

## 새로 분리한 *Bacillus thuringiensis* NT0423균주의 내독소 단백질에 대한 이중 특이성

Dual specificity of  $\delta$ -endotoxins produced by newly isolated  
*Bacillus thuringiensis* NT0423

金祐山 · 朴鉉宇 · 金尙賢<sup>1</sup> · 柳鏞萬 · 徐淑才<sup>2</sup> · 姜錫權

Ho San Kim, Hyun Woo Park, Sang Hyun Kim<sup>1</sup>,  
Yong Man Yu, Sook-Jae Seo<sup>2</sup> and Seok Kwon Kang

**ABSTRACT** Thirteen isolates of *Bacillus thuringiensis* producing parasporal inclusions, obtained from 45 samples of dust and soil of sericultural farms in Kyeong-ki province, were examined for their toxicity against larvae of Lepidoptera, Diptera and Coleoptera. Of these isolates, *Bacillus thuringiensis* NT0423 was toxic to both Lepidopteran and Dipteran larvae. NT0423 showed that the LC<sub>50</sub> values against the Lepidoptera, *Plutella maculipennis* and the Diptera, *Culex pipiens* were  $1.30 \times 10^6$  CFU/ml,  $2.88 \times 10^5$  CFU/ml, respectively. The typical bipyramidal crystals produced by NT0423 composed of protoxins of 130-140kDa encoded by one or more plasmid-borne genes. Also, plasmid DNA analysis indicated that this isolate has 9 plasmids which differ with reported several *B. thuringiensis* strains.

**KEY WORDS** *Bacillus thuringiensis*. bipyramidal crystals, bioassay

**초 록** 경기도 일원의 양잠 농가의 먼지에서 채취한 45개의 샘플중에서 내독소 단백질 결정체를 생산하는 13개의 *Bacillus thuringiensis*를 분리하였다. 이 중 2개 균주는 파리목에 독성을 나타냈으며, 특히 독성검정에서 NT0423균주의 LC<sub>50</sub>수치는 나비목의 배추좀나방이 최소  $1.30 \times 10^6$  CFU/ml이며, 파리목인 빨간 집모기에는  $2.88 \times 10^5$  CFU/ml로 나타났다. 새로 분리된 NT0423균주가 생산하는 내독소 단백질 결정체는 주사 전자현미경사진에서 전형적인 이중 피라미드모양을 보였다. 그리고 이 내독소 단백질 결정체의 SDS-PAGE 분석에서는 주요한 130kDa의 polypeptide을 나타내었다. 또한 NT0423균주의 총 플라스미드 DNA분석에서는 9개의 플라스미드를 갖고 있어 기존의 유사한 독성을 나타내는 균주들과 다른 패턴을 보였다.

**검 색 어** 내독소 단백질 결정체, *Bacillus thuringiensis*, 독성검정

*Bacillus thuringiensis* (*B. t*)는 그람 양성 토 양세균으로서 성장조건이 악화되면 내생포자와 함께 생성하는 내독소 단백질 결정체가 나비목 과 파리목 및 딱정벌레목의 곤충에 대해서 강력한 독성을 나타내기 때문에 미생물 살충제로서 크게 주목을 받고 있다. 따라서 농작물과 산림 및 위생해충의 방제에 유용한 생물농약으로 잘 알려져 있다. 이미 오래전부터 미국을

College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University Suwon 441-744, Korea  
1 Sericultural Experiment Station, RDA Suwon 441-100, Korea  
2 College of Natural Sciences, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

비롯한 선진국에서는 *B. t* 균주를 이용한 무공해 미생물 농약제제가 개발되어 상업적으로 유용하게 쓰이고 있으며, 최근에는 *B. t* 균주에 대하여 숙주범위가 확대되고 독성을 증진시키기 위한 분자 유전학적인 연구가 이루어지고 있으며, 동시에 새로운 *B. t* 균주에 대한 탐색분리에 관한 연구도 지속적으로 수행되고 있다.

지금까지 분리 보고된 *B. t* 균주의 일반적인 분포상태는 다양하다. 특히 *B. t* 균주는 세계 각국의 여러가지 형태의 토양에서 분리되고 있으며(DeLucca et al. 1981, Martin & Travers 1989, Ohba & Aizawa 1986), 모기 유충에 독성이 강한 *B. t* subsp. *israelensis*의 경우 이스라엘의 사막에 있는 모기서식처인 연못에서 분리하였고(Goldberg & Margalit 1977), 또한 죽은 곤충의 유충에서 분리한 *B. t* subsp. *tenebrionis*는 딱정벌레목에 강한 독성을 나타내며(Krieg et al. 1983), 이외에도 저장작물(DeLucca et al. 1982), 그리고 잎 표면(Smith & Couche 1991) 등에서도 분리된 것으로 보고되어져 있다.

본 연구에서는 새로운 *B. t* 균주를 탐색, 분리하기 위한 일련의 연구로서 경기도 일원의 양잠농가의 먼지와 토양으로부터 *B. t* 균주를 분리하고, 현미경 관찰, 단백질 및 플라스미드 패턴의 조사 그리고 독성검정을 통한 연구 결과에서 새로운 균주로 인정되었기에 이를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 세균의 분리

토양 시료들은 멸균된 스폰을 사용하여 비닐 봉지에 5~10g 정도씩 채취한 다음, 실온에서 보관하였다. 토양 시료는 주로 경기도 일원 양잠농가의 잠사에서 토양과 먼지를 대상으로 채취하였다.

토양 시료의 약 1g을 멸균 증류수 10ml에 넣고 2분 동안 격렬하게 교반한 후, 65°C에서 30분 동안 증탕하였다. 시료를  $10^{-4}$  CFU/ml로 희석시키고 300 $\mu$ l를 영양평판매지상(Nutrient

agar)에 도말한 후, 27°C에서 5일간 배양하였다. 증식된 세균 콜로니들은 선발하여, 위상차 현미경을 통하여 내독소 단백질 결정체를 형성하는 것을 *B. t* 균주로 선발하였다.

### 전자현미경 관찰

준비된 시료를 알루미늄 원반시료대 위에서 자연 건조시킨 후, 탄소와 금으로 씌우고日立 S-570형의 주사 전자현미경으로 관찰하였다.

### 플라스미드 DNA의 분리

*B. t* 플라스미드 DNA는 개선된 alkaline lysis 방법(Birnboim et al. 1979)에 의해 분리하였다. 50ml의 L. B배지에 *B. t* 균주를 접종하여 27°C, 12시간 배양한 후, L.B와 S.P.Y 배지 각 250ml에 접종하여 27°C, OD<sub>600nm</sub>에서 0.7이 될 때까지 배양하였다. 위의 조건하에서 배양된 *B. t* 균주를 5000g, 5분간 원심분리하여 균체를 집균하고, 이것에 10ml의 Sol. I 용액[50mM Glucose, 25mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA]을 넣어서 균체를 vortex mixer로 잘 풀어준 다음, 50mg/ml의 농도로 lysozyme을 넣어 섞은 후, 실온에서 20분간 정치하였다. 신선하게 만든 Sol. II 용액(0.2N NaOH, 1% SDS) 20ml을 첨가해서 용액을 균질화시킨 다음, 얼음속에 10분간 정치하였다. Sol. III 용액(5M Potassium acetate 60ml, Glacial acetic acid 11.5ml, 멸균증류수 28.5ml) 15ml을 넣어 천천히 섞어 주고, 10분간 정치한 다음 상온에서 10,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액만 회수하였다. 이 상등액에 99% 에탄올을 두배의 부피로 첨가해서 -70°C에서 20분간 정치시킨 뒤, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 얻은 후 건조시켰다.

이렇게 건조된 침전물에 8ml의 TE 완충액(pH8.0)을 넣어 잘 녹인 후, RNase A를 10 $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 단백질을 제거하기 위해 phenol용액을 처리하여 상등액을 취하였다. 이렇게 얻어진 상등액으로부터 chloroform과 isoamylalcohol이

24 : 1로 혼합된 용액을 등량처리하여 원심분리한 다음 상등액을 취했다. 이 상등액에 99% 에탄올을 두배의 부피로 넣고  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 정치한 다음, 12,000rpm에서 15분간 원심분리해서 얻어진 침전물에 70% 에탄올로 3회 씻은 후 건조시켰다. 건조된 침전물에 100 $\mu\text{l}$ 의 TE 완충액을 넣어 잘 녹인 후 흡광도(260nm)를 측정하여 DNA의 순수도와 농도를 조사해서 적당량을 사용하였다.

### 내독소 단백질 결정체의 분리

새로운 균주의 내독소 단백질 결정체를 생산하기 위해, 3  $\ell$ 의 G.Y.S매지(Nickerson et al. 1974)가 들어 있는 대형 발효기에 새로운 *B. t* 균주를 접종하여  $27^{\circ}\text{C}$ 에서 공기를 주입시키면서 160rpm으로 4일 이상 배양하여 침전물을 수집하였다. 이 침전물들을 0.01% Triton X-100을 포함한 1M NaCl 용액으로 3회 세척한 다음, 초음파 교반기로 교반하여 Sucrose로 67%, 72%, 79%, 87% 농도의 불연속 밀도 구배를 만들어  $4^{\circ}\text{C}$ , 80,000g에서 14시간동안 초원심분리하였다(Wendy et al. 1983). 79%와 87% 농도에서 생성된 내독소 단백질 결정체층만 회수하여 멸균된 3차 증류수로 3회 이상 세척하여 Sucrose를 완전히 제거하고 냉동 건조시켜 사용하였다.

### 단백질 전기영동

순수하게 분리된 내독소 단백질 결정체를 Laemmli(1970)의 방법을 일부 수정하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 준비된 시료 일정량에 5X Sample buffer [0.6ml 1M Tris-HCl(pH6.8), 5ml 50% glycerol, 2ml 10% SDS, 0.5ml 2-mercaptoethanol, 1ml 1% bromophenol blue, 0.9ml  $\text{H}_2\text{O}$ ]를 섞은 다음  $100^{\circ}\text{C}$  물에서 5분 동안 가열한 후, 상온에서 잠시 정치시키고 원심분리하여 상등액을 회수한 다음, 10% SDS-PAGE를 행하였다.

### 독성검정

새로운 *B. t* 균주를 sporulation이 일어날 때까지  $27^{\circ}\text{C}$ , 4일 동안 배양하여, spore count로 농도를 측정한 다음, 연속적으로 희석하여 약 1ml당 2mg정도의 단백질이 함유된 집중원 200 $\mu\text{l}$ 를 2g의 인공사료에 첨가하여 각 구당 나비목 곤충인 배추좀나방(*Plutella maculipennis*), 흰불나방(*Hypantria cunea*), 담배나방(*Heliothis assulta*), 누에(*Bombyx mori*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*) 유충 각 20마리씩 넣고 2일간 치사성을 관찰하였다. 파리목인 모기유충(*Culex pipiens*)에 대한 독성검정은  $10^{-4} \sim 10^{-6}$  CFU/ml로 연속적으로 희석하여 20ml를 만든 후, 모기 20마리를 넣고 그 치사성을 관찰하였다. 그리고 딱정벌레목인 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)와 팥바구미(*Callosobruchus chinensis*)에 대한 독성검정은 쌀과 팥 각 5g을 새로운 *B. t* 배양액에 2시간 동안 담구었다가 꺼내어 물기가 완전히 마를 때까지 음건한 후, 각 20마리의 바구미를 넣어 1주일간 그 치사성을 관찰하였다.

독성검정에 사용된 누에는 농촌 진흥청 잠업시험장으로 부터, 배추좀나방, 흰불나방, 담배나방은 서울대학교 곤충생태학 실험실에서 유지되고 있는 것을, 그리고 모기는 동 대학 위생곤충학 실험실로 부터 분양받아 사용하였다.

### 결과 및 고찰

토양에서 분리되는 많은 종류의 *B. t* 균주는 그 특성이 다양하다. 나비목, 파리목, 그리고 딱정벌레목에 선택적으로 살충성을 나타내는 균주들과 나비목과 파리목에 대해 독성을 보이는 균주들, 그리고 내독소 단백질 결정체는 형성하지만, 독성이 없는 균주들이 있다. 그러나 이들 독성이 전혀 없는 *B. t* 균주들도 지금까지 독성검정에 공시되지 않은 새로운 계층에 대해서는 독성을 보일 가능성도 있을 수 있다. 특이한 활성을 가지는 *B. t* 균주의 분리는 토양을 비롯한 여러 장소에서 분리되었고, 1979년의 Ohba 등이 보고한 대로 양잠농가의 먼지에서

많은 *B. t* 균주가 분리된 사실은 곤충 서식처나 곤충유충 자체에서의 분리만큼 효과적임을 알 수 있다. 따라서 이들 장소에 대한 집중적인 분리, 탐색이 중요하며, 이런 특성이 있는 균주에 대한 연구는 새로운 *B. t* 제의 개발뿐만 아니라, 해충 저항성의 출현에 대한 문제를 해결할 수 있기 때문이다.

본 연구는 경기도 일원의 양잠 농가의 토양과 먼지에서 분리하고 다양한 *B. t* 균주를 주사 전자현미경을 통하여 정제된 내독소 단백질 결정체를 관찰한 결과, 포자와 내독소 단백질 결정체가 함께 혼재해 매우 윤곽이 뚜렷한 이중 피라미드형 결정체만을 보이고 있다(Fig. 1). 그림 2는 Sucrose 불연속 밀도구배로 정제한 내독소 단백질 결정체를 10% SDS-PAGE 분석을 한 결과, 이 새로운 *B. t* 균주가 약 130kDa의 분자량을 갖는 protoxin과 미량의 밴드를 나타내고 있음을 보여 주고 있다. 이 미량의 밴드는 포자와 세포등이 혼재되어 있는



Fig. 1. Scanning electron micrograph( $\times 10,000$ ) of crystals of NT0423 strain purified by 67~87% discontinuous Sucrose density gradient centrifugation. C: crystal, S: spore.

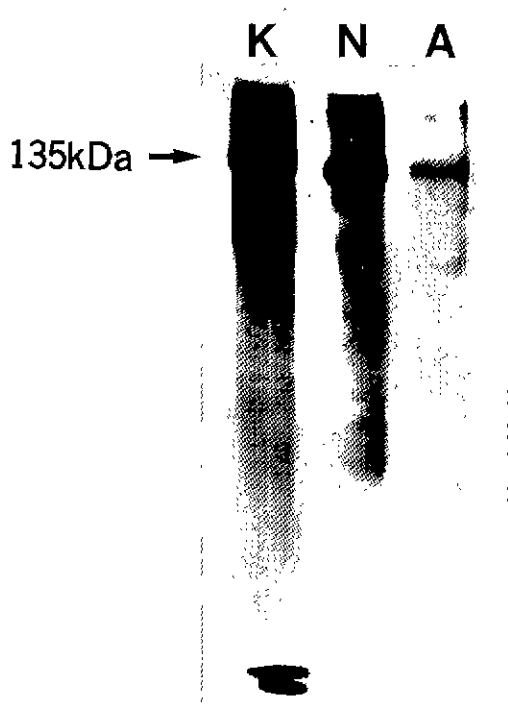


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of crystal proteins of several *B. thuringiensis* strains. Lane K, *B. t* subsp. *kurstaki* HD-1 ; Lane N, NT0423 strain ; Lane A, *B. t* subsp. *aizawai*.

것으로 추측된다. 이러한 결과는 살충성에 있어서 이중 특이성을 갖는 대표적인 *B. t k* HD-1과는 전혀 다른 단백질 형태를 보이고 있음을 물론, 또한 현미경으로 관찰했을 때에도 P2의 입방형 결정체는 보이지 않았으며, *B. t k* HD-1의 독소 단백질에 의하여 생산된 항체와도 반응하지 않은 것으로 볼 때 *B. t k* HD-1과는 다른 균주임을 알 수 있었다.

이 새로운 *B. t* 균주의 독성검정에서 수종의 나비목 곤충뿐만 아니라, 파리목 곤충에 대해서도 높은 활성을 보였다. 표 1에서 나타난 것과 같이 매추좀나방, 누에, 담배나방, 흰불나방에 대해서는 매우 높은 독성을 보이고 있지만, 담배거세미나방 같은 *Spodoptera*속의 곤충에 대해서는 *cryI* 유전자형에 속하는 대개의 *B. t* 균주들처럼 낮은 활성을 가지고 있었다. 한편 파리목 곤충에 독성을 나타내는 이 새로운 *B. t*

Table 1. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* NT0423 strain against Lepidopteran, Dipteran and Coleopteran larvae.

Tested larvae	strain
	<i>B. thuringiensis</i> NT0423
(Lepidopteran)	
<i>Plutella maculipennis</i>	+++
<i>Heliothis assulta</i>	+++
<i>Hypantiria cunea</i>	+++
<i>Bombyx mori</i>	+++
<i>Spodoptera litura</i>	-
(Dipteran)	
<i>Culex pipiens</i>	++
(Coleopteran)	
<i>Sitophilus oryzae</i>	-
<i>Callosobruchus chinensis</i>	-

+++ ; Highly effective, 100% lethality

++ ; Effective, 80% lethality

- ; Entirely not effective, 0% lethality

균주는 그 독성자체가 *B.t* subsp. *israelensis*보다는 저독성이지만 다른 모기 유충에 독성이 있는 *B.t* subsp. *darmstadiensis*, *B.t* subsp. *kyushuensis*등 보다는 독성이 강하게 나타났다. 특히 *cryII*의 독소 단백질보다는 강한 독성을 나타냈다. 한편 딱정벌레목에 대한 독성은 두 종류의 바구미를 대상으로 독성검정을 행하였으나, 전혀 독성이 없는 것을 2주일이 지나 확인하였다. 결론적으로 이 새로운 *B.t*균주는 기존의 밝혀진 *B.t k* HD-1처럼 나비목과 파리목에 동시에 독성을 나타내는 이중 특이성(Wilham 1989)을 갖고 있었다. 표 2에서 볼 수 있는 것과 같이, NT0423균주의 LC<sub>50</sub>수치는 나비목의 배추좀나방이 최소  $1.30 \times 10^6$  CFU/ml이며, 파리목인 모기에는  $2.88 \times 10^5$  CFU/ml로 나타났다. 나비목과 파리목에 동시에 독성을 나타내는 *B.t*균주는 현재 독성이 미치는 숙주범

Table 2. Toxicities of NT0423 and reference strain of *Bacillus thuringiensis* to the Lepidopteran and Dipteran larvae

	No. of CFU/ml			
	<i>Plutella maculipennis</i> <sup>a</sup>		<i>Culex pipiens</i> <sup>b</sup>	
	50%	100%	50%	100%
subsp. <i>israelensis</i>	—	—	$5.2 \times 10^4$	$8.3 \times 10^5$
subsp. <i>kurstaki</i>	$1.53 \times 10^5$	$1.53 \times 10^7$	—	—
NT0423	$1.30 \times 10^6$	—	$2.88 \times 10^5$	$1.30 \times 10^5$

<sup>a</sup> Third-instar larvae

<sup>b</sup> 2-3 days larvae

<sup>c</sup> Could not observe dead larvae until No. of  $1.53 \times 10^6$  CFU/ml

위와 아미노산 서열에 의해 분류한 기준에 의하면 *cryII* 유전자형에 속한다. 이 유전자는 입방형 구조물을 형성하는 65kDa 단백질을 암호화하고 있는 유전자로서 130kDa의 이중 피라미드형 구조물을 형성하는 P1 결정체 단백질과는 대조적으로 P2 단백질로서 명명되어졌다(Yamamoto et al. 1983). 새롭게 분리한 *B.t*균주는 *cryII* 유전자형에 해당될 것이라는 판단하에 독소 단백질의 분자량 및 전기영동상, 플라스미드 DNA의 분석에 의한 비교와 전자현미경 관찰로 기존의 밝혀진 비슷한 성질의 *B.t*

균주와는 차이가 있음을 확인하였다.

지금까지 밝혀진 것에 의하면, 나비목과 파리목에 동시에 독성을 나타내는 *B.t*균주는 Hofte와 Whitely가 1989년에 보고한 대로 *B.t* subsp. *k* HD-1과 *B.t* subsp. *tolworthi*와 *kenyae*가 있다. 그러나 이들 균주들은 입방형 구조물을 형성하면서 이중 특이성을 가지지만, 새로운 *B.t*균주는 이중 피라미드형 구조물만을 생산하면서 이중 특이성을 가지는 것이 특징이다. SDS-PAGE상에서 보여진 대로 *B.t k* HD-1과는 단백질 형태에서 상이했는데, 플라스미드

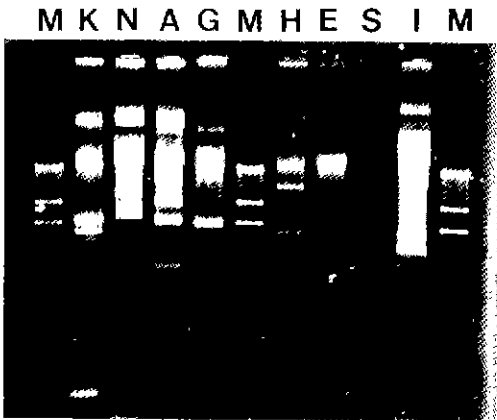


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis analysis of total plasmid DNA of several *B.t.* 0.7% agarose gel stained with EtBr. Lane M,  $\lambda$  DNA digested with HindIII; Lane K, *B.t.* subsp. *kurstaki* HD-1; Lane N, NT0423 strain; Lane A, *B.t.* subsp. *aizawai*; Lane G, *B.t.* subsp. *galleriae*; Lane H, *B.t.* subsp. *kurstaki* HD-73; Lane E, *B.t.* subsp. *entomocidus*; Lane S, *B.t.* subsp. *sotto*; Lane I, *B.t.* subsp. *israelensis*.

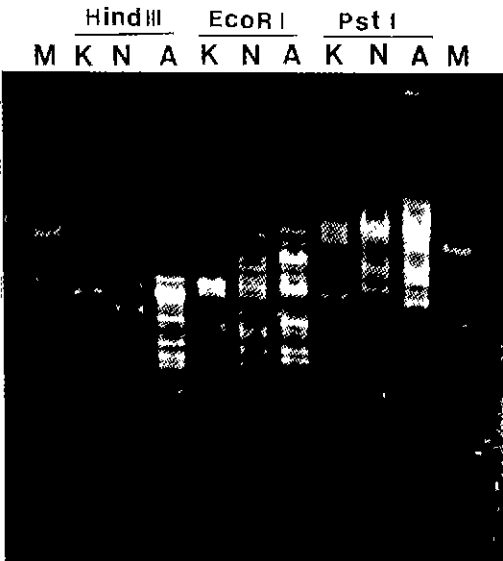


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis analysis of various restriction endonuclease digested several *B.t.* plasmid DNAs. 0.7% agarose gel stained with EtBr. Lane K, N and A (HindIII); *B.t.* subsp. *kurstaki* HD-1, NT0423 strain and *aizawai* plasmid DNA digested with HindIII. Lane K, N and A (EcoRI); *B.t.* subsp. *kurstaki* HD-1, NT0423 strain and *aizawai* plasmid DNA digested with EcoRI. Lane K, N and A (Pst I); *B.t.* subsp., *kurstaki* HD-1, NT0423 strain and *aizawai* plasmid DNA digested with Pst I.

DNA상에서도 9개의 플라스미드를 가지고 있어 역시 비교된 *B.t.* 균주와 다른 형태를 보이고 있다(Fig. 3). *B.t.* subsp. *aizawai*와 단백질 및 플라스미드 DNA의 패턴이 약간 비슷하지만 세 증의 제한효소를 이용하여 절단하여 비교했을 때 NT0423균주와 다른 상을 보였으며(Fig. 4), 특히 subsp. *aizawai*는 모기에 대한 독성을 발견할 수 없었다.

이상의 결과를 기초로 하여 지금까지 밝혀진 *B.t.* 관련 자료를 종합해 볼 때(Hofte et al. 1989), 이 새로운 균주는 *cryII* 유전자형에 속하는 것으로 사료된다. 이 결과는 *cryII* 유전자형의 전형적인 *B.t. k* HD-1의 특성을 토대로 보다 세밀한 분석을 수행할 예정이며 아울러 내독소 결정체 단백질을 암호화하고 있는 유전자를 클로닝하고 염기서열을 조사하여 이종 특이성을 보이는 영역을 규명하고, 해충저항성 식물체를 제조할 것이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 특정연구개발 사업비 및 서울대학교 농업생명연구소제연구센터의 지원으로 수행된 것임.

인 용 문 헌

Birnboim, J. C. & J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 7: 1513~1523.

Brownbridge, M. & J. Margalit. 1986. New *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Israel are highly toxic to mosquito larvae. *J. Invertebr. pathol.* 48: 216~222.

DeLucca, A. J., Palmgren, M. S. & A. Ciegler. 1982. *Bacillus thuringiensis* in grain elevator dusts. *Can. J. Microbiol.* 28: 452~456.

DeLucca, A. J., Simonson, J. G. & A. D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United states. *Can. J. Microbiol.* 27: 865~870.

- Hofte, H. & H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242~255.
- Krieg, A., Huger, A. M., Laugenbrugh, G. A. & W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber Larven Coleopteran wirksamer pathotyp. Z. Angew. Entwicklungsgesch. 96: 500~508.
- Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 227: 680~685.
- Martin, P. A. W. & R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2437~2442.
- Nickerson, K. W. & L. A. Jr Bulla. 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 28: 124~128.
- Ohba, M. & K. Aizawa. 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils in Japan. J. Invertebr. pathol. 47: 12~20.
- Ohba, M., Aizawa, K. & T. Furusawa. 1979. Distribution of *Bacillus thuringiensis* serotypes in Ehime prefecture, Japan. Appl. Entomol. Zool. 14: 340~345.
- Thomas W. E. & D. J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal  $\delta$ -Endotoxin: Effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. J. Cell. Sci. 60: 181~197.
- William, R. W. & H. R. Whiteley. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. J. Bacteriol. 171: 965~974.
- Yamamoto, T. 1983. Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. J. Gen. Microbiol. 129: 2595~2603.
- Yamamoto, T., Garcia, J. A. & H. T. Dulmage. 1983. Immunological properties of the entomocidal proteins of *Bacillus thuringiensis* and its insecticidal activity. J. Invertebr. Pathol. 41: 122~130.
- Yamamoto, T. & R. E. McLaughlin. 1981. Isolation of a proteins from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103: 414~421.

(1993년 9월 3일 접수)