

苏芸金杆菌的质粒检测及载晶体蛋白合成基因的质粒在不同菌株间的传递

李 荣 森

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

分析了苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 7 个变种 19 个野生菌株及无晶体 (sp^+cr^-) 和无芽孢 (sp^-cr^+) 突变株的质粒图型,证实了苏芸金杆菌的质粒组成既有变种的特异性,亦有菌株的特异性。载有晶体蛋白合成基因的质粒, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-191 菌株可能为 42 和 50Mdal, *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD-282 菌株为 47Mdal, *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS-82 菌株为 57Mdal 的质粒,而 *B. thuringiensis* var. *wuhanensis* 140 菌株的此种基因则可能不在质粒上而在染色体中。HD-191 载晶体蛋白合成基因的质粒以很高频率被传递给其无晶体突变株 HD-1 并在后者细胞中表达。 *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS-82 菌株和 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 无晶体突变株 HD-1 之间载晶体蛋白合成基因质粒的传递未能成功,提示可能存在着不相容性的障碍。

关键词 质粒;结合;晶体

苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 因能产生对多种昆虫具高毒力的晶体蛋白质和芽孢毒性蛋白质,因而在虫害防治中被广泛应用^[1]。自 1979 年以来,已逐步查明,除少数变种外,苏芸金杆菌的大多数变种其晶体蛋白合成基因位于质粒上^[2-6,10],先后实现了某些苏芸金杆菌菌株之间及该菌与它种细菌之间携带晶体蛋白合成基因质粒的转移^[5,7-9]。通过分子克隆,苏芸金杆菌的晶体蛋白合成基因已在某些非产品体细菌如 *Escherichia coli* 和 *Bacillus subtilis* 的细胞内获得表达^[8,10-11]。本文目的在于分析苏芸金杆菌的质粒组成,查明供试菌株编码晶体蛋白基因所在的质粒,并了解其在不同变种和不同菌株间传递的特性和条件。

材 料 与 方 法

(一) 材料

1. 苏芸金杆菌菌株: 共 7 个变种的 19 个菌株,包括武汉杆菌变种(*Bacillus thuringiensis* var.

wuhanensis) 140、HD-573 及 140-A;苏芸金杆菌变种(*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*) HD-2;库斯塔杆菌变种(*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) HD-191、HD-1 (无晶体突变株 sp^+cr^-);蜡螟杆菌变种(*B. thuringiensis* var. *galleriae*) 8-25;松毛虫杆菌变种(*B. thuringiensis* var. *dendrolimus*) HD-35;鮎泽杆菌变种(*B. thuringiensis* var. *aizawai*) HD-282、HD-282-M (sp^+cr^-)、HD-137 (sp^-cr^+)、HD-11;以色列杆菌变种(*B. thuringiensis* var. *israelensis*) IPS-82、HD-500、HD-563、HD-567 及其无晶体自然突变株 HD-653、HD-654、HD-655、HD-658、HD-659。以上菌株除 140 得自中国科学院武汉病毒研究所,IPS-82 得自 Dr. De Barjac, 8-25 自美国 90TS-8-25 蜡螟杆菌 BT 工业制剂中分离出而外,其它均来自 Dr. Dulmage。

2. 生化试剂: 溶菌酶 42000 单位/mg, 蛋白酶 5.4 单位/mg, RNaseA85 Kunitz 单位/mg, 溴化乙锭(以上皆系 Sigma 产品);电泳纯琼脂糖(BRL 产品);聚丙烯酰胺及甲叉双丙烯酰胺(BDH

本文于 1985 年 4 月 5 日收到。

产品);葡聚糖 1500 (瑞典 Pharmacia 产品);牛心汁琼脂 (Difco 产品);营养琼脂 (Oxoid 产品)。

(二) 方法

1. 细菌培养: 用于质粒图型分析的各菌株的斜面菌体接种于牛心汁琼脂平板上, 于 30℃ 培养约 14 小时。用于制备晶体的菌体培养于 PWYE 液体培养基 (蛋白胨 5%, 酵母汁 0.1%, NaCl 0.5%, pH7.5) 中。质粒消除试验中, 细菌培养于营养琼脂平板上 42℃ 72 小时, 或培养于 PWYE 液体培养基中, 30℃ 振荡培养直至形成芽孢和晶体。

2. 晶体提纯: 制备较大量晶体时, 首先参照 Sharpe 等^[13] 方法以无明胶的泡沫法除去部分芽孢, 经葡聚糖和聚乙二醇双相法^[13] 由下相中获得粗提纯晶体, 经 30—70% 溴化钠梯度密度离心^[14], 再经紫外线照射 4 小时^[15] 即可得到纯度达 99.990—99.999% 的晶体。制备少量晶体时, 以 45—87% 的蔗糖不连续梯度密度离心二次 (Beckman L5-50B 超速离心机, SW-28 转头, 80,000g 离心 14—15 小时), 即可由 60—65% 的梯度中抽出浓重乳白的纯晶体带。

3. 质粒 DNA 制备: 基本按 Eckhardt 法^[16] 进行, 取培养菌体 (30℃ 下于营养琼脂或牛心汁琼脂平板上培养 14—16 小时) 一环 (约含细胞 10^8 个) 接种于 0.7ml 含溶菌酶的 TES 缓冲液 (30 mM Tris, 5 mM EDTA, 20% 的含 2mg/ml 溶菌酶的蔗糖, pH8.0) 的小试管中, 充分混匀并于 30℃ 培育 30 分钟 (按相差显微镜下观察时绝大部分细胞裂解为度), 每管中加入 0.1 ml RNA 酶 A (10μg/ml) 和 0.1ml 5mg/ml 的蛋白酶溶液。上述酶皆临用时先溶于 TES 缓冲液中。然后在每管的溶菌物中加入 0.1ml 10% 的 SDS, 温和地将每个试管倒顺 3—5 次, 随之将各管在 30℃ 下保温约 30 分钟。而后, 试管于 RC-5B 冷冻高速离心机 SS34 转头上 4℃ 下以 40,000g 离心 15 分钟, 在试管上层形成清亮的质粒 DNA 粗提液。

4. 琼脂糖凝胶电泳: 水平电泳参照 Jarret^[17] 所述, 每取 60μl 质粒 DNA 样品于样品孔中, 琼脂糖凝胶浓度为 0.65%, 溶于 TBE 缓冲液 (89 mM Tris, 2.5mM EDTA, 89mM 硼酸, pH8.4), 凝胶板大小为 20×20×0.3cm, 以 TBE 为电泳

缓冲液, 在 12—20mA 泳动 18—20 小时。水平琼脂糖凝胶电泳主要用以检查低分子量质粒。垂直电泳以改进的 Eckhardt^[16] 法进行, 每取 50μl 质粒 DNA 样品加入样品孔中, 凝胶板为 15×15×0.2cm, 以 0.5% 的琼脂糖溶于 TBE 缓冲液制备凝胶, TBE 缓冲液为电泳缓冲液, 以 3—4mA 泳动 1.5 小时, 8—10mA 2 小时, 25mA 2—3 小时。此法主要用以检出高分子量质粒。为快速检测亲株和转化株的质粒图谱, 使用了微型琼脂糖凝胶电泳, 凝胶大小为 10×10×0.1cm, 每取 8μl 质粒 DNA 样品注入样品孔中, 5mA 泳动 40 分钟, 13mA 泳动 2 小时。上述经电泳后的凝胶板用 TBE 缓冲液的 0.5μg/ml 的溴化乙锭染色, 凝胶经洗涤后在波长 254nm 的紫外灯下观察并照相。

5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 此种电泳用以分析转化株和亲株产生的晶体蛋白质多肽成分, 参照 Laemmli 法^[18] 进行。上层凝胶浓度为 3.0%, 下层为 10%, 凝胶板为 14.5×14.5×0.15cm; 溶晶样品缓冲液: 50mM Tris-HCl (pH7.5), 1% SDS, 25mM 二硫苏糖醇, 2mM 氟化苯基磺酰甲烷 (PMSF), 1mM EDTA, 10% 甘油, 0.0025% 溴酚兰。电泳缓冲液: Tris 0.6%, 甘氨酸 2.88%; SDS 0.1% (W/V)。于 20—40mA 泳动 3.5 小时后, 凝胶在含 0.1% 考马斯亮兰的甲醇-醋酸-水 (5:1:5) 溶液中染色, 在乙醇-醋酸-水 (10:7.5:82.5) 溶液中脱色。

6. 结合试验: 以 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 野生株 HD-191 为供体, HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$) 为受体的结合试验中, 首先选育出 HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$) 的抗链霉素 (100μg/ml 培养基) 的抗药株。二菌株先分别在牛心汁 (BHI) 琼脂上培养过夜, 然后混合培养于 BHI 培养基中过夜, 挑取琼脂平板上的菌体于含 100μg/ml 链霉素的营养琼脂平板上划线接种, 30℃ 下培养至少 48 小时, 然后在相差显微镜下逐个检查每一个菌落的菌体, 挑选出能形成晶体和芽孢的单菌落, 即转化子, 并进行质粒图型分析。 *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS-82 菌株和 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$) 菌株之间的结合试验, 方法基本同上。

7. 质粒消除: 为获得无晶体突变株, 以 *B. thuringiensis* var. *wuhanensis* 的 140 菌株为材料, 以两种方法进行质粒消除试验。高温培养法:

菌体划线接种于营养琼脂平板上, 42℃培养 72 小时; SDS 处理: 添加 0.002% 和 0.01% SDS 于 PWYE 液体培养基中, 经培养后再将菌体划线接种于营养琼脂平板上。经上述培养后, 参照 Gonzalez^[2] 的结果, 首先挑出特征性的变异菌落进行镜检, 并对所有出现的单个菌落逐一进行镜检, 观察其晶体和芽孢形成情况, 最后筛选出无晶体突变株并分析其质粒图型。

结 果

(一) 质粒图谱分析

水平琼脂糖凝胶电泳的结果(图 1, 2)

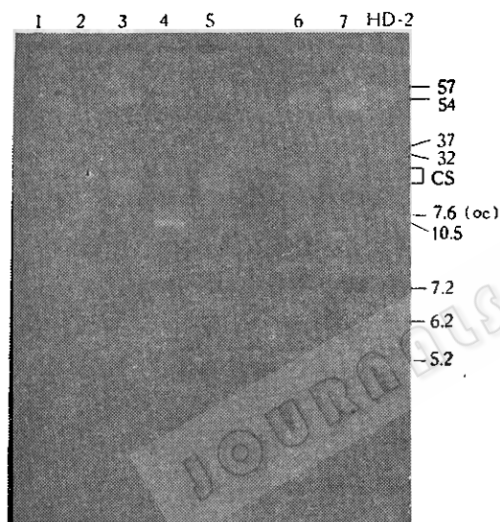


图 1 7 种苏芸金杆菌的质粒图型(水平电泳)

Fig. 1 Plasmid patterns of seven strains of *Bacillus thuringiensis* by agarose gel electrophoresis (horizontal electrophoresis)

1. 140(*Bacillus thuringiensis* var. *wuhanensis*);
2. 8-25 (*B. thuringiensis* var. *galleriae*);
3. HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$);
4. HD-191 (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*);
5. HD-282;
6. HD-282-M($sp^{+}cr^{-}$);
7. HD-11 (*B. thuringiensis* var. *aizawai*);
- HD-2 (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*), plasmid standard

CS: Chromosome DNA; oc: Open circular plasmid

图右边所标数字系以 Mdal 为单位的质粒 DNA 的分子量

The molecular weight of plasmids in Mdal were indicated on the right of the figure

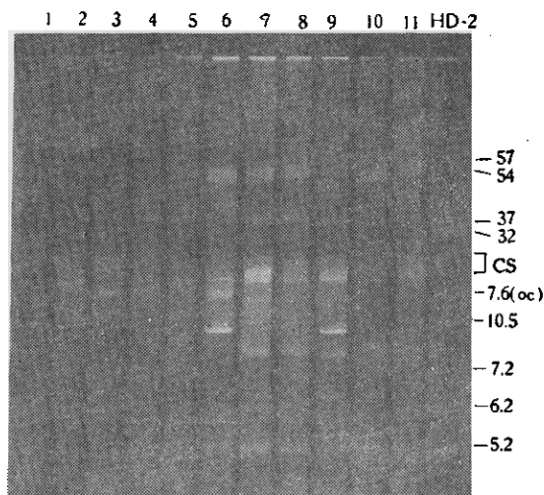


图 2 苏芸金杆菌 11 个菌株的质粒图型(水平电泳)

Fig. 2 Plasmid patterns of eleven strains of *Bacillus thuringiensis* by agarose gel electrophoresis (horizontal electrophoresis)

1. 140; 2. HD-573;
3. 140-A (*B. thuringiensis* var. *wuhanensis*);
4. 8-25 (*B. thuringiensis* var. *galleriae*);
5. HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$);
6. HD-191 (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*);
7. HD-282;
8. HD-282-M($sp^{+}cr^{-}$);
9. HD-137($sp^{-}cr^{+}$);
10. HD-11 (*B. thuringiensis* var. *aizawai*);
11. HD-35 (*B. thuringiensis* var. *dendrolimus*);
- HD-2 (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*), plasmid standard;

CS: Chromosome DNA; oc: Open circular plasmid

图右边数字系以 Mdal 为单位的质粒 DNA 分子量

The molecular weight of plasmids in Mdal were indicated on the right of the figure

表明, 苏芸金杆菌的质粒组成是极其多样化的, 不仅不同变种间而且同一变种不同菌株间, 其质粒组成也不同。此种条件下的电泳对高分子量质粒(位于染色体 DNA 模糊带以上)的分离效果较差, 而对低分子量质粒(位于染色体 DNA 模糊带以下)的分离效果较好, 故低分子量质粒组成的差异能清楚地显示出来。HD-282(图 1-5)有多达 8 条质粒带, 140(图 1-1)仅有 3 种

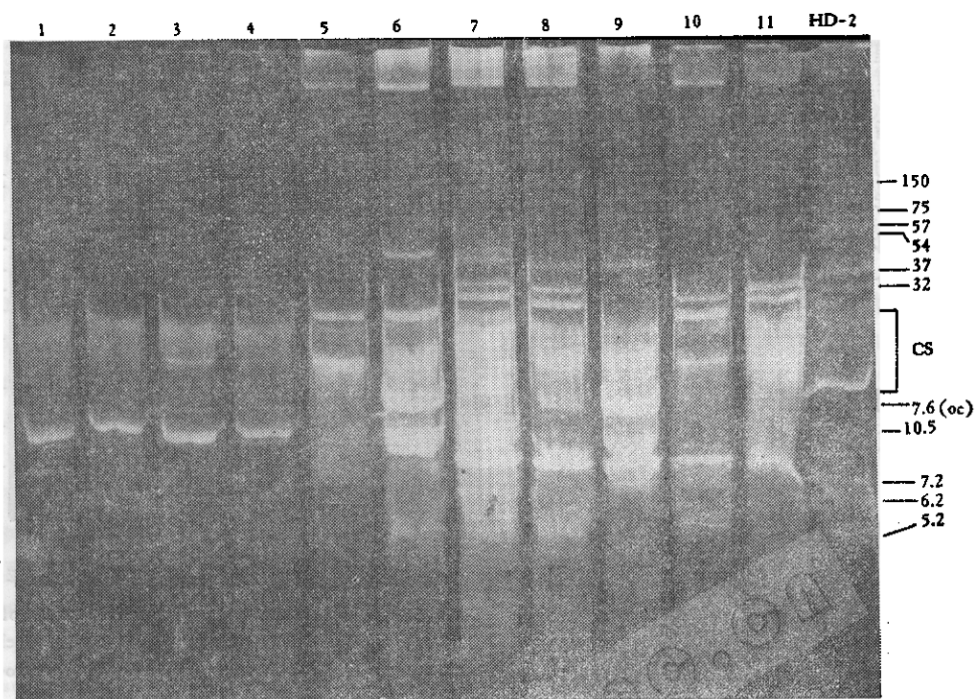


图 3 苏芸金杆菌 11 个菌株的质粒电泳图型(垂直电泳)

Fig. 3 Plasmid patterns of eleven strains of *Bacillus thuringiensis* by agarose gel electrophoresis (vertical electrophoresis)

1. 140; 2. HD-573; 3. 140-A (*B. thuringiensis* var. *wuhanensis*); 4. 8-25 (*B. thuringiensis* var. *galleriae*); 5. HD-1($sp^{+}cr^{-}$); 6. HD-191 (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*); 7. HD-282; 8. HD-282-M($sp^{+}cr^{-}$); 9. HD-137; 10. HD-11 (*B. thuringiensis* var. *aizawai*); 11. HD-35 (*B. thuringiensis* var. *dendrolimus*);

HD-2 (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*), plasmid standard;

CS: Chromosome DNA; oc: Open circular plasmid

图右边数字系以 Mdal 为单位的质粒 DNA 分子量

The molecular weight of plasmids in Mdal were indicated on the right of the figure

质粒, HD-35 (图 2-11)除 1 条可能为高分子量质粒带外,未见任何低分子量质粒带。HD-282 (图 1-5)和 HD-11 (图 1-7)同属 *B. thuringiensis* var. *aizawai*,但互相缺少对方所具有的 1 种或 2 种低分子量的质粒。不同来源的 *B. thuringiensis* var. *wuhanensis* 的菌株中,140 和 HD-573 (图 2-1.与 2)具相同的质粒图谱,而 140-A 则多 1 条约 10 Mdal 的质粒带。值得注意的是 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 的无晶体突变株 HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$) (图 1-3)来源于

HD-191 (图 1-4),二者不但低分子量质粒组成不同,而且高分子量质粒的组成也不同,HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$) 缺少后者所具有的分分子量约为 47 Mdal 和 50 Mdal 的两种质粒。武汉杆菌变种的 140 及 140-A 和蜡螟杆菌变种的 8-25 的质粒组成相同 (图 1 及图 2)。 *B. thuringiensis* var. *aizawai* 的无晶体突变株 HD-282-M ($sp^{+}cr^{-}$) (图 1-6)来源于野生株 HD-282 (图 1-5),它们的质粒图谱表现相同,这要进一步用垂直凝胶电泳验证。据已有报道^[2-4,10,19-20]苏芸金杆

菌的晶体蛋白合成基因皆位于高分子量(> 30 Mdal)的质粒上,故垂直琼脂糖凝胶电泳的质粒 DNA 图型对于确定编码晶体蛋白基因的所在质粒有重要意义。

垂直琼脂糖凝胶电泳结果(图 3)显示出 11 个苏芸金杆菌菌株的高分子量质粒组成有明显差异。*B. thuringiensis* var. *kurstaki* 的野生株 HD-191 较由其衍生的突变株 HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$) 多 3 条分子量分别为 37、42 及 50 Mdal 的质粒 DNA 带(图 3-5 与 6)。已报道 50 Mdal 的质粒与 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 的晶体形成有关^[2], 44 Mdal 的质粒与 HD-263 的晶体形成有关^[19];根据本结果, HD-191 的 37、42 及 50 Mdal 3 种质粒中的至少 1 种与其晶体形成有关。*B. thuringiensis* var. *aizawai* 的 HD-282 (图 3-7)虽较其无晶体突变株 HD-282-M ($sp^{+}cr^{-}$) (图 3-8)少了分子量为 54 和 50 Mdal 的两条质粒带,但多了 1 条约 47 Mdal 的质粒带,故此质粒可能决定着 HD-282 的晶体蛋白质的形成。*B. thuringiensis* var. *wuhanensis* 的 3 个菌株(图 3-1—3)在此种条件下未显示高分子量质粒 DNA 带的存在。

B. thuringiensis var. *israelensis* 野生株 IPS-82、HD-500、HD-563 及 HD-567 (图 4-1—4) 和其在保藏状态下丧失产晶体能力的自然突变株 HD-653、HD-654、HD-655、HD-658 及 HD-659 (图 4-5—9) 的质粒图型分析表明,所有野生株皆具有 57 及 54 Mdal 的两种高分子质粒,而不产晶体的突变株或失去 57 Mdal 的质粒(图 4-6 与 7),或失去 57 和 54 Mdal 两种质粒(图 4-6 与 9)。HD-658 (图 4-8) 表现出特别不同的质粒图型,经进一步鉴定证明,此菌系蜡状芽孢杆菌(推测是保藏或转接时污染所致)。此结果表明:(1) *B. thuringiensis* var. *israelensis* 各供试菌株晶体的形

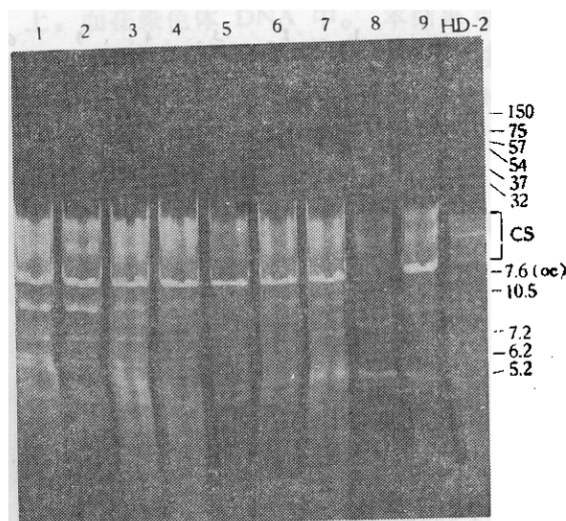


图 4 *B. thuringiensis* var. *israelensis* 的野生株及无晶体自然突变株质粒的电泳图型

Fig. 4 Plasmid patterns of wild strains and spontaneous acrySTALLIFEROUS mutants of *B. thuringiensis* var *israelensis* by agarose gel electrophoresis (vertical electrophoresis)

野生株: Wild strains: 1. IPS-82; 2. HD-500; 3. HD-563; 4. HD-567;

无晶体自然突变株: Spontaneous acrySTALLIFEROUS mutants: 5. HD-653; 6. HD-654; 7. HD-655; 8. HD-658; 9. HD-659; HD-2. Plasmid standard; CS: Chromosome DNA; oc: Open circular plasmid

图右边数字表示以 Mdal 为单位的质粒 DNA 分子量

The molecular weight of plasmids in Mdal were indicated on the right of the figure

成与 57 Mdal 的质粒有关;(2) 此变种的晶体蛋白质基因所在的质粒在细胞内处于不稳定状态。

(二) 质粒的传递

在以 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 的野生株 HD-191 为供体,以 HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$, 抗链霉素 str^R) 为受体的结合试验中,获得了抗链霉素而又产晶体的转化子,转化率达 31.2% (由 90 个单菌落中检出 29 个转化菌落)。质粒的电泳图型(图 5)表明,

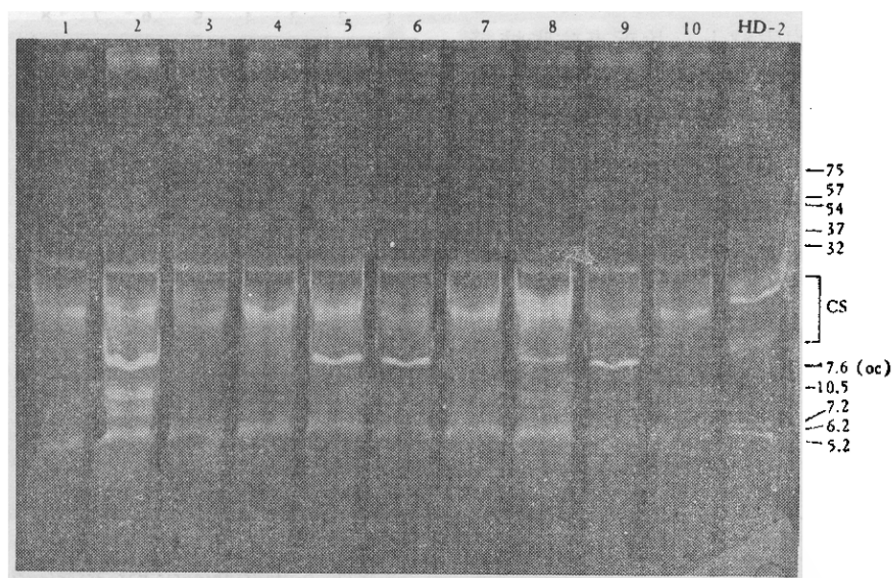


图 5 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$), HD-191 及其转化子的质粒电泳图型

Fig. 5 Plasmid patterns of HD-1($sp^{+}cr^{-}$), HD-191 (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) and their transformants by agarose gel electrophoresis

1. HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$), 受体 Recipient; 2. HD-191, 供体 Donor; 3—10. 转化子 Transformants; HD-2. 质粒标准 Plasmid standard

图右数字表示以 Mdal 为单位的质粒 DNA 分子量

The molecular weight of plasmids in Mdal were indicated on the right of the figure

HD-191 的 50 Mdal 的特定质粒已转入受体菌 HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$) 中。在以 *B. thuringiensis* var. *israelensis* 的 IPS-82 为供体, 以 HD-1 ($sp^{+}cr^{-}$) 为受体的质粒传递试验中, 质粒转移未能实现。

(三) 质粒消除试验

以 *B. thuringiensis* var. *wuhanensis* 140 菌株进行的质粒消除试验中, 无论 SDS 或 42℃ 下培养皆未获得不产晶体的突变株。处理前、后的菌株所产晶体具有相同的蛋白质多肽成分 (图 6)。

讨 论

苏芸金杆菌的质粒组成不仅在不同变种间而且同一变种的不同菌株间亦有差异, 而且从已有的报道和本研究中看出, 编

码晶体蛋白质的基因系位于高分子量 (> 30 Mdal) 质粒中。因此, 在研究苏芸金杆菌的晶体蛋白质合成基因定位于何种质粒时, 重点应考查其高分子量质粒组成的异同。此外, 在进行此种研究时, 采用野生株和由其直接衍生出的无晶体突变株是必要的, 否则会导致模糊不清的结果。

同一变种内的野生株及其无晶体突变株之间, 结合作用易于进行, 因而承载晶体蛋白合成基因的质粒能以很高频率进行传递而使后者获得产晶体的能力; 而不同变种之间质粒传递作用则难以进行 (或者可能是质粒被传递而基因不表达)。这一事实表明, 细菌的亲缘关系对质粒传递作用有相当大的影响, 亲缘关系越远, 传递作用的障碍越大。这意味着以结合方法获得

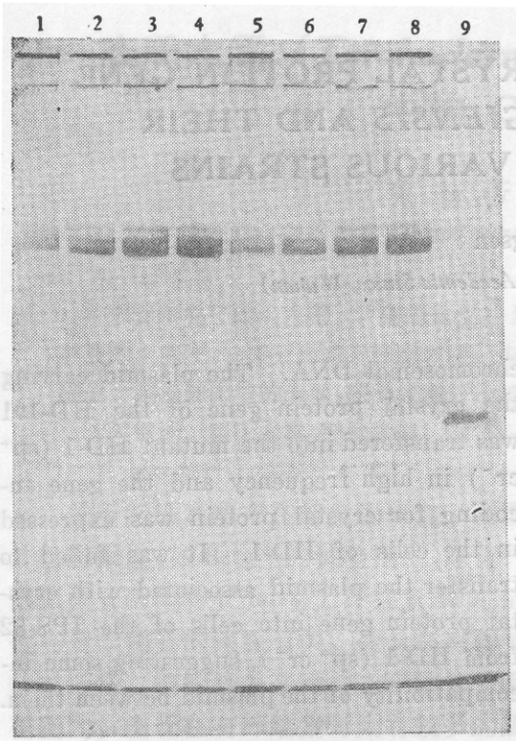


图 6 SDS 和高温培养(42°C)处理前后 140 菌株 (*B. thuringiensis* var. *wuhanensis*) 晶体的多肽的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图型

Fig. 6 SDS-PAGE patterns of polypeptides of crystals from 140 (*B. thuringiensis* var. *wuhanensis*) treated by SDS and growth under high temperature (42°C)

1,5.处理前的 140 晶体; 2,3,4. 0.01% SDS 处理后 140 的晶体; 6,7,8. 高温培养后的 140 晶体; 9. 蛋白质标准, 从上至下: 牛血清清蛋白 (M. W. 66,000), 卵清蛋白 (M. W. 45,000), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (M. W. 36,000)

1,5. Original crystals; 2,3 and 4. Crystals of strain 140 after treatment by 0.01% SDS in nutrient broth for 20 h; 6,7 and 8. Crystals of strain 140 after growth under 42°C in nutrient agar for 72 h; 9. Protein standards (from top to bottom): albumin bovine (M. W. 66,000), ovalbumin (M. W. 45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (M. W. 36,000)

苏芸金杆菌转化子有一定限度。

用对许多苏芸金杆菌有效的质粒消除方法并不能使 *B. thuringiensis* var. *wuhanensis* 140 菌株丧失形成晶体的能力, 提示该菌的晶体蛋白合成基因可能不在质粒

上, 而在染色体 DNA 中。本结果可与 Kronstad 等的结果^[6]相对应, 他们在用由一克隆晶体蛋白基因得到的 732 个碱基对的 *EcoRI*-F 片段作杂交探针的试验中指出, 杂交作用仅发生于 *B. thuringiensis* var. *wuhanensis* 的染色体 DNA 及一分子量为 5.2 Mdal 的小质粒。

参 考 文 献

- [1] Falcon, L. A.: Microbial Control of Insect and Mites, eds, Burges, H. D. and N. W. Hussey, Academic Press, p. 72-73, 1971.
- [2] Gonzalez, J. M. et al.: *Plasmid*, 5: 351-365, 1981.
- [3] Ward, E. S. and D. J. Ellar: *FEBS Letters*, 158(1): 45-49, 1983.
- [4] Gonzalez, J. M. and B. C. Carlton: *Plasmid*, 11: 28-38, 1984.
- [5] Kamdar, H. and K. Jayaraman: *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 110(2): 477-482, 1983.
- [6] Krostad, J. W. et al.: *J. Bacteriol.*, 154(1): 419-428, 1983.
- [7] Klier, A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 191(2): 257-262, 1983.
- [8] Klier, A. et al.: *EMBO Journal*, 1(7): 791-799, 1982.
- [9] Martin, P. A. W. et al.: *J. Bacteriol.*, 145(2): 980-983, 1981.
- [10] Held, G. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6065-6069, 1982.
- [11] Klier, A. et al.: *Nucleic Acids Research*, 3973-3987, 1984.
- [12] Sharpe, E. S. et al.: *J. Invertebr. Path.*, 34(3): 315-316, 1979.
- [13] Goodman, N. S. et al.: *J. Bacteriol.*, 94(2): 485, 1967.
- [14] Barbara, J. A. and K. W. Nickerson: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(4): 625-626, 1978.
- [15] Burges, H. D. et al.: *J. Invertebr. Path.*, 27(1): 87-94, 1976.
- [16] Eckhardt, T.: *Plasmid*, 1: 584-588, 1978.
- [17] Jarrett, P.: *FEMS Microbiology Letters*, 16: 55-60, 1983.
- [18] Laemmli, U. K.: *Nature (London)*, 227: 680-685, 1970.
- [19] Gonzalez, J. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6951-6955, 1982.

THE PLASMIDS CARRING CRYSTAL PROTEIN GENE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* AND THEIR TRANSFER BETWEEN VARIOUS STRAINS

Li Rongsen

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

The patterns of plasmids from 19 strains of *Bacillus thuringiensis* representing 7 subspecies were investigated by agarose gel electrophoresis. It was shown that the composition of plasmids of *Bacillus thuringiensis* was not only subspecies-specific but also strain-specific. The size of the plasmids associated with formation of the crystal protein was 42 and 50 Mdal in HD-191 (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*), 47 Mdal in HD-282 (*B. thuringiensis* var. *aizawai*), and 57 Mdal in IPS-82 (*B. thuringiensis* var. *israelensis*). The crystal protein gene of strain 140 (*B. thuringiensis* var. *wuhanensis*) was most possibly not located in plasmid, but in

chromosomal DNA. The plasmid carrying the crystal protein gene of the HD-191 was transferred into the mutant HD-1 ($sp^+ cr^-$) in high frequency and the gene encoding for crystal protein was expressed in the cells of HD-1. It was failed to transfer the plasmid associated with crystal protein gene into cells of the IPS-82 from HD-1 ($sp^+ cr^-$), suggesting some incompatibility of the plasmid between them.

Key words

Plasmid; Conjugation; Crystal