

근권 길항세균 *Pseudomonas fluorescens* KR164에 *Bacillus thuringiensis* HD-1 유전자의 삽입과 발현

김영일 · 이영환 · 강훈수*

전남대학교 농과대학 농화학과, *(주) 미원중앙연구소

초록 : 식물병원성 사상균에 대해 길항력을 갖는 그람음성 *Pseudomonas fluorescens* KR164의 chromosome에 그람 양성인 *Bacillus thuringiensis*(BT)의 HD-1 toxin gene을 삽입하기 위하여 이 유전자를 갖는 plasmids pSUPBT과 pSUPBTR을 작성하였다. Conjugation을 이용한 transposition으로 *P. fluorescens* KR164의 chromosome에 이 plasmids를 삽입시켜 BT toxin 유전자를 갖는 *P. fluorescens* KR164의 변이균주를 조제하였다. Southern blotting으로 균주의 cellular DNAs를 조사한 결과 모든 변이균주에서 한 개 이상의 BT toxin gene의 삽입이 확인되었으며 독소단백질의 존재 역시 SDS-PAGE에 의해서 확인되었으며 이러한 독소단백질의 결정 생성은 전자현미경에서도 확인되었다(1992년 5월 18일 접수, 1992년 6월 8일 수리).

미생물을 이용한 해충의 방제에는 세균, 사상균, virus 등이 널리 연구되고 있는데 특히 *Bacillus thuringiensis* (BT)가 생산하는 protoxin은 실용화 단계에 있다.^{3,7)} 농업에서 BT toxin에 관한 보고는 대부분 나비목 유충의 방제에 국한되어 있으며, 선충 및 기타 토양해충 방제에 대한 보고는 드물다.⁶⁾ 특히 BT toxin은 햇빛이나 생화학적 분해과정에 민감하기 때문에 독소 유전자의 식물체에 형질전환 등이 시도되고 있다.³⁾ 따라서 이러한 BT toxin gene을 근권 길항 미생물에 삽입시켜 사용함으로써 독소단백질의 효과 및 안정성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 토양에 서식하는 해충 방제제로서의 응용을 기대할 수 있다.

본 연구는 시설 원예작물의 연작지 토양에서 살균 및 살충의 효과를 얻을 수 있는 미생물 개발에 관한 기초 연구로, 토양 전염성 병원균인 *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani* 등에 대하여 길항력을 갖는 *P. fluorescens*^{9,12)}의 chromosome에 BT toxin 유전자를 삽입하고 삽입된 유전자의 발현을 검정하고자 DNA 분석, RNA 분석, 단백질 분석 및 전자현미경에 의한 생성된 독소단백질의 형태를 조사하였다.

재료 및 방법

BT toxin gene의 subcloning

필요한 plasmid는 Molecular cloning에 기술된 trans-

formation의 방법⁵⁾에 따라 *Escherichia coli* HB101에 삽입시켜 증폭시킨 후에 Minilysate 방법으로 추출 정제하고, 추출된 plasmid는 제한효소로 절단하여 agarose gel electrophoresis를 이용하여 plasmid를 확인하였다. Vector plasmid에 삽입되어 있는 DNA fragment는 plasmid DNA를 제한효소로 절단하고 low melting agarose를 이용한 전기영동법으로 fragment를 분리 회수한 후 phenol/chloroform으로 정제하여 사용하였으며 DNA molecular cloning은 정제된 DNA fragment에 linker를 붙인 후에 사용하고자 하는 vector에 삽입시켰다.

P. fluorescens chromosome에 plasmid의 삽입

선발된 공시균주 *P. fluorescens*를 항생제 nalidixic acid (Nal.) 500 ppm 또는 rifampicin(Rif.) 150 ppm을 함유한 King's B agar plate(proteose peptone 20g, glycerol 10g, MgSO₄·7H₂O 1.5g, K₂HPO₄·3H₂O, agar 15g per liter, pH 7.2)에 차례로 접종 배양하여 Nal.과 Rif.에 내성을 갖는 spontaneous mutant를 유도하고, 이 *P. fluorescens*의 chromosome으로 conjugation 방법에 의해 원하는 plasmid를 삽입하였다. 즉, BT toxin gene이 위치한 conjugation용 plasmid pSUPBT 또는 pSUPBTR을 갖는 *E. coli* S17 strain¹¹⁾과 Nal., Rif.에 내성을 갖는 *P. fluorescens*를 LB agar plate에 동시 도말 접종하여, 37°C에서 24시간 배양한 후에 이를 회수하여 항생제를 함유한 LB agar plate(Neo. 40 ppm, Nal. 500 ppm, Rif. 150 ppm)에

Key words: Biological control, *Bacillus thuringiensis* toxin, gene expression, *Pseudomonas fluorescens*
Corresponding author: Y. H. Rhee

재접종하여 colony가 나올 때까지 배양하였다.

DNA 추출과 Southern blotting

P. fluorescens를 LB broth에서 배양한 후 원심분리하여 회수된 bacterial pellet를 Tris buffer(Tris 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7.6)로 현탁시키고, lysozyme(최종 농도 1 mg/ml)을 처리하여 37 °C에서 1시간 정치한 후에, 20% sarcosyl을 최종 농도가 1% 되도록 가하여, DNA를 노출시켜 cesium chloride(CsCl) 밀도구배를 이용한 원심분리법으로 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 Tris buffer(Tris 10 mM, pH 7.6)에 투석하여 CsCl을 제거한 후 사용하였다. 추출된 DNA는 제한효소로 처리한 후 0.7% agarose gel을 이용하여 전기영동 시켰으며, 전기영동된 DNA는 Molecular cloning에 기술된 방법에 따라 nitrocellulose paper로 전이시켜 Southern blotting에 사용하였다. Hybridization에 필요한 probe는 primer extension 방법으로 32P isotope와 plasmid DNA를 사용하여 조제하였다.

SDS-PAGE에 의한 단백질 분석

BT toxin gene이 삽입된 균주가 생성하는 toxin protein의 분석은 Laemmli와 Shivakumar 등의 방법을 변용시켜 실시하였다. 제조합 균주를 ACC 배지(proteose peptone 20g, glycerol 1.5g, K2SO4 1.5g, MgSO4·7H2O, agar 12g, per liter pH 7.2)에서 30 °C, 36시간 배양한 다음 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 TESP buffer(30 mM Tris, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, pH 7.6)로 현탁한 다음 80 μA로 ultrasonication하여 단백질 분석시료로 사용하였다. 시료와 sample buffer(SDS 0.02g, glycerol 0.1g, β-mercaptoethanol 50 μl, 15 μg Bromothymol blue/ml, 0.5 mM Tris 62.5 μl, pH 6.8)를 혼합한 후 전기영동하였다. 표준 단백질로는 myosin(M.W. 205 KD), beta-galactosidase (M.W. 116 KD), phosphorylase B(M.W. 97.4 KD), bovine serum albumin(M.W. 66 KD), egg albumine(M.W. 45 KD) 그리고 carbonic anhydrase(M.W. 29 KD)을 함유하고 있는 Sigma 제품(Cat. # SDS-6H)을 사용하였다. 전개된 gel은 0.25% Coomassie brilliant blue G-250으로 염색하여 7% acetic acid로 탈색하였다. 탈색된 gel은 densitometer(Shimadzu CS-9000)을 이용하여 590 nm에서 optical density를 측정하였다.

전자현미경에 의한 독소단백질 관찰

독소단백질의 생성여부를 관찰하기 위하여 제조합 균주를 ACC 배지에서 30 °C, 36시간 배양한 다음 균체를

회수하였다. 회수된 균체는 Shivakumar 등의 방법에 따라 glutaraldehyde로 고정을 한 후, basic fuchsin methylene blue로 염색하여 초박질하고 절편은 copper grid에 부착시켜 Reynold법으로 0.5% uranyl acetate와 lead citrate의 이중염색을 실시하여 Carl Zeiss 109 Transmission electronic microscope으로 50 kV 가속 전압 하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

Plasmids pSUPBT와 pSUPBTR의 구성

공시균주 P. fluorescens KR164에 BT toxin gene을 삽입하기 위해 사용될 plasmid pSUPBT와 pSUPBTR을 구성하고자 Fig. 1과 같이 plasmid pSUP2021과 American type culture collection(ATCC)에서 구입한 plasmid pES1을 이용하였다. 우선 plasmid pES1의 6 kilo base (kb) EcoRI site내에 존재하는 BT toxin gene을 얻기 위해 plasmid pES1을 EcoRI으로 partial digest하고 low melting agarose gel을 이용한 전기영동법으로 분리 회수한 후 정제하였다. 회수된 DNA fragment의 양 선단을 linker를 사용하여 BamHI site로 변경한 후 alkaline phosphatase로 처리한 pSUP2021의 transposon(Tn) 5 내의 BamHI site에 cloning하였다. 삽입된 BT toxin

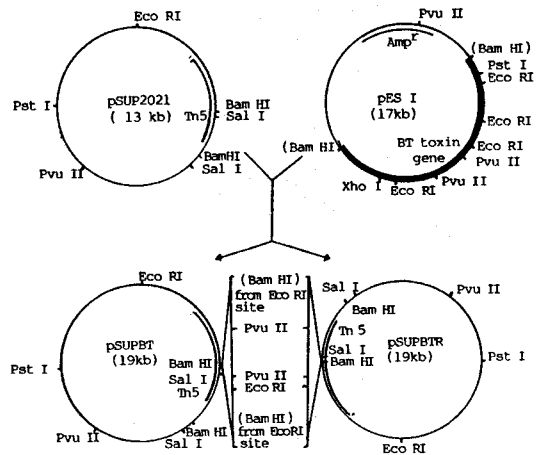


Fig. 1. Construction of the plasmids pSUPBT and pSUPBTR.

The 6 kb DNA fragment between EcoRI sites of pES1 was isolated. The EcoRI ends were modified to give BamHI sites. This 6 kb fragment was inserted into the BamHI site, treated with alkaline phosphatase of pSUP 2021 to construct the plasmids pSUPBT and pSUPBTR. Orientation of the inserted BT toxin genes in the plasmids pSUPBT and pSUPBTR are different each other.

gene의 배위(orientation) 방향이 다른 두 plasmid를 확인하고 이를 각각 pSUPBT와 pSUPBTR이라 명명하였으며 *P. fluorescens*의 chromosome에 *BT* toxin gene을 삽입하기 위한 conjugation용 vector로 사용하였다.

***P. fluorescens*에 *BT* toxin gene의 삽입**

P. fluorescens KR164¹²⁾에 transposition에 의한 conjugation법으로 *BT* toxin gene을 삽입하기 위해서 우선 Nal. 500 ppm과 Rif. 150 ppm에 내성을 갖는 KR164 변이주(KR164NR)를 유도하였으며 plasmid pSUPBT와 pSUPBTR은 conjugation용 host bacteria인 *E. coli* S17¹¹⁾에 삽입시켰다. Plasmid pSUPBT 또는 pSUPBTR을 갖는 *E. coli* S17과 *P. fluorescens*을 혼합 배양한 후 항생제 Nal., Rif. 및 Neo.에 대하여 내성을 갖는 몇 개의 *P. fluorescens*의 colony를 선택하였다. Plasmid pSUPBT 또는 pSUPBTR에 의해 형질전환된 공시균주 *P. fluorescens*을 *P. fluorescens* KR164(pSUPBT)와 KR164(pSUPBTR)이

라 명명하였으며 선택된 colony마다 일련번호를 붙였다. 형질변환된 KR164(pSUPBT)#2, KR164(pSUPBT)#3, KR164(pSUPBTR)#2, KR164(pSUPBTR)#3에서 *BT* toxin gene의 존재 유무를 확인하기 위해서 추출된 각각의 cellular DNA 8 µg씩을 제한효소 *EcoRI*으로 처리하여 전기영동한 후 nitrocellulose에 DNA를 옮기고 나서, isotope로 labelling한 plasmid pSUPBTR을 probe로 하여 Southern blotting 하였다. Fig. 2와 같이 형질전환된 균주 모두 band pattern이 다른 것으로 보아 모든 균주의 chromosome에 *BT* toxin gene이 삽입되었으며 *BT* toxin gene이 삽입된 위치가 균주마다 각각 다른 것을 알 수 있었다.

SDS-PAGE에 의한 단백질 분석

P. fluorescens KR164NR에 삽입된 *BT* toxin gene의 최종 생성물인 독소단백질의 생성여부를 SDS-PAGE로 분석하였다. *BT* toxin은 135 KD의 결정형태와 66 KD의 수용성 protoxin의 2가지 형태로 존재하는 δ -endo toxin으로서 나비목 유충 등에 살충력을 갖는 독소단백질로 알려져 있다.¹⁾ Transformant인 *P. fluorescens* KR164

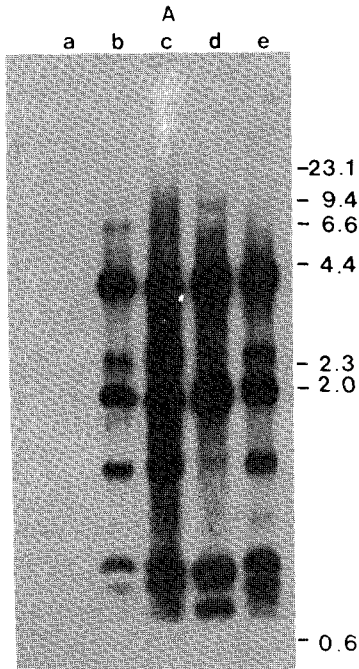


Fig. 2. Photograph after southern blotting of DNAs from *P. fluorescens* containing *BT* toxin gene. Eight micrograms of each DNA were digested with restriction enzyme *EcoRI*, fractionated on 0.7% agarose gel and transferred to nitrocellulose paper for hybridization. Plasmid pSUPBTR were used as a probe after labelling using a primer extension method. Lane a: KR164NR; lane b: KR164(pSUPBT)#2; lane c: KR164(pSUPBT)#3; lane d: KR164(pSUPBTR)#2; lane e: KR164(pSUPBTR)#3.

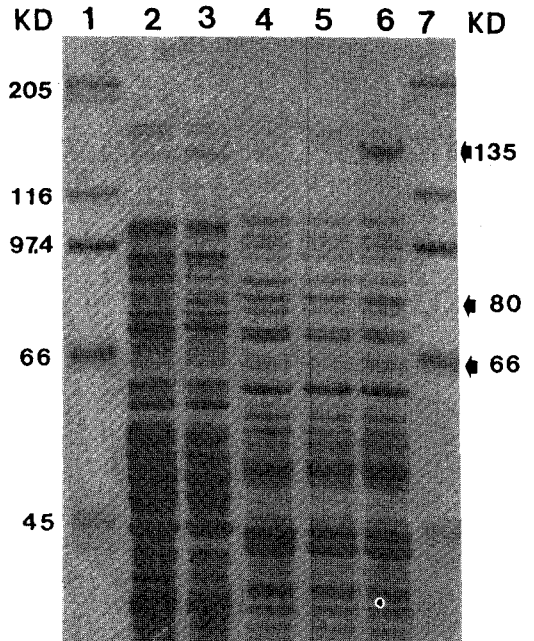


Fig. 3. SDS-PAGE pattern of the protein extracts from *E. coli* and *P. fluorescens* transformants. Lanes 1 and 7: protein size marker; lane 2: *E. coli* HB101; lane 3: *E. coli* HB101 containing plasmid pES1; lane 4: *P. fluorescens* KR164; lane 5: *P. fluorescens* KR164(pSUPBT)#3; lane 6: *P. fluorescens* KR164(pSUPBTR)#3.

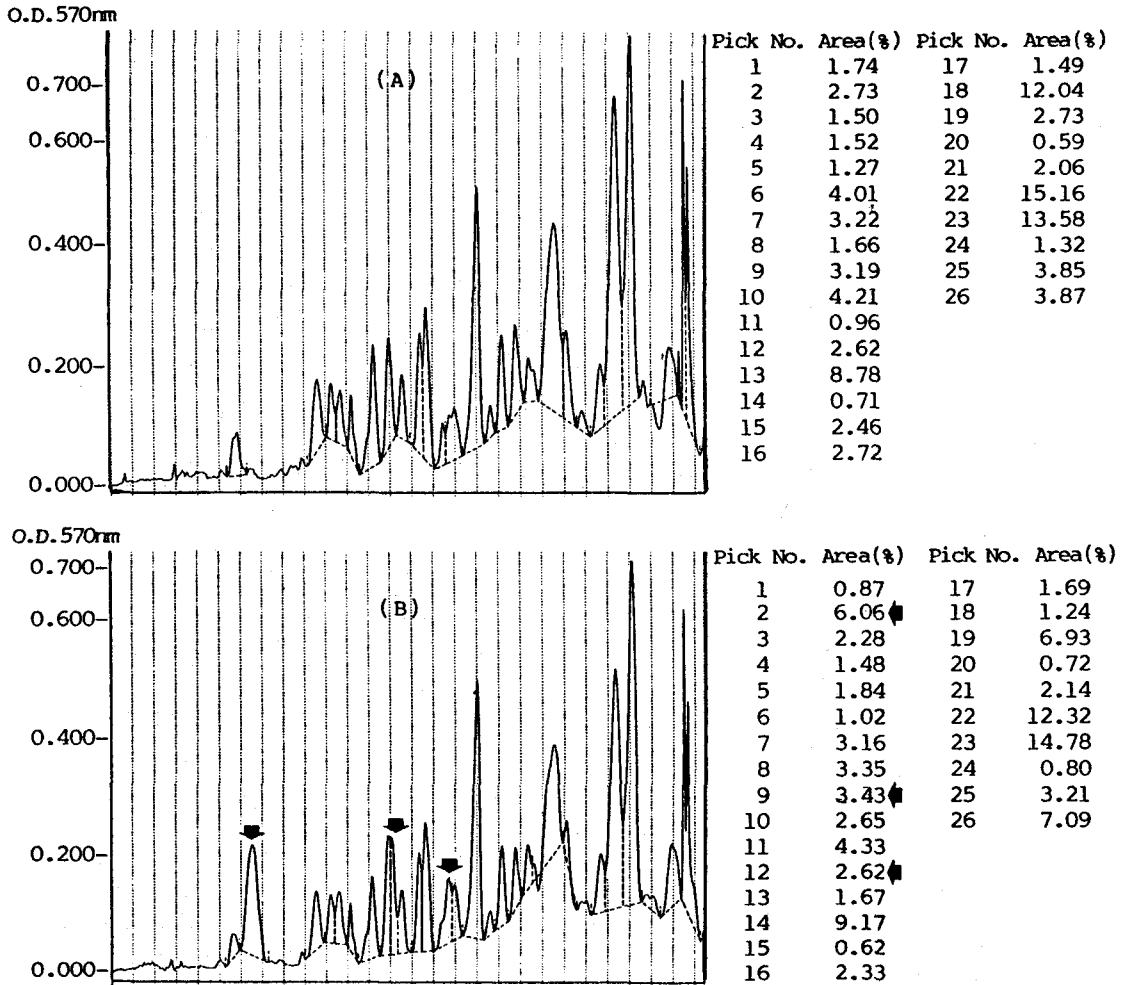


Fig. 4. Densitogram of protein pattern from SDS-PAGE in *P. fluorescens* KR164. A: *P. fluorescens* KR164, B: *P. fluorescens* KR164(pSUPBTR)#3

(pSUPBT)#3 및 KR164(pSUPBTR)#3에서의 단백질 생성은 Fig. 3과 같다. *P. fluorescens* KR164(pSUPBTR)#3 균주에서 대조균주인 *E. coli* HB101(plasmid pES1)과 동일한 135 KD의 단백질이 생성됨을 알 수 있었다. 또한 *P. fluorescens* KR164(pSUPBTR)#3에서 확인된 80 KD의 단백질은 135 KD의 독소단백질이 SDS-PAGE과정의 알카리 pH에 의한 분해와 SDS에 의한 S-S 결합의 절단으로 인해 생성된다는 Couche 등²⁾의 보고와 일치하였으며, SDS-PAGE상의 band에 대한 densitogram 분석에 의하면 Fig. 4와 같이 *P. fluorescens* KR164(pSUPBTR)#3에서 생성되는 독소단백질의 양은 bacteria lysis buffer에 용해된 전체 단백질의 약 10%를 차지하였다.

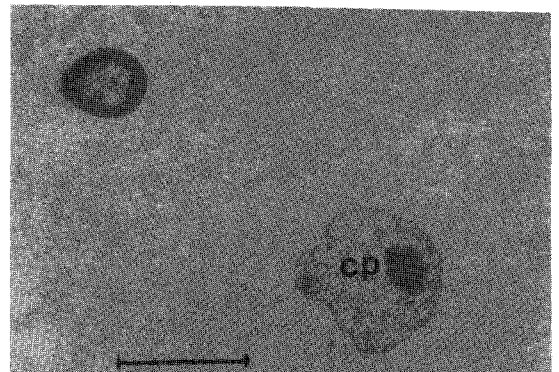


Fig. 5. Transmission electron micrograph of insecticidal crystal toxin formation in *P. fluorescens* KR164 (pSUPBT)#3, 12,000X (bar=1 μ m). cp: Crystal protein toxin

전자현미경에 의한 독소단백질의 관찰

P. fluorescens KR164(pSUPBTR) #3 균주를 LB배지에서 36시간 배양하여 전자현미경으로 관찰한 결과 Fig. 5와 같이 bipyramidal 모양의 독소 결정체가 관찰되었다. *BT* toxin gene이 다른 균주에서 재조합 되었을 때 모 균주에서와 같은 결정성 독소단백질의 형태가 생성되기 어렵다는 것이 일반적이나 본 재조합 균주에서는 모 균주에서와 유사한 형태가 관찰되었다.

참 고 문 헌

1. Arthur, I. A., Backman, W. and Peter, D.: Microbiol. Riview, 50 : 1(1966)
2. Couche, G. A., Pfannenstiel, M. A. and Nickerson, K. W.: J. Bacteriology, 169 : 3281(1987)
3. Keiko, N. and Imanaka, T.: Appl. and Envirn. Microbiol., 55 : 320(1989)
4. Lamli, U. K.: Nature, 227 : 680(1970)
5. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: Molecular cloning; A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor(1989)
6. Meadows, S. and Bone, L. W.: J. Parasitol., 75 : 191 (1989)
7. Michio, H.: Soil and Microbiol., 32 : 25(1988)
8. Reynold, E. S.: J. Cell Biology, 17 : 208(1963)
9. Scher, F. M., Dupler, M. and Baker, R.: Can J. Microbiol., 30 : 1271(1984)
10. Shivakumar, A. G., Gundling, G. J., Benson, T. A. and Spear, B. B.: J. Bacteriology, 166 : 194(1986)
11. Simon, R., Priefer, U. and Puhler, A.: Biotechnology, 1 : 784(1983)
12. 이영환, 김영일, 이재평, 김용웅, 김용재, 이재와: 한국토양비료학회지, 23 : 53(1990)

Expression of *Bacillus thuringiensis* HD-1 gene in rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* KR164

Yeong-Yil Kim, Young-Hwan Rhee and Heun-Soo Kang*(College of Agriculture, Chon-Nam National University, Kwang-Ju 500-757, Korea, *Central Research Institute, Mi-Won Co., Seoul 130-020, Korea)

Abstract : The plasmids pSUPBT and pSUPBTR were constructed with a vector pSUP2021 and the *BT* toxin gene in the plasmid pES 1. The plasmids constructed were introduced into the antagonistic rhizobacteria *P. fluorescens* KR164 by conjugation and *P. fluorescens* having pSUPBT and pSUPBTR were named *P. fluorescens* KR164(pSUPBT) # 2, KR164(pSUPBT) # 3, KR164(pSUPBTR) # 2 and KR164(pSUPBTR) # 3, respectively. The *BT* toxin gene were identified in all transformants by Southern hybridization and the final product of *BT* toxin gene was identified only in *P. fluorescens* KR164(pSUPBTR) # 3 by SDS-PAGE. This crystal toxin protein were also observed in electron microscopy.