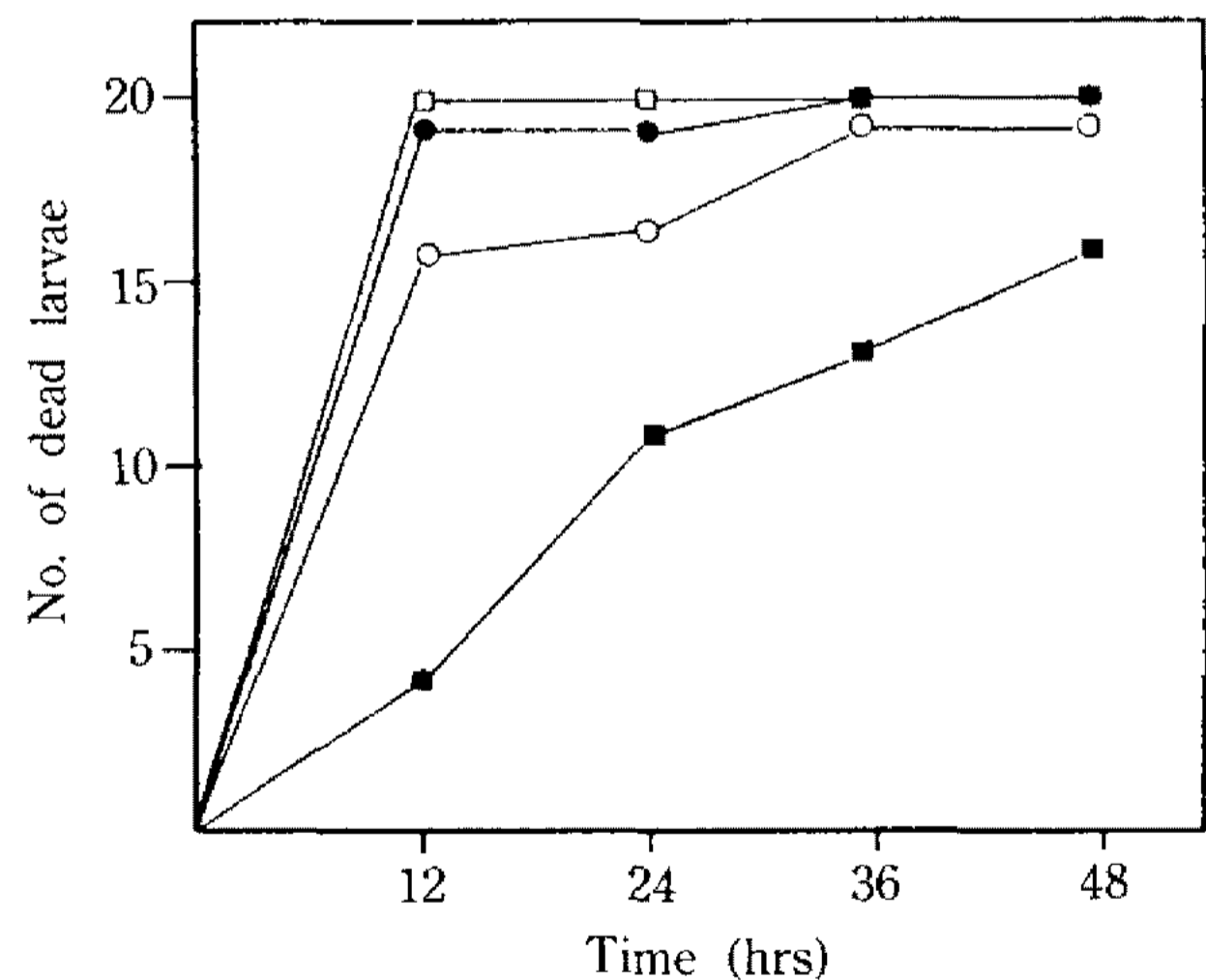


Fig. 6. Toxicities of crystal proteins from four strains of *B. thuringiensis* against *C. pipiens*.

□: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (1.04×10^6 spores/ml)

●: Transformant (1.26×10^6 spores/ml)

○: *B. thuringiensis* acrySTALLIFEROUS mutant, *cryB*(pCG5) (1.32×10^6 spores/ml)

■: *B. thuringiensis* NT0423 (1.15×10^6 spores/ml)

있어서 파리목인 모기 유충 *Culex pipiens*에 대한 독성검정 결과는 Fig. 6과 같이, *B. thuringiensis* NT0423은 내독소 단백질의 독성이 시간의 경과에 따라

Table 1. Toxicities of *B. thuringiensis* to the Lepidoptera, *Bombyx mori* and *Hyphantria cunea*

Strains	<i>B. mori</i>	<i>H. cunea</i>
<i>B. thuringiensis cryB</i> (pCG5 ^a)	—	—
<i>B. thuringiensis</i> NT0423	+++ ^b	+++
Transformant	+++	+++

^aVector harboring toxin protein gene from *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14.

^b+++ larvicidal toxicity.

서 급격한 증가를 보였으며, pCG5의 경우 *cryIVD* 및 *cytA* 유전자를 모두 가지고 있으나 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 비교하였을 때 초기의 독성이 낮은 것으로 나타났다. 반면, 형질전환체에 있어서는 비교 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 대등한 높은 치사율을 보였다. 또한, 나비목 유충인 누에 및 흰불나방에 대해서도 NT0423의 wild type과 비교하여 독성이 떨어지지 않은 결과로 미루어 볼 때 (Table 1), 형질전환체에서 소실된 2개의 plasmid DNA는 NT0423 균주의 내독소 단백질의 생성, 살충력 및 기주범위의 어느 것에도 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 이 결과를 바탕으로 현재 본 연구실에서는 하나의 *B. thuringiensis* 세포에서 동시에 두 종류의 내독소 단백질 결정체를 생산하는 작용기작, 숙주범위 인자 및 독성의 비교 등에 관한 연구를 계속하여 수행하고 있다.

요 약

경기도 화성군 양잠농가에서 새로 분리한 *B. thuringiensis* NT0423 균주는 bipyramidal형 내독소 단백질 결정체로 130 kDa의 protoxin을 생산하며 나비목과 파리목에 동시에 독성을 갖는 균주이다. 이러한 균주에 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14이 생산하는 ovoidal 형태의 내독소 단백질의 유전자가 삽입 되어있는 pCG5 벡터를 사용하여 형질전환하였다. 형질전환체가 bipyramidal형과 ovoidal형의 두가지 모양의 내독소 단백질 결정체를 한세포에 동시에 생성하는 것을 주사현미경으로 관찰하였으며, 형질전환체의 plasmid DNA 분석에서 pCG5가 안정하게 존재함을 확인하였다.

또한, SDS-PAGE 결과 형질전환체는 *B. thuringiensis* NT0423 유래의 130 kDa 및 PG-14 내독소 단백질 유전자가 삽입되어 있는 pCG5 벡터에 의한 72

kDa과 27 kDa의 3종류의 단백질을 생성하고 있음을 나타내었다.

생물검정에서 파리목인 빨간집모기(*Culex pipiens*) 2일 유충에 대한 독성은 형질전환체가 NT0423의 wild type에 비하여 증가된 치사율을 보였으며, 나비목인 누에(*Bombyx mori*)와 흰불나방(*Hyphantria cunea*) 각 3령 유충에 대하여도 강한 독성을 나타냈다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 특정연구개발 사업비 및 서울대학교 농업생명과학연구원 연구센터의 지원으로 수행된 것이며, 전자현미경 사진을 위하여 협조해준 농촌진흥청 농업기술연구소 전자현미경실 연구원 제위께 감사드립니다.

참고문헌

- Hannay, C.L. and D. Fitz-James. 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis berliner*. *Can. J. Microbiol.* 1: 694-710.
- Goldberg, L.J. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles serengetii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* 37: 355-358.
- Krieg, V.A., A.M. Huger, G.A. Langenbruch and W. Schmetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *Z. Angew. Entomol.* 96: 500-508.
- Yamamoto, T. and T. Iizuka. 1983. Two types of entomocidal toxins in the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *Arch. Biochem. Biophys.* 227: 233-241.
- Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux and M.M. Lecadet. 1989. Transformation and expression of cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 211-218.
- Aronson, A.I., W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
- Whiteley, H.R. and H.E. Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 549-576.
- Calogero, S., A.M. Albertini, C. Fogher, R. Marzari and A. Galizzi. 1989. Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin gene in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 446-453.

9. Honée, G., W. Vriezen and B. Visser. 1990. A translation fusion product of two different insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* exhibits an enlarged insecticidal spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 823-825.
10. Barton, K.A., H.R. Whiteley and N.-S. Yang. 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.* **85**: 1103-1109.
11. Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Höfte, S. Jansens, M. De Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. Van Montagu and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature(London)*. **328**: 33-37.
12. Mahilon, J., W. Chungjatupornchai, J. Decock, S. Dierickx, F. Michiels, M. Peferoen and H. Joos. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**: 205-210.
13. Lereclus, D., M. Vallade, J. Chaufaux, O. Arantes and S. Rambaud. 1992. Expansion of insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by *in vivo* genetic recombination. *Bio/Technology* **10**: 418-421.
14. Lecadet, M.M., J. Chaufaux, J. Ribier and D. Lereclus. 1992. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 840-849.
15. Kim, H.S., H.W. Park, Y.M. Yu and S.K. Kang. 1993. Characterization of activity crystal protein produced by new *Bacillus thuringiensis* NT0423 isolated from soil. *K. J. Appl. Entomol.* (in print)
16. Chang, C., Y.M. Yu, S.M. Dai, S.K. Law and S.S. Gill. 1993. High level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 815-821.
17. Schurter, W., M. Geiser and D. Mathe. 1989. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* via electroporation: transformation of a crystalliferous strains with a cloned delta-endotoxin genes. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 177-181.
18. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**: 1513-1523.
19. Thomas, W.E. and D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: Effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* **60**: 181-197.
20. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**: 680-685.
21. Thorne, C.B. 1978. Transduction in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 1109-1115.
22. Gonzalez, J.M., Jr., B.J. Brown and B.C. Carlton. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 6951-6955.
23. Obukowicz, M.G., F.J. Perlak, F. Kusano-Kretzmer, E.J. Mayer and L.S. Wartrud. 1986. Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of Pseudomonads using Tn5. *Gene* **45**: 327-331.
24. Murphy, R.C. and S.E. Stevens, Jr. 1992. Cloning and expression of the *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1650-1655.
25. McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**: 193-195.
26. Bone, E.J. and D.J. Ellar. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**: 171-178.
27. Wu, D. and F.N. Chang. 1985. Synergism in mosquitoicidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Lett.* **190**: 232-236.
28. Yu, Y.M., M. Ohba and K. Aizawa. 1987. Synergistic effects of the 65- and 25-kilodalton proteins of *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (Serotype 8a: 8b) in mosquito larvicidal activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 459-462.
29. Höfte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.
30. Lereclus, D., M.-M. Lecadet, J. Ribier and R. Dedonder. 1982. Molecular relationships among the plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 391-398.
31. Levinson, B.L., K.J. Kasyan, S.S. Chiu, T.C. Currier and J.M. Jr., Gonzalez. 1990. Identification of δ -exotoxin production, plasmids encoding δ -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J. Bacteriol.* **172**: 3172-3179.

(Received August 12, 1993)