

모기유충에 살충력이 있는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2 내독소의 면역학적 성질

정태영 · 김광현*

동의대학교 자연대 미생물학과

Immunological Characteristics of Mosquitocidal Delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* Subsp. *darmstadiensis* 73E10-2

Cheung, Tae-yeung and Kwang-Hyeon Kim*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

In the mosquitocidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2, were contained an immunologically homologous protein. The homologous protein was confirmed from Ouchterlony test, immuno-electrophoresis, and enzyme linked immunoassay by polyclonal antibodies against the delta-endotoxins of both strains.

Bacillus thuringiensis 균주가 생산하는 내독소(delta-endotoxin) 중 모기에만 독성을 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 내독소-포자혼합물로부터 모기유충에 대한 주 독성단백질(67kDa)이 Kim 등(1)에 의해 추출, 정제된 바 있으며 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소에서도 동일한 분자량의 단백질이 주 독성단백질로 알려져 있다(2-4). 그러나 이들 두 균주의 모기에 대한 주 독성단백질로서 항체를 각각 조제하여 면역확산반응을 시켜 본 결과 주 독성단백질 상호간에는 전혀 침강선이 인정되지 않았다(1). 또한, 두 균주의 내독소에 존재하는 각각의 용혈성 단백질(28kDa)을 immunoblotting 한 결과도 서로 상이하었다는 보고(5)가 있어 이들 양균주의 내독소의 단백질은 그 기원이 다를 것이라고 생각되었다.

한편, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소에 대한 항체와 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 내독소와의 이중 면역확산반응에서 부분적인 침강선이 인정되었다는 Bourgooin 등(6)의 보고에

의하면 이들 두 균주의 내독소에는 동일한 기원의 단백질이 혼존하고 있을 가능성을 시사하였다. 따라서 이같은 상반된 견해를 명확히 규명코자 이들 두 균주의 내독소를 면역학적으로 비교 검토하였다.

재료 및 방법

균배양 및 내독소 분리

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis*(이하 Bti라 칭함)와 *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2(이하 Btd라 칭함)가 사용되었으며, 이들 균주는 일본 Kyushu 대학 Aizawa 교수로부터 분양받았다. 균주들은 TYG 배지(7)에서 완전히 포자가 형성될 때까지 배양(28°C, 8일간)되었으며, 내독소(delta-endotoxin)의 분리는 Cheung과 Hammock의 방법(8)으로 행하였다. 분리된 내독소는 10mM EDTA 용액에 씻은 후 -20°C에 보존하였다.

단백질 정량

Lowry 등의 방법(9)으로 측정하였다.

항체생산 및 정제

Key words: Mosquitocidal delta-endotoxin, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2

*Corresponding author

내독소는 0.1 N NaOH로 용해(37°C, 2시간)시켜서 원심분리(13,000×g, 15분간)하여 비용해성 물질은 제거시켰다. 용해된 내독소 단백질은 pH 9.0까지 진한 초산용액으로 조정하고 2 mg/ml 내독소 단백질(항원) 0.5 ml를 complete freund adjuvant와 잘 혼합시켜 토끼에 피하주사하였다. 4주후에 다시 2 mg/ml 항원 0.5 ml를 incomplete freund adjuvant 0.5 ml와 잘 혼합시켜 토끼에 2차로 피하에 주사하였다. 그 후 일주일이 지나서 2 mg/ml 항원 1.0 ml만을 3차로 주사시켰다. 최종 주사 후 일주일이 지나서 토끼의 혈액을 채취하고 원심분리(1,000×g, 30분간)시켜서 항혈청을 분리하였다. 항혈청은 Na₂SO₄·10H₂O로 염색시키고 생성된 침전물은 20 mM PBS(Phosphate buffer saline, pH 7.5)로 투석시켜서 -30°C에 보관하면서 내독소의 항체로 사용하였다.

이중 면역확산법

Smith와 Ulrich(1983)가 기술한 방법(10)에 따라 0.2 M PBS에 용해된 0.9% agarose(Sigma Co.) gel 상에서 행하였으며 침강선은 4°C에서 4일간 관찰하였다.

면역전기영동

Johnstone과 Thrope(1987)가 기술한 방법(11)에 따라 1.0% agarose gel을 사용하여 1.5 mA/cm로 항원을 전기영동하였다.

효소항체법

Voller 등의 방법(12)에 따라 microplate(삼광화학, 일본)의 well에 항원을 흡착(4°C, 하룻밤)시킨 후 항체(1:2000 희석액)를 가하여 25°C에서 3시간 흡착시켰다. 그 후 goat antirabbit immunoglobulin alkaline phosphatase conjugate(Sigma Co.)를 1:2000으로 희석하여 25°C에서 3시간 반응시켰다. 기질은 p-nitrophenyl phosphate를 10% diethanolamine buffer(pH 9.8)에 용해하고 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) Reader로 측정(405 nm)하였다.

이종항원과의 교차반응

Oh 등의 방법(13)에 따라 두 균주의 항체가 각각 이종의 항원에 반응하는 정도를 알기위해 각각의 항체를 0.1 µg/ml로 희석하여 효소항체법으로 반응시켰다.

이종항원에 의한 반응억제율

Wie 등의 방법(14)에 따라 두 균주의 항체에 각각의 이종항원을 가하고 4°C에서 하룻밤 동안 방치시켜서

내독소에 존재하는 공통항원을 흡수시켰다. 흡수시키고 남은 항체는 미리 동종항원(10 µg/ml)으로 도말된 microplate well에 가하여 효소항체법으로 이종항원에 의한 반응억제율을 조사하였다.

결과 및 고찰

면역확산반응 및 면역전기이동

Bti와 Btd의 항원과 그에 대한 항체를 이중 면역확산시킨 결과 Btd 항체와 Bti 항원과의 반응에서는 침강선이 형성되었으나(Fig. 1), Bti 항체와 Btd 항원과의 반응에서는 침강선이 형성되지 않았다. 또한 이들 두 균주의 항원을 면역전기영동시켜 본 결과 동종의 항원-항체 반응에서 Bti와 Btd가 각각 2개와 3개의 주 침강선이 형성되었으며, Bti 항원과 Btd 항체 사이에는 약한 침강선 1개가 형성되었다(Fig. 2). 그러나 Btd 항원과 Bti 항체 사이에는 전혀 침강선이 형성되지 않았다. 이는 Bourgouin 등(6)이 기술한 Btd 항원과 Bti 항체와의 이중 면역확산에서 부분적인 침강선이 형성되었다고 한 결과로 보아 본 실험에서 Bti 항체와 Btd 항원 사이의 이중 면역확산반응 및 면역전기영동상에서 침강선이 형성되지 않는 것은 Bti 항원내에는 Btd 항원과 공통되는 인자가 극히 소량 함유되어 있어 침강선이 형성되지 않을 가능성이 있다고 사료된다.

항원 항체 교차반응

두 균주의 항체를 0.1 µg/ml로 희석하고 각각 이종의 항원과 교차반응을 행하여 효소항체법으로 조사해 본 결과 양균주의 이종의 항원에 대한 교차반응의 양상이 유사하였다(Fig. 3, 4). 이는 면역확산반응 및 면역전기영동에서 기술한 바와 같이 Bti와 Btd의 항원사이에는 공통되는 인자가 존재한다는 것을 확인하였다.

이종항원에 의한 반응억제율

두 균주의 항체에 각각 이종의 항원을 흡수시킨 후 잔존하는 항체의 역가를 측정함으로써 이종항원에 의한 동종의 항원-항체반응 억제율이 조사되었다. 그 결과 Bti 항체 0.1 µg/ml는 동종항원 10 µg/ml를 완전히 흡수하였으나, 이종항원과의 흡수반응에서는 약 1 µg/ml 이상의 농도에서 내독소에 함유된 공통인자의 흡수가 나타나기 시작했다(Fig. 5). 또한 Btd 항체 0.1 µg/ml는 동종항원 5 µg/ml를 완전히 흡수하였으나, 이종항원과의 흡수반응에서는 약 0.1 µg/ml 이상의 농도에서 내독소에 함유된 공통인자의 흡수가 시작되었다(Fig. 6). 그러

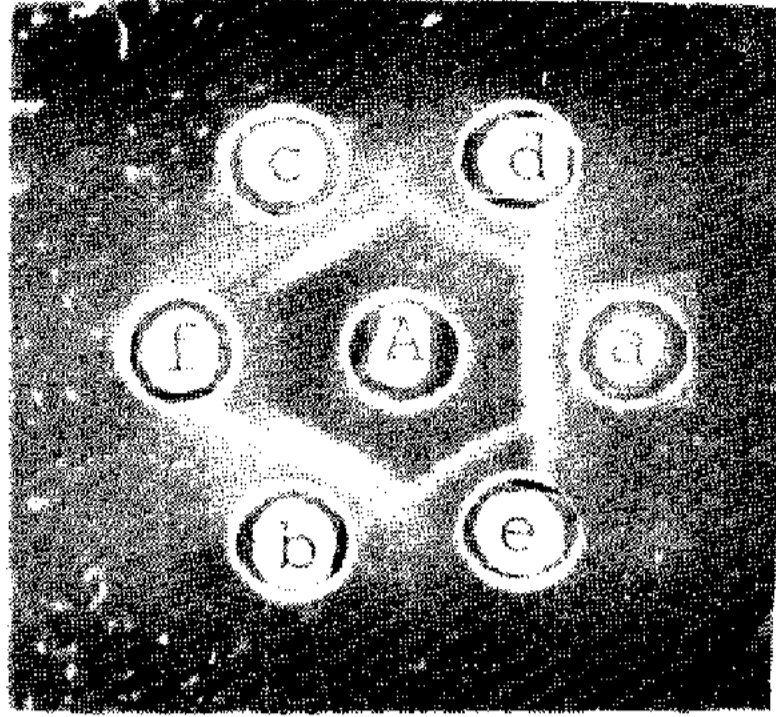


Fig. 1. Immunodiffusion pattern of delta-endotoxin.
The center well (A) contained antiserum against delta-endotoxin of Btd. The wells surrounding the anti-serum contained delta-endotoxin of Btd (a, b, c) and Bti (d, e, f).

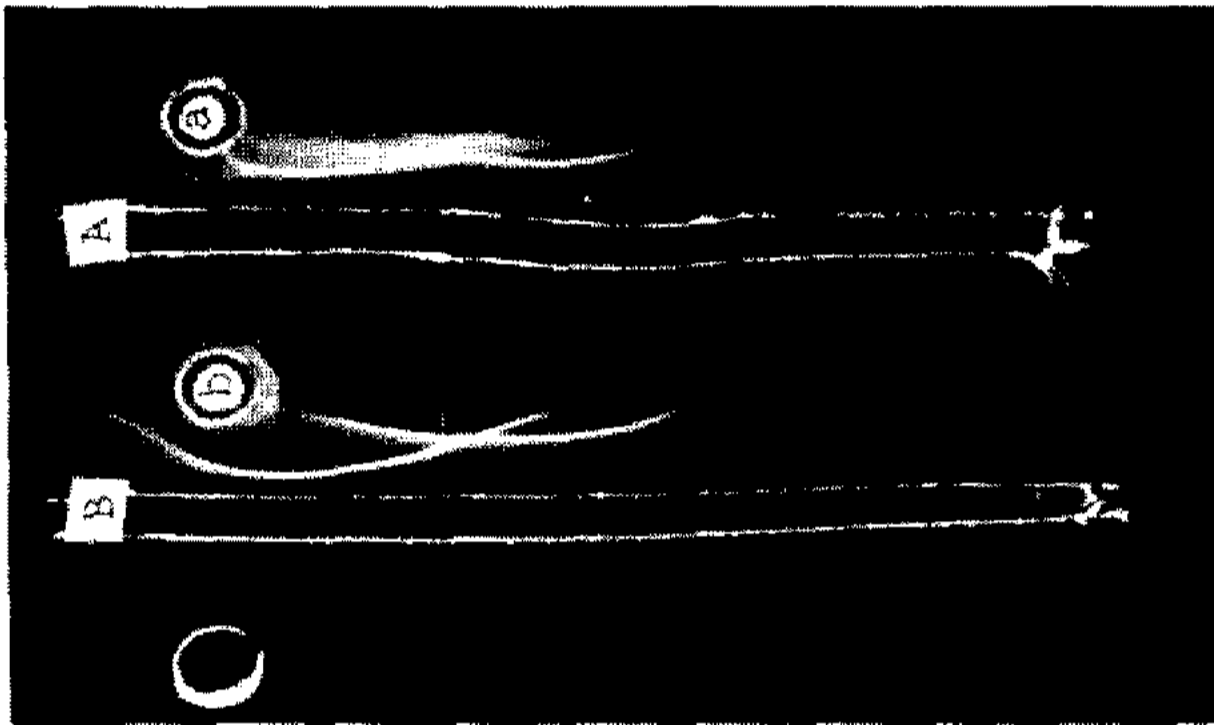


Fig. 2. Immunoelectrophoresis patterns of delta-endotoxin.
The wells contained delta-endotoxin of Btd (a) and Bti (b), respectively. The throughes contained antiserum against delta-endotoxin of Btd (A) and Bti (B).

므로 Bti 항원에 함유된 공통인자와 Btd 항원에 함유된 공통인자는 각각의 항원량이 $1\mu\text{g/ml}$ 와 $0.1\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 측정되지 않았다. 따라서 Btd 항원내에 존재하는 공통인자의 함량이 Bti 항원내에 존재하는 공통인자의 함량보다 많기 때문에 Btd 항체와 Bti 항체가 각각 동종의 항원에 대한 동일한 항체를 가지고 있어도 이종항원에 대한 공통 항원의 흡수에는 차이가 있다고 생각된다. 이같은 현상은 토끼의 개체간의 항체생산력과도 관계가 크다고 생각되나 각 항원에 대한 항체생산에서 2 반복의 실험결과가 동일하였다. 따라서 토끼 개체간의 항체생산력과는 관계가 없다고 생각되며 면역확산반응과 면역전기영동상에서 Btd 항체가 이종항원(Bti 항원)과 반응하면 침강선이 형성되었으나, 반대로 Bti 항체가 이종항원(Btd 항원)과 반응하면 침강선이 형성되지 않는 것과도 잘 일치하였다. 따라서 Kim 등(1)은 Btd의 내독소에 함유된 모가유충에 대한 주 독성단백질(67kDa)이 Bti의 내독소에 함유된 동일한 분자량의 모

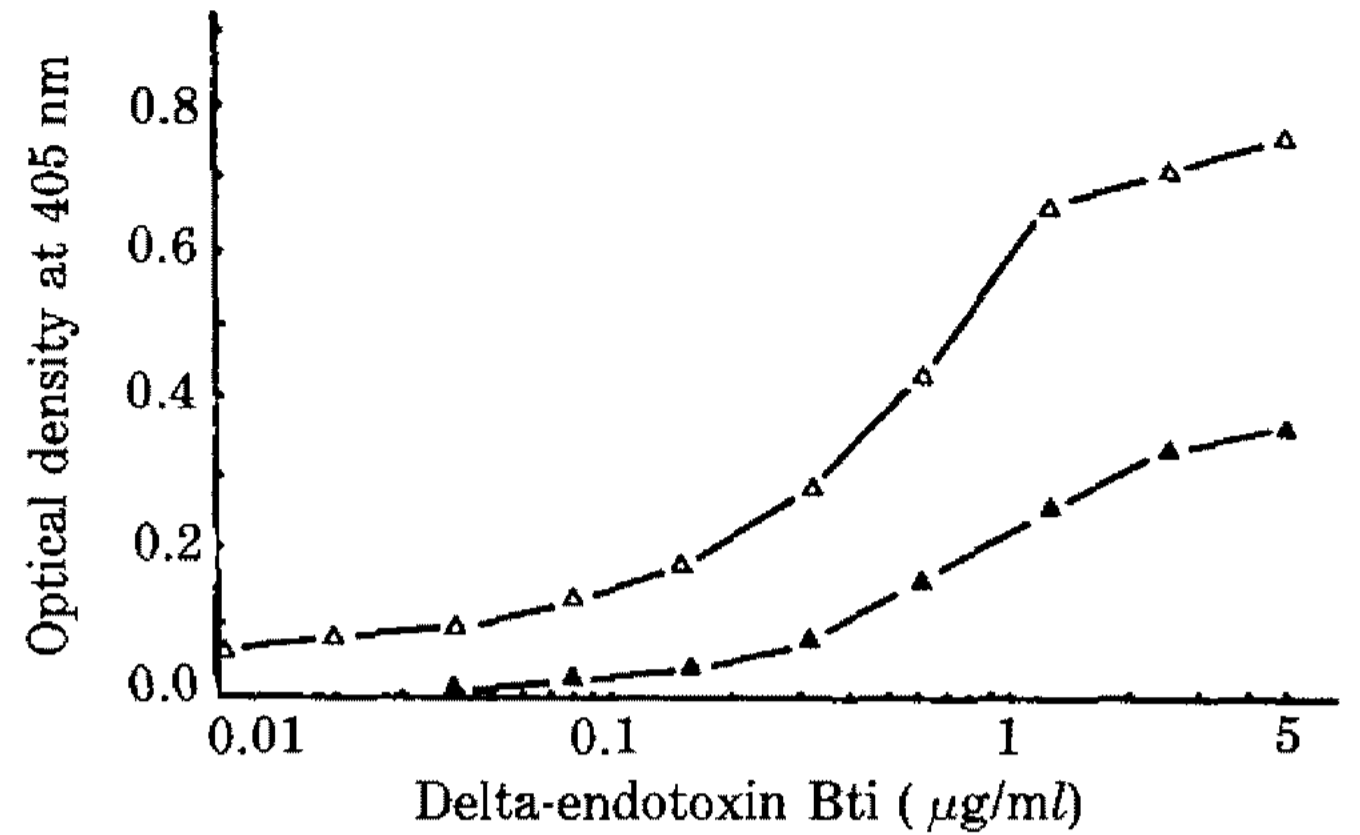


Fig. 3. Cross reaction of delta-endotoxin of Bti on antiserum against delta-endotoxin of Btd.
Symbols: Δ ; antiserum against delta-endotoxin of Bti, \blacktriangle ; antiserum against delta-endotoxin of Btd.

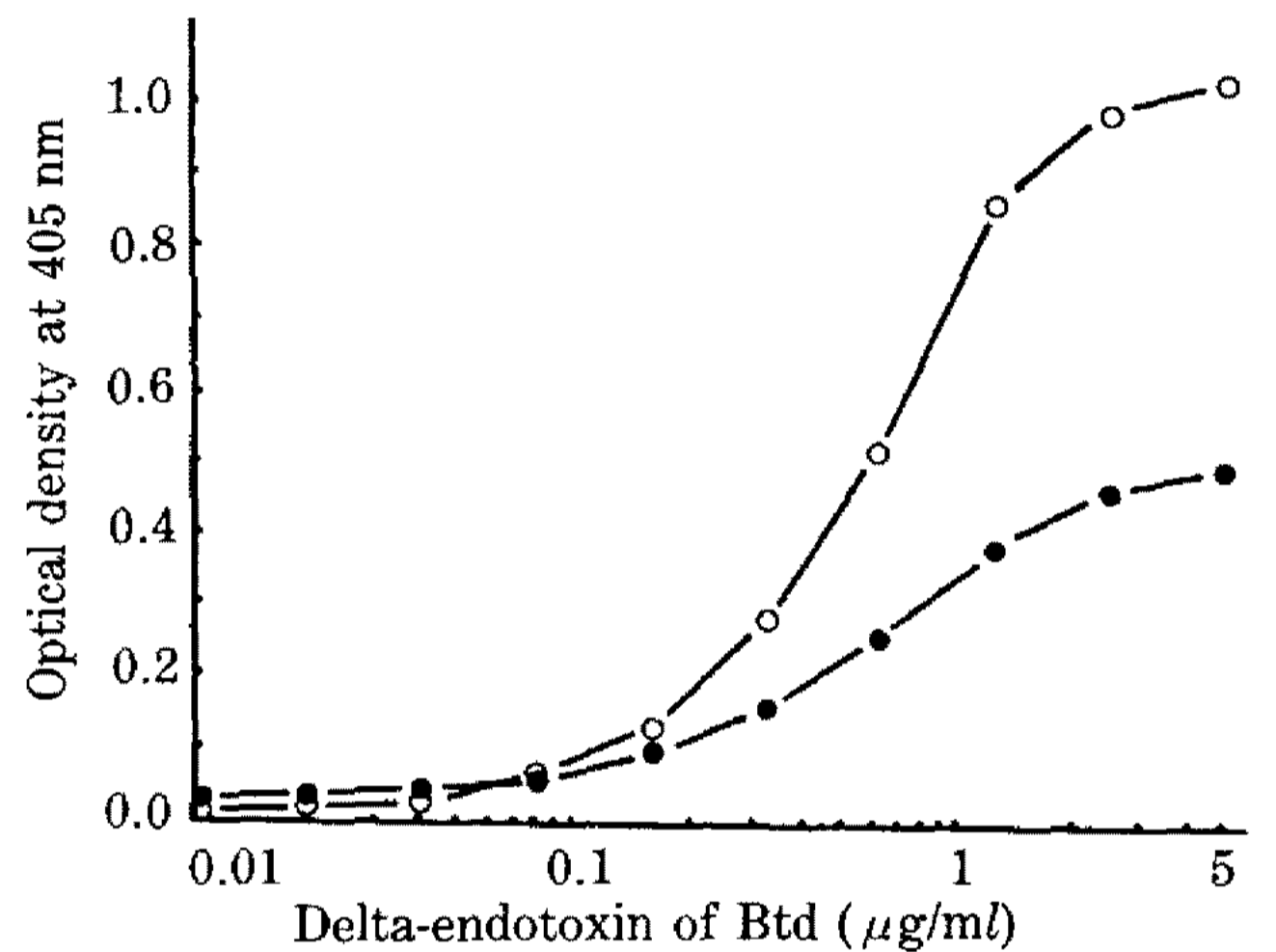


Fig. 4. Cross reaction of delta-endotoxin of Btd on antiserum against delta-endotoxin of Bti.
Symbols: \bullet ; antiserum against delta-endotoxin of Bti, \circ ; antiserum against delta-endotoxin of Btd.

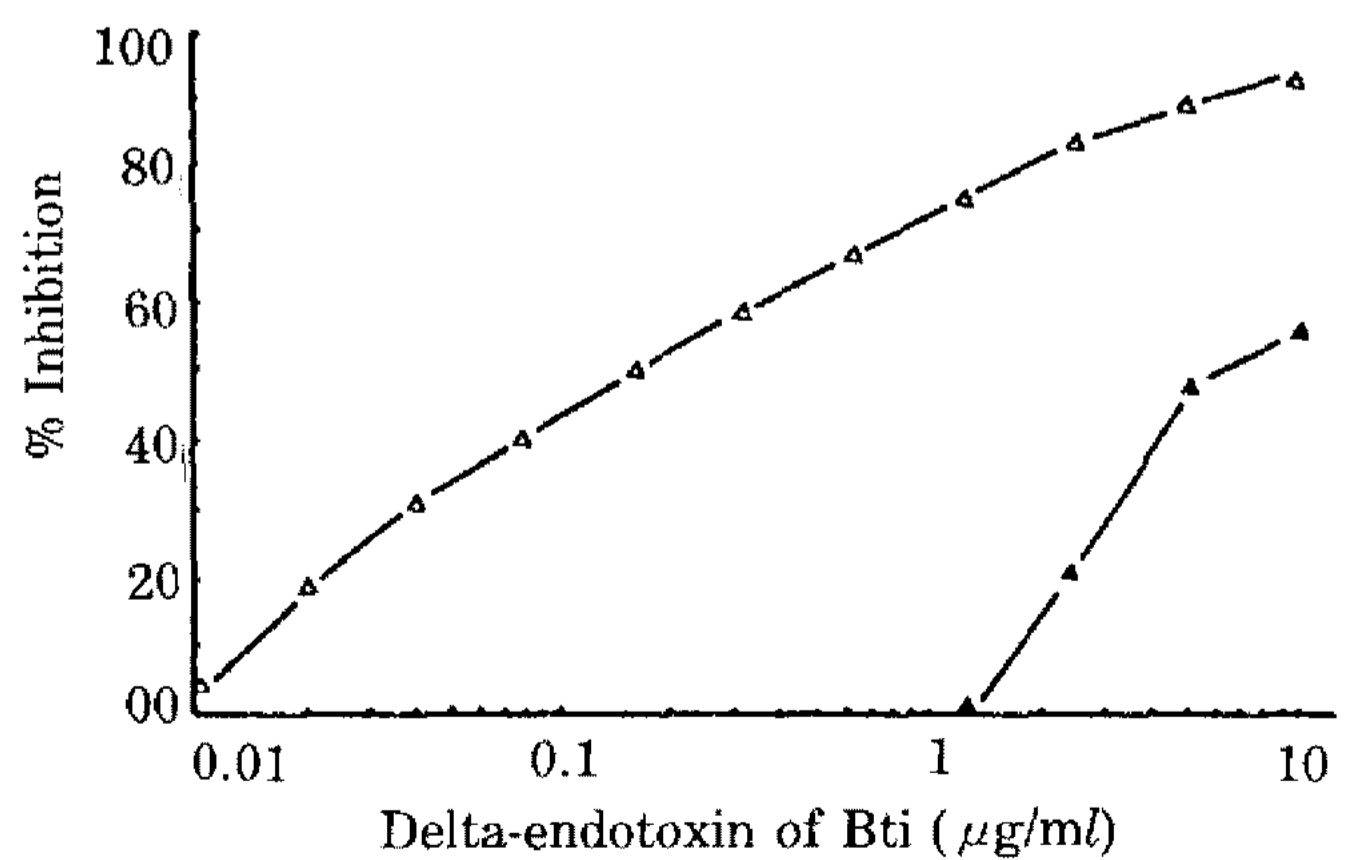


Fig. 5. Inhibition on binding of homologous antigen-antibody of Bti by delta-endotoxin of Btd.
Symbols: Δ ; delta-endotoxin of Bti, \blacktriangle ; delta-endotoxin of Btd.

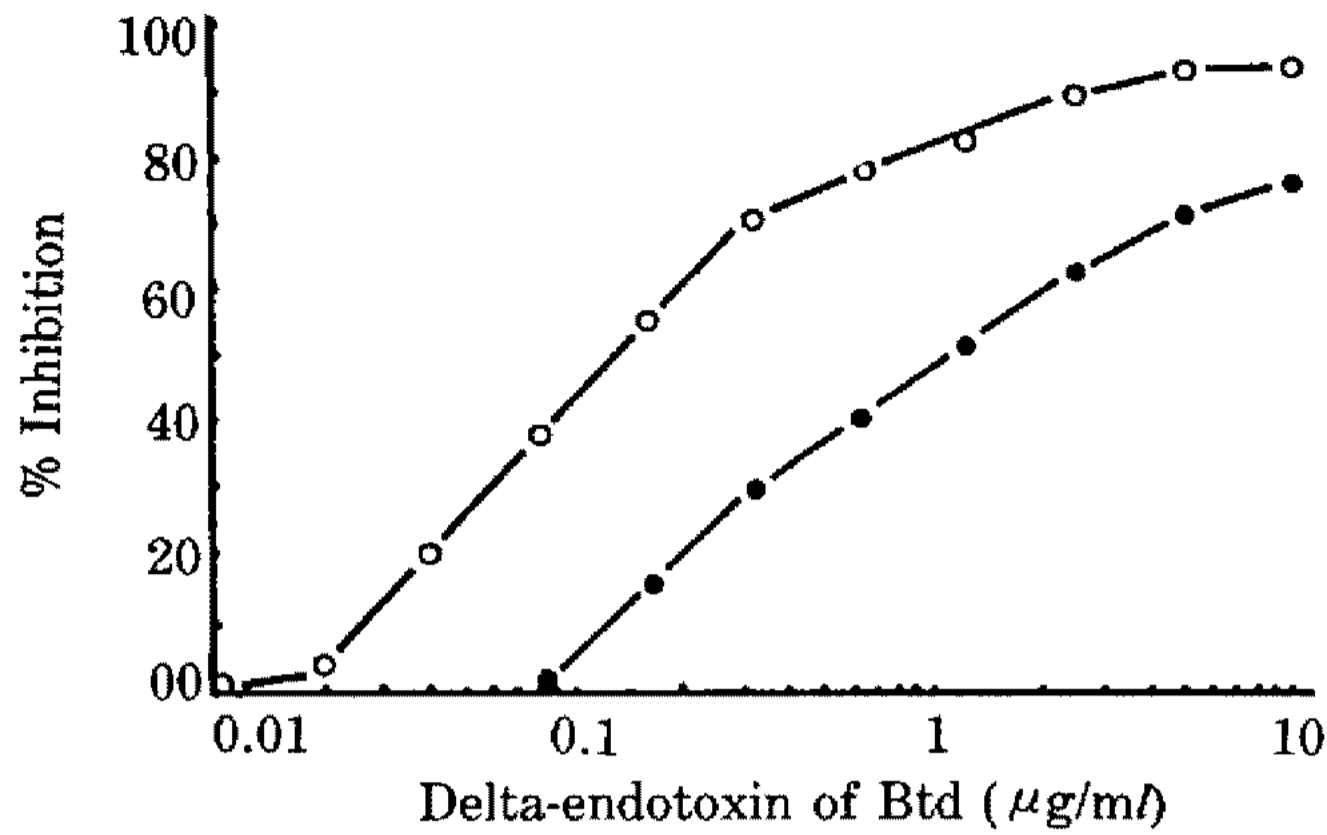


Fig. 6. Inhibition on binding of homologous antigen-antibody of Btd by delta-endotoxin of Bti.

Symbols: ○; delta-endotoxin of Bti, ●; delta-endotoxin of Btd.

기유충에 대한 주 독성단백질과의 이중 면역확산반응에서 서로 상이하였다고 기술하였으며, Drobniowski와 Ellar(5)는 양균주의 내독소에 존재하는 용혈성 단백질(28 kDa)을 immunoblotting 한 결과 서로 상이하였다고 기술하였다. 따라서 이들 양균주의 내독소에서 존재하는 공통인자는 67 kDa와 28 kDa 단백질 이외의 단백질일 가능성이 있다고 생각된다.

요 약

Bti와 Btd의 내독소에 대한 면역학적인 검토를 행한 결과 양균주의 내독소에는 동일한 기원의 단백질이 혼존하고 있음을 면역확산반응 및 면역전기영동법으로 확인되었다. 또한 동일한 기원의 단백질 함량은 Bti 내독소보다 Btd 내독소에 많이 존재함을 효소항체법으로 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 1989년도 한국과학재단의 연구비 지원에

의한 결과의 일부이며 관계되시는 분들께 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim, K.H., M. Ohba and K. Aizawa: *J. Invertebr. Pathol.* **44**, 214 (1984).
2. Hurley, J.M., L.A. Bulla, Jr. and R.E. Andrews, Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1316 (1987).
3. Hurley, J.M., S.G. Lee, R.E. Andrews, Jr., M.J. Kloedon and L.A. Bulla, Jr.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **126**, 961 (1985).
4. Yamamoto, T., T. Iizuka and J.N. Aronson: *Curr. Microbiol.* **9**, 279 (1983).
5. Drobniowski, F.A. and D.J. Ellar: *J. Bacteriol.* **171**, 3060 (1989).
6. Bourgouin, C., A. Killer and G. Rapoport: *Mol. Gen. Genet.* **205**, 390 (1986).
7. Kwang, J.Y. and K.H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**, 425 (1987).
8. Cheung, P.Y. and B.D. Hammock: *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 425 (1985).
9. Lowry, O.H., Roserbrough, N.J., Farr, A.L. and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
10. Smith, A. and J. Ulrich: *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 586 (1983).
11. Johnstone, A. and R. Thorpe: *Immunochemistry in practice*, Blackwell Scientific Pub., 2nd ed., 139 (1987).
12. Voller, A., D.E. Bidwell and A. Bactlett: *Enzyme-linked immuno-sorbent assay*, (Rose, N.R. and H. Friedman: *Manual of clinical immunology*, 2nd ed.) American Society for Microbiology, Washington D.C. 359 (1980).
13. 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).
14. Wie, S.I., R.E. Andrew, Jr., B.D. Hommock, R.M. Faust and L.A. Bulla, Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 891 (1982).

(Received May 22, 1990)