

Bacillus thuringiensis serovar. *kurstaki* HD 73 균과 분리균 KBS 722 의 곤충치사 내독소 단백질의 Gene localization 에 관한 연구

오상수^{1*}·박영남²·구본성¹·박유신¹·윤상홍¹

¹농촌진흥청 농업기술연구소 유전공학과 ²동양나이론 중앙연구소

Entomocidal Protein Gene Localization of *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD73 and Isolates KBS722

Oh, Sang-Soo^{1*}, Young-Nam Park², Bon-Sung Koo¹, Yu-Shin Park¹
and Sang-Hong Yoon¹

¹Agricultural Biotechnology Division, Agricultural Sciences Institute, RDA,
Suweon 440-100, Korea

²Central Research Lab. Tongyang Nylon Co. Ltd., 183, Hoge-Dong, Anyang 430-080, Korea

Six plasmids of *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD73 were detected, with approximate sizes of 7.4, 7.8, 8.1, 11.3, and 75 Kb, as well as a low copied plasmid of similar length to 75 Kb. Partially cured mutants from *B. thuringiensis* HD73 were obtained either by the treatment of the curing agent, ethidium bromide(0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or by spontaneous curing. AcrySTALLIFEROUS mutants(Cry⁻) were identified by microscopic observation and immunoblotting with polyclonal antibody against 133 KD delta-endotoxin of HD73. Ten Cry⁻ mutants were found to be lack of 75 Kb plasmid. These results implicated that this plasmid was associated with delta-endotoxin production. After isolating the mutants, we streaked them on potato dextrose agar, spizizen casamino acid glucose, starch agar, and nutrient agar. Only on starch agar medium did morphologies of Cry⁻ appear translucent and light greyish. On the other hand, the mutants of *B. thuringiensis* isolated from Korean soil, designated KBS722, were obtained by the treatment of novobiocin (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). AcrySTALLIFEROUS mutants of KBS722 were less translucent than HD73 mutants' only on nutrient agar medium. Compared the plasmid profile of the mutants with delta-endotoxin production, the results seemed to indicate that the insecticidal protein gene of *B. thuringiensis* isolates KBS722 located on about 225 Kb plasmid DNA.

Bacillus thuringiensis 는 δ -endotoxin 을 생성하는 그람 양성균이며 여러가지 인시목과 쌍시목 유충에 독성을 나타내므로 미생물 살충제로 상품화되어 있는 중요한 산업미생물의 일종이다(1).

B. thuringiensis 는 1984 년도까지 H-flagella 의 항혈청 반응에 따라 24 아종으로 분류되어 있으며(2), 이후에도 계속 새로운 균주가 분리 보고되고 있다. 이 중에서 *B. t.* serovar. *kurstaki* 는 몇가지 농작물 및 산림해충에 대하여 타균주보다 독성이 강할 뿐만 아니라(3,4) 최근에 쌍시목 유충에 대해서도 독성이 있다고 보고되어 더욱 관심을 끌고 있는 균주로 알

려져 있다(5).

한편 이들 균주는 여러가지 plasmid DNA 를 보유하고 있는 것으로 알려져 있으며(5-9), 내독소 단백질 유전자를 암호화하는 plasmid 를 확인하기 위해서 plasmid curing(7,8) transconjugation(9), southern blotting 법(10) 등으로 내독소를 코드하고 있는 유전자가 몇개의 균주에서 밝혀지게 되었다. DNA hybridization 에 의한 내독소 유전자의 위치 확인은 내독소 단백질간 동질성 및 곤충치사 유전자의 재조합이 선행되어야 하는 실험상 복잡한 점이 있다. Plasmid 전이에 의한 transconjugation 은 비록 실험

Key words: *Bacillus thuringiensis*, insecticidal protein gene, plasmid curing, immunoblotting

* Corresponding author

방법은 간편하지만 donor 와 recipient 균주간 표지형질을 우선 선발해야 하는 단점도 있다. Plasmid curing 방법은 curing 후 변이주간 plasmid DNA 전기영동 양상과 내독소 생성능을 상호 비교하여 내독소 유전자의 위치를 밝혀내는 실험으로서 내독소 비생성균(Cry⁻)을 선발할 수 있는 방법이 문제가 된다. 또한 *B. thuringiensis* 균을 배양하거나 보관중에 자연적으로 특정 plasmid 가 curing 되어 살충력이 감소한다는 보고가 있어(8, 9, 11) *in vitro* 에서 내독소 생성균을 쉽게 선발할 수 있는 방법이 요청된다 고 하겠다.

따라서 본 연구는 인시목 유충에 대하여 독성이 강한 균으로 알려진 *B. t.* serovar. *kurstaki* HD73 균주를 사용하여 plasmid curing에 의한 내독소 유전자의 위치를 확인하고 변이주간 내독소 생성능을 간이 선별할 수 있는 배지를 선발했다. 이 방법을 국내 토양에서 분리한 KBS 722 균에 적용하여 그 내독소 단백질의 유전자 위치를 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

B. thuringiensis HD73 균주는 NRRL(Northern Regional Research Lab. USDA-ARS, Peoria, Illinois), IPL(USDA-ARS, Insect Pathology Lab. BARC-West, Beltsville, Maryland), Howard T. Dulmage(USDA-ARS Cotton Insect Research Unit, Brownsville Texas)로부터 각각 분양받았으며, *B. thuringiensis* HD2는 Dr. Bruce C. Carlton(Dept. of Mol. and Popul. Genetics Univ. of Georgia, Athens, Georgia), *E. coli* V1 57 균은 Dr. M.J. Voll(Dept. of Microbiology, Univ. of Maryland, College Park, Maryland)로부터 분양받았다.

B. thuringiensis HD73 균의 plasmid curing

YEG 액체배지(12)에 1 루프의 균을 접종하여 16 시간 배양한 다음 EtBr 용액(0.02 µg/ml)이 함유된 50 ml의 동일배지에 0.5 ml의 전배양액을 가하여 30°C에서 24 시간 배양하였다. 이 배양액을 적당히 희석한 후 테트라사이클린(9 µg/ml)이 함유된 YEG 평판배지에 도말하여 생육하지 않는 균을 4°C에서 18개월간 보관 후 다시 단일아포를 분리하여 선발하였다. 이 변이주들의 내독소 생성여부는 다음과 같이 확인하였다. 각각의 균을 nutrient 고체배지에서 1주일 배양한 다음 멸균된 면전봉으로 슬라이드그라

스상에 5~6개의 균을 이전, 화염고정 시켰다. 고정된 균은 Amido black 10-B로 3~5분간 염색하여 현미경으로 내독소 생성여부를 검정하였다(13).

변이주간 내독소 단백질의 SDS-PAGE 및 western blotting

내독소 단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli(14)의 방법에 준하여 분석했다. 시료 조제는 GYS 배지(15)에서 3일간 배양한 후 배양액 1.5 ml을 원심분리하여 침전된 균체를 1N NaCl과 멸균수로 세척하여 470 µl의 멸균수로 현탁시키고 204 µl의 sample buffer을 가한 다음 수조에서 5분간 비등시켜 원심분리하여 조제하였다. HD73의 내독소 결정체는 GYS 액체배지에서 3~4일간 배양해서 Renograin-76을 이용한 밀도구배 방법으로 분리하였고 항원은 preparative SDS-PAGE로 133 KD의 단백질 밴드를 adjuvant와 혼합하여 10일 간격으로 토끼에 4회 주사하여 항체를 얻었으며 기타 실험법은 오 등(16)의 방법에 준했다.

Western blotting 실험은 Towbin 등(17)과 Beiziegel(18)의 방법을 부분 수정하여 실험했다. SDS-PAGE 후 젤을 blotting 용액(24 mM Trizma base, 192 mM glycine, 20% methanol)에서 electroblotting하여 nitrocellulose sheet에 부착시키고 molecular standard(Biorad Cat. No. 161-0303)는 amido black 10-B(0.1% amido black 10-B, 20% methanol, 10% acetic acid)로 2~3분간 염색하여 각 밴드를 연필로 표시했다. 2~3%의 BSA로 30-60분간 blocking 했으며 1차 항체는 세척액(10 mM Tris·HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% tween 20)으로 희석해서(1:500) 60분간 항원과 결합시켰다. 그리고 2차 항체는 anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugates을 사용하였으며 기질과 염색반응은 10 ml의 alkaline phosphate액(100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)에 66 µl의 nitro blue tetrazolium(50 mg/ml)과 33 µl의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate액(50 mg/ml)을 가해서 반응시켰다.

사용균주의 plasmid DNA 분리

HD73과 그 변이주 및 표준분자량 측정용 균주의 plasmid 분리법은 오 등(19)의 방법으로 실험했으나 *E. coli* V517의 경우는 LB 배지에서 배양했으며 분리중 가해지는 용액의 양은 2배로 희석해서 분리했다.

고체배지에서 Cry⁺ 균과 Cry⁻ 균의 형태변이 조사
내독소 형성균(Cry⁺)과 내독소 비형성균(Cry⁻)간
배지상에서 균 군락의 형태변이를 조사하기 위하여
야생균과 변이주들을 GYS 배지에서 하룻밤 배양해
서 potato dextrose agar(PDA, DIFCO 0013-01-4),
spizizen casamino acid glucose agar(SCG) (7),
starch agar(SA, DIFCO 0072-01-2), nutrient agar
(NA, DIFCO 0069-01-7) 배지에 10 μ l 를 dot 로 점
종하여 균 군락의 형태를 관찰하였다.

분리균 KBS 722 의 내독소 유전자의 탐색

Plasmid curing 실험은 novobiocin(3 μ g/ml)으로
처리하여 7 일간 30 $^{\circ}$ C에서 배양한 다음 적당히 희석
하여 PDA, SA, SCG, NA 평판배지에 도달해서 균
군락의 형태가 야생주와 다른 균을 현미경 검경에
의한 내독소 생성능과 plasmid 를 검출하여 비교 분
석했다.

결과 및 고찰

HD 73 균주의 변이주 선발

B. thuringiensis 가 생산하는 내독소는 길이 0.6
~1.8 μ m, 폭 0.3~0.9 μ m 인 결정체 구조를 갖는
(21) 당단백질의 일종으로 알려져 있다(22). 그러므
로 amido black 10-B로 염색했을 때 내독소를 생성
하는 균은 분리균 KBS 722 와 같이 남갈색을 띠는
이중피라미드 구조를 가지고 있으며 염색되지 않은
시료보다 쉽게 구별할 수 있었다(Fig.5 참조). HD
73-101 에 속하는 변이주는 내독소 결정체를 관찰할
수 없었다. 변이주간 단백질을 분석했을 때 대부분
약 133 KD 와 66 KD 의 주 밴드가 나타났다. 그러나
HD 73-101 에 속하는 변이주는 66 KD 밴드만이 나타
났다(Fig.1-S 참조). 한편 HD 73 의 내독소에 대한
항체와 immunoblotting 을 시켜보았을 때 약 133 KD
의 단백질과 반응이 일어났으나 HD 73-101 과는 반
응하지 않았다. 또한 Iizuka 와 Yamamoto(5)는 HD
73 내독소의 크기가 약 135 KD 이라고 보고하였으
며, 내독소는 세포 건물중당 20~30% 로 많은 양의
내독소를 생성한다는 보고와(23) 상기 결과를 분석
검토해 보면 본 실험에 사용한 HD 73 의 내독소 단
백질의 분자량은 약 133 KD 이었고, HD 73-101 균주
를 제외한 타변이주는 내독소가 생성되는 것을 재확
인할 수 있었다. 이와 같이 배양액으로부터 내독소
를 순수분리 하지 않더라도 내독소 단백질의 크기를
분석할 수 있는 가능성이 보였다.

변이주간 Plasmid DNA 의 전기영동 비교

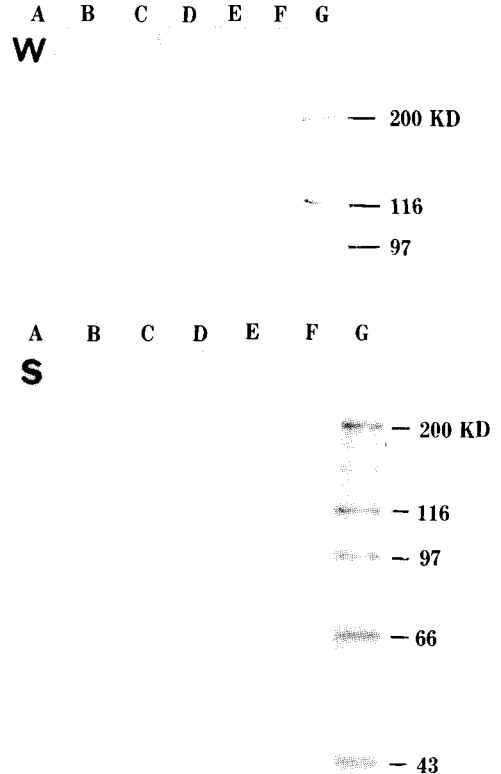


Fig. 1. Comparative analysis of SDS-PAGE and western blotting among the cured mutants of *B. thuringiensis* HD73.

Plate W; Western blotting between the crystal protein produced by mutants of *B. thuringiensis* HD73 and polyclonal antibody against 133KD delta-endotoxin of HD73

Plate S; Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

A; HD73 IPL., B; HD73 NRRL, C; HD73-101, D; HD73-102, E; HD73-104, G; molecular standard

HD 73 균과 그 변이주들의 plasmid 를 분리하여 0.6% agarose 젤에서 전기영동을 한 결과는 Fig.2 와 같다.

Plasmid DNA 의 표준분자량은 Gonzalez 등(5)이 전자현미경으로 그 크기를 밝힌 HD 2 균과 Macrina 등(24)이 여러가지 균에서 크기와 copy 수가 다른 plasmid 를 대장균에 집적시킨 *E. coli* V 517 균을 사용했다. NRRL 과 Dulmage 박사로부터 분양받은 균의 plasmid 크기는 7.4, 7.8, 8.1, 11.3, 75Kb 및 75Kb 와 크기가 비슷하고 copy 수가 적은 또 하나의 plasmid DNA 로 여섯개의 plasmid 를 보유한 것으로 나타났다. 그러나 IPL 균은 이외에 약 70

Kb와 4.0 Kb의 두개의 plasmid를 더 보유하고 있는 것으로 나타났다. 여기서는 Dulmage 박사로부터 분양받은 균을 curing 실험에 사용했다. Fig.1과 2의 변이주간 내독소 생성능과 plasmid DNA의 curing 유무를 상호 비교하여 그 선발된 균수를 Table 1에 나타내었다. Curing된 형태로는 다섯개 균으로 나눌 수 있었고, 총 18개의 변이주를 얻었다. 내독소의 생성능과 plasmid DNA 전기영동을 비교해 보면 75 Kb의 plasmid가 curing 됐을 때 내독소 생성능이 없었으며 또한 75 Kb DNA와 크기가

거의 유사하고 copy 수를 UV densitometer로 측정해 보았을 때 copy 수가 약 4배 정도 적은 plasmid도 나타났다. 이 결과는 HD73-101 균에 속하는 10개의 변이주에서 단일아포를 분리하여 plasmid DNA를 확인한 결과도 같은 양상이었다. 이런 결과들로 미루어 보아 HD73의 내독소 단백질 유전자는 75 Kb의 plasmid DNA 상에 위치해 있는 것으로 추정된다.

한편 이들 변이주와 야생주간 테트라사이클린 항생제에 대한 최소요구량은 8-9 µg/ml로 나타나 균주간에 그 농도는 별 차이가 없었으며 이 항생제에 대한 저항성 인자는 7.4 Kb와 8.2 Kb plasmid 또는 염색체 DNA에 연추된 것으로 추정된다. 변이주 HD73-105에 속하는 변이주 중에서 한개는 자연적으로 curing된 것이며 한개는 약제 curing으로 선발한 것이다(25). 또한 오와 이 등(25)이 약제 처리에 의해서도 curing이 일어나지 않았던 균에서도 4°C에서 균 계대함이 없이 18개월간 보관했을 때 독소를 생성하지 않는 균도 발견할 수 있었다. 따라서 이 균주도 보관중에 특정 plasmid가 curing되어진 것으로 사료된다. 변이주 HD73-105는 타변이주와 달리 약 11.4 Kb plasmid가 curing되었으나 약 12.2 Kb의 DNA가 신생되어 나타났다. González 등(7)은 HD73을 curing했을 때 변이주 중에서 10, 65, 70 Kb의 plasmid가 나타났다고 했으며, HD2 균주에서도 이런 현상이 나타났다고 보고하였다. 또 본 실험에서 HD73-IPL 균주에서 약 70 Kb의 plasmid가 검출된 것은 González가 보고한 HD73-2 균에서 유래된 것인지는 아직 확실히 알 수 없다. 다만 상기 여러 결과로 미루어 볼 때 transposable element에 의한 deletion이나 plasmid DNA 간 재조합이 일어

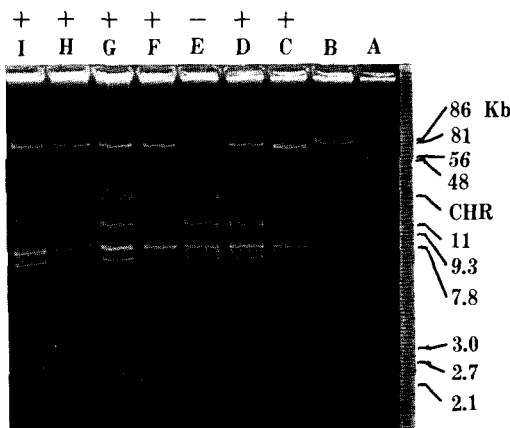


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis pattern of plasmid DNA arrays isolated from *B. thuringiensis* HD73 and its mutants which were treated with curing agent, ethidium bromide (0.02 µg/ml).

A; *E. coli* V517, B; HD2, C; HD73 IPL, D; HD73-NRRL and provided by Dr. H.T. Dulmage, E; HD73-101, F; HD73-102, G; HD73-103, H; HD73-104, I; HD73-105, CHR; chromosomal DNA, +; crystal toxin production, -; non-crystal production.

Table 1. Comparative analysis of delta-endotoxin production and plasmid DNA presence among *B. thuringiensis* HD73 mutants.

Mutants	Toxin production	Plasmid DNA (Kb)								No. of mutants
		4.0	7.4	7.9	8.2	11.4	70	75	75 ^{a)}	
HD73-IPL	+	+	+	+	+	+	+	+	ND*	
HD73-NRRL	+	-	+	+	+	+	-	+	ND	
HD73-101	-	-	+	+	+	+	-	+	ND	10
HD73-102	+	-	+	-	+	-	-	+	ND	1
HD73-103	+	-	+	-	+	+	-	+	ND	1
HD73-104	+	-	+	+	+	-	-	+	ND	4
HD73-105	+	-	+	+	+	12.2**	-	+	ND	2

^{a)} lower copied than 75 Kb plasmid

*ND; Not determined

**11.4 Kb plasmid lost, but 12.2 Kb generated.

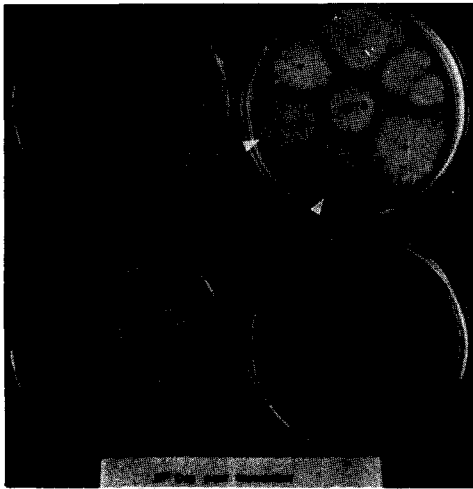


Fig. 3. Morphologies of cry⁺ and cry⁻ colonies of *B. thuringiensis* HD73 on several agar media. The arrows indicate acrySTALLOUS colonies which are more translucent than cry⁺ colonies on starch agar.

NA; nutrient agar, SA; starch agar, PDA; potato dextrose agar, SCG; spizizen casamino acid glucose medium

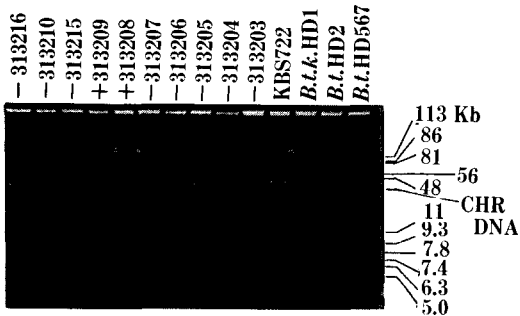


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis pattern of partially cured derivatives of *B. thuringiensis* isolates KBS722. Arrow indicate specific plasmid coding the insecticidal protein gene. (+) and (-) indicate crystal production and its absence, respectively.

난 것이 아닌가 추정이 되나, 금후 plasmid 물 probe로 조제해서 plasmid 간 또는 chromosomal DNA와 southern blotting을 해 보아야 할 과제라고 사료된다. 오와 이 등(25)이 보고한 HD 73 균주는 11개의 plasmid DNA를 보유하고 있다고 한 것은 75 Kb의 plasmid를 제외한 plasmid를 젤에서 elution하여 제한효소 분석을 한 결과 분리중 nick 또는 gap이 일어난 데에 기인한 것으로 사료된다(26).

Cry⁺ 균주와 Cry⁻ 균주의 균군락의 형태변이

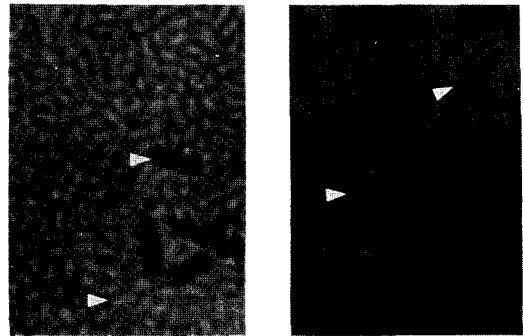


Fig. 5. Phase contrast microscopic observation of spore and crystal toxin produced by *B. thuringiensis* isolated KBS722 and its mutants (1,000 \times). Arrow a, b, and c indicate vegetative cell, spore, and crystal delta-endotoxin, respectively.

Plate A; Non-crystal forming mutants Plate B; Crystal forming strains.

상기 선발된 변이주들을 몇가지 고체배지상에서 균군락의 형태적 차이를 조사해 보았더니 SCG, NA, PDA 평판배지에서는 별 차이가 없었으나 SA 배지에서는 내독소 생성능이 없는 균(Cry⁻)은 접종 후 1일부터 다소 차이가 나타나기 시작하여 4~5일간 배양했을 때 콜로니가 Cry⁺균보다 투명하고 옅은 회색으로 보였다(Fig. 3).

분리균 KBS 722의 내독소 유전자의 위치확인

경북 상주군의 토양에서 분리한 KBS 722 균주를(27) novobiocin(3 μ g/ml)로 처리해서 NA, PDA, SCG, SA 고체배지에 도말하여 균군락의 형태와 plasmid DNA 전기영동양상을 비교해 보았을 때 내독소가 생성되지 않는 변이주는(Fig.5 참조) HD 73 균과 달리 SA 배지에서는 형태적인 차이가 없었으나 NA 평판배지에서 야생주보다 투명도의 차이가 나타났다. 아울러 Cry⁻ 변이주들은 모두 약 225 Kb의 plasmid가 curing된 것으로 보아 분리균 KBS 722의 내독소 유전자는 이 plasmid DNA 상에 있는 것으로 추정된다. González 등(9)은 NA 평판배지에서 HD 2가 생산하는 내독소의 생성유무에 따른 집락의 차이가 있었다고 했으며 HD 567 균은 SA 배지에서 Ryabchenko와 Alikhanian(28)은 그의 배지에서 각각 차이가 있다고 보고하였다. 그러나 *darmstadtensis* IPL 균주에서는 투명도에 의한 차이는 없었으나 균형태에 의한 차이는 있었다(unpublished data). 이와 같이 Cry⁺와 Cry⁻의 균주간 배지에서 내독소 생성능의 차이는 균주와 배지에 따라 다른 것으로 사료되며 이런 문제는 집락의 투명정도, 색깔, 형태 등을 고려하여 수행한다면 *in vitro*에서 Cry⁺ 균주

와 Cry⁻주를 간편하게 판별할 수 있으리라 생각된다.

요 약

나비목 유충에 독성이 강한 균으로 알려진 *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD 73을 ethidium bromide (0.02 µg/ml) 처리와 자연적 curing에 의한 내독소 유전자의 위치를 확인하여 변이주간 내독소 생성능을 간이 선별할 수 있는 배지를 선별한 다음 국내 토양에서 분리한 KBS 722 균주에 적용하여 그 내독소 단백질 유전자의 위치를 확인한 결과를 요약하면 다음과 같다. HD 73-NRRL과 Dulmage 박사로 분양받은 균주는 약 7.4, 7.1, 8.1, 11.3, 75 Kb 및 크기가 75 Kb와 비슷하고 copy 수가 적은 또 하나의 plasmid로 전부 6개의 plasmid를 보유하고 있었으며 IPL 균주는 약 4.0과 70 Kb plasmid를 더 보유하는 것으로 나타났다. 상기 HD 73 균주들의 내독소 단백질 크기는 모두 133 KD 정도였고 HD 73의 내독소 유전자는 변이주간 내독소의 현미경 검정과, immunoblotting plasmid DNA의 전기영동결과 75 Kb 상에 있는 것으로 나타났다. 이들 변이주들을 potato dextrose agar, starch agar, spizizen casamino acid glucose와 nutrient agar 평판배지에 접종하여 균형태를 관찰하였을 때 내독소 비형성균(Cry⁻)은 starch agar 배지에서만 반투명하고 균 군락의 색깔이 옅은 회색을 띠었다. 한편 국내 분리균 KBS 722를 novobiocin (3 µg/ml)으로 plasmid를 curing시켜 상기 4가지 배지에 도말했을 때 nutrient agar 배지에서만 Cry⁻ 변이주가 반투명하고 옅은 회색을 나타내었다. KBS 722의 내독소 유전자는 약 225 Kb의 plasmid 상에 있는 것으로 나타났으며 *in vitro*에서 쉽게 Cry⁺주와 Cry⁻주의 판별이 가능하였다.

참고문헌

1. Faust, R.M. and L.A. Bullar, Jr.: *Microbial and viral pesticides*. Marcel Dekker Inc., New York, 75 (1982).
2. Burges, H.D.: *Mosquito News*. **44**, 66 (1984).
3. 유재기, 이영근, 김성봉: 시험연구보고서, 농약연구소, 111(1984).
4. Chung, S.B. and J.H. Ko: *Kor. J. Environ. Agric.* **4**, 108 (1985).
5. Iizuka, T. and T. Yamamoto: *FEMS Microbiol.*

- Lett.* **19**, 187 (1983).
6. Gonzalez, Jr. J.M., H.T. Dulmage and B.C. Carlton: *Plasmid*, **5**, 351 (1981).
8. Gonzalez, Jr., J.M., B.J. Brown and B.C. Carlton: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**, 6951 (1982).
9. Gonzalez, Jr., J.M. and B.C. Carlton: *Plasmid*, **11**, 28 (1984).
10. Kronstad, J.W., H.E. Schepef and H.R. Whitely: *J. Bacteriol.* **154**, 419 (1983).
11. Kamdar, H. and K. Jayaraman: *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **110**, 477 (1983).
12. Held, G.A., L.A. Bullar, Jr., E. Ferrari, J. Hoch, A.I. Aronson, and S.A. Minnich: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6065 (1982).
13. Smironff, W.A.: *J. Insect Pathol.* **4**, 384 (1962).
14. Laemmli, U.K.: *Nature* **277**, 680 (1970).
15. Nickerson, N.W. and L.A. Bullar, Jr.: *Appl. Microbiol.* **28**, 124 (1974).
16. Oh, S.S., Y.J. Lee, C.K. Kim, B.S. Koo, J.B. Kim and H.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 168 (1988).
17. Towbin, H., T. Saehelin and J. Gordon: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350 (1979).
18. Beisiegel, U.: *Electrophoresis*, **7**, 1 (1986).
19. Oh, S.S., T.Y. Chung, R.M. Faust and J.C. Ryu: *Res. Rept. RDA (Biotechnol.)*, **30**, 61 (1988).
20. Trevors, J.T.: *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 149 (1986).
21. Faust, R.M., J.R. Adams, K. Abe, T. Iizuka and L.A. Bullar, Jr.: *J. Seric. Sci. Jpn.*, **51**, 316 (1982).
22. Pfannenstiel, M.A., G. Muthukumar, G.A. Couche and K.W. Nickerson: *J. Bacteriol.* **169**, 7969 (1987).
23. Lecadet, M.M. and R. Dedonder: *Eur. J. Biochem.*, **23**, 282 (1971).
24. Marcrina, F.L., D.J. Kopecko, K.R. Jones, D.J. Ayers and S.M. McCowen: *Plasmid* **1**, 417 (1978).
25. Oh, S.S. and H.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 51 (1985).
26. Oh, S.S., Y.N. Park, Y.S. Park and T.Y. Chung: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, Abstract (1988).
27. Oh, S.S., P.A.W. Martin, T.Y. Chung, K.K. Kim and M.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, Abstract (1988).
28. Ryabchenko, N.F. and S.I. Alikhanian: *Genetika*, **20**, 1076 (1984).

(Received February 23, 1989)