

# 球形芽孢杆菌 C<sub>3</sub>-41 二元毒素基因在苏云金芽孢杆菌 以色列亚种中的克隆和表达

袁志明<sup>1</sup> Nielsen-LeRoux C<sup>2</sup> Pasteur N<sup>3</sup> Delecluse A<sup>2</sup> Charles J-F<sup>2</sup>  
Frutos R<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071) (<sup>2</sup> 巴斯德研究所昆虫病原菌研究室 法国)

(<sup>3</sup> 蒙波利埃第二大学进化科学研究所 法国)

(<sup>4</sup> 国际农业发展研究中心分子病理和遗传工程研究室 法国)

**提 要** 球形芽孢杆菌 C<sub>3</sub>-41 是我国分离的一株对蚊幼虫有毒杀作用的高毒力菌株,对库蚊、按蚊幼虫的毒性高于 2362 菌株, Southern 杂交证明 C<sub>3</sub>-41 总 DNA 中 3.5Kb HindIII 片段上带有 41.9 和 51.4kD 二元毒素基因,该片段由 3479 个核苷酸组成,核苷酸序列同 2362 菌株的二元毒素基因序列完全相同。含二元毒素基因的重组质粒 pCW-1 和 pCW-2 能在大肠杆菌中表达产生二元毒素蛋白,但表达量低,重组子杀蚊毒性低。无晶体型苏云金芽孢杆菌以色列亚种重组子在其芽孢形成中能产生以晶体形式存在的二元毒素蛋白,其全发酵液和纯化晶体蛋白的杀蚊活性与 C<sub>3</sub>-41 相近。

**关键词** 球形芽孢杆菌,苏云金芽孢杆菌以色列亚种,杀蚊,毒性,二元毒素基因

**分类号** Q785 **文献标识码** A **文章编号** 0001-620X(1999)01-0029-35

蚊虫是多种人类传染疾病的传播媒介,象疟疾、丝虫病、乙型脑炎、黄热病和登革热等,对人类的健康造成了极大的危害,控制蚊虫被认为是消除这些蚊媒疾病的唯一方法。其中利用蚊虫病原菌球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus* 简称 Bs)和苏云金杆菌以色列亚种(*B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 简称 Bt)进行蚊幼虫的生物控制是有效方法之一,多年来一直成功地用于蚊虫的大面积防治<sup>[1-2]</sup>。

Bs 在其生长发育过程中能产生位于芽孢外膜内的伴孢晶体。蚊幼虫取食芽孢晶体混合物后,晶体在蚊幼虫中肠碱性环境和蛋白酶的作用下被降解形成 41.9 和 51.4kD 杀蚊活性蛋白<sup>[3]</sup>。研究结果表明单独的 41.9 和 51.4kD 蛋白对蚊幼虫无毒,只有两种蛋白的协同作用才会表现出毒性,是一种二元毒素<sup>[4-6]</sup>。目前对编码二元毒素蛋白的基因进行了克隆、核苷酸序列分析及在不同寄主中的表达,但其表达水平较低<sup>[7]</sup>。

C<sub>3</sub>-41 菌株是我室分离的一株高毒力的 Bs 菌株,属血清型 H<sub>5a5b</sub> 型<sup>[8]</sup>,它所产生的 41.9 和 51.4kD 毒素蛋白对库蚊(*Culex* spp.)、按蚊(*Anopheles* spp.)和曼蚊(*Mansonia* spp.)都有很高的毒力,其毒力高于 WHO 推荐的 2362 菌株<sup>[9]</sup>。对该菌株的生理、生长发育、蛋白毒素、杀虫活性、病理、生产和应用进行了研究。BsC<sub>3</sub>-41 杀蚊剂已在我国十几个省(市)进行了大面积的野外应用,在蚊虫的综合防治中取得了良好的应用防治效果。

本研究是在弄清 C<sub>3</sub>-41 菌株二元毒素基因的结构、核苷酸序列的基础上,考查该基因

在大肠杆菌(*Escherchia coli*)和无晶型 *Bt* 中的表达,进行表达产物的杀蚊活性分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:实验所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基:LB 和 SOB 培养基参照 Maniatis 等<sup>[10]</sup>用于 *Bs* 培养的 MBS 培养基参照 Kalfon 等<sup>[11]</sup>。MU 培养基:蛋白胨 7.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  123mg,  $NaH_2PO_4$  6.8g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  1.7mg,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  14mg,  $Fe_2(SO_4)_3$  20mg,  $CaCl_2 \cdot H_2O$  147mg, 加水至 1000mL, 调 pH7.4, 使用前加入 1% 的葡萄糖。根据实验要求在不同的培养基中加入  $50\mu g/mL$  氨苄青霉素或  $12.5\mu g/mL$  四环素。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmid used in this study

菌株和质粒 Strain and plasmid	特性 Genotypes and characteristics	来源 Source
菌株 Strain		
<i>Bacillus sphaericus</i> C <sub>3</sub> -41 ( <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> 4Q2-81	Wide type Cry <sup>-</sup>	本试验室保存 Dr. Delecule A <sup>[12]</sup>
<i>E. coli</i> JM110	galk galT ara tonA thr tsx( $\Delta$ lac-proAB)F'	本研究
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	supE44 $\Delta$ lacU169 $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\lambda$ sdR17 recA1 endA1 gyrA96 relA1	本研究
质粒 Plasmid		
pBU4	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Dr. Delecule A <sup>[12]</sup>

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 操作: *Bs* 总 DNA 抽提参照 bourgouin 等<sup>[13]</sup>方法。质粒的酶切降解、脱磷酸化和连接反应,菌落原位杂交, DNA 印迹转移和杂交, 低熔点琼脂糖凝胶回收 DNA, 大肠杆菌感受态的制备和转化及重组质粒的限制性酶切分析参照 Maniatis 等<sup>[10]</sup>。一组寡聚核苷酸引物由 Gense(Paris, France)合成。PCR 扩增反应条件如下: 95°C 预培养 5 min, 94°C 变性 1 min, 42°C 退火 1 min, 72°C 复性 2 min, 25 个循环。用 Genclean Kit 纯化扩增产物, 按 Promega 公司随机引物标记试剂盒标记以制备放射性探针。

1.2.2 二元毒素基因的克隆: 按修改的 Maniatis 等<sup>[10]</sup>所述方法将 *Bs* 总 DNA 用限制性内切酶 HindIII 部分消化以确定最佳条件, 然后用适量的 HindIII 大量消化总 DNA, 用酚:氯仿抽提两次后, 乙醇沉淀回收 DNA 片段。通过 10%~40% 蔗糖密度梯度离心将不同大小的 DNA 片段分开, 分步收集不同的分离组份, Southern 杂交确定含目的基因的收集物。该收集物纯化后与经 HindIII 酶切并脱磷酸化的双功能载体 pBU4 连接, 按常规方法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 最后在含氨苄青霉素, X-gal 和 IPTG 的 LB 培养基上筛选白色菌落, 经重组质粒限制性酶切分析及 PCR 扩增反应确定重组质粒中含所需目的基因。

1.2.3 *Bt* 的转化: *Bt*4Q2-81 转化参照 Heierson 等<sup>[14]</sup>。将预培养的细菌接种在 50mLLB 培养基中, 30°C 摇床培养至  $OD_{650} = 1$ , 离心收集菌体, 用预冷的无菌蒸馏水洗涤

一次后,悬于 4mL 的 40% PEG6000, 200mL 的细菌悬液同 5~15 $\mu$ g 的质粒 DNA 混合,用 Bio-Rad Gene Pulser 电穿孔仪转化后,用 LB 培养基稀释 10 倍,在 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1.5h,然后涂布在含四环素的 LB 上,48h 后挑选重组菌落。

**1.2.4 伴孢晶体的分离、纯化** 将 *Bt* 重组子接种在 1000mL 含四环素的 MU 培养基上,28 $^{\circ}$ C 摇床培养至芽孢完全脱落,离心(12 000r/min, 30min),用 1mol/L NaCl 悬浮沉淀,再离心,用无菌水洗涤两次,再悬于 20mL 无菌水中。加入 0.1mol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF),悬浮液在冰浴中用超声波发生器(Branson Sonifer)处理 4 min,通过不连续的蔗糖梯度(67%、72%和 79%)超离心将伴孢晶体与芽孢和细胞碎片分开,收集伴孢晶体组分,充分洗涤后保藏于 -20 $^{\circ}$ C。

**1.2.5 蛋白质分析** C<sub>3</sub>-41 菌株在 MBS 培养基培养至芽孢释放;*E. coli* 重组子在含氨基青霉素的 LB 中培养过夜;*Bt* 重组子在含四环素的 MU 中培养至芽孢完全脱落。分别离心收集菌集,悬于 1mol/L NaCl 处理 1h,离心,无菌水洗涤两次后用 0.05mol/L NaOH 在 30 $^{\circ}$ C 抽提 1h,碱抽提液经 1mol/L HCl 中和后在 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH8.0)中透析过夜。伴孢晶体和碱抽提液中的蛋白质浓度测定采用 Bradford 法,以牛血清蛋白为标准品。按常规方法进行样品蛋白质的 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 上的蛋白质通过电转移转移到硝酸纤维膜上。ECL Western Blotting Kit(Amersham)进行蛋白质的免疫测定。41.9 和 51.4kD 蛋白的抗血清是利用 2362 菌株的二元毒素抗原制备。

**1.2.6 生物测定** 在实验室饲养的敏感尖音库蚊(*Culex pipiens*)和抗性尖音库蚊(SPHAE)3~4 龄幼虫用于生物测定。全发酵液、碱抽提液和纯化晶体蛋白毒性的生物测定方法和 LC<sub>50</sub>及 LC<sub>90</sub>的计算参照 Thiery 等<sup>[15]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 二元毒素基因的克隆

参照 2362 菌株二元毒素基因的核苷酸序列设计,合成一组位于 3.5kb HindIII 酶切片段中 1483~1501 和 2572~2593 核苷酸之间的一组寡聚核苷酸作引物。其中 BS-1:5' GCT AAA TAG GCC TTT ATC CC;BS-2:5' CCG AAA CCA TTA TAC ATG GG。以 2362 总 DNA 为模板,通过 PCR 技术扩增出一条 1.1kb 的 DNA 片段,经 <sup>32</sup>P ATP 标记制备放射性同位素标记探针,用于重组菌落的原位杂交和 Southern 杂交。

C<sub>3</sub>-41 菌株总 DNA 经酶切降解为 1.0~8.0kb 的 DNA 片段,通过杂交证明 1.1kb 的探针同 3.5kb HindIII 的酶切片段具有同源性。总 DNA 酶切片段经 10%~40% 蔗糖密度梯度离心,将不同大小的 DNA 片段分开,分步收集不同组份于 Eppendorf 中,每管收集 0.5ml, Southern 杂交确定含目的基因的收集组分,经浓缩和纯化后连接在经 HindIII 酶切及脱磷酸化的 pBU4 质粒上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在含抗生素的 LB 培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 12h,挑出 432 个白色菌落。经菌落原位杂交和 Southern 杂交证明重组子 E-CW-1 含二元毒素基因。经 HindIII、KpnI、EcoRI、EcoRV、SphI、XbaI 和 AllIII 酶切分析,重组质粒 pCW1 中二元毒素基因的转录方向与 LacZ 的转录方向相同,如图 1。

用 HindIII 酶切 pCW1 质粒后,分离、纯化的 3.5kb DNA 片断,重新连接到 pBU4 质粒上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。从选择性培养基上挑出白色菌落。经重组质粒的酶切分析,重

组质粒中 78.26% 的外源插入子基因属顺向插入, 11.74% 属反向插入。其中重组质粒 pCW2 中外源基因转录方向同 LacZ 转录方向相反, 如图 1。

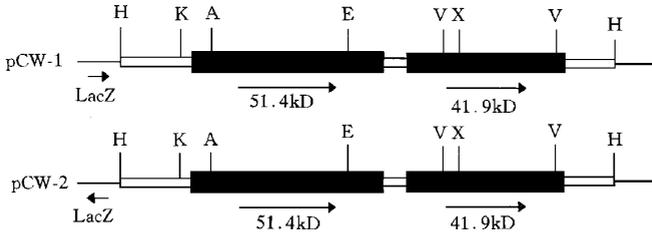


图 1 重组质粒 pCW1 和 pCW2 的酶切图谱

Fig. 1 Restriction maps of the recombinant plasmids pCW1 and pCW2

The HindIII DNA fragment containing the 41.9 and 51.4kD protein genes of *B. sphaericus* was inserted in vector pBU4 at the HindIII site of multiple cloning site (MCS)

H :HindIII K :KpnI A :AflIII E :EcoRI V :EcoRV X :XbaI S :SphI.

## 2.2 3.5kb HindIII 酶切片段的序列分析

采用双脱氧 DNA 末段终止法,按 Pharmacia 公司 T<sub>7</sub> 测序试剂盒方法进行 DNA 序列测定。C<sub>3</sub>-41 菌株的 HindIII 酶切片段由 3479 个核苷酸组成。用 DNA Strider 软件进行该二元毒素基因与 2362 菌株二元毒素基因核苷酸序列的比较和分析。结果表明两个 3.5kb HindIII 片段的 DNA 同源性高达 99.9%。

## 2.3 毒素基因在 *Bt* 中的克隆和表达

为提高外源质粒在 *Bt* 中的表达,先将 pCW1 和 pCW2 转化到 *E. coli* JM110 中使重组质粒核苷酸非甲基化。重新分离非甲基化的质粒,通过电转移的方式转化 *Bt* 4Q2-81 菌株后,涂布在含四环素的 LB 上,48h 挑出菌落。经质粒酶切分析,PCR 扩增反应和 Southern 杂交确定 *Bt* 重组子中含二元毒素基因。*Bt* 的转化率为  $10^5 \sim 10^6/\mu\text{g}$ 。随机挑选几株重组子用于下一步实验,4Q2-81 中含 pCW1 和 pCW2 的菌株分别记为 B-CW-1 和 B-CW-2。经 *Bt* 重组子全发酵液和晶体蛋白质含量分析及生物测定分析,重组质粒 pCW1 在 4Q2-81 中的蛋白表达水平高于 pCW2。

## 2.4 蛋白质分析

通过 12% 的 SDS-PAGE 进行了 C<sub>3</sub>-41、*E. coli* 重组子 (E-CW-1 和 E-CW-2) 和 *Bt* 重组子 (B-CW-1 和 B-CW-2) 及含 pBU4 的 *E. coli* (E-pBU4) 和 4Q2-81 (B-pBU4) 对照菌株的碱抽提液及 *Bt* 重组子的纯化晶体的蛋白质分析。结果如图 2。

B-CW-1 和 B-CW-2 碱抽提液和纯化晶体样品同 *Bs* 野生型菌株一样,可以检测到 51.4 和 41.9kD 的两条蛋白带;E-CW-1 和 E-CW-2 产生的两条蛋白带不明显;对照样品 (E-pBU4 和 B-pBU4) 中未检测到相应的两条带。用稀释 20 000 倍的 41.9 和 51.4kD 毒素蛋白抗血清对不同样品进行 Western Blotting 分析,除 E-pBU4 和 B-pBU4 外,在野生型 C<sub>3</sub>-41 和不同的重组子中都可以明显地检测到两条毒蛋白带。但可以看出重组质粒在 *E. coli* 中的表达量较低,因此在同样的条件其杂交带较弱,而且发现几条分子量较少的弱蛋白带。可能是二元毒素降解后产生的降解蛋白产物。

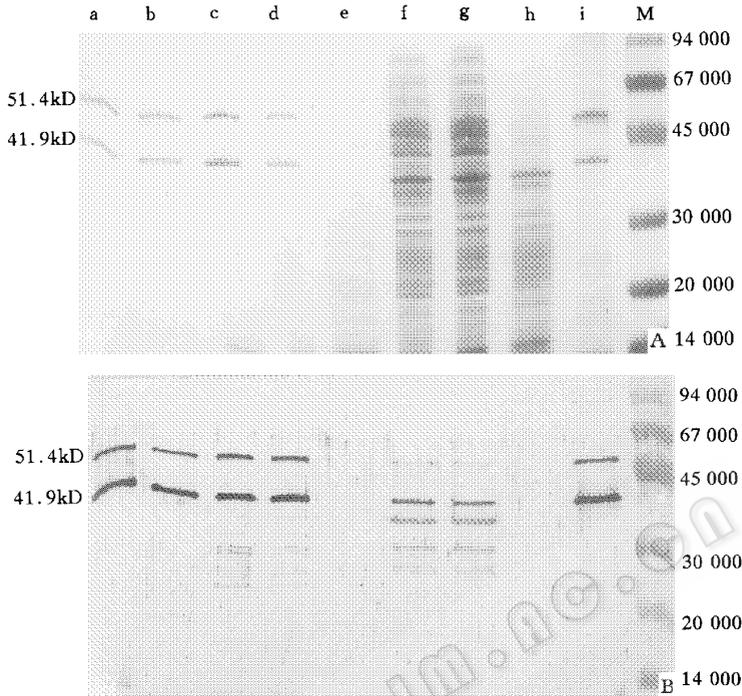


图 2 *B. sphaericus* C<sub>3</sub>-41 和重组子碱抽提液及纯化晶体蛋白 SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析

A :SDS-PAGE B :Western Blotting

Fig.2 Protein analysis of the transformants of *E. coli* and *B. thuringiensis* expressing the *B. sphaericus* crystal proteins

M. Marker ; lane a , b. Purified crystal of B-CW-2 and B-CW-1 ; lane c d e f g h i Alkali-solubilized toxins of B-CW-2 , B-CW-1 , B-pBU4 , E-CW-2 , E-CW-1 , E-pBU4 and C<sub>3</sub>-41 respectively

## 2.5 杀蚊活性

从上可以看出, C<sub>3</sub>-41 菌株对敏感尖音库蚊幼虫有较高的毒性,而对抗性蚊幼虫几乎无毒。如此相对应,含二元毒素基因的 *E. coli* 和 *Bt* 4Q2-81 重组子也出现类似的毒性。由于毒素基因在 *E. coli* 中表达水平较低,其发酵液的毒力也较低。而毒素基因在 4Q2-81 所表达的蛋白量同在 *Bs* 菌株中的表达量相近,全发酵液对尖音库蚊的 LC<sub>50</sub> 为  $1.5 \times 10^{-6}$  左右。此外,毒素基因顺向插入重组质粒(pCW1)的表达水平高于毒素基因反向插入重组质粒(pCW2)的表达水平。E-CW-1 和 B-CW-1 全发酵物对敏感尖音库蚊幼虫的 LC<sub>50</sub> 分别为  $1.619 \times 10^{-4}$  和  $1.834 \times 10^{-6}$ ,而 E-CW-2 和 B-CW-2 的 LC<sub>50</sub> 分别为  $2.765 \times 10^{-4}$  和  $3.262 \times 10^{-5}$ 。

## 3 讨论

C<sub>3</sub>-41 是一株在中国分离的高毒力菌株,它对库蚊,按蚊和伊蚊(*Aedes* spp.)的毒性都不同程度的高于 2362 菌株。但毒素基因核苷酸序列比较、分析表明,两菌株的二元毒素基因的序列完全一样,能表达完全相同 41.9 和 51.4kD 蛋白多肽。其它作者的研究结

果也表明,2362,1593和2317-3菌株毒素蛋白基因的大小和核苷酸序列完全一样,但2362菌株的杀蚊活性高于1593和2317-3<sup>[16]</sup>。Bs对蚊幼虫的毒杀作用主要是由二元毒素基因所表达的二元毒素蛋白决定的。但芽孢活性在杀蚊过程中也起着重要作用。因此我们认为含相同二元毒素基因的不同高毒力菌株间的毒性差异可能是由于不同菌株间的生理差异所导致的二元毒素基因表达量差异及芽孢活性的差异决定的。

表2 野生型菌株和不同克隆子对敏感及抗性蚊幼虫的毒性\*

Table 2 Toxicity of *B. sphaericus* and different recombinants against susceptible and resistant mosquito larvae

菌株 Strains	样品类型 Types of samples	敏感尖音库蚊 <i>Culex pipiens</i> (Susceptible)		抗性尖音库蚊 <i>Culex pipiens</i> (Resistant)	
		LC50**	LC90**	LC50**	LC90**
		<i>B. s</i> C <sub>3</sub> -41	FWC	$1.266 \times 10^{-6}$	$4.854 \times 10^{-6}$
E-pBU4	FWC	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$
E-CW-1	FWC	$1.619 \times 10^{-4}$	$5.742 \times 10^{-4}$	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$
E-CW-2	FWC	$2.765 \times 10^{-4}$	$9.165 \times 10^{-4}$	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$
B-pBU4	FWC	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$
B-CW-1	FWC	$1.834 \times 10^{-6}$	$5.741 \times 10^{-6}$	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$
B-CW-1	cry	1.123ng	9.372ng	$>140\mu\text{g}$	$>140\mu\text{g}$
B-CW-2	FWC	$3.262 \times 10^{-5}$	$1.148 \times 10^{-4}$	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$

FWC: Final whole cultures; Cry: Purified crystal from B-CW-1; \* Results recorded at 48h; \*\* LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> are calculated as FWC dilution and ng/ml or  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of crystal protein.

二元毒素基因分别可以在 *E. coli* 和 *Bt* 中表达。在 *E. coli* 重组子中,二元毒素蛋白合成于细菌的整个生长、发育过程中,表达量较低;同时由于毒素不能形成晶体而在培养过程中释放到培养液中,被细胞所释放的蛋白酶降解。因此所检测到的蛋白毒素量较低,同时可以通过 Western Blotting 检测到分子量较小的杂交降解蛋白带。本文所采用的载体 pBU4 是将经 EcoO109 酶切的 pUC19 和经 EcoRI 酶切的 pBC16-1 连接而获得的双功能载体,可以启动 *Bt* 芽孢和晶体的正常形成<sup>[13]</sup>,因此重组质粒 pCW-1 和 pCW-1 可以在 4Q2-81 中表达二元毒素并形成位于孢外膜外,易于分离的伴孢晶体,这使 Bs 晶体蛋白的纯化及蛋白特性的精细分析成为可能。在 E-CW-1 和 B-CW-1 重组子中,重组质粒中二元毒素基因的转录方向同 LacZ 的转录方向相同时,其表达的蛋白量较高,全发酵物的毒力高;反之蛋白表达量低,杀蚊活性低。这同 Bourgouin<sup>[13]</sup>等所观察到的结果相同,可能是由于的 LacZ 启动子在重组子芽孢形成中影响了晶体蛋白的合成。

## 参 考 文 献

- [1] Potter A G, Davidson E W, Liu J W. *Microbiol Rev*, 1993, **57**: 838~861.
- [2] Hofte H, Whiteley HR. *Microbiol Rev*, 1989, **53**: 242~255.
- [3] Priest F G. *J Appl Bacteriol*, 1992, **72**: 357~369.
- [4] Broadwell A H, Clark N A, Baumann L et al. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 4032~4036.
- [5] Baumann L, Bauamann P. *Curr Microbiol*, 1990, **23**: 51~57.
- [6] Baumann P, Clark M A, Baumann L et al. *Microbiol Rev*, 1991, **55**: 425~436.

- [ 7 ] Charles J F , Nielsen-LeRoux C , Delecluse A. *Ann Rev Entomol* ,1996 ,451~472.
- [ 8 ] 张用梅 ,刘娥英 ,蔡昌建等. 杀虫微生物 ,1989 ,1 98~101.
- [ 9 ] 张用梅 ,刘娥英 ,蔡昌建等. 中华流行病学杂志 ,1989 ,10( 7 ) 20~30.
- [ 10 ] Maniatis T , Fritsch E F , Sambrook J. *Molecular Cloning ; A Laboratory Manual* , NY :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [ 11 ] Kalfon A ,Thiery I ,Charles J F. *Eur J Microbiol Biotechnol* ,1983 ,18 :168~173.
- [ 12 ] Delecluse A , Charles J F , Klier A *et al.* *J Bacteriol* ,1991 ,173 3374~3381.
- [ 13 ] Bourgouin C , Delecluse A , de la Terre F. *Appl Environ Microbiol* ,1990 ,56 340~344.
- [ 14 ] Heierson A , Landen R , Lougren L. *J Bacteriol* ,1987 ,169 :1147~1152.
- [ 15 ] Thiery I , Ofori J , Cosmao D V *et al.* *Appl Microbiol biotechnol* ,1992 ,137 2776~2785.
- [ 16 ] Berry C , Jackson-Yap J , Oei C *et al.* *Nucleic Acids Res* , 1989 ,17 7516~7521.

## CLONING AND EXPRESSION OF THE BINARY TOXIN GENES OF *BACILLUS SPHAERICUS* C<sub>3</sub>-41 IN A CRYSTAL MINUS *B. THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENSIS*

Yuan Zhiming<sup>1</sup> Neilsen-LeRoux C<sup>2</sup> Pasteur N<sup>3</sup> Delecluse A<sup>2</sup> Charles J-F<sup>2</sup>  
Frutos R<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> Wuhan Institute of Virology , Chinese Academy of Sciences , Wuhan 430071 )

(<sup>2</sup> Bacteries Entomopathenes , Institut Pasteur , 75724 Paris France )

(<sup>3</sup> Institut des Sciences de l'Evolution , Montpellier II , 34095 Montpellier France )

(<sup>4</sup> BIOTROP-IGEPAM , CIRAD , 34096 Montpellier France )

**Abstract** *Bacillus sphaericus* C<sub>3</sub>-41 , belonging to serotype H5a5b , is a highly toxic strain isolated from a mosquito-breeding site in China. It has been shown that it had a higher toxicity against *Culex* spp. than the reference strain 2362 at the laboratory and field conditions. Using synthetic oligonucleotides designed on the basis of the binary toxin gene sequence of 2362 , a 1.1kb DNA fragment was produced and the genetic library was prepared from a HindIII digest of total DNA from C<sub>3</sub>-41. One colony containing the 3.5kb HindIII fragment was selected for further studies. Sequence analysis revealed that this 3.5kb Hind DNA fragment was composed of 3479 nucleic acids and the sequence of the binary toxin gene of C<sub>3</sub>-41 is completely identical to that of strain 2362. The toxin genes have been transferred into a nontoxic crystal-minus strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. The recombinant strains could express the binary toxin of *B. sphaericus* as crystalline structures during their sporulation. The expression products of the recombinants have a high toxicity to susceptible *Culex pipiens* subsp. *quinquefasciatus* and no toxicity to resistant larvae (*Culex pipiens* subsp. *pipiens*) from France.

**Key words** *Bacillus sphaericus* , *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* , Mosquito-larvicidal , toxicity , Binary toxin gene