

Bacillus thuringiensis 내에서 안정한 벡터를 이용한 *cry1C* 유전자의 발현

최수근 · 오근희 · 김정일 · 박승환*
생명공학연구소 미생물 분자유전학RU

Expression of *cry1C* Gene Using a Segregationally Stable Shuttle Vector in *Bacillus thuringiensis*. Soo-Keun Choi, Keun-Hee Oh, Jeong-Il Kim and Seung-Hwan Park*. *Bacterial Molecular Genetics RU, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea* - During sporulation, *Bacillus thuringiensis* strains produce crystals consist of toxin proteins highly specific against insect pests. Their host specificities are desirable from a standpoint of environmental safety, but also limit market potential. Thus, development of improved *Bacillus thuringiensis* strains having broad host spectrum will contribute to increase its use. For the construction of *Bacillus thuringiensis* strain having broad host spectrum, we cloned *cry1C* gene encoding a toxin protein highly toxic against *Spodoptera exigua* from a *B. thuringiensis* isolate and constructed two recombinant plasmids, pUBC1C and p1C60. The plasmid pUBC1C has a replication origin of the natural plasmid pBC16 from *B. cereus* which is closely related species to *B. thuringiensis*, and the pBC16 was known to be replicated by rolling-circle mechanism. The plasmid p1C60 has a replication origin of a resident 60 MDa plasmid from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD263, and it is believed that the p1C60 is replicated in a theta mode. The two plasmids were introduced into *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* cryB strain, and the transformed strains produced well-shaped bipyramidal crystals. We confirmed the expression of the *cry1C* gene by SDS-PAGE, and Western blotting. By investigating the segregational stability, it was found that the plasmid p1C60 is more stable than the pUBC1C.

*Bacillus thuringiensis*는 포자를 형성하는 그람양성균으로서 포자형성기 동안 독소단백질로 구성되어 있는 결정체를 만든다. 이들 독소단백질은 나비목, 파리목, 딱정벌레목 등 다양한곤충에 선택적 독성을 가지는 것으로 잘 알려져 있으며 그들의 아미노산 서열의 상동성에 따라 Cry1에서 Cry18의 Cry 단백질과 Cyt으로 분류되며 계속해서 새로운 독소단백질 유전자가 분리되고 있다. 이 독소단백질들은 해충의 유충에 의해 섭식되어 유충의 중장에 용해된 다음 중장의 단백질분해효소 작용에 의해 활성을 가지는 작은 분자로 분해된다. 활성분자들은 상피세포에 존재하는 수용체와 결합하여 세포막을 변화시킴으로써 삼투압 균형을 파괴하고, 결국 유충은 섭식을 멈추고 죽음에 이르게 된다.

B. thuringiensis 독소단백질의 선택적 살충성에 기인한 좁은 살충스펙트럼은 생태계 보호라는 측면에서는 장점으로 작용하지만 *B. thuringiensis* 제품의 광범위한 사용을 제한하고 있으며 이를 극복하기 위하여 더 넓은 스펙트럼을 가진 개량 균주의 개발이 요구되고 있다. 지금까지 개발된 개량 균주들은 주로 접합에 의한 유전자 도

입으로 제작된 균주들이다. 그러나 접합에 의한 유전자 도입은 그 유전자가 이동이 가능한 플라스미드상에 존재해야 하며, 균주가 공여체와 수용체로 작용할 수 있어야 하는 등 상당히 제한된 범위내에서만 가능하다. 한편 electroporation으로 균주를 형질전환하는 방법이 발달함에 따라 독소단백질 유전자를 electroporation 방법으로 다양한 종류의 *B. thuringiensis* 균주에 도입하려고 시도하였는데 세포내로 도입된 독소단백질 유전자를 높은 수준으로 발현시키고 안정하게 유지하기 위해서는 *B. thuringiensis*에 적당한 발현 벡터를 사용해야한다. 최근까지 *B. thuringiensis* 균주의 형질전환에 이용된 셔틀벡터는 *E. coli*(16), *Bacillus cereus*(18), *Staphylococcus aureus*(5, 6)과 같은 이질적인 종의 DNA를 이용한 것이었다. 이러한 벡터는 형질전환된 후 세포내에서 매우 불안정하고, 그들의 높은 복제수 때문에 원래 존재하고 있던 *cry* 유전자의 발현을 감소시킨다고 보고되었다. 또한 그람 양성 세균에서 분리된 대부분의 작은 플라스미드는 rolling-circle 기작으로 복제되며, rolling-circle기작으로 복제될 때에는 단일가닥의 중간체가 형성되므로 구조적으로 불안정하다고 알려져 있다(4, 9, 10, 15). 그러나 크기가 큰 플라스미드는 염색체 DNA처럼 theta 형태의 기작으로 복제하므로 구조적으로 안정한 것으로 알려져 있으며 최근 *B. thuringiensis*가 가지고 있는 고유의 큰 플

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4412, Fax. 82-42-860-4594

E-mail: shpark@kribb4680.kribb.re.kr

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *cry1C*, Expression, Segregational stability

라스미드에서 분리한 복제기원의 염기서열에 대한 보고와(3) *B. thuringiensis*의 복제기원을 이용한 서플벡터의 제작에 대한 보고가 늘어나고 있다(1, 2, 7).

본 연구에서는 살충 스펙트럼이 넓은 *B. thuringiensis* 균주를 개발하기 위해 난방제해충인 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 대해 살충활성을 가지고 있는 *cry1C* 유전자를 *B. thuringiensis* 분리균으로부터 클로닝하였고 이를 *B. thuringiensis* 내에서 안정하게 유지, 발현시키고자 두가지 플라스미드, pUBC1C와 p1C60,를 제작하였다. 플라스미드 pUBC1C는 *B. cereus*에서 분리한 플라스미드 pBC16을 이용하여 제작하였고 플라스미드 p1C60은 *B. thuringiensis* HD263이 가진 60 MDa 플라스미드의 복제기원을 이용하여 제작하였다. 이 플라스미드들을 이용하여 *cry1C* 유전자를 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* cryB⁻ 균주에서 성공적으로 발현시켰으며 형질전환된 세포 내에서의 플라스미드 안정성을 비교하였다.

재료 및 방법

재료 및 사용 균주

제한효소, T4 DNA ligase, DIG-High Prime 및 Southern blot을 위한 시약들은 베링거만하임(Boehringer Mannheim)사에서 구입하였으며, 항생제 및 기타 시약들은 Sigma사에서 구입하였다. Western blot analysis에 사용한 Cry1C 단백질에 대한 항체는 미국의 Bio-Synthesis사에 의뢰하여 만들었다. *cry1C* 유전자의 공여균인 *B. thuringiensis* 균주는 자연계에서 직접 분리하여 사용하였으며 결정체 단백질을 형성하지 않는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* cryB⁻ 균주와 플라스미드 pBC16의 공여균인 *B. cereus*는 BGSC(*Bacillus* Genetics Stock Center, Ohio, USA)에서 분양받아 사용하였다.

형질전환

형질전환을 위한 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* cryB⁻ 균주는 Kalman 등의 방법(12)에 근거하여 다음과 같이 준비하였다. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* cryB⁻ 균주를 BHIS(brain heart infusion plus 0.5 M sucrose)에 접종하여 600 nm의 파장에서 흡광도 0.2가 될 때까지 30°C에서 진탕배양하였다. 원심분리로 세포를 모아서 동일한 부피의 5 mM HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid [pH 7])-0.5 M sucrose로 한 번, 1/10 부피로 두 번 더 씻어 주었다. 마지막으로 1/10부피의 5 mM HEPES-0.5 M sucrose에 녹여 350 µl를 electroporation에 사용하였다. Electroporation은 1.25 kV와 3 µF로 0.2-cm electrode gap cuvette에서 실시하였다. 전기충격을 가한 직후 5 ml의 BHIS를 넣고 30°C에서 3시간 동안 배양한 후 항생제가 포함된 TBAB

평판배지에 도말하였다.

Southern blotting

B. thuringiensis 균주의 전체 DNA를 Kalman et. al. (11)의 방법으로 분리하여 여러가지 제한효소로 절단한 다음, 0.8% agarose gel에 전기영동하였다. 분리된 DNA를 Trans-Vac TE80 vacuum blotter(Hoefer Scientific)을 이용하여 nylon membrane으로 옮겼다. DNA를 gel에서 membrane으로 옮기는 동안, denaturation 용액(0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)으로 15분, neutralization 용액(1.0 M Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl)으로 15분, 그리고 2×SSC(1×SSC, 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)로 15분간 처리하였다. Membrane으로 DNA를 옮긴 다음, UV를 3분간 처리하여 DNA를 고정시켰다. 그리고 DNA가 결합된 membrane을 0.02% SDS와 1.0% blocking agent(Boehringer Mannheim Biochemicals) 및 0.1% N-lauroylsarcosine이 포함된 5×SSC로 68°C에서 한시간 동안 prehybridization을 실시한 후 하룻밤 동안 hybridization을 실시하였다. 이때 사용한 probe DNA는 *B. thuringiensis* 균주의 전체 DNA를 주형으로 *cry1C* 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭시킨 PCR 산물을 베링거만하임사의 Dig-High Prime으로 표지한 것이다. *cry1C*-type 유전자의 PCR 증폭을 위해서 Kalman 등(11)에 의해 고안된 프라이머 GALP1(nt 871-899, 5'-CCACAGTTACAGTCTGTAGCTCAATTACC-3')과 GALP2(nt 1831-1854, 5'-CCGC TACTAATAGAACCTGCACCA-3')를 사용하였다. Hybridized DNA에 대한 판별은 The DIG System User's Guide for filter Hybridization(Boehringer Mannheim Biochemicals)에 기술된 방법에 따랐다.

Colony hybridization

제조합 플라스미드로 형질전환된 *E. coli*를 nylon membrane으로 옮긴 후 0.1% SDS가 포함된 denaturation 용액, neutralization용액 및 2X SSC 용액을 각각 15분씩 처리하고 UV를 사용하여 DNA를 고정시킨 다음 0.1% SDS가 포함된 3×SSC에서 1시간 동안 반응시켜 세포의 잔해를 제거하였다. 다음에 68°C에서 1시간 동안 prehybridization을 실시하고 probe DNA가 포함된 prehybridization 용액에 담구어 68°C에서 하룻밤동안 hybridization시켰다. 이 후의 과정은 Southern blotting과 동일하게 실시하였다.

Western blotting

Cry1C 유전자가 발현된 *B. thuringiensis*를 SDS-PAGE로 단백질을 전개시킨 후 nitrocellulose membrane에 옮기고, Maniatis 등의 방법(14)에 의해 Western blot-

ting을 수행하였다. 첫 번째 항체는 *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD198의 Cry1C 단백질에 대한 항체를 1:1000의 희석비로 사용하였고 두 번째 항체는 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG(Sigma)를 사용하였다.

Segregational stability

세포내에서 재조합 플라스미드의 안정성을 보기 위하여 Kiewiet 등(13)의 방법으로 segregational stability를 조사하였다. 재조합 플라스미드로 형질전환된 *B. thuringiensis*을 고체평판배지 상에서 연속적으로 두 번 계대배양한 후 단일 콜로니를 따서 항생제가 포함된 LB 액체배지에 접종하였다. 각각의 배양액을 항생제가 포함되지 않은 100 ml의 LB 액체배지에 10^6 배 희석되도록 접종하였다. 이것을 660 파장에서 흡광도가 0.6을 넘지 않도록 배양하면서 매 25세대(약 12시간)마다 새로운 배지에 재접종하였고, 또한 항생제가 들어있지 않은 LB 평판배지에 도말하여 30°C에서 배양하였다. 생성된 콜로니 중 약 200개의 콜로니를 임의로 선택하여 항생제가 들어있는 LB 평판배지에 옮겨서 생성되는 콜로니의 수를 세어 항생제 저항성을 가진 콜로니의 비율을 산출하였다.

결과 및 고찰

cry1C 유전자의 cloning

B. thuringiensis 분리균으로부터 *cry1C* 유전자를 클로닝하기 위하여, 앞서 설명한 방법으로 probe DNA를 합성하고 *B. thuringiensis* 분리균의 전체 DNA를 여러 제한효소로 절단하여 Southern blot을 실시한 결과, 약 4.0 kb의 *EcoRI/HindIII* 절편과 약 2.5 kb의 *HindIII* 절편이 확인되었다. 따라서, 전체 DNA를 *EcoRI/HindIII*와 *HindIII*로 각각 처리하여 플라스미드 pUC19에 삽입한 다음, colony hybridization으로 4.0 kb의 *EcoRI/HindIII* 절편과 2.5 kb의 *HindIII* 절편이 삽입된 클론을 찾았다. 4.0 kb의 *EcoRI/HindIII* 절편이 클로닝된 부분은 *cry1C* 유전자의 N-말단이 속해 있었고 2.5 kb의 *HindIII* 절편이 클로닝된 부분은 *cry1C* 유전자의 C-말단에 해당하는 부분이었다. 따라서, 우리는 두 부분으로 나누어져 있는 *cry1C* 유전자를 하나의 벡터로 다시 subcloning을 실시하였다. 4.0 kb의 *EcoRI/HindIII* 절편내에 있는 *cry1C* 유전자의 N-말단에 해당하는 부분인, 2.2 kb의 *HindII/HindIII* 절편을 pUC19에 삽입하였고, 이 재조합 플라스미드를 다시 *HindIII*로 절단하여 C-말단에 해당하는 2.5 kb의 *HindIII* 절편을 삽입하였다. 이렇게 클로닝된 *cry1C* 유전자의 제한효소 지도를 조사해본 결과 기존의 *cry1C* 유전자와 일치하였으며 이 재조합 플라스미드를 p1C라 명명하였다(data not shown).

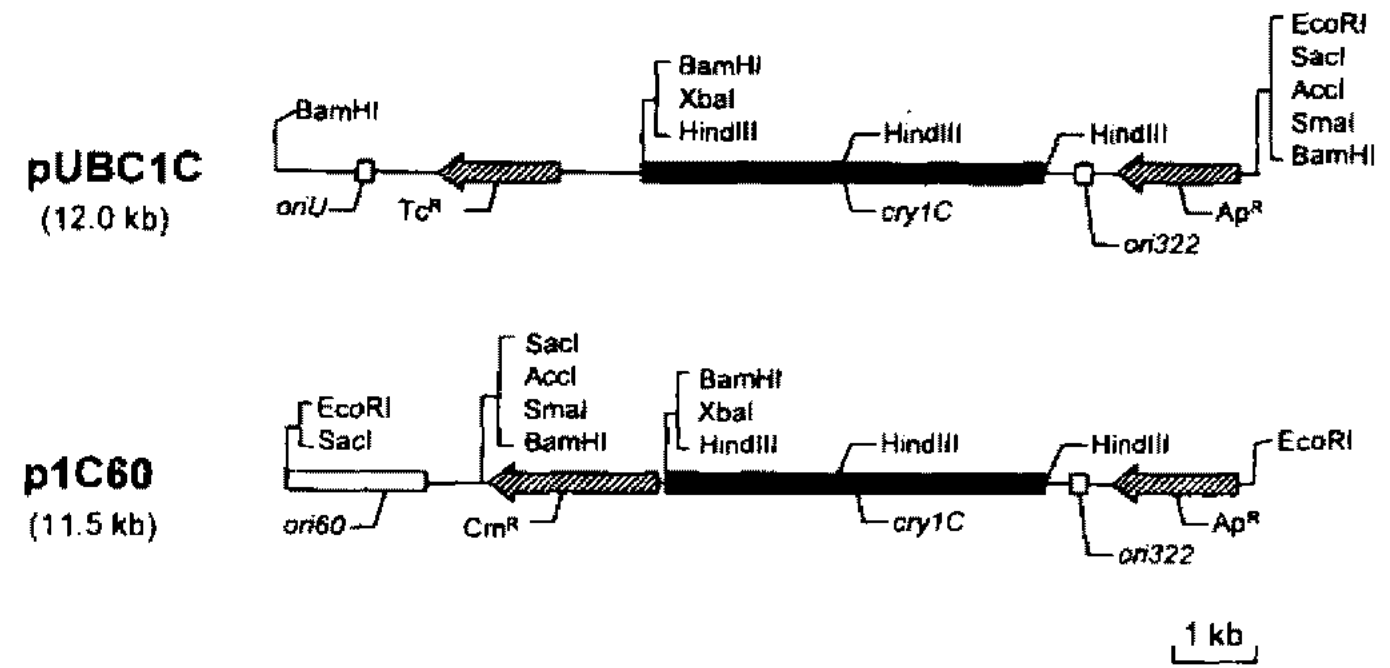


Fig. 1. Restriction maps of pUBC1C and p1C60.

The plasmid pUBC1C has a replication origin (*oriU*) of natural plasmid pBC16 from *B. cereus* and the plasmid p1C60 has a replication origin (*ori60*) of a resident 60 MDa plasmid from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD263. The black boxes indicate the *cry1C* genes, dashed arrows are antibiotics resistance genes and open boxes are replication origins.

발현벡터의 제작

클로닝된 *cry1C* 유전자를 *B. thuringiensis* 내에서 안정하게 발현시키기 위하여 rolling-circle 기작으로 복제되는 셔틀벡터와 theta 형태의 기작으로 복제되는 두 가지 셔틀벡터를 제작하였으며 이들의 세포 내에서의 안정성과 이들을 통한 *cry* 유전자의 발현정도를 비교하였다.

pUBC1C Rolling-circle 기작으로 복제되는 것으로 알려진 작은 플라스미드의 복제기원을 가진 셔틀벡터를 만들기 위하여 생화학적으로 *B. thuringiensis*와 가장 가까운 균주로 알려진 *B. cereus*에서(19) 분리한 플라스미드 pBC16을 이용하였다. pBC16을 *Bam*HI로 절단하여 이미 만들어진 플라스미드 p1C에 삽입하여 pUBC1C를 만들었다(Fig. 1). pUBC1C는 *B. cereus*의 복제기원과 *E. coli*의 복제기원, tetracycline 저항 유전자, ampicilline 저항 유전자, 그리고 *cry1C* 유전자를 포함하고 있다.

p1C60 *B. thuringiensis*는 theta 형태의 복제기작을 가지는 고유의 큰 플라스미드들을 다수 가지고 있으며 이들 플라스미드들의 복제기원에 대한 염기서열이 보고된 바 있다(3). 이 중 *B. thuringiensis* HD263이 가지고 있는 60 MDa 플라스미드의 복제기원(*ori60*)을 이용한 셔틀벡터를 만들기 위해 두가지 프라이머, 5'-CCCGAGCTCGATCACGATATTAATAAATTA-3' 및 5'-CCCGAGCTCGACCTACTCAAAAATCCCT-3',를 제작한 후 HD263의 전체 DNA로부터 *ori60*을 증폭하였다. 증폭된 2.3 kb의 절편과 *B. thuringiensis*에서 이용할 수 있는 chloramphenicol 저항성 유전자를 앞서 제작된 플라스미드 p1C에 삽입하여 p1C60을 만들었다(Fig. 1).

Cry1C 단백질의 확인

두가지 재조합 플라스미드, pUBC1C 및 p1C60를 electroporation 방법을 사용하여 *B. thuringiensis* subsp.

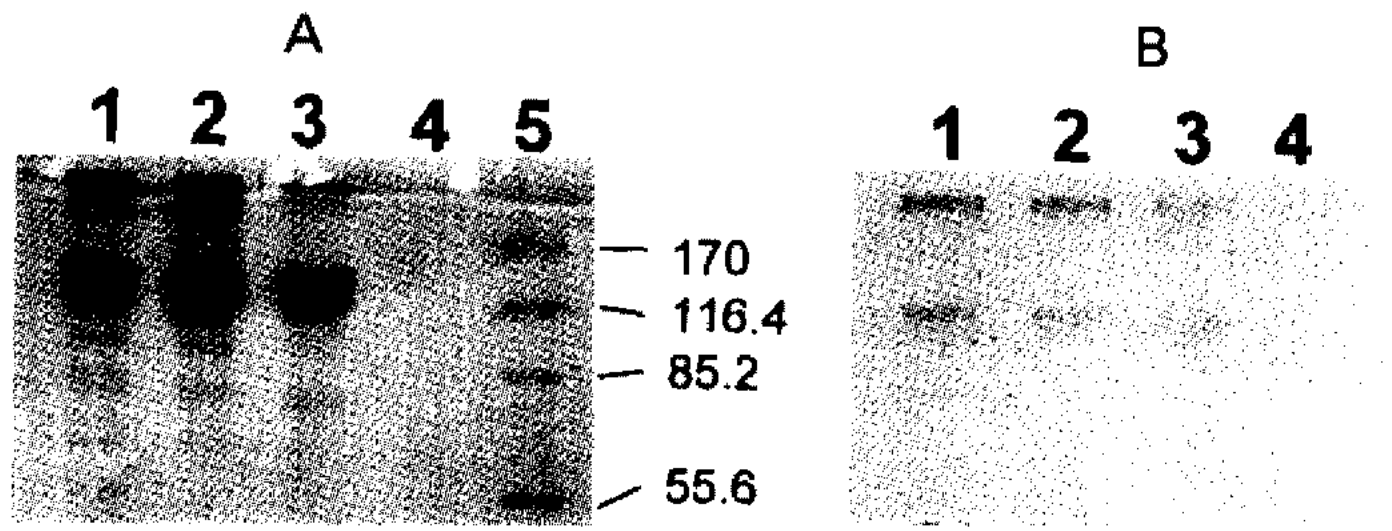


Fig. 2. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of Cry 1C protein from native and transformed *B. thuringiensis*. lane 1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* *cryB*⁻ strain harboring p1C60; lane 2, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* *cryB*⁻ strain harboring pUBC1C; lane 3, *B. thuringiensis* isolate harboring *cry1C* gene; lane 4, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* *cryB*⁻ strain; lane 5, SDS-PAGE protein size standard.

kurstaki *cryB*⁻ 균주에 도입하여 포자형성을 유도한 후 위상차 현미경하에서 관찰하였을 때 두 가지 경우 모두 크고 뚜렷한 독소 단백질 결정체를 형성하고 있었다. 이를 SDS-PAGE상에서 단백질 밴드를 분석한 결과, Cry 1C 단백질과 동일한 분자량을 가진 약 130 kDa의 단백질 밴드가 나타났고(Fig. 2A), Cry1C에 특이적인 항체를 이용한 Western blot analysis에서 이 단백질 밴드가 Cry1C 단백질임을 확인하였다(Fig. 2B). 또한 배추좀나방을 이용한 살충성검정을 수행한 결과 발현된 두가지 단백질 모두 살충활성을 가지고 있음을 알 수 있었다 (data not shown). 따라서 두 벡터는 모두 *B. thuringiensis*에서 성공적으로 *cry1C* 유전자를 발현하여 독소 단백질 결정체를 형성함을 알 수 있었다.

플라스미드 안정성 조사

형질전환된 후 플라스미드 pUBC1C 및 p1C60이 얼마나 안정하게 *B. thuringiensis*내에서 유지되는지를 알아보기 위하여 segregational stability를 시험한 결과, pUBC1C는 25 세대에서 항생제 저항 균주가 59%로 줄어 들었고, 75 세대에서는 2%까지 떨어졌다. 그러나 p1C60은 25세대에서 96%가 유지되었고, 125 세대에서도 92%까지 유지되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 theta 형태의 기작으로 복제하는 플라스미드가 rolling-circle 기작으로 복제하는 것보다 세포내에서 더 안정하게 유지되는 것을 보여준다. 이는 산업균주의 개발이라는 측면에서 볼 때 theta 형태의 복제기작을 가진 플라스미드를 이용한 재조합균주의 개발이 rolling-circle 복제기작을 가진 플라스미드를 이용한 것보다 더 유리함을 의미한다.

*B. cereus*에서 유래된 플라스미드 pBC16은 *Bacillus*에서 일반적으로 널리 사용되는 플라스미드인 pUB110과 DNA 염기서열상 높은 상동성을 가지고 있는데(81%) 특히 복제기원의 염기서열은 정확히 일치하고 있다. 따라서 플라스미드 pBC16 뿐만 아니라 pUB110을 이용한 재조합 플라스미드 역시 *B. thuringiensis* 내에서 안정성

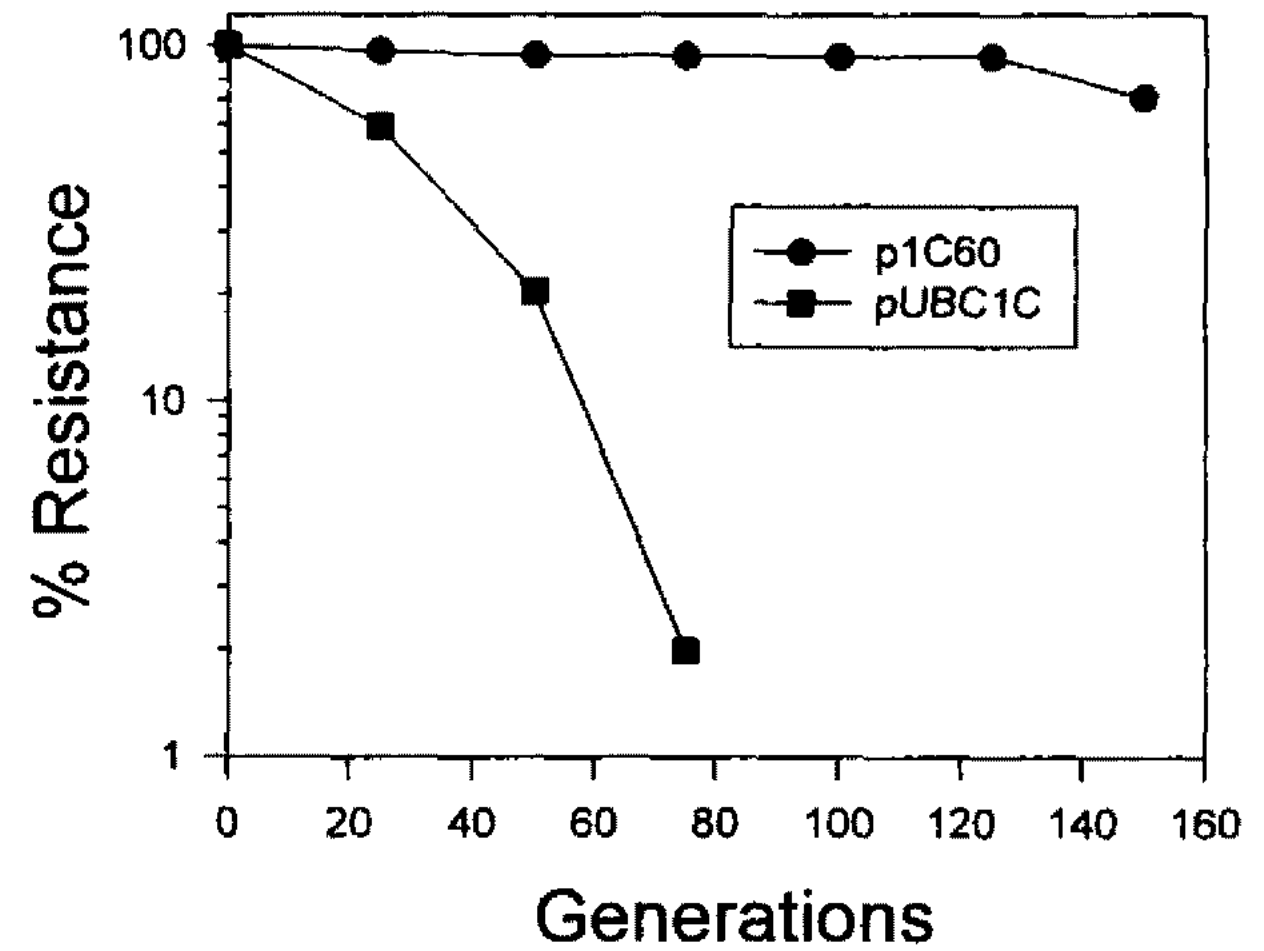


Fig. 3. Segregational stabilities of the plasmid pUBC1C and p1C60 in *B. thuringiensis*.

Exponentially growing cultures of plasmid-carrying *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* *cryB*⁻ strains in medium with antibiotics were diluted in antibiotic-free medium and subcultured for approximately 150 generations. After every 25 generations, samples were plated onto nonselective agar. Colonies were subsequently assayed for resistance to antibiotics after transfer to selective plates. Symbols: ■, pUBC1C; ●, p1C60.

이 낮음을 예상할 수 있으며 이들을 이용한 산업균주의 개발은 그 효용성이 낮음을 추측할 수 있다. 한편 *ori60*의 복제기원을 가진 재조합 플라스미드 p1C60이 *B. thuringiensis*에만 특이적으로 작용하는지를 알아보기 위하여 플라스미드 p1C60을 *B. subtilis*에 도입시켰지만 transformant를 얻을 수가 없었다. 이러한 결과는 *B. thuringiensis* 고유의 플라스미드에서 유래된 복제기원 *ori60*은 *B. thuringiensis*에서만 작용할 가능성이 크다는 것을 추측할 수 있다.

요 약

살충 스펙트럼이 넓은 *B. thuringiensis* 균주를 개발하기 위해 난방제해충인 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 살충활성을 가지고 있는 *cry1C* 유전자를 *B. thuringiensis* 분리균으로부터 클로닝하였고 이를 *B. thuringiensis* 내에서 안정하게 유지되는 벡터를 이용해 발현시키고자 두가지 플라스미드, pUBC1C와 p1C60,를 제작하였다. 플라스미드 pUBC1C는 *B. cereus*에서 분리한 플라스미드 pBC16을 이용하여 제작하였고 플라스미드 p1C60은 *B. thuringiensis* HD263이 가진 60 MDa 플라스미드의 복제기원을 이용하여 제작하였다. 이 두가지 플라스미드를 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* *cryB*⁻ 균주에 도입하여 포자형성을 유도한 후 위상차 현미경하에서 관찰하였을 때 두 가지 경우 모두 크고 뚜렷한 독소 단백질 결정체를 형성하고 있었으며 이를 SDS-PAGE 및 Western blot analysis을 통하여 발현된 단백질이 Cry1C 단백질임을

확인하였다. 또한 세포내에서 두 플라스미드의 안정성을 시험한 결과, pUBC1C는 세포내에서 불안정하였으나 *B. thuringiensis* 고유의 복제기원을 가진 p1C60은 세포내에서 매우 안정하였다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 과학기술처 선도기술 개발사업 연구비지원(HS1230)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Arantes O. and D. Lereclus. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* **108**: 115-119.
- Baum J. A., M. Dolores, M. Coyle, Pearce Gilbert, Christine S. Jany, and Cynthia Gawron-Burke. 1990. Novel cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3420-3428.
- Baum J. A. and M. Pearce Gilbert. 1991. Characterization and comparative sequence analysis of replication origins from three large *Bacillus thuringiensis* plasmids. *J. Bacteriol.* **173**: 5280-5289.
- Bron S., S. Holsappel, G. Venema, and B.P.H. Peeters. 1990. Plasmid deletion formation between short direct repeats in *Bacillus subtilis* is stimulated by single-stranded rolling-circle replication intermediates. *Mol. Genet.* **226**: 88-96.
- Crickmore N., C. Nicholls, D. J. Earp, T. C. Hodgman, and D. J. Ellar. 1990. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expression novel entomocidal delta-endotoxin combinations. *Biochem. J.* **270**: 133-136.
- Fisher H. M., P. Luthy, and S. Schweitzer. 1988. Introduction of plasmid pC194 into *Bacillus thuringiensis* by protoplast transformation at plasmid transfer. *Arch. Microbiol.* **139**: 213-217.
- Gamel P. H. and Jean-Christophe Piot. 1992. Characterization and properties of a novel plasmid vector for *Bacillus thuringiensis* displaying compatibility with host plasmids. *Gene* **20**: 17-26.
- Inoue Hiroaki, Hiroshi Nojima, and Hiroroto Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Janniere L. and S. D. Ehrlich. 1987. Recombination between short repeated sequence is more frequent in plasmids than in the chromosome of *Bacillus subtilis*. *Mol. Genet.* **210**: 116-121.
- Janniere L. C. Bruand and S. D. Ehrlich. 1990. Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors. *Gene* **87**: 53-61.
- Kalman S., Kristine L. Kiehne, L. John and Takashi Yamamoto. 1993. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1131-1137.
- Kalman S., Kristine L. Kiehne, Nicole Cooper, Mitra Shahabi Reynoso, and Takashi Yamamoto. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3063-3065.
- Kiewiet R., Jan Kok, Jos F. M. L. Seegers, Gerard Venema, and Sierd Bron. 1993. The mode of replication is a major factor in segregational plasmid instability in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 358-364.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.
- McDowell D. G. and N. H. Mann. 1991. Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* strain HD1-DIPEL. *Plasmid* **25**: 113-120.
- Miteva V. I. and R. T. Grigorova. 1988. Construction of a bifunctional genetically labelled plasmid for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *An. Microbiol.* **150**: 496-498.
- Palva A., Gabriele Vidgren, Marjo simonen, Helena Rintala and Paivi Laamanen. 1990. Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pBC16 from *Bacillus cereus*. *Nucleic Acids Research.* **18**: 1635.
- Schurter W., M. Geiser, and D. Mathe. 1989. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* via electrophoration: transformation of acrySTALLIFEROUS strains with a cloned delta-endotoxin gene. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 177-181.
- te Giffel MC, RR Beumer, N Klijn, A Wagendo and FM Rombouts. 1997. Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**: 47-51.

(Received 6 May 1997)