

## *B. thuringiensis* var. *kurstaki*와 *B. thuringiensis* var. *israelensis* 내독소 결정체의 전자현미경 관찰과 전기영동분석

이형환 · 강태숙 · 유관희

전국대학교 생물학과 분자미생물학교실  
(1985년 9월 2일 수리)

## E. M. Visualization and Electrophoresis analysis of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* and *B. thuringiensis* var. *israelensis* $\sigma$ -endotoxin

Hyung Hoan Lee, Tae Sook Kang, Kwan Hee Yoo

Molecular Microbiology Laboratory, Department of Biology,  
Kon Kuk University, Seoul 133 Korea  
(Received September 2, 1985)

Delta-endotoxin crystals of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* and *B. thuringiensis* var. *israelensis* were purified by NaBr density gradient centrifugation and the wet weight of the BTK endotoxin was approximately 23.79% of the cell wet weight and that of BTI was 25%. The shape of BTK crystal was bipyramidal, whose size was  $1.7\mu\text{m} \times 0.9\mu\text{m}$  and that of BTI was a spheroid, whose size was about  $1.6 \times 0.45\mu\text{m}$ . The molecular weight of BTK crystal protein was approximately 134,000 daltons and that of BTI was about 128,000 daltons.

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (BTK)는 인시류, 쌍시류 및 진더물 등의 유충에 독성을 나타내는 단백질 결정형의 delta-endotoxin (내독소)을 아포 형성시에 세포내에 생산하며<sup>(1,2,3,4)</sup>, *B. thuringiensis* var. *israelensis* (BTI)는 모기의 유충에 독성을 나타내는 delta-endotoxin을 아포 형성시에 세포내에 형성을 한다<sup>(5,6,7,14)</sup>. BT의 delta-endotoxin은 강 알칼리 pH에서 용해되며, 곤충에 독성을 나타낸다는 사실을 Thosmas와 Ellar<sup>9</sup>는 보고했다.

BTK의 성숙된 endotoxin은 모양이 이중 피라미드 형태이고<sup>(1,2)</sup>, BTI는 형태가 광학현미경적 관찰에 의하면 원형으로 보고된 바 있으나<sup>(2)</sup>, 전자현미경적 비교는 아직 미흡하며, 형태적인 차이가 어떻게 하여 생기는지, 그리고 내독소 결정체 단백질을

이루는 폴리펩티드의 어떠한 차이에 의해서 숙주범위가 상이한지는 아직 규명되지 않고 있다.

본 연구에서는 상기의 두 균주의 내독소의 전자현미경 비교관찰과 endotoxin의 분리 및 SDS-PAGE에 의한 분석 등을 비교한 것을 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 사용한 균주

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* K-3 (BTK)와 var. *israelensis* K-14 (BTI)는 본 연구실에 보관 중인것을 사용하였다.

#### 실험 방법

##### 1) BT균의 생장곡선의 측정

멸균된 GBY배지 (Glucose 2.0g, yeast extract

2.0g, bactopectone 2.0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.05g,  $CaCl_2$  0.08g,  $ZnSO_4$  0.005g,  $CuSO_4 \cdot H_2O$  0.005g,  $(NH_4)_2SO_4$  2.0g,  $K_2HPO_4$  0.5g을 1,000ml 증류수에 녹인 후에 pH 7.0 으로 조정) 10ml에 BT균을 2백금이 접종하여 28°C에서 12시간 배양한 다음에 멸균된 250ml의 GBY 배지에 5ml의 BT배양액을 넣고 회전진탕 배양기(Labline Inst.)에서 180rpm으로 배양하면서 일정 시간마다 4ml씩 채취하여 570nm에서 분광광도계(Shimadzu 120)로 세포의 양을 측정했다.

## 2) 내독소 결정체의 정제

BTK 또는 BTI균주를 멸균한 GBY 배지 250ml에 2백금이를 접종한 후에 28°C 항온기에서 72시간 배양을 한 다음 17,000×g로 원심분리를 15분간 하여 배양균을 침전시키고 상등액은 버렸다. 침전 배양균을 증류수로 현탁하여 3회 반복 원심분리 하여 세척했다. 그 후 증류수에 녹인 1.0M NaCl과 0.01% Triton X-100 혼합용액 5ml로 현탁하여 초음파 파쇄기(braun-sonic 151D)로 세포벽을 파괴하기 위하여 30초씩 초음파를 15회 처리하였다. 분쇄액은 20~70% NaBr 밀도구배 원심분리를 4°C, 20,000×g(kontron A4)에서 2시간 동안 실시한 후에 원심분리 튜브에 분리되어 형성한 각 층 밴드를 파스태르피펫으로 회수하여 위상차 현미경으로 내독소 결정체를 관찰한 후 내독소 결정체 밴드를 분리했으며, 결정체의 양을 조사했다.

## 3) 내독소 결정체의 전자현미경적 관찰

정제된 내독소 결정체 현탁액을 콜로디온 막을 씌운 전자현미경 그리드위에 떨어뜨리고 실온에 방치하여 건조를 시킨 뒤에 platinum으로 코팅하여 주사전자현미경(Hitachi S-450)으로 20kv에서 15,000배로 관찰했다.

## 4) 내독소 결정체 단백질의 SDS-PAGE 분석

내독소 결정체 용액 2.5ml을 1N NaOH로 pH가 12로 되게 조정된 후에 37°C에서 30시간 처리한 다음, 다시 pH가 7.5로 되게 재조정했다. 용해된 내독소 용액 200μl에 SDS 완충액(4.6% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.125 M Tris·HCl, 0.1% Bromophenol, pH 6.8)을 200μl 첨가하여 혼합한 후에 100°C에서 90초간 열처리를 하여 디스크킬링 10% 폴리아크릴아마이드젤에서 전기영동을 킬링당 4mA로 9시간 실시했다.

표준분자량 측정용 단백질(Pharmacia Fine chemicals) 100μg을 2.5% SDS 완충액(2.5% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.125 M

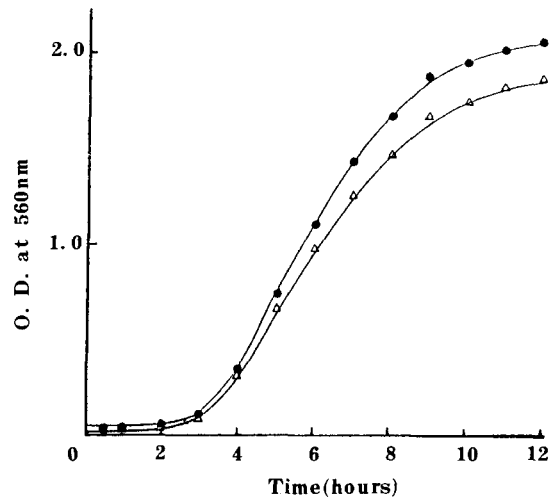


Fig. 1. Growth curves of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* and *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

They were cultured in GBY medium at 28°C, whose growths were measured at 560nm.

●—● *B. t. var. israelensis*

△—△ *B. t. var. kurstaki*

Tris-HCl, 0.1% Bromophenol blue, pH 6.8) 에 섞은 다음에 100°C에서 5분간 열처리를 하여 폴리 아크릴아마이드젤에서 전기영동을 했다. 전기영동 젤의 준비와 방법은 O'ffarel *et. al.*<sup>(10)</sup>의 방법을 따랐으며, 젤을 trichloric acid로 고정탈색을 한 후에 Densitometer (Camag Scanner)로 분석을 했다.

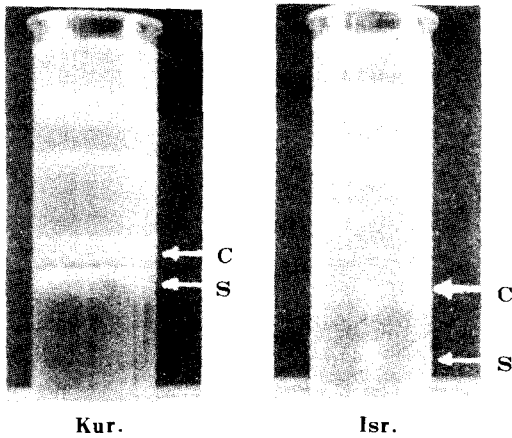
## 결과 및 고찰

*B. thuringiensis* var. *kurstaki*와 var. *israelensis*의 성장

BTK와 BTI의 성장은 접종 후 3시간부터 대수 증식기에 들어가 10시간 후에는 정체기에 들어가는 것으로 나타났다(Fig. 1).

### 내독소 결정체의 정제

BT배양액을 초음파 처리하여 NaBr 밀도 기울기 구배에서 내독소 결정체를 아포와 완전히 분리할 수 있었다(Fig. 2). 내독소 결정체와 아포를 밀도 기울기 구배에서 완전히 분리하는 데는 NaBr의 농형성 조건에 따라서 BTK와 BTI 사이에 차이를 나타냈다. BTK는 NaBr 밀도 조성이 50 ml의 원심분리기 튜브에서 70%의 NaBr을 5ml, 60%는 8ml,



**Fig. 2. Separation of endotoxin crystals and spores in *B. thuringiensis* lysates by 20-60% NaBr density gradient centrifugation.**

BTcultures were sonificated and then centrifuged at 20,000 × g for 2 hours at 4°C. C indicates crystalline endotoxin band and S does spores.

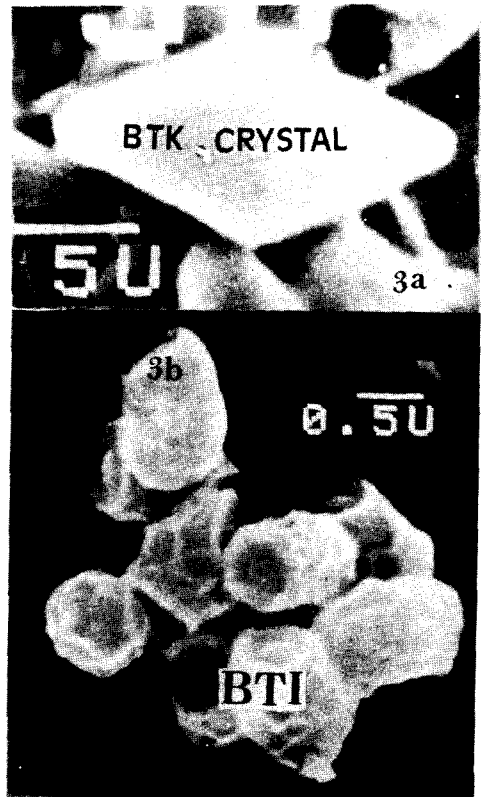
Kur : BT kurstaki, Isr : israelensis.

50%는 8ml, 40%는 10ml, 30%는 8ml, 그리고 20%는 5ml씩을 아래로부터 위로 넣고 2시간 20,000g 에서 원심분리를 했을 때에 내독소 결정체층이 튜브 중앙에 그리고 아포는 튜브 중앙 아래쪽에 각각 떠를 형성하였다. BTI의 경우는 NaBr농도가 70%인 것이 4ml, 60%는 8ml, 50%는 12ml, 40%는 12ml, 30%는 14ml, 20%는 14ml씩을 넣은 튜브에서 내독소 결정체와 아포를 뚜렷이 분리할 수 있었다. BTI 내독소 결정체는 튜브 중앙에, 아포는 밑에서 떠를 형성했었다 (Fig. 2).

상기 방법으로 형성된 내독소 결정체와 아포를 분리하여 원심분리를 시켜 배양 후의 침전 세균량 (Wet weight)과 비교한 결과 BTK 내독소의 무게의 비율은 23.79%, BTI는 25.04%였다 (Table 1).

**Table 1. Weight of *B. thuringiensis* crystalline endotoxin.**

Strains	Amounts of BT lysate loaded (mg)	Amounts of endotoxin recovered (mg)	Weight ratio (%) of endotoxin
BT kurstaki	512.8	122	23.79
BT israelensis	906.6	227	25.04



**Fig. 3. Scanning electron micrographs of *B. thuringiensis* endotoxin.**

The crystals were coated with platinum and observed (× 30,000).

3a : BTK crystal, 3b : BTI crystal.

**내독소 결정체의 주사현미경적 관찰**

BTK의 내독소 결정체의 모양은 성숙되지 않은 것은 거의 구형에 가까웠으며, 점점 성숙되어 가면서 이중 피라미드형으로 성숙되어 가는 것을 관찰할 수 있었고, 외피는 굴곡이 많았다 (Fig. 3a). 성숙한 결정체의 크기는 길이가 1.7μm 이었고, 중앙의 폭은 0.9μm 였다.

BTI의 내독소 결정체의 모양은 원형에서 장타원형을 이루고 있었다. 장원형은 크기가 약 1.2×0.8 였으며, 장타원형은 길이가 1.6μm 이었으며, 폭은 약 0.45μm 였으며, 외형은 주름이 잡혀 있다 (Fig. 3b).

**내독소 단백질의 SDS-PAGE에 의한 전기영동 분석**

BTK와 BTI의 내독소 결정체를 pH 12의 알칼리 pH에서 완전히 용해시켜서 10% 폴리아크릴르마이드 젤 전기영동을 한 다음에 측정된 단백질 이동거리 (Rf)는 BTK는 0.406이었고 BTI는 0.421이었던

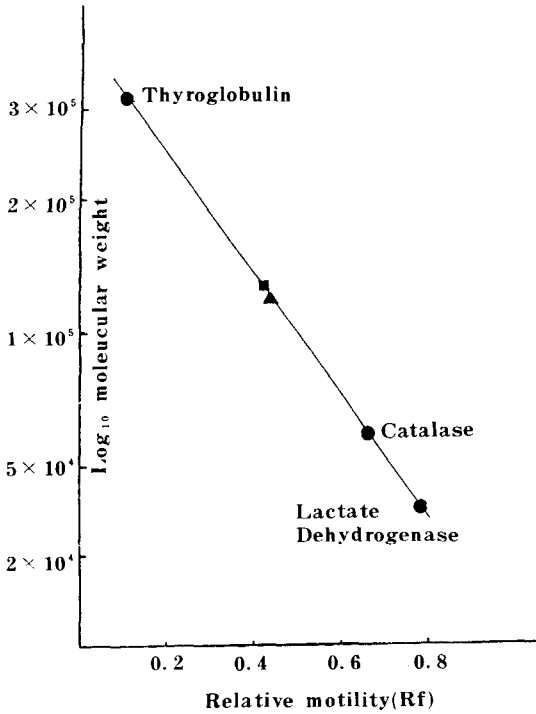


Fig. 4. Molecular weight of *B. thuringiensis* endotoxin proteins.

The curve was obtained with proteins from SDS-10% polyacrylamide gel electrophoregram.

(■) : BTK endotoxin protein,  
(▲) : BTI endotoxin protein.

으며, 이미 분자량을 아는 단백질들의 이동거리와 비교하여 결정한 분자량은 BTK의 내독소 단백질은 134,000 달톤이었고, BTI는 128,000 달톤이었다 (Table 2).

전기영동한 쥘을 densitometer로 분석한 결과는 결정체 단백질 때 이외 큰 띠는 나타나지 않은 것으로 보아서 단일 가닥의 폴리펩티드가 축적되어 내독소가 이루어진 것 같으며 (Fig.5), Hüher *et*

Table 2. Estimate of molecular weights of *B. thuringiensis* endotoxin proteins.

Strains	Rf	Relative molecular weights
BT kurstaki	0.406	134,000
BT israelensis	0.421	128,000

$$Rf = \frac{\text{distance from top line migrated by protein}}{\text{distance from top line migrated by dye}}$$

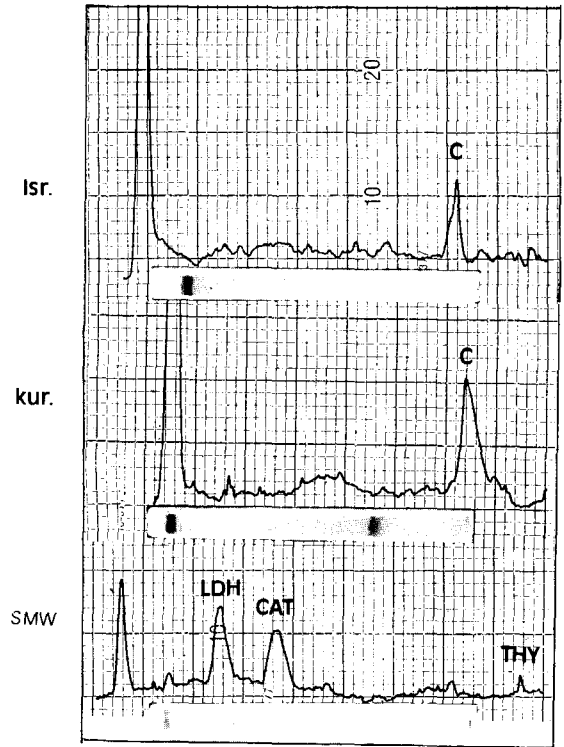


Fig. 5. Densitograms of electrophoretic endotoxin proteins of *B. thuringiensis* varieties.

The endotoxins were solubilized with 1.0 N NaOH and then run on 10% polyacrylamide gel.

C indicates endotoxin proteins.

LDH : lactate dehydrogenase (subunit : 36,000 달톤).

CAT : catalase (subunit : 60,000),

THY : thyroglobulin (330,000).

SMW : standard molecular weights.

*al*<sup>(12)</sup>은 내독소 단백질이 단일 폴리펩티드로 되어 있으며, 분자량은 약 130,000 달톤인 것을 보고한 결과와 매우 유사하다. 또한 Bulla *et al.*<sup>(13)</sup>은 BTK의 분자량이 약 120,000 달톤인 것으로 보고하였으나 본 연구에서는 더 크게 나타났다.

요 약

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 와 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 의 내독소 결정체와 아포를 NaBr 밀도 기울기 원심분리에 의하여 쉽게 분리하였으며, 전체 세포 무게에서 내독소 결정체

의 무게의 비율은 BTK가 23.79%, BTI가 25%였다.

BTK와 BTI의 내독소 결정체의 모형은 BTK는 이중 피라미드 형태이며, 성숙한 결정체의 길이는  $1.7\mu\text{m}$ 이었고, 중앙의 폭은 약  $0.9\mu\text{m}$ 였다. BTI의 내독소 결정체는 장타원형으로 큰 것은 길이가  $1.6\mu\text{m}$ 이고, 폭은  $0.45\mu\text{m}$ 였으며, 원형은  $1.2 \times 0.8\mu\text{m}$ 였다. 결정체 단백질의 분자량은 BTK의 것이 134,000달톤이었고, BTI의 결정체는 128,000달톤이었다.

### 참고문헌

1. Kurstaki, E: Microbial and Viral Pesticides. Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1982)
2. Lee, H.H., K.H. Yoo and S.Y. Kim, HG: *J. Gen. Eng.* **1**: 29-35 (1984)
3. Mohd-Salleh, M.B. and L.C. Lewis: *J. Invertebr. Pathol.* **39**: 290-297 (1982)
4. Dulmage, H.T., H.M. Graham and E. Martinez: *J. Invertebr. Pathol.* **32**: 40-50
5. Wraight, S.P., D. Molloy, H. Jamback and P. McCoy: *J. Invertebr. Pathol.* **38**: 78-87 (1981)
6. Charles, Par, J.F.: *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **134A**: 365-381 (1983)
7. Klowden, M.J., G.A. Held and L.A. Bulla, Jr.: *Appl Environment. Microbiol.* **46**: 312-315 (1983)
8. Armstrong, J.L., G.F. Rohrmann and G.S. Beaudreau: *J. Bacteriol.* **161**: 39-46 (1985)
9. Thomas, W.E. and D.J. Ellar: *J. Cell Sci.* **60**: 181-197 (1983)
10. O'ffarel, P.H.: *J. Biological Chem.* **250**: 4007-4021 (1975)
11. Labaw, L.W.: *J. Ultrastruct.* **10**: 66-75 (1964)
12. Hüber, H.E., P. Luthy, H.B. Ebersold and J.L. Cordier: *Archieve of Microbiology* **129**: 14-18 (1981)
13. Bulla, L.A., K.J. Kramer and L.I. Davidson: *J. Bacteriol.* **130**: 375-383 (1977)
14. de Barjac, H. C.R.: *Acad. Sci. (Paris)* **286**: 1629-1632 (1978).