

苏云金芽胞杆菌拟步行甲亚种 YBT-1765 中稳定质粒 pBMB175 的克隆和功能分析

韩冬梅* * 黄军艳* * 喻子牛 孙 明*

(华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘 要 从苏云金芽胞杆菌拟步行甲亚种 YBT-1765 中克隆得到一个大小约 15.2 kb 的质粒 pBMB175, 构建了该质粒的限制性图谱, 通过功能验证, 将其最小的复制区定位在一个 1151bp 的片段上。分析了包含有这个复制区的一个大小为 4152 bp 的核苷酸序列, 该片段包含有 3 个编码框 (ORF1、ORF2 和 ORF3)。氨基酸序列同源性比较发现, ORF1 (767AA) 与 UvrD- 旋促酶、重组酶 RecD 和 RecB 家族具有 20% ~ 30% 的相似性; ORF2 (149AA) 没有发现与任何已知序列具有同源性; ORF3 (83AA) 与 pGI3 中一个未知功能的蛋白 (ORF7) 具有 34% 的相似性。通过缺失及序列比较分析推测 ORF2 可能编码一种新的复制蛋白。因此 pBMB175 的复制类型可能属于一类新的复制家族。利用最小复制区构建的重组质粒在无抗生素选择压力下可稳定遗传 40 多代, 具备构建稳定遗传质粒载体的潜力。

关键词 苏云金芽胞杆菌, 质粒 pBMB175, 复制区, 序列分析, 质粒载体

中图分类号 Q93, Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209 (2005) 06-0832-05

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是一种革兰氏阳性细菌, 能够产生具有多种杀虫活性的杀虫晶体蛋白, 被广泛应用于杀虫剂的研发与生产当中。但作为生物杀虫剂, 许多具有高毒力的苏云金芽胞杆菌株系的杀虫谱比较窄; 而 20 世纪 80 年代中期以来, 在室内实验和田间实验中均筛选到对苏云金芽胞杆菌制剂产生了抗性的害虫^[1,2], 影响了该菌的应用。解决这些问题的一个重要方法就是构建高效、广谱的重组菌株。该菌的绝大多数野生菌株都含有丰富多样的内生质粒, 因此质粒间的不相容性给重组菌株的构建带来了较大的困难, 而利用其自身质粒构建的载体, 在提高工程菌稳定性和对环境的安全性方面有很大的价值。目前研究主要包括两个方面, 一是利用质粒消除的方法筛选受体菌, 二是利用稳定的复制子构建稳定遗传的质粒载体。

质粒的复制通常具有 3 种主要类型: 滚环复制 (rolling-circle) 型、 θ 复制型以及 D 环复制^[3]。滚环复制的质粒 (简称 RC 质粒) 分子量通常较小, 在细胞中拷贝数较高。其复制需要 3 种结构分子: (1) 编码复制蛋白的 *rep* 基因及其调节因子; (2) 双链复制起始区 (简称 *dso* 区), 该区域包括 Rep 蛋白识别位点

bind 和切割位点 *nic*, 常常具有多个茎环或十字形结构; (3) 单链复制起始区 (简称 *ssO* 区)^[3~5]。一般情况下, 质粒复制所需的最小复制子包括完整的 *rep* 基因和 *dso* 区, 根据 Rep 蛋白和 *dso* 区的相似性, RC 质粒被分成了 17 个不同的家族 (<http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR-home.htm>), 它们代表了所有已知的滚环复制的复制子^[5,6]。

目前对苏云金芽胞杆菌的多个亚种的质粒及其复制子已经展开了较为深入的研究, 而对拟步行甲亚种质粒的研究还比较少。利用逐级升温结合 SDS 培养消除拟步行甲亚种 YBT-1765 的内生质粒过程中, 发现一个大小约 15.2kb 的质粒 (pBMB175) 异常稳定。目前拟步行甲亚种中仅有由本课题组从菌株 YBT-1765 中克隆得到了一个复制子 *ori165*^[7]。鉴于 pBMB175 在 YBT-1765 菌株中异常稳定, 本研究希望找到该质粒的复制区, 研究其稳定机制并最终应用于稳定的穿梭载体的构建, 解决工程菌构建中由质粒的不相容性带来的问题。

另一方面, 由于苏云金芽胞杆菌的较大质粒上常定位有杀虫晶体蛋白基因, 因此对它的研究比较深入, 而对以滚环方式复制的较小质粒的研究却比

基金项目 国家‘973 项目’(2003CB114201) 国家‘863 计划’(2003AA223081, 2004AA214092)

* 通讯作者。Tel 86-27-87283455 Fax 86-27-87280670; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

* * 两位作者对此文具有同等贡献。

作者简介 韩冬梅 (1983 -), 女, 天津市人, 2001 级生物科学专业本科生。黄军艳 (1977 -), 女, 湖北武汉人, 博士研究生, 主要从事苏云金芽胞杆菌分子生物学研究工作。

收稿日期 2005-04-29, 修回日期 2005-06-20

较少。目前已经公布的以滚环方式复制的苏云金芽胞杆菌质粒还很少^[6,8~13],基本上都已经完成了全序列测定并进行了功能分析,同时根据 Rep 蛋白和 *dso* 区的特点将他们归类。推测本文构建的拟步行甲亚种中的 pBMB175 也应遵循滚环复制,因此本文希望能够对该质粒的复制机制进行研究,为其分类

提供一定的理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :表 1 为本实验所用菌株和质粒。

表 1 实验所用的菌株与质粒

Table 1 The bacteria and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	<i>supE44, hsd△5, thi△(lac-proAB)/F'</i> [<i>traD36, proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> △M15]	This laboratory
TG1 (pBMB1751P)	TG1 containing pBMB1751P	This work
TG1 (pBMB1752P)	TG1 containing pBMB1752P	This work
<i>Bacillus thuringiensis</i>		
YBT-1765	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> , H8ab	Stored in this lab
BMB19-3	YBT-1765 cured the largest plasmid	This work
BMB175	YBT-1765 cured-partial plasmids, only containing pBMB175	This work
BMB171	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , H3abc, acrySTALLiferous, plasmid-cured strain	This laboratory
BMB171-1751	BMB171 containing pBMB1751	This work
BMB171-1751C	BMB171 containing pBMB1751C	This work
BMB171-1751D	BMB171 containing pBMB1751D	This work
Plasmid		
pUC19	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp ^r ; 2.69 kb	This laboratory
pDG780	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp ^r , Kan ^r ; 4.4 kb	Provided by BGSC
pBMB175	a plasmid in BMB175, about 16.6 kb	This work
pBMB1751P	pUC19 with pBMB175/ <i>Cla</i> I (about 4.2 kb), about 6.9 kb	This work
pBMB1752P	pUC19 with pBMB175/ <i>Cla</i> I (about 11.0 kb), about 15.7 kb	This work
pBMB1751	pDG780 with pBMB1751P/ <i>Sac</i> I - <i>Pst</i> I (about 4.2 kb), about 8.6 kb	This work
pBMB1752	pDG780 with pBMB1751P/ <i>Sac</i> I - <i>Pst</i> I (about 11.0 kb), about 15.4 kb	This work
pBMB1751A	pDG780 with pBMB1751P/ <i>Eco</i> R I (about 1.3 kb), about 5.7 kb	This work
pBMB1751B	pDG780 with pBMB1751P/ <i>Xba</i> I - <i>Pst</i> I (about 3.0 kb), about 7.4 kb	This work
pBMB1751C	pDG780 with pBMB1751P/ <i>Eco</i> R V - <i>Sac</i> I (about 2.1 kb), about 6.5 kb	This work
pBMB1751D	pDG780 with pBMB1751P/ <i>Xba</i> I (about 1.2 kb), about 5.6 kb	This work

1.1.2 主要试剂和仪器 :各种限制性内切酶,T4 DNA 连接酶, *Taq* DNA 聚合酶,碱性磷酸酶 (CIAP) 等酶制剂以及 DNA 分子量标准 (如 λDNA/*Hind* III Marker,1kb Ladder) 均为 TaKaRa 公司产品 ;抗生素、十二烷基硫酸钠 (SDS)、溶菌酶及 RNA 酶为进口分装 ;主要生化试剂购自武汉亚法、武汉天元、上海生工和北京原平皓公司,其余普通试剂均为国产试剂 ;DNA 凝胶回收使用 V-gene 公司的 DNA Gel Extraction Kito. 氨苄青霉素 (Amp) 使用浓度为 100μg/mL,卡那霉素 (Kan) 使用浓度为 50μg/mL。

本实验中所用的主要仪器设备如下 :离心机型号为 5415D 和 5415R,购自 Eppendorf 公司 ;电脉冲仪型号为 Genepulser™ 为 Bio-Rad 产品 ;恒温摇床型号为 HQL150C,购自中国科学院武汉科学仪器厂 ;生化培养箱型号为 LRH-250A,购自广东省医疗器械厂。

1.2 培养基和培养条件

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 使用 LB 培养基,于

37℃ 培养。苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 使用 LB 培养基,于 28℃ 培养。抗生素的终浓度分别为 氨苄青霉素 (Amp) 100μg/L,卡那霉素 (Kan) 50μg/L。

1.3 质粒 DNA 的分离和纯化

大肠杆菌质粒的分离参照文献 [14] 的方法,苏云金芽胞杆菌质粒的分离参照文献 [15] 的方法。酶切后的 DNA 使用 DNA Gel Extraction Kit 回收纯化。

1.4 重组质粒的构建、转化及其稳定性检测

重组质粒的构建参照文献 [14] 的方法。大肠杆菌的常规转化采用氯化钙法^[14],苏云金芽胞杆菌采用电转化法。参照文献 [7] 检测重组质粒的稳定性。

1.5 序列测定和分析

北京奥科公司完成测序。序列分析采用 ORF-finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 软件,序列同源性比较在 GenBank 中利用 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 进行。

2 结果和分析

2.1 pBMB175 的限制酶图谱

YBT-1765 菌株含有 3 个以上内生质粒,经过逐级升温结合 SDS 培养的方法消除质粒后获得只含有一个异常稳定的 15.2kb 左右的质粒(pBMB175)的菌株,将该菌株命名为 BMB175 (图 1)。由于 pBMB175 高度稳定,用其构建稳定遗传的质粒载体方面具有很大潜力,因此展开了对它的研究。直接从 BMB175 中抽提质粒 pBMB175,利用 26 种常用的限制性内切酶对其进行酶切,确定了该质粒上各种酶的酶切位点个数。选用限制性内切酶 *EcoRV*、*Cla* I、*Spe* I、*Xba* I 及 *Acc* I 分别进行单酶切和双酶切消化,然后进行琼脂糖凝胶电泳。以 λ DNA / *Hind* III 片段和 1 kb DNA Ladder 作为分子量标准,以各片段的迁移距离为横坐标,以各片段分子量的常用对数值为纵坐标,绘制出 DNA 分子量标准曲线,再利用该曲线根据各个限制片段的迁移距离,测定其分子量大小(表 2)。按照文献[16]的方法,

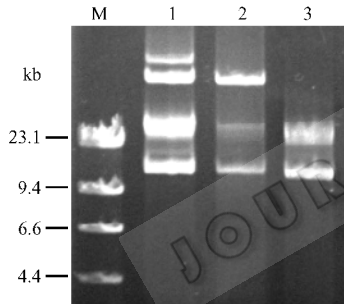


图 1 苏云金芽胞杆菌 YBT-1765 及其质粒部分消除突变株的质粒琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of plasmids of *B. thuringiensis* YBT-1765 and its cured-partial plasmid mutant strains
M. λ DNA / *Hind* III ; 1. Plasmid in YBT-1765 ; 2. Plasmid in BMB19-3 ; 3. Plasmid in BMB175.

同时参照 pBMB175 中 4.2kb *Cla* I 酶切片段的测序

结果(见后文),绘制出 pBMB175 的限制酶图谱(图 2)。

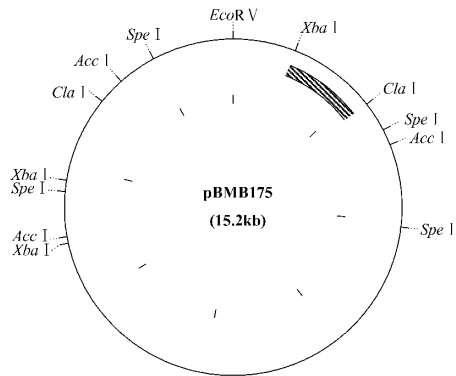


图 2 质粒 pBMB175 的限制酶图谱

Fig.2 The restriction map of pBMB175
Shaded area : the replicating region.

2.2 pBMB175 复制区的克隆

通过分析 pBMB175 的物理图谱,选用 *Cla* I 进行酶切消化,得到大小约为 4.2kb 和 11.0kb 的两个片段。从凝胶中分别回收并纯化这两个片段,再与载体 pUC19/*Acc* I 连接,转化到 *E. coli* TG1 中,所得重组质粒命名为 pBMB1751P 和 pBMB1752P,分别酶切两质粒,将回收的约 4.2kb 和 11.0kb *Sac* I - *Pst* I 片段克隆到载体 pDG780 上,获得 pBMB1751 和 pBMB1752,再分别转入苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种无质粒突变株 BMB171 中。

结果发现,pBMB1751 能够在这个菌株中复制,而 pBMB1752 则不能。这证明 pBMB175 复制区定位在这个大约 4.2kb 的片段上。

2.3 氨基酸及核苷酸序列分析

对 pBMB1751P 上的亚克隆片段进行测序,大小为 4152bp。经 ORF-finder 软件分析发现该片段包含有 3 个编码框(ORF1、ORF2 和 ORF3),可分别编码 767 个、149 个和 83 个氨基酸组成的蛋白质(图 3)。进行氨基酸同源性分析,其 ORF1 (767AA) 与 UvrD-

表 2 pBMB175 的限制性内切酶分析

Table 2 Restriction endonuclease analysis of pBMB175										
Fragments number	Size of restriction fragments(kb)									
	<i>EcoRV</i>	<i>Cla</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Acc</i> I	<i>Spe</i> I	<i>EcoRV</i> + <i>Cla</i> I	<i>EcoRV</i> + <i>Xba</i> I	<i>EcoRV</i> + <i>Acc</i> I	<i>EcoRV</i> + <i>Spe</i> I	<i>Cla</i> I + <i>Xba</i> I
1	15.0	11.0	9.7	8.1	7.5	11.0	9.7	8.1	7.5	8.7
2		4.2	4.4	4.5	3.5	2.1	3.5	2.8	2.6	3.1
3		0.9	2.5	2.6	2.1	0.9	2.5	2.6	1.3	
4			1.4		0.9	1.7	1.4	1.3		
5								1.2	0.9	
Total	15.0	15.2	15.0	15.1	15.0	15.2	15.0	15.1	15.3	15.3

旋酶(helicase)、重组酶 RecD 和 RecB 家族具有 20%~30% 的相似性 没有发现 ORF2 (149AA)与任何已知序列具有相似性 ;ORF3 (83AA)与 pGI3 中的一个未知功能的潜在蛋白(ORF7)具有 34% 的相似性,其编码基因邻近 pGI3 的 Rep 蛋白编码基因。

将该片段进行核苷酸的 Blast 分析发现,ORF2 和 ORF3 之间的一个大小为 85 bp 的片段(第 3680~3764 个碱基)与 pGI3 中的 *rep* 基因(ORF6)和 ORF7 之间一段区域(第 4446~4530 个碱基)具有 74% 的相似性(图 3)。此外,ORF1 上游的一个大小为 41 bp 的片段(第 150~190 个碱基)与 pBMB2062 的 ORF1 和 ORF2 之间的第 1424 至第 1464 个碱基之间区段有 92% 的相似性(图 3),并且该区域富含 AT(AT 含量占 73%)。

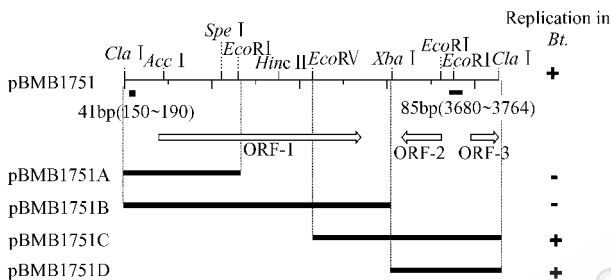


图 3 pBMB175 的复制区分析图谱

Fig.3 The replicating region analysis of pBMB175

进行核苷酸序列二级结构分析发现,在 ORF2 内及其上游,具有多个茎环结构(图 4),其中一个较大的茎环结构位于 ORF2 上游第 3821~3867 个碱基之间,Gibbs 自由能为 -11.6 kcal,是这些茎环结构中最为稳定的,推测这个区域可能是 *dso* 区。

综上分析,推测 ORF2 可能编码 Rep 蛋白。

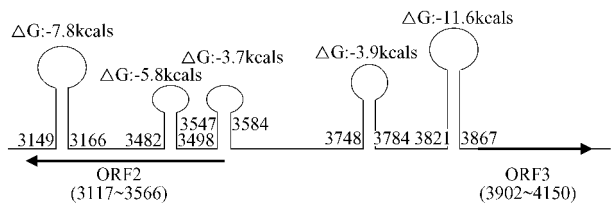


图 4 ORF2 内及其上游的茎环结构示意图

Fig.4 The stem-loops in ORF2 and its upstream($\Delta G < -3.5\text{kcal}$)

2.4 pBMB175 的最小复制区

用不同的限制性内切酶酶切 4152 bp 的片段,分别与质粒载体 pDG780 相连,构建了 4 个重组子 (pBMB1751A, pBMB1751B, pBMB1751C 和 pBMB1751D)(图 3)。将他们分别转入 BMB171 后发现,pBMB1751A 和 pBMB1751B 不具有复制功能而 pBMB1751C 和 pBMB1751D 能够复制。这说明复制

区域在 pBMB1751D 的 *Xba* I -*Cla* I 片段上。

2.5 重组质粒的遗传稳定性

重组质粒 pBMB1751、pBMB1751C 和 pBMB1751D 转化进入菌株 BMB171 后进行稳定性检测发现含有完整的 3 个 ORFs 的 pBMB1751 的稳定性为 0%,而不含有 ORF1 的 pBMB1751C 和 pBMB1751D 均为 100%。由此推测,可能是 ORF1 造成了 pBMB175 的复制不稳定。

3 讨论

YBT-1765 菌株属于苏云金芽胞杆菌拟步行甲亚种,目前已经从该菌的一个大质粒上克隆得到了这一亚种中的第一个复制子^[7]。本研究克隆了该菌中的最小质粒、找到了它的复制区并对其进行了序列及功能分析,这是拟步行甲亚种中的第一个小质粒克隆。经过对其核苷酸序列进行 blast 分析发现,pBMB175 只与 pBMB2062 和 pGI3 的部分未知功能区域具有相似性,这两个质粒均采用滚环复制机制,又因为没有发现 pBMB175 与任何 θ 复制质粒有相似性,同时它只有 15.2kb 左右大小,由此推测 pBMB175 可能属于滚环复制质粒。

有研究表明同一个滚环复制质粒家族的 *nic* 位点具有高度保守性,而 *bind* 位点则不存在保守性,同时其复制蛋白也具有较高的相似性^[3~5]。值得注意的是,ORF2 编码的潜在蛋白不与任何已知 Rep 蛋白家族具有相似性,而 pBMB175 中包含着 ORF2 和 ORF3 的复制区核苷酸序列也没有与已知的 17 个家族中相似的区域。滚环复制型质粒分类的主要依据是复制子的相似性^[3,12,17,18],在 Database of Plasmid Replicons (http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR_home.htm)上对滚环复制 17 个家族的分类也主要依据了 Rep 蛋白的相似性。因此根据本研究结果,建议将 pBMB175 列为一个新的复制家族。

稳定性测验发现,含有完整的 3 个 ORF 的 pBMB1751 在 BMB171 中非常不稳定,而不含 ORF1 的 pBMB1751C 和 pBMB1751D 则很稳定。由此我们猜测,ORF1 或其两侧的某些区域可能导致了复制的不稳定;而 pBMB175 在其宿主菌 YBT-1765 中又是高度稳定,因此在 pBMB175 的未知区域,或者在其宿主菌的染色体 DNA 中,可能具有某些功能组件调控 ORF1 的作用。应用这个复制区构建稳定的质粒载体,对解决该亚种工程菌构建中由质粒的不相容性带来的问题非常重要,这个方面的工作还需要进一步深入进行。

参 考 文 献

- [1] Tabashnik B F. Evolution of resistance of *Bacillus thuringiensis*. *Ann Rev Entomol*, 1994, **39**: 47–49.
- [2] Tabashnik B F, Finson N, Groeters F R, *et al.* Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, **91**: 4120–4124.
- [3] Khan S A. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61**: 442–455.
- [4] Khan S A. Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol Microbiol*, 2000, **37**(3): 477–484.
- [5] Khan S A. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid*, 2005, **53**: 126–136.
- [6] Andrup L, Jensen G B, Wilcks A, *et al.* The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmids from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. *Plasmid*, 2003, **49**: 205–232.
- [7] 魏芳, 孙明, 喻子牛, 苏云金芽胞杆菌拟步行甲亚种质粒复制子 ori165 的克隆. *微生物学报*, 2002, **42**(1): 45–49.
- [8] 孙明, 魏芳, 刘子铎, 等. 苏云金芽胞杆菌质粒 pBMB2062 的克隆及遗传稳定载体的构建. *遗传学报*, 2000, **27**(10): 932–938.
- [9] McDowell D G, Mann N H. Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* strain HD1-DIPEL. *Plasmid*, 1991, **25**: 113–120.
- [10] Marin R, Valero J, Letarte R, *et al.* Isolation and sequence of a 2-kbp miniplasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-3a3b: relationship with miniplasmids of other *Bacillus thuringiensis* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **94**: 263–270.
- [11] Madsen S M, Andrup L, Boe L. Fine mapping and DNA sequence of replication functions of *Bacillus thuringiensis* plasmid pTX14-3. *Plasmid*, 1993, **30**: 119–130.
- [12] Hoflack L, Seurinck J, Mahillon J. Nucleotide sequence and characterization of the cryptic *Bacillus thuringiensis* plasmid pGI3 reveal a new family of rolling circle replicons. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(16): 5000–5008.
- [13] Hoflack L, Wilcks A, Andrup L, *et al.* Functional insight into pGI2 a cryptic rolling-circle replicating plasmid from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, 1999, **145**: 1519–1530.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Manniatis T. *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Kalman S, Kiehne K L, Libs J L, *et al.* Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 1131–1137.
- [16] 齐义鹏. 基因及其操作原理. 武汉: 武汉大学出版社, 1998.
- [17] del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria M J, *et al.* Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(2): 434–464.
- [18] Rosso M L, Vary P S. Distribution of *Bacillus megaterium* QM B1551 plasmids among other *B. megaterium* strains and *Bacillus* species. *Plasmid*, 2005, **53**: 205–217.

Cloning and functional analysis of the stable plasmid pBMB175 in *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* strains YBT-1765

HAN Dong-mei HUANG Jun-yan YU Zi-niu SUN Ming*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A 15.2 kb plasmid pBMB175 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* strains YBT-1765 was cloned and the restriction map was constructed. The mini-replicating region of pBMB175 was located in a 1151 bp fragment by functional analysis. The sequence of a 4152 bp fragment which contained the mini-replicating region was analyzed and results showed that the fragment had three potential open reading frames (ORF1, ORF2 and ORF3). Sequence comparison and homology search revealed that ORF1 (767AA) has 20% ~ 30% similarity to UvrD-helicase, RecD and RecB family proteins; no homology was found between ORF2 (149AA) and other known proteins; ORF3 shared 34% identification to a potential protein (ORF7) in pGI3. Deletion and sequence analysis presumed that the protein encoded by ORF2 maybe a new replication protein. Above all, pBMB175 likely belongs to a new plasmid family with a new replicon. The recombinant plasmid harboring the mini-replicating region is very stable, even after growth for more than 40 generations without selection, so it might be used as a cloning and expression vector.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Plasmid pBMB175, Replicating region, Sequence analysis, Plasmid vector

Foundation item: National Basic Research Program of China (2003CB114201); Chinese National Program for High Technology Research and Development (2003AA223081, 2004AA214092)

* Corresponding author. Tel: 86-27-87283455; Fax: 86-27-87280670; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

Received date: 04-29-2005