韓蠶學誌 35(1), 36～42 (1993)
Korean J. Seric. Sci.
〈論 文〉

두종의 *Bacillus thuringiensis* 내독소단백질 유전자의 융합에 의한 발현

諸連鎬[1] · 金尙賢[2] · 金祐山[1] · 柳鏞萬[1] · 徐淑才[3] · 姜錫權[1] · 趙鏞涉[4]
[1]서울대학교 농업생물신소재연구센터
[2]農村振興廳 蠶業試驗場, [3]경상대학교 자연과학대학, [4]서울대학교 농업생명과학대학

Expression of Fusion Products of Insecticidal Crystal Protein Genes from Two Different *Bacillus thuringiensis* Strains

Yeon Ho Je[1], Sang Hyun Kim[2], Ho San Kim[1], Yong Man Yu[1], Sook Jae Seo[3] Seok Kwon Kang[1] and Yong Sup Cho[4]
[1]The Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University
[2]Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon, Korea
[3]College of Natural Sciences, Gyeong Sang National University
[4]College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University

Abstract

Expression of insecticidal protein by fusion product of truncated HD-1 [CryIA(a)] N-terminal and HD-73 [CryIA(c)] C-terminal fragment of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* was investigated. Immunological analysis of transformants by using polyclonal antisera raised against the whole-crystal protein of HD-1 revealed that SK4 and SK5 were observed cross-reaction with polypeptides of 77-kDa and 105-kDa, respectively. Bioassay of the transformant pSK5 to *Plutella maculipennis* and *Heliothis assulta* were 96% and 97%, respectively.

Key words : *Bacillus thurihgiensis*, gene fusion, immunological analysis, bioassay

序 論

*Bacillus thuringiensis*는 그람 양성의 토양세균으로서 성장조건이 악화되면 포자를 형성하고 동시에 강력한 살충 효과를 가진 여러가지 모양의 내독소 결정체 단백질을 형성하는데(Hanny and Fitz-James, 1955), 대부분이 나비목 해충에 독성을 나타내며, 파리목과 딱정벌레목 유충에도 독성이 있는 것으로 보고되었다(Dulmage and Rhodes, 1971; Goldberg and Margalit, 1977; Kreig *et al.*, 1983). 이 중 나비목에 독성을 가지는 내독소단백질은 모양이 대부분 이중 피라미드형이고 분자량이 약 120～150 kDa이며 알칼리 및 곤충의 소화액 처리에 의하여 약 60～72 kDa의 독성을 가지는 펩타이드로 분해된다(Höfte and Whiteley, 1989). 또한 이들은 내독소단백질의 숙주범위 및 유전자에 기초하여 4종류로 분류하였다. 이 중 나비목 곤충에 독성을 나타내는 유전자를 CryI이라 명명하였으며, 또한 이것을 유전자 염기서열의 차이에 따라 다시 CryIA, CryIB, CryIC 및 CryID로 그리고 보다 세부적으로 CryIA 유전자는 CryIA(a), CryIA(b) 및 CryIA(c)로 나누었는데, 이것들은 서로 80%의 상동성을 갖고 있다. B.t 내독소단백질을 합성하는 유전자는 45 kb로부터 225 kb 크기의 플라스미드에 다양하게 존재하는 것으로 보고되고 있다. 또한 내독소단백질을 coding하는 domain은 protoxin의 N-terminal 방향의 반쪽에 존재함을 증명하였다(Höfte *et al.*, 1986).

최근에 B.t 내독소단백질의 특성을 유전학적으로 보완하여 미생물 살충제로 개발하고자 해충저항성 유전자를 담배 및 토마토와 같은 식물체에 도입시킨

해충저항성 전환 식물체(Barton *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987)의 개발, Pseudomonas와 Cyanobacterium과 같은 균주에 B.t 내독소단백질 유전자를 도입시킨 형질전환 세균(Obukowitcz *et al.*, 1986; Thirumaran *et al.*, 1992)의 개발 및 시로 다른 두종의 내독소 유전자를 융합시켜 숙주범위를 넓히고자 하는 연구(Guy *et al.*, 1990) 등이 행하여지고 있다.

본 실험은 B.t 내독소단백질의 융합 가능성을 알아보고, 융합물이 내독소단백질의 숙주범위에 관여하는 인자를 찾기 위하여 truncated *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 CryIA(b) 유전자의 N-말단부분에 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 CryIA(c) 유전자의 C-말단부분을 융합시켜 유전자 발현산물의 독성과 그 역할 및 특성을 조사하였다.

材料 및 方法

1. 사용균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1(serotype 3a : 3b) 균주는 미 농무성 Faust 박사로부터 분양받았으며, 형질전환의 수용균주로는 캘리포니아 대학의 H. Boyer 박사로부터 분양받은 *E. coli* MC1061과 *E. coli* JM109 균주를 사용하였다.

Cloning 벡터는 pUC19(New England BioLabs, Inc.)를 사용하였고, 발현벡터로는 pT7-5와 pGP1-2 (Harvard Medical School)를 사용하였다. 한편 B.t 내독소단백질 유전자로서는 본 연구실에서 cloning하여 pSK3으로 명명한 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1의 CryIA(b) 유전자를, 그리고 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 CryIA(c) 유전자는 김정일 박사로부터 받은 pKU-CP6을 사용하였다.

2. 플라스미드의 분리

B.t 균주와 *E. coli* 균주로부터 플라스미드의 분리는 이미 보고된 alkaline lysis 방법(Birnboim and Doly, 1979)을 개선하여 사용하였다. B.t k HD-1 플라스미드의 경우 L.B 배양액에 접종하여 30℃, 12시간 동안 1차 배양 후, 250 m*l*의 L.B, 또한 S.P.Y 배지에 접종하여 30에서 OD_{600} nm에서 0.7이 될 때까지 배양하였다. *E. coli*는 L.B 배양액 250 m*l*에 배양하여(37℃, 12 hr) 5,000 g, 5분간 원심분리하여 균체를 회수하였다.

회수된 균에 10 m*l*의 G.T.E 용액[50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl(pH 8.0), 10 mM EDTA]을 넣어 균체를 잘 풀어준 후 1 m*l*의 lysozyme(50 mg/m*l*) 용액을 넣어 섞은 다음, 실온에서 5분간 정치하였다. 새로 제조한 20 m*l*의 NaS 용액(0.2 N NaOH, 1% SDS)을 넣어 균체를 균질화시킨 후, 얼음속에서 10분간 정치하였다. 15 m*l*의 3 M potassium acetate 용액(5 M potassium acetate 60 m*l*, glacial acetic acid 11.5 m*l*, 멸균증류수 28.5 m*l*)을 넣어 천천히 섞어주고, 5분간 정치한 다음, 상온에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 새로운 용기에 옮겼다. 여기에 동량의 Isopropanol을 넣고 원심분리하여 모아진 침전물은 1 m*l*의 TE 용액을 넣어 잘 녹인 다음 RNase A를 10 μg/m*l*의 농도로 첨가하고 37℃에 30분간 반응시킨 후 동량의 phenol 용액을 처리하여 단백질이 제거된 상등액만을 취하였다. 얻어진 상등액으로부터 혹시 남아 있을지도 모르는 phenol을 제거하기 위하여 동량의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)을 넣어 원심분리한 다음 다시 상등액만을 취하였다. 이 상등액에 2배의 99% 에탄올을 넣고, −70℃에서 15분간 정치한 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 얻은 후, 70% 에탄올로 닦아내어 건조시켰다. 건조된 침전물에 100 μ*l*의 TE를 넣어 잘 녹인 후 OD_{260} nm에서 흡광도를 측정하여 DNA의 순수도와 농도를 조사한 후, 환산하여 사용하였다.

3. 융합유전자 pSK4, pSK5의 작성

독소유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pSK3 DNA를 순수분리하여, EcoRI, HindIII, ClaI등의 제한효소를 시간과 조건을 달리하여 처리한 후, 전기영동하여 얻어진 DNA 절편의 배열순서 결정에는 partial digestion 방법에 의거하여 제한효소 유전자 지도를 작성하고 추후 sequencing을 통하여 확정하였다.

B.t k HD-1 CryIA(a) 유전자의 subclone pSK3는 HindIII로 절단한 후 제한효소 EcoRI을 이용 제한효소 지도 작성으로 확인된 internal EcoRI 부위를 partial digestion하여 부분제거 하였다. B.t k HD-73 CryIA(c) 내독소단백질 유전자가 함유된 pKU-CP6 DNA를 순수분리하여 제한효소 BamHI으로 절단한 뒤 0.7% agarose gel에 전기영동하여 elution한 3.7 kb 정도의 BamHI 절편을 pUC19 벡터 BamHI site에 subcloning하여 pKU-CP6-I을 얻었다. Subclone pKU-CP6-I을 HindIII와 EcoRI으로 절단하여 내독소단백질 유전자의 variable region에 해당하는 1.8 kb 정도의 절편을 elution하였다. 이것을 부분제거된 절편과 융합하여 4.8 kb의 pSK4와 5.5 kb의 pSK5 벡터를 만들었다.

4. Western blot

재조합 플라스미드를 함유한 *E. coli*를 Ampicillin (100 μg/ml)이 들어있는 L.B 배지에 접종하여 37℃에서 18시간 배양했다. 배양액 1 ml를 원심분리(12,000 rpm, 30 sec)하여 균체를 회수한 후 500 μl의 氷冷下의 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)로 균체를 씻어 집균한 다음 25 μl의 멸균증류수와 25 μl의 2×SDS sample buffer(100 mM Tris-HCl(pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)를 넣고 균체가 완전히 풀릴 때까지 교반하였다.

이 균체를 초음파 攪拌器를 이용하여 氷冷下에서 22,000 cycle/sec의 속도로 30초간 攪拌하고, 100℃ 물에서 5분 동안 가열하였다. 상온에서 12,000 g, 10분간 원심분리하여 상등액(25 μl)만을 취하여 Laemmli(1970) 방법에 의거하여 SDS-PAGE를 수행하였다.

SDS-PAGE한 gel은 Towbin 등(1979)의 방법에 의거하여 western blotting 완충액(24 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol)에서 nitrocellulose filter로 단백질을 electrophoretic blotting한 후, nitrocellulose filter를 1% bovine serum albumin으로 blocking시킨 뒤 미리 준비된 B.t k HD-1 내독소단백질 항체를 TBST 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20)으로 100배 희석하여 1차 항체로, goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate를 2차 항체로 결합시켰으며, substrate로 15 ml의 alkaline phosphate 용액(100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$)과 99 μl의 NBT (Nitro Blue Tetrazation 50 μg/ml in 70% dimethylformamide)와 50 μl의 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, 50 μg/ml in 70% dimethylformamide)을 잘 섞어 발생시켰으며 증류수로 반응을 정지시켰다.

5. 독성검정

재조합 플라스미드(pSK3, pSK4 및 pSK5)를 함유한 형질전환체 *E. coli*를 Ampicillin(100 μg/ml)이 들어있는 L.B배지에 접종하여 37℃, 18시간 배양하였다. 배양액을 12,000 rpm, 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 2 ml의 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 7.4)로 잘 풀어준 후 초음파 분쇄기를 이용하여 氷冷下에서 22,000 cycle/sec의 속도로 30초씩 5번 교반하여 인공사료 2 g에 0.2 ml의 시료를 도말한 후 이를 배추좀나방의 3령 유충을 50마리씩, 그리고 담배나방의 3령 유충을 40마리씩을 각각 공시하여 30℃에서 5일간 처리사료로 사육하면서 치사효과를 관찰하였다.

結果 및 考察

1. 내독소단백질 유전자의 위치탐색

Bacillus thuringiensis HD-1 균주의 내독소단백질 유전자는 4종류[CryIA(a), CryIA(b), CryIIA, CryIIB]로 구성되어 있다. 또한 이들 내독소단백질을 coding하는 유전자가 CryIA(a)는 4.5 kb, CryIA(b)는 5.3 kb에 위치하는 것(Kronstad *et al.*, 1983; Höfte and Whiteley, 1989)으로 알려져 있다. 한편 CryIA(c)로서 *B. thuringiensis* HD-73 균주의 경우는 독소단백질 유전가가 73 kb plasmid상의 6.6 kb HindIII 절편에 위치하는 것으로 보고(Kronstad *et al.*, 1983)되었다. 이러한 3종류의 유전자인 CryIA(a), CryIA(b) 및 CryIA(c)는 서로 80%의 상동성을 보이고 있다. 따라서 우리는 유사한 유전자의 융합 가능성을 확인하고 이 기능을 이용하여 종류가 다른 B.t균주의 융합으로 기주범위를 이 실험을 통하여 넓히고자 시도하였다.

우리는 B.t k HD-1 내독소단백질 유전자를 탐색하기 위하여 전체 플라스미드 DNA를 순수분리한 후

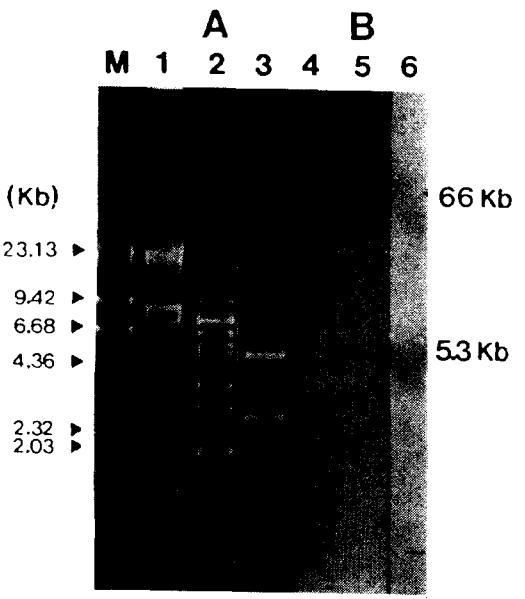

Fig. 1. *Hybridization analysis of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 total plasmid DNA. (A) Agarose gel displaying plasmids from derivatives of strain HD-1. Lane 1, Crude plasmid; lane 2, HindIII digested total plasmid DNA fragments; lane 3, HindIII digested plasmid pSK2. (B) Southern blot of panel A probed with the radioactively laveled 3.7 kb BamHI fragment.*

제한효소 HindIII로 절단하고, 0.7% agarose gel에 전기영동한 후 nitrocellulose filter에 전이시킨 다음, pKU-CP6의 BamHI 3.7 kb 절편을 probe로 하여 Southern blotting을 행하였다(Fig. 1). 전체 플라스미드 DNA를 loading한 lane 4에서는 66 kb에, 그리고 HindIII로 절단한 lane 5에서는 5.3 kb 위치에서 각각 내독소단백질 유전자가 존재해 있는 것으로 밝혀졌다. pKU-CP6는 HD-73의 CryIA(c)의 내독소단백질 유전자가 cloning된 벡터로 CryIA(a), (b), (c)간의 DNA 상동성 때문에 probe로 선택하였다.

2. 내독소단백질 유전자의 cloning과 subcloning

Southern blotting 분석에 의해 확인된 HindIII 절편을 얻기 위해 순수분리된 B.t k HD-1 plasmid DNA를 HindIII로 절단하여 0.7% agarose gel에 전기영동한 후 5.3 kb DNA 절편을 용출하였다. 미리 HindIII로 절단하고 dephosphorylation시킨 pUC19 벡터에 용출된 5.3 kb DNA 절편을 ligation한 후 *E. coli* JM109 균주에 형질전환시켜 X-gal과 IPTG가 표면처리되고 Ampicillin이 들어 있는 L.B 배지에 균체를 배양하였다. 선택배지 상에서 얻어진 5개의 흰색 콜로니를 선발하여 Southern blotting한 결과, 내독소단백질 유전자가 함유된 5.3 kb clone을 얻어서 pSK2로 명명하였다. 또한 pSK2를 여러 제한효소로 처리하여 Southern blotting한 결과, HindIII로 처리했을 때 벡터를 포함한 4.5 kb 정도의 위치에서 내독소단백질 유전자의 존재를 확인할 수 있어 이를 subcloning하여 pSK3을 얻었다.

얻어진 pSK3 내독소단백질 유전자를 Sanger 등(1977)의 dideoxynucleotide chain termination 방법에 의해 DNA 염기서열을 결정하였으며, 필요한 부분에 대해서는 합성 oligonucleotide를 제조하여 primer로 사용하였다.

결정된 염기서열중 translation start codon ATG는 155번째의 nucleotide로부터 시작되고, 전사 개시 장소로는 Wong 등(1983)이 보고한 것과 같이 B.t I와 B.t II로서 2개가 존재하는 것으로 확인할 수 있었는데, B.t II의 경우는 67번째 nucleotide에서, B.t I의 경우 86번째 nucleotide로부터 시작되는 것을 알 수 있었다. 또한 Adang(1985)이 보고한 Shine-Dalgano sequence인 'GGAGG"는 144-148번째 nucleotide임을 확인할 수 있었다. 한편 추정되는 아미노산의 수는 Höfte등(1989)이 보고한 1,155개에 훨씬 못미치는 566개였고, termination codon이 없는 것으로 보아 말단부분이 절단된 truncate된 유전자임을을 확인할 수 있었다.

일반적으로 B.t 내독소단백질 유전자에 있어서 toxin domain은 protoxin으로부터 N-말단 절반 정도까지이고(Höfte and Whiteley, 1989), 실제로 HD-1의 경우 독성을 나타내는 내독소단백질의 분자량이 약 68 kDa(Schnef *et al.*, 1985)인 점 등으로 미루어 보아 566개의 아미노산을 가진 pSK3의 경우에는 독성이 없는 것으로 독성검정을 통해서 확인할 수 있었다.

3. pSK4와 pSK5의 융합 유전자 제작

pSK3의 독성을 재생시키기 위해서는 B.t k HD-1 5.3 kb 유전자에서 active domain의 3′ proximal region인 567-620 아미노산 절편을 결합시켜야 한다. 그러나, 이와 같은 시도는 다른 연구자에 의한 deletion analysis 실험(Schnepf *et al.*, 1985)을 통하여 이루어졌기 때문에, 본 실험에서는 유전자형이 다른 HD-73 CryIA(c) 유전자의 internal 1.8 kb EcoRI-HindIII 절편을 기존의 pSK3의 완전히 HindIII 절단한 후에 EcoRI으로 부분 절단한 절편에 ligation시켜 융합 플라스미드인 pSK4와 pSK5를 얻었다(Fig. 2). 제조된 pSK4, pSK5의 방향성을 확인하기 위해 제한효

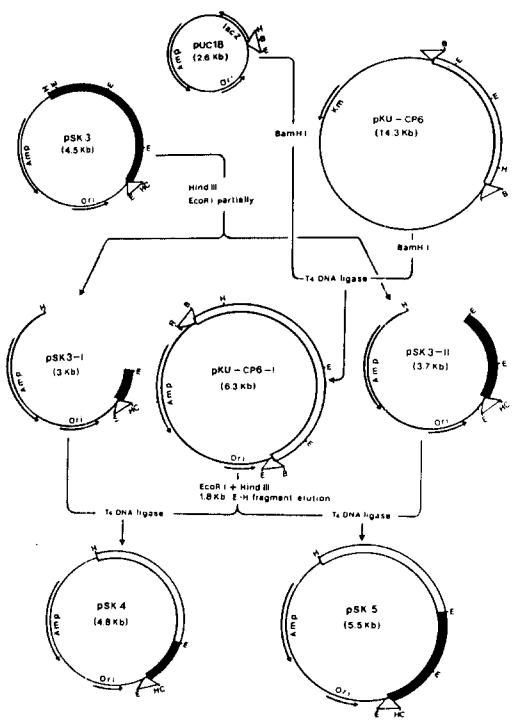

Fig. 2. *Constraction of plasmid containing a partial B. thuringiensis subsp. kurstaki strain HD-1 and HD-73 crystal protein gene.*

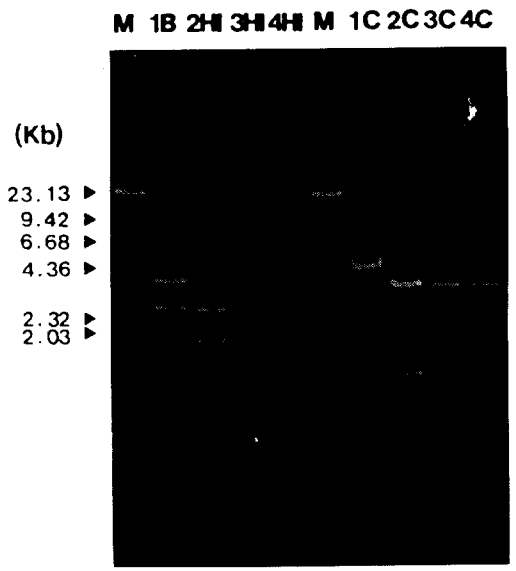

Fig. 3. *Comparison of restriction enzyme patterns of pSK3, 4, 5 and pKU-CP6-I.*
M: λDNA/HindIII, 1B: pKU-CP6-I, 2HI: pSK3/HindIII + HincII, 3HI: pSK/4HindII + HindII, 4HI: pSK5/HindIII + HincII, 1C: pKU-CP6-I/ClaI, 2C: pSK3/ClaI, 3C: pSK4/ClaI, 4C: pSK5/ClaI.

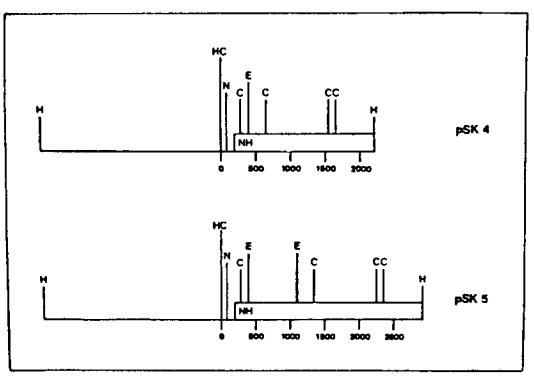

Fig. 4. *Restriction enzyme map of pSK4 and pSK5.*
H: HindIII, Hc: HincII, N: NdeI, C: ClaI, E: EcoRI.

소 BamHI, HindIII, ClaI을 이용해서, 벡터인 pKU-CP6-1과 pSK3을 같이 전기영동하여 REN 형태를 비교하였다(Fig. 3). BamHI으로 처리한 pKU-CP6-I의 경우(Fig. 3, lane 1B), insert의 크기가 3.7 kb 정도, HindIII와 HincII로 이중절단한 나머지 pSK3(Fig. 3, lane 2HB), pSK4(Fig. 3, lane 3HB), pSK5(Fig. 3, lane 4HB)의 경우, 각각 1.9 kb, 2.2 kb, 2.9 kb로서 예상했던

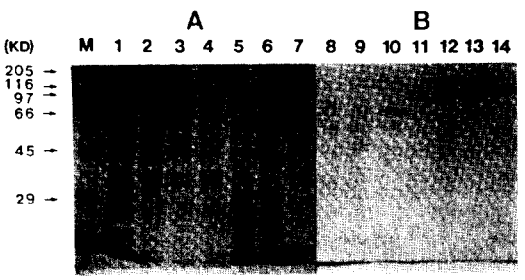

Fig. 5. *SDS-PAGE (A) and immunoblot (B) of extract of B. thuringiensis and E. coli. Lane 1, wild type E. coli JM109; lane 2, E. coli JM109 harboring pUC19; lane 3, E. coli clone pSK4; lane 4, E. coli clone pSK5; lane 5, B. thuringiensis subsp. kurstaki HD-1; lane 6, B. thuringiensis subsp. kurstaki HD-73; lane 7, E. coli clone pKU-CP6; lane M, protein marker.*

Table 1. *Assays for toxicity of preparations purified from B.t k HD-1 and recombinant E. coli strains*

Strain	Tested Larvae	
	P. maculipennis	*H. assulta*
HD-1	50/50	40/40
SK3	0/50	0/40
SK4	0/50	0/40
SK5	48/50	37/40
E. coli BL21(DE3)	0/50	0/40

* No. Dead Individuals/No. Tested Individuals.

insert의 크기와 일치하였고, ClaI으로 절단, 확인한 결과 이들 1.8 kb EcoRI-HindIII 절편이 올바른 방향으로 ligation되었음을 확인할 수 있었으며, pSK4 및 pSK5의 제한효소 지도를 작성하였다(Fig. 4).

4. 재조합 균주 pSK4와 pSK5의 western blot.

재조합 균주에서의 pSK4와 pSK5의 발현여부를 조사하기 위해서 세포 추출물을 전기영동하여 western blotting을 하였다(Fig. 5). lane 10은 pSK4, lane 11은 pSK5의 western blotting 결과로서, 각각 약 77 kDa, 105 kDa의 내독소단백질 유전자가 발현되었음을 알 수 있었다. lane 7은 pKU-CP6-I의 세포 추출물로 wild type JM109와 확실히 다른 형태를 보이고 있으면서도 lane 14에서와 같이 blot간의 공통 minor band가 확인되므로서 독소와 *E. coli* 세포 추출물간의 단백질 상호작용이 일어났을 가능성이 있을 것으로 추측된다. pSK4와 pSK5는 각각 약 2.2 kb와 2.9 kb의 insert를 갖는 균주로 translational start site로부터

그 추정된 아미노산을 계산하면 약 73 kDa과 100 kDa의 분자량을 갖는 단백질로서 위의 결과와 유사한 것으로 판단된다.

5. 독소단백질의 발현에 대한 독성검정

E. coli JM109 세포에서 재조합 플라스미드 pSK3, pSK4, pSK5의 발현으로 생성된 단백질의 분자량을 측정한 결과, B.t HD-1의 내독소단백질가 매우 유사한 성질을 갖는 것으로 확인되었으나, Table 1은 이들의 생물학적 활성 여부는 살충력 검정으로서 확인할 수 있다. 살충력 검정 실험에서 세포내 내독소단백질을 합성하여 결정성 내독소를 만드는 B.t k HD-1과 달리 재조합 균주인 SK3, SK4 및 SK5가 결정성 내독소 형태를 만들지 못하므로 초음파 교반기를 통해 세포 밖으로 추출시킨 다음, 이를 시료로 사용하였다. 독성검정에 있어서 SK3와 SK4는 active domain 부위의 variable region이 소실된 결과로서 생성된 단백질의 독성은 확인되지 않았다. SK4는 CryIA(b) 유전자의 translational start codon으로부터 92 codon까지의 절편에 CryIA(c) 유전자의 333 codon에서 933 codon까지의 절편을 융합한 것으로서 일반적인 독소 절편에서 92 codon부터 331 codon까지의 부위가 소실된 균주이다. 이것의 독성검정 결과는 SK3과 같은 결과를 나타낸 것으로 보아 toxic moiety 29-607 codon의 N-말단쪽 약 1/2이 소실됨으로 인해 독성이 손실된 것으로 생각된다. 그러나 이 소실된 부위가 절대적으로 독성에 어떤 영향을 미치는지는 이 실험만으로는 알 수가 없었으며, 독소 절편의 conserved region도 독소의 일반적인 형태에 관여하나 독성발현에 없어서는 안될 부분으로 추정된다.

또 하나의 형질전환체 SK5는 CryIA(b) 유전자의 Met codon부터 331 codon까지의 절편에 SK4와 같은 CryIA(c) 유전자 internal 절편을 융합시킨 재조합 균주이다. 즉 331-333 codon 부위가 소실된 SK5의 독성검정은 처리구에서 배추좀나방에는 96%, 담배나방에는 97%의 높은 치사율을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 아미노산의 N-말단쪽 332 codon 부위는 독성에 관여하지 않는 것으로 추측할 수 있으며, CryIA(b) 유전자의 truncated N-말단 부분과 CryIA(c) 유전자의 C-말단 부분의 융합은 독성범위를 넓힐 수 있는 새로운 균주의 개발 가능성을 나타내 주었다.

摘 要

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1의 내독소단백질 유전자인 CryIA(a)의 N-말단 부분과 B.t k HD-73의 내독소단백질 유전자인 CryIA(c)의 C-말단 부분의 융합에 따른 독성발현 여부에 관하여 조사하였다. 융합생산물인 pSK3, pSK4 및 pSK5의 플라스미드는 각각 4.5 kb, 4.8 kb 그리고 5.5 kb로 구성되어 있다. 형질전환체의 내독소단백질에 대한 Western blotting은 SK4 및 SK5가 77 kDa 그리고 105 kDa에서 B.t k HD-1 항체에 대하여 반응을 나타내었다. 독성검정의 공시충인 배추좀나방 및 담배나방을 사용한 결과 pSK5를 포함하는 형질전환체만이 각각 96% 및 97%의 높은 치사율을 나타냈다.

사 사

이 연구는 교육부 유전공학 연구비와 서울대학교 농업신소재 연구센터 지원에 의하여 수행된 것이다.

引 用 文 獻

Adang, M. T., M. J. Staver, T. A. Rocheleam, T. Leighton, R. F. Barker, and D. V. Thompson(1985) Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexia.* Gene, **36**: 289-300.

Batron. 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.

Brinboim, J. C., and J. Doly(1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., **7**: 1513-1523.

Dulmage, H. T., and R. A. Rhodes(1971) Production of pathogens in artificial media, p. 507-540. In H. D. Burgess and N. W. Hussey(ed.), Microbiol control of insects and mites, Academic Press. Inc., New York.

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.

Guy, H., W. Vriezen, and B. Visser(1990) A translation fusion product of two different insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* exhibits an enlarged insecticidal spectrum. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 823-825.

Hannay, C. L., and P. Fitz-James(1955) The protein crystals of *Bacillus thuringiensis berliner.* Can. J. Microbiol. **1**: 694-710.

Höfte, H., H. Greve, J. Seurinck, S. Jansens, and J. Mahillon(1986) Structural and functional analysis of

a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis Berliner* 1715. Eur. J. Biochem. **161**: 273-280.

Höfte, H., and H. R. Whiteley(1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. **53**: 242-255.

Krieg, V. A., A. M. Huger, G. A. Langenbruch, and W. Schnetter (1983) *B. thuringiensis* var *tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of coleoptera. Z. Angew. Entomol. **96**: 500-508.

Kronstad, J. W., H. E. Schnepf, and H. R. Whiteley (1983) Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. J. Bacteriol. **154**: 419-428.

Laemmli, U. K.(1970) Cleavage of structrual proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London), **227**: 680-685.

Obukowitcz, M. G., F. J. Perlak, F. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, and L. S. Watrud(1986) Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of Pseudomonads usiong Tn5. Gene **45**: 327-331.

Sanger, F., S. Nicklen., and A. R. Coulson(1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Nat'l. Acad., U.S.A., **74**: 5463-5467.

Schnepf, H. E., H. C. Wong, and H. R. Whiteley(1985) The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. **260**: 6264-6267.

Thirumaran, T., H. John, B. Sydney, O. Coreen, and B. Colin(1992) Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant caulobacter crescentus, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. Appl. and environ. Microbiol. **58**: 905-910.

Towbin, H. R., R. Stachelin and J. Gordon(1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A., **76**: 4350-4354.

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.

Wong, H. C., H. E. Schnepf., and H. R. Whiteley(1983) Transcriptional and translational start sites for the B.t crystal protein gene. J. Biol. Chem., **254**: 1960-1967.