

## D1 살충성 유전자 cryIAc1 염기서열 변형 및 합성

농업과학기술원 : 박범석\*, 남승현, 조현석, 김정선, 진용문, 김호일

서울대학교 : 제연호

### Synthetic insecticidal cryIAc1 gene

National Institute of Agricultural Science and Technology : Beomseok Park\*,

Seunghyun Nam, Hyunsuk Cho, Jungsun Kim, Yongmoon Jin, Hoil Kim

Seoul National University : Yeonho Je

#### 시험목적

토양 세균 *Bacillus thuringiensis*(Bt)의 살충성 유전자 cryIAc1의 염기서열을 변형하여 식물체에 도입했을 때 높은 효율로 발현되도록 함.

#### 재료 및 방법

- o 배추 유전자들의 codon 조사 및 cryIAc1 유전자 곤충독소 부분(1854 bp) 변형
- o Primer 합성 및 recursive PCR
- o PCR 단편 클로닝, 염기서열 분석 및 PCR 단편 연결
- o in vitro 발현, SDS-PAGE, western blot 및 생물검정

#### 결과 및 고찰

- o 배추과 작물의 중요 해충인 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 방제를 목적으로 cryIAc1 유전자의 전체 3537 bp 중 곤충독소 부분인 아미노말단 1854 bp를 아미노산서열 변화없이 염기서열을 변형시켰다.
- o 배추의 metallothionein-like protein (490 bp, accession no. L31940) 등 배추 유전자 11개의 codon usage를 조사하여 염기서열 변형에 참조하였다.
- o 진핵세포 유전자들의 발현 조절 요소로서 가능한 염기서열은 모두 제거하면서 G+C 함량은 48 %로 높였다.
- o PCR 프라이머는 56개를 합성하였는데, 순서대로 인접한 프라이머와 14 - 18 염기씩 중첩되며, 중첩부분의 annealing 온도가 45 °C 이상 되도록 하였다.
- o Recursive PCR 결과 변형된 cryIAc1 1,865 bp를(번역종료 codon과 제한효소자리 첨부로 9 bp 증가) 포함하게 되었을 때 PCR 단편 클론은 7개였는데, 이들을 제한효소자리를 이용하여 연결하였다.
- o 전이벡터 pBac8-Bt9 과 BacPAK6 viral DNA를 이용하여 곤충세포 Sf9에서 재조합 바이러스를 선발하고 변형 cryIAc1을 발현시켰다.
- o 변형 cryIAc1 단백질 발현을 SDS-PAGE 및 western blot으로 분석하였다.
- o 배추좀나방 유충으로 변형 cryIAc1 단백질의 살충성을 검정, 확인하였다.

Table 1. Comparison of wild-type cryIAc1 and modified cryIAc1 gene

	Wild-type gene	Modified gene
Bases different from wild-type	-	393/1854(21.2%)
Codons different from wild-type	-	349/618(56.5%)
Base composition	577 A; 315 C; 377 G; 585 T	479 A; 497 C; 397 G; 481 T
G + C content	37.32 %	48.22 %
Potential poly(A) sites	11	0
A + T rich regions, >6 consecutive A and/or T	36	0
ATTTA sequences	9	0
CCAAT	6	1
TATA	19	0
AGGT(intron 3' end)	6	0

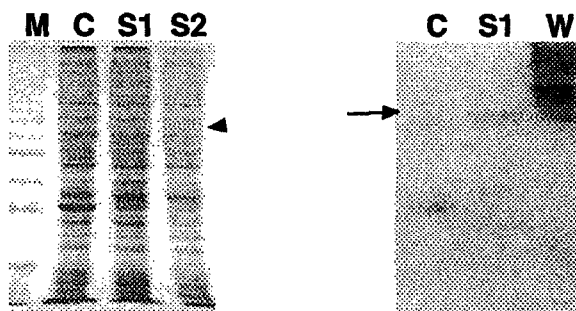


Fig. 1. SDS-PAGE and western blot analysis of modified cryIAc1 protein produced in insect cell culture. (Left) Arrowhead indicates the 67 kD toxin protein. (Right) The 67 kD band in S1 column showed specific reaction to anti-cryIAc1 antibody. M, protein size marker; C, total protein of cell culture infected with BacPAK6; S1, infected with recombinant vBac-Bt9-S1; S2, infected with recombinant vBac-Bt9-S2; W, cryIAc protein from wild-type Bt.

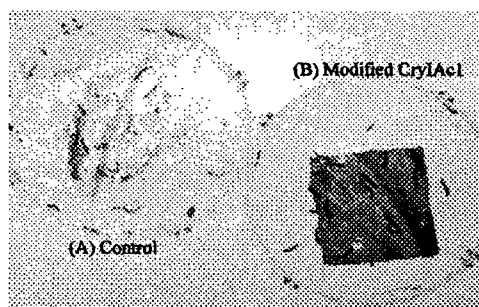


Fig. 2. Diamondback moth assay with modified cryIAc1 protein. Chinese cabbage leaf treated with mock infected insect cell suspension (A) and baculovirus vector containing modified cryIAc1 gene infected cell suspension (B). All diamondback moth larvae died after 18 hours of feeding.