

Bacillus thuringiensis var *kurstaki* HD-1의 內毒素 蛋白質 遺傳에 關여하는 plasmid의 決定

金哲永 · 金尚賢 · 金英勳 · 姜錫權
서울대학교 農業生命科學大學

Determination of Plasmids Encoding Crystal Toxic Protein Gene in *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-1

Chul Young Kim, Sang Hyun Kim, Young Hoon Kim and Seok Kwon Kang
College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

The objective of this study is to identify plasmids of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (B. t k HD-1) toxic to lepidopteran larvae. The results from agarose gel electrophoresis indicated that the bacterium contained 9 plasmids with approximate sizes of 1.4, 4.9, 5.4, 9.3, 10, 29, 44, 52, and 150 megadaltons(Md). By treating the wild type of B. t k HD-1 with either SDS or EtBr as curing agent, 26 cured mutants of the bacterium were obtained, 9 of them were crystalliferous(cry⁺) and the others acrySTALLIFEROUS(cry⁻). Plasmids from B. t k HD-1 were transferred to *B. cereus* 569 str^R cry⁻ recipients (Bc569 M1). Among 13 isolates of Bc569 M1 transciipient, 11 of them were capable of producing the crystal toxic proteins. The plasmid patterns of Bc569 M1 transciipients and partially cured mutants of B. t k HD-1 on agarose gel electrophoresis suggested that the 29 and 44Md plasmids should be involved in the production of crystalline toxic proteins.

Key words : *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, δ -endotoxin, plasmid

緒 論

Bacillus thuringiensis(이하 B. t로 약함)는 토양 박테리아로서 성장조건이 악화되면 胞子를 형성하고 동시에 殺蟲效果를 가진 細胞內 毒素蛋白質(parasporal crystal protein)을 생성하는데(Angus, 1964; Angus, 1956) 이 내독소단백질은 130 kd 정도의 분자량을 가진 single polypeptide로서 이를 해충이 섭취하면 알칼리성 소화액(pH 10 이상)이나 단백질 분해酵素에 의해 독소로 작용한다.

B. t의 내독소 단백질을 생성하는 유전자는 B. t내에 존재하는 여러개의 large plasmid중 일부가 curing되었을 때에 acrySTALLIFEROUS(cry⁻) mutation을 일으키는 것으로 볼때, 이들 plasmid 내에 coding 되어져

있는 것으로 추정되고 있다. Whiteley 등(1981), Gonzalez 등(1981, 1982), Bulla 등(1981), Klier 등(1982), Aronson 등(1982), Whiteley 등(1984)은 B. t k HD-1의 경우 10개의 plasmid중 30~150 Md 사이의 3개의 plasmid상에 이들 probe와 homology를 갖는 B.t 내독소 단백질 유전자가 존재하는 것으로 보고하였고, 이어서 이들은(1984) 이러한 homology는 promotor gene에 stem loop를 형성하는 transposable element와 유사한 逆反復 염기서열(inverted repeated sequence)에 의해 나타나는 것으로 확인하였다. 한편 Gonzalez 등(1984)의 보고는 B. t k HD-1의 curing 실험을 통해 얻어진 Cry⁺, Cry⁻ 변이주의 plasmid를 비교, 검토한 결과, 29 Md plasmid상에 존재한다고 하여 상기 Whiteley의 보고와는 상이한 결과를 주장

하였다.

이러한 관점에서 본 연구에서는 앞으로 이들 내독소 단백질 遺傳子의 發現 및 調節機作을 糾明하기 위한 연구에 이용하고자, 내독소 단백질이 clone된 recombinant *E. coli*를 만들기 위해 먼저 curing agent 처리에 의해 일부 plasmid가 cured된 crystalliferous (cry⁻) 및 acrySTALLIFEROUS(cry⁺) B. t mutant를 분리하고, 이들의 plasmid를 추출하여, Agarose 전기영동을 확인하였다. 또한 이들 泳動像과 *Bacillus cereus* mutant의 plasmid 電氣泳動像을 비교한 결과로부터, B. t 내독소 단백질 유전자기 기억된 plasmid를 분리 연구하였다.

材料 및 方法

1. 公試菌株

Agarose 電氣泳動像에서 plasmid의 분자량을 측정하기 위해 이용된 표준 菌株는 미국 농무성의 Faust 박사로부터 분양받은 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1(B. t k HD-1)와 *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* HD-2 (B. t HD-2)이었고, B. t와 mating 실험에서 B. t plasmid 수용균으로 분리한 *B. cereus* NRRL 569 균주를 본 실험실에서 Ethyl methane sulphonate(EMS) 처리 후 황산 streptomycin에 순응시켜 만든 *B. cereus* 569 M1(BC 569 M1)이었다.

2. 使用培地 및 菌培養

B. t와 *B. cereus* 및 이들로부터 얻어진 변이균주의 plasmid 성상을 조사하기 위하여 균배양에 이용한 배지는 Glucose-yeast extract salt(G.Y.S)와 L-broth를 이용하였으며, *B. cereus*와 B. t의 mating 실험에 이용한 배지는 L-broth와 황산 streptomycin(100 µg/ml)이 포함된 Nutrient agar 培地였다.

이상 황산 streptomycin 저항성 *B. cereus* 變異株를

선택하기 위한 M56 Minimal medium과 황산 streptomycin 濃度包配(0~100 µg/ml) Nutrient agar 培地를 이용하였다.

3. Plasmid cured B. t 變異菌株의 分離

B. t plasmid curing은 0.002% SDS(sodium dodecyl sulfate)와 0.5 µg/ml의 EtBr(Ethidium Bromide)을 curing agent로 하여 아래와 같이 수행하였다.

100 ml Erlenmeyer flask내 20 ml의 L-broth 배지를 넣어 B. t를 접종하고, 3~4시간 배양($10^3 \sim 10^4$ cell/ml)한 다음, curing agent를 첨가하여 32°C에서 12시간 배양한 후 分光光度計를 이용하여 600 nm 파장에서 吸光度를 측정 0.6정도의 흡광도를 나타낼 때 100배의 신선한 L-broth배지에 희석하여 Nutrient Agar에 plating하고, 32°C에서 2일간 배양, 직경 5 mm 정도의 colony가 형성되면 이들을 다시 G.Y.S agar 배지에 streaking하여 3~4일간 배양하면 대부분 sporulation이 일어나게 되는데 이때에 위상차 현미경으로 검경하여 내독소 단백질 生成여부를 확인하고, cry⁻/spo⁺ cry⁺/spo⁺ 變異株로 분류한 뒤 Nutrient agar slant 培地에 接種 5°C에 보관하였다.

4. B. t plasmid가 전이된 B. cereus의 분류

Mating 실험에 의해 이용된 donor 균주는 streptomycin 感受性(Str^s) B. t k HD-1을 이용하였고 수용균주로는 EMS를 처리하여 mutation을 誘導한 *B. cereus* 569균을 황산 streptomycin 농도포배 Nutrient Agar 배지에 대해 내성을 가지는 colony를 選拔에 이용하였다(Fig. 1). *B. cereus*와 B. t의 Mating 조건은 각각의 균주를 100 ml Erlenmeyer flask에서 12~14시간 攪拌 培養한 후, 2 ml tube에 신선한 배지에 1:100이 되게 혼합하여 6~8시간 동안 再培養하고, 이들을 각 10 µl씩 취하여 1.5 ml microcentrifuge tube에서 혼합하여 停置狀態에서 48시간 배양하였다.

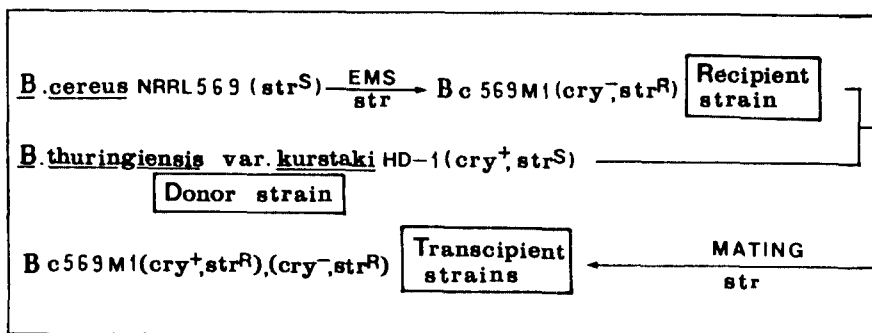


Fig. 1. Model for selection of Bc 569 M1 transciptients: EMS: ethyl methane sulfonate, str: streptomycin.

32°C 에서 배양 12시간 경과 후에 나타나는 colony를 분리하여 slant배지에 분주한 다음 5°C 에서 보관하였다.

5. Plasmid 分離 및 Agarose 電氣泳動

B. t와 B. cereus의 plasmid 분리는 분자량이 30 Md 이상인 plasmid의 분리도를 높이기 위해 Birnboim & Doly(1979) 방법을 일부 變形한 방법으로 수행하였다.

結果 및 考察

1. B. thuringiensis var. kurstaki HD-1, B. cereus 569 plasmid의 분리

B. t k HD-1 균주는 1.4~150 Md 사이에 9개의 plasmid가 B. cereus에서는 1개의 plasmid가 존재하는 것으로 나타났고(Fig. 2. lane a, Fig. 3. lane a, Fig. 7. lane c), 電子顯微鏡으로 그 크기가 확인된 B. t HD-2 plasmid를 표준 DNA로 하여 이들의 분자량을 추정하는 결과는 표 1과 같다. 표 1에서 확인된 B. t k HD-1의 plasmid수와 그 분자량은 개선된 Eckhardt lysate 방법에 의거 plasmid를 분리하고 電氣泳動을 수행하여, 분자량이 150 Md, 52 Md, 44 Md, 29 Md, 10 Md, 9.3 Md, 5.4 Md, 5.2 Md, 4.9 Md, 1.4 Md인 10개의 plasmid가 존재한다고 보고한 Gonzalez 등(1982)의 보고나, Birnboim & Doly의 방법에 의거 plasmid를 분리하여 분자량이 54, 47, 30, 10, 9.3, 5.6, 5.2, 1.5 Md인 8개의 plasmid가 존재한다고 보고한 Lereclus 등(1982)의 보고와 비교할 때 Gonzalez의 보고에서 확인된 5.2 Md plasmid가 확인되지 않았으며, Lereclus 등의 보고에서 없는 것으로 보이는 150 Md의 plasmid가 확인되었다는 사실을 제외하고는 이들 보고서와 거의 일치되는 결과이며, Fig. 2. lane (a)의 5.4 Md plasmid band가 2개의 band일 가능성도 배제할 수 없다.

2. 일부 plasmid가 소실된 B. thuringiensis 변이균

주의 분리

Curing agent로서 SDS와 EtBr을 처리하여 일부 plasmid를 curing시킨 변이주를 20 ml G.Y.S.培地가 들어있는 100 ml Erlenmeyer flask에 接種한 후, 6~8 시간 培養, late exponential phase에 이를 때 수거 분리하여, 개선된 Birnboim & Doly(1979) 방법에 따라 plasmid를 추출하고, 0.4~0.5% Agarose gel 電氣泳動을 행하여 plasmid curing여부에 대한 결과를 얻었다(Fig. 2, 3, 4, 5, Table 2).

0.5 µg/ml의 EtBr을 curing agent로 처리한 경우, Nutrient agar plate로 부터 약 80개의 colony를 조

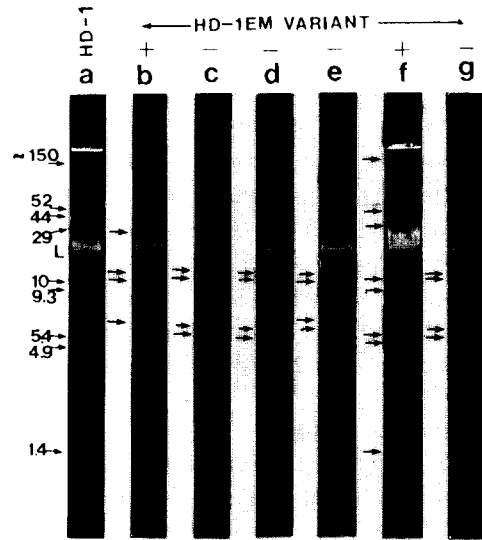


Fig. 2. Plasmid patterns of partially cured mutants of *B. thuringiensis* HD-1 (HD-1EM variant): The "L" indicates the position of chromosomal DNA fragment; A "+" indicates crystal forming mutant; A "-" indicates loss of crystal production; Lane a) HD-1, b) HD-1EM1, c) HD-1EM2, d) HD-1EM3, e) HD-1EM4, f) HD-1EM5, g) HD-1EM6.

Table 1. *Bacillus thuringiensis* HD-1, HD-2 and *Bacillus cereus* plasmids number and their sizes

Strain	Serotype ^(a)	No. of plasmid	Plasmid size ^(b) (megadaltons)
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> HD-2	1	9	5.2, 6.2, 7.2, 32, 37, 54, 57, 75, 150Md
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-1	3ab	9	1.4, 4.9, 5.4, 9.3, 10, 29, 44, 52, 150Md
<i>B. cereus</i> 569	1	8Md	

a) Gives flagella serotype (de Barjac and Bonnefoi, 1973)

b) Masses of the HD-2 plasmids were determined by electromicroscopy(Gonzalez and Carlton, 1980) and used as molecular weight standard on agarose gel to estimate molecular weight for the other strain plasmid.

Table 2. Number and estimated molecular weights of plasmids and the presence of crystalline inclusions of partially cured mutant *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1

Mutant strain	Curing agent	Crystalline inclusions ^(a)	Plasmid number ^(b)	Plasmid profile
HD-1EM1	EtBr	+	4	150, 52, 44, 4.9, 1.4Md plasmid lost
HD-1EM2, 3, 4, 6, 13	EtBr	-	4	10, 9.3, 5.4, 4.9Md plasmid mobility changed The others lost
HD-1EM5	EtBr	+	8	52Md plasmid lost
HD-1EM7, 10, 12, 14	EtBr	+	7	52, 44Md plasmid lost
HD-1EM8, 9	EtBr	-	2	10, 9.3Md plasmid mobility changed The others lost
HD-1EM11	EtBr	-	3	10, 9.3, 5.4Md plasmid mobility changed The others lost
HD-1SM1, 10	SDS	-	3	150, 52, 44, 29, 10, 1.4Md plasmid lost
HD-1SM2	SDS	-	0	All plasmid lost
HD-1SM3, 4	SDS	-	2	10, 9.3Md plasmid mobility changed The others lost
HD-1SM5	SDS	-	1	10Md plasmid mobility changed The others lost
HD-1SM6	SDS	+	5	52, 44, 10, 9.3Md plasmid lost
HD-1SM8	SDS	+	7	52, 29Md plasmid lost
HD-1SM9, 7	SDS	-	3	10, 5.4, 4.9Md plasmid mobility changed The others lost
HD-1SM11	SDS	+	5	150, 52, 44, 10Md plasmid lost
HD-1SM12	SDS	-	4	150, 52, 44, 29, 9.3Md plasmid lost

(a) Presence(+) or absence(-) of phase-refractile parasporal crystals after growth on nutrient agar.

(b) Indicates the change in plasmid pattern as compared to its parental strain.

사하여 일부 plasmid가 curing된 내독소 단백질 합성能力을 가진 6개의 變異菌株(cry⁻ mutant)와 내독소 단백질 합성能力이 상실된 8개의 변이균주(cry mutant)가 분리되었는데 이들 변이균주의 plasmid 전기영동상과 B. t k HD-1 균주의 plasmid 전기영동상을 비교한 결과, 최고 7개에서 최저 2개의 plasmid가 curing된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2, 3).

이들 중 HD-1 變異菌株 EM-1, EM-5, EM-7, EM-10, EM-12, EM-14는 내독소 합성能力을 가진 변이균주로서 공통적으로 분자량이 29, 10, 9.3, 5.4 Md인 4개의 plasmid를 가지고 있으며, 이상의 고분자 또는 저분자량의 plasmid는 EM-1의 경우 150, 52, 44 Md 모두 소실되었으며, EM-7, EM-10, EM-13, EM-14는 52와 44 Md plasmid가, EM-5는 44 Md 만이 소실되었다.

이들에 있어서 특히 주목되어지는 현상은 1.4 Md plasmid가 소실된 EM-1의 경우(Fig. 2 lane b)로서 1.4 Md plasmid가 존재하는 EM-5나 EM-7(Fig. 2 lane g, Fig. 3 Lane b)에 비해 10, 9.3, 5.4 Md의 plasmid군의 이동도가 감소하여 분자량으로 환산하면 0.4~0.8 Md 정도가 증가하는 것을 볼 수 있었다.

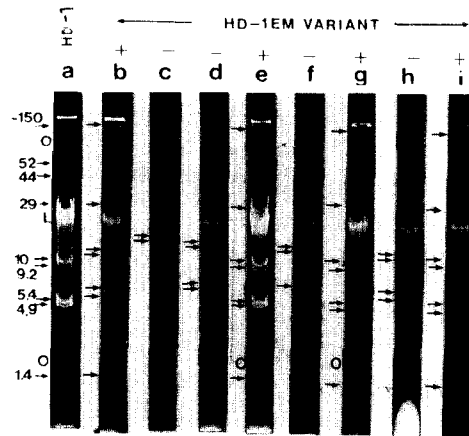


Fig. 3. Plasmid patterns of partially cured mutants of *B. thuringiensis* HD-1 (HD-1EM variant): The "L" indicates the position of chromosomal DNA fragment; A "+" indicates crystal forming mutant; A "-" indicates loss of crystal production; Lane a) HD-1, b) HD-1EM7, c) HD-1EM8, d) HD-1EM9, e) HD-1EM10, f) HD-1EM11, g) HD-1EM12, h) HD-1EM13, i) HD-1EM14.

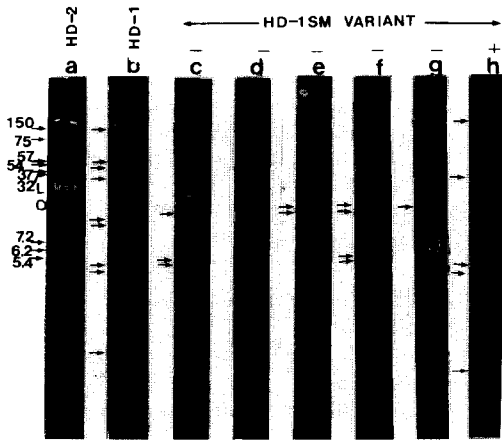


Fig. 4. Plasmid patterns of partially cured mutants of *B. thuringiensis* HD-1(HD-1SM variants); The "L" indicates the position of chromosomal DNA fragment; A "+" indicates crystal forming mutant; A "-" indicates loss of crystal production; Lane a) HD-1, b) HD-1SM7, c) HD-1SM6, d) HD-1SM1, e) HD-1SM2, f) HD-1SM4, g) HD-1SM3.

또한 EM-10, EM-12, EM-14의 경우에는 wild type HD-1에서는 존재하지 않는 4.9와 1.4 Md 사이의 plasmid군의 이동도에서 약간의 증가趨勢를 보이는 경향을 나타내었다. 내독소 합성능력이 없는 EM-2, EM-3, EM-4, EM-6(Fig. 2 lane c, d, e, g)와 EM-8, EM-9, EM-11, EM-13(Fig. 3 lane c, d, f, h)의 plasmid 전기영동상에서는 29 Md 이상의 plasmid가 모두 소실되었으며, cry⁺ 변이균주에서와 같이 1.4 Md plasmid가 나타나지 않은 변이균주는 4.9~10 Md 사이의 4개 plasmid군의 이동률이 감소되어짐을 확인할 수 있었다.

curing agent로서 0.002% SDS를 처리한 경우에는 EtBr를 curing agent로 사용한 처리구에 비해 균의 생존률과 변이菌株 발생율이 상당히 떨어지는 경향을 보여 Nutrient agar plate에 나타난 약 140개의 colony를 확인한 결과, 일부 plasmid가 curing된 3개 cry⁺ 변이균주(SM-6, SM-8, SM-11)와 9개의 cry⁻ 변이균주(SM-1, SM-2, SM-3, SM-4, SM-5, SM-7, SM-9, SM-10, SM-12)를 분리할 수 있었다(Fig. 4, 5).

SDS를 curing agent로 처리한 변이균주 역시 Fig. 2, 3의 EtBr 처리구에서와 같이 cry⁻ 변이균주는 29 Md 이상의 plasmid는 거의 모두 消失되었고, 1.4 Md plasmid가 나타나지 않은 경우에 10~4.9 Md 사이에

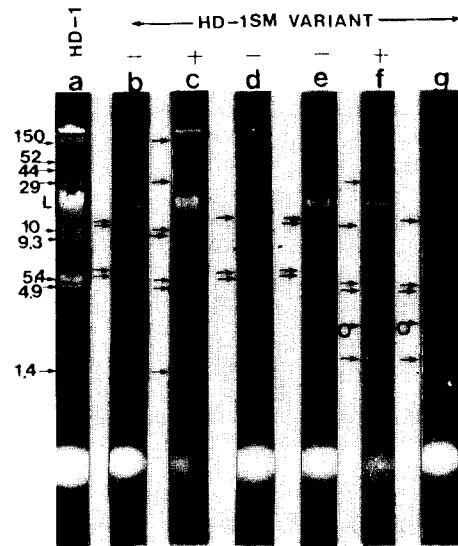


Fig. 5. Plasmid patterns of partially cured mutants of *B. thuringiensis* HD-1(HD-1SM variants); The "L" indicates the position of chromosomal DNA fragment; A "+" indicates crystal forming mutant; A "-" indicates loss of crystal production; Lane a) HD-2, b) HD-1, c) HD-1SM1, d) HD-1SM11, e) HD-1SM7, f) HD-1SM9, g) HD-1SM10, h) HD-1SM12.

4개의 plasmid군의 이동도가 減少되었으며, 1.4와 4.9 Md plasmid 사이에 미세 band가 나타난 변이균주(SM-11, SM-12)와 나타나지 않은 변이균주(Fig. 5, lane c)를 비교하여 보면, 10~4.9 Md plasmid군의 이동도가 증가함을 보여 EtBr 처리구와 큰 차이가 없었다.

이상과 같이 EtBr이나 SDS를 curing agent로 사용하여 일부 plasmid가 curing된 *B. t k* HD-1 변이菌株를 분리하고, 이들의 plasmid 전기영동상을 확인한 결과는 SM-8을 제외한 모든 cry⁻ 변이균주에서 29, 10, 9.3, 5.4, 4.9 Md plasmid가 공통적으로 존재하였으나, 그림 2, 3, 4, 5의 EM-2, EM-3, EM-4, EM-6, EM-13, SM-4, SM-9, SM-10 변이균주에서는 上記 5개 plasmid중 29 Md plasmid를 제외한 10, 9.3, 5.4, 4.9 Md plasmid가 모두 존재함에도 불구하고, 내독소 단백질을 합성하지 않는 것으로 볼때 29 Md plasmid가 내독소 단백질 합성에 관여하는 遺傳子로서 결정적인 관계가 있는 것으로 추정되며, 이외 SM-8에서 고분자 plasmid중 29 Md 대신 44 Md와 150 Md이 존재할 때에도 내독소 단백질 합성에 관여하는 것으로 생각할 수 있다.

Table 3. Number and estimated molecular weights of plasmids and the presence of crystalline inclusions of transcipts resulted from conjugations between *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1(donor) and *B. cereus* 569M1 (recipient)

Transcipt ^(a) strain	Crystal ^(b) inclusions	Plasmid profile ^(c)
Bc569M1-1	+	52, 44Md transferred; New 56Md plasmid
Bc569M1-2	+	150, 52, 44Md transferred; New 56Md plasmid
Bc569M1-3	+	44Md transferred; New 56Md transferred
Bc569M1-4	+	44Md transferred; New 56Md transferred
Bc569M1-5	+	52, 44Md transferred; New 60Md plasmid
Bc569M1-6	+	44, 29Md transferred
Bc569M1-7	+	150, 29Md transferred
Bc569M1-8	-	5.4, 4.9Md transferred
Bc569M1-9	+	150, 29Md transferred
Bc569M1-10	-	10, 9.3, 5.4, 4.9Md transferred
Bc569M1-11	+	150, 44, 9.3Md transferred
Bc569M1-12	+	29, 10, 9.3, 5.4, 9.1, 1.4Md transferred
Bc569M1-13	+	150, 29Md transferred

a) The number of parental strain is given, followed number means mutant derivation.

b) Presence(+) or absence(-) of phase-refractile parasporal crystals after growth on nutrient agar.

c) Plasmid transferred from the donor strain *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1.

3. *B. thuringiensis* plasmid가 轉移된 *B. cereus* conjugant의 分離

*B. cereus*와 *B. thuringiensis*의 mating 실험을 통하여 *B. thuringiensis* 내독소 단백질 gene coding plasmid를 포함한 일부 plasmid가 轉移된 *B. cereus* 受容性 菌株을 選擇하였다. B. t plasmid상에는 選擇標識(selection maker) 유전자가 존재하지 않는 관계로 먼저 EMS(ethyl-methane sulfonate)로 처리한 *B. cereus*를 황산 streptomycin이 함유된 배지에 順應시켜 100 µg/ml 황산 streptomycin 배지에서도 내성을 가지는 *B. cereus* 황산 streptomycin 내성(streptomycin resistant) 변이균주를 분리하여 Bc 569 M1이라고 명하고 mating 실험에서 B. t plasmid 수용균주로 이용하였다. *B. cereus* str^R 변이균주와 B. t k HD-1의 mating은 L-broth에서 低速攪拌培養에 의하여 수행하였으며, 100 µg/ml 황산 streptomycin이 함유된 Nutrient agar 배지에 塗抹한 후 30°C 에서 24~48시간 培養하여 얻은 colony를 조사하고, plasmid를 추출, Agarose 전기영동을 행한 결과 B. t plasmid가 轉移된 11개 cry⁻ *B. cereus* 변이균주와 2개의 cry⁺ *B. cereus* 變異菌株가 分離되었다(Table 3).

Bc 569 M1과 B. t 를 혼합배양한 후 황산 streptomycin(100 µg/ml) 배지에 plating한 결과 나타난 colony는 가장자리가 매끈하고 둥근형(S-type)과 거칠고 부정형(R-type)의 2가지 형태로 나타났고, 이들의 차이를 位相差 顯微鏡으로 鏡檢한 결과는 Fig. 6에서처

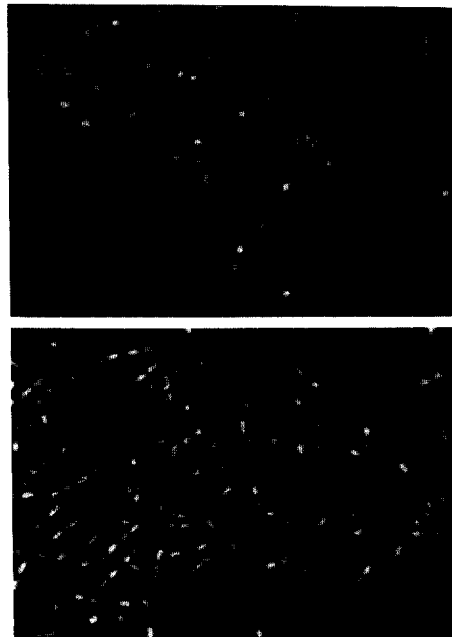


Fig. 6. Phase contrast photomicrographs of *B. cereus* incubated at 30°C on nutrient agar plate. (A) *B. cereus* 569 recipient and cry⁻ *B. cereus* 569 M1 transcipt. There are spores (S) but no crystal toxic protein (C). (B) plate of *B. cereus* 569 M1 cry⁺ transcipt shown many spores and crystals.

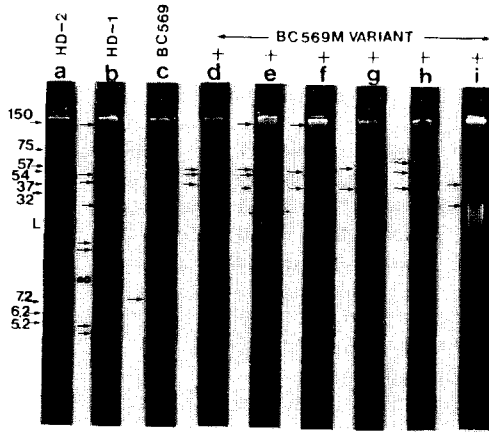


Fig. 7. Plasmid of donor(*B. thuringiensis* HD-1), and recipient(*B. cereus* 569) and transcipt strains(BC 569 M1 variants): The "L" shows the position of chromosomal DNA fragment; A "+" above a slot indicates crystal forming transcipt; Lane HD-2, b) HD-1 donor, c) BC 569 strRrecipient, d) BC 569 M1-1, e) BC 569 M1-2, f) BC 569 M1-3, g) BC 569 M1-4, h) BC 569 M1-5, i) BC 569 M1-6.

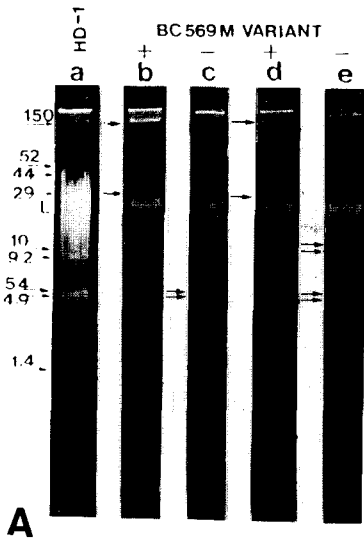


Fig. 8. Plasmid patterns of donor(*B. thuringiensis* HD-1), and transcipt strains (BC 569 M1 variants): The "L" shows the position of chromosomal DNA fragment; A "+" above a slot indicates crystal forming transcipt; Lane HD-1, b) BC 569 M1-7, c) BC 569 M1-8, d) BC 569 M1-9, e) BC 569M1-10.

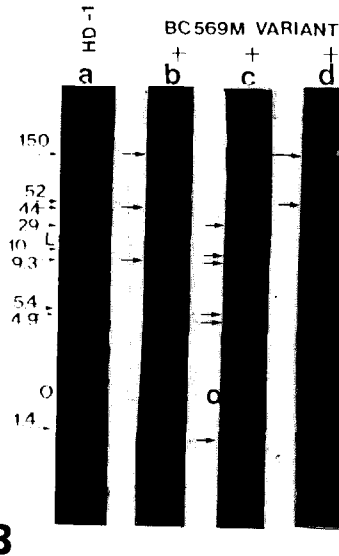


Fig. 9. Plasmid patterns of donor(*B. thuringiensis* HD-1), and transcipt strains (BC569 M1 variants): The "L" shows the position of chromosomal DNA fragment; A "+" above a slot indicates crystal forming transcipt; Lane a) HD-1, b) BC 569 M1-11, c) BC 569 M1-12, d) BC 569 M1-13.

럼 S-type colony는 내독소 단백질을 합성하지 않는 *B. cereus*였고, R-type colony는 내독소 단백질 합성 능력을 가진 *B. cereus*로 확인되었다.

분리한 *B. cereus* 569 變異菌株(Bc 569 M1-1-M1-13)의 plasmid 電氣泳動像은 Fig. 7, 8, 9에서 보는 바와 같이 상당히 복잡한 樣相을 나타내었다.

본 실험의 결과에서 얻어진 Bc 569 M1 conjugant 변이균주의 plasmid 전기영동상에서 *B. t k* HD-1 균주내 있는 9개 plasmid가 多樣한 組合으로 존재하는 것이 확인되었으나 Bc 569 M1-8(Fig.8 lane c), M1-10(Fig.8 lane e), M1-12(Fig.9 lane c)를 제외한 대부분의 Bc 569 M1 변이균주에서는 29 Md 이상의 고분자 plasmid가 전이된 것으로 밝혀졌으며 특히 내독소 단백질을 합성하는 Bc 569 M1 변이균주에서는 반드시 44 Md이나 29 Md plasmid중 1개가 존재하였다.

Cry⁺ Bc 569 M1 변이균주는 colony 모양에서 Bc 569 M1 受容菌株와 다른 특징을 갖는 것과는 달리 cry⁻ Bc 569 M1 變異菌株는 Bc 569 M1 受容菌株와 plasmid 전기영동상을 확인하기 전에는 뚜렷한 表現形의 차이를 나타내지 않는 어려움이 있기 때문에 약 140여개의 S-type colony를 조사한 결과 Fig. 8의 lane

c와 e의 Bc 569 M1-9, M1-10 2개의 cry⁻ Bc 569 M1 變異菌株 중 Bc 569 M1-10을 cry⁺ Bc 569 M1-12와 비교함으로써 29 Md plasmid의 존재여부에 따라 내독소 단백질 합성이 결정되어 진다는 사실을 밝힐 수 있었다. 상기 결과는 前項의 일부 plasmid가 curing된 B. t 변이균주의 plasmid 전기영동에서 cry⁺ 變異菌株과 cry⁻ 變異菌株을 비교할때, cry⁻ 變異菌株에서는 44 Md, 29 Md plasmid가 소실되었다는 사항이나, 저분자 plasmid에 비해 고분자 plasmid의 curing이 쉽게 일어난다는 사실과 일치되는 것으로 B. t k HD-1 균주에서 내독소 단백질 유전자가 기억된 plasmid는 44 Md, 29 Md plasmid인 것으로 믿어진다.

한편 Fig. 7에서 Bc 569 M1-1, M1-2, M1-3, M1-4, M1-5 變異菌株에서는 受容菌株인 *B. cereus* 569나 供與菌株인 B. t k HD-1에는 존재하지 않는 분자량 60 Md, 56 Md의 새로운 plasmid를 가지고 있었으며, B. t plasmid가 轉移되기 전부터 Bc 569 M1에 존재하고 있던 8Md plasmid가 B. t plasmid가 전이되면서 소실되었다. 이러한 결과의 원인은 본 실험결과에서는 확인할 수 없었으나, 前項의 curing 실험에서 B. t k HD-1의 1.4Md plasmid가 소실됨에 따라 4.9-10 Md 사이 plasmid군의 이동도가 감소한 사항이나, 일반적으로 plasmid나 chromosomal DNA 간에는 recombinant 발생빈도가 높다는 사항을 배경으로 추정하여 보면 Bc 569 M1의 8 Md plasmid와 B. t의 44 Md 혹은 52 Md의 고분자 plasmid가 recombinant가 일어남으로 인해 새로운 band가 존재했거나 아니면 또 다른 원인으로 8 Md plasmid의 소실은 처음부터 copy수가 적은 plasmid가 보다 강력한 replication origin을 가진 B. t plasmid가 전이됨에 따라 이들과의 경쟁적인 replication으로 인해 양립할 수 없는 상태로 됨으로 인하여 일어나는 현상으로 생각할 수 있다. 그러나, 새로운 plasmid의 존재는 replication 과정상의 dimer일 가능성도 배제될 수 없다고 추측된다.

摘 要

B. t k HD-1 菌株에 0.002% SDS와 0.5 µg/ml EtBr을 처리한 결과, 9개의 cry⁻ 變異菌株을 分離하였으며 또한 B. t k HD-1균주와 *B. cereus* 569균주를 混合培養하는 방법으로 mating실험을 수행하여 B. t k HD-1으로부터 일부 plasmid가 轉移된 11개의 cry⁺ *B. cereus*와 2개의 cry⁻ *B. cereus*를 分離하고 plasmid 수와 분자량을 조사하였다. B. t k HD-1의 경우 9개의 plasmid가 존재하였고 일부 plasmid가 curing된 B.

t k HD-1 변이균주의 경우 29 Md plasmid나 44 Md plasmid가 반드시 존재하였으나, cry⁻ 변이균주에는 29 Md 이상의 모든 plasmid가 소실되어 내독소 단백질 합성에 관여하는 유전자가 기억된 plasmid를 결정하였다.

사 사

이 논문은 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음

引 用 文 獻

- Angus, T. A., 1954. A bacterial toxin paralyzing silk-worm larvae. *Nature(London)* **173**: 545.
- Angus, T. A., 1956. Extraction, Purification, and properties of *Bacillus sotto* toxin. *Can. J. Microbiol.* **2**: 416-426.
- Aronson, A. I., D. J. Tyrell, P. C. Fitz-James, and L. A. Bulla, Jr. 1982. Relationship of the synthesis of spore coat protein and parasporal crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **151**: 399-410.
- Birnboim, J. C. and J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**: 1513-1523.
- Bulla, L. A., Jr., K. J. Kramer, D. J. Cox, B. L. Jones, L. I. Davison and G. L. Lockhart, 1981. Purification and characterization of the entomocidal protein of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **256**: 3000-3004
- de Barjac, H., and Bonnefoi, 1973. Classification of *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga* **18**: 5-17.
- Gonzalez, J. M., Jr. and B. C. Carlton, 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*
- Gonzalez, J. M., Jr. and B. C. Carlton, 1982. Plasmid transfer in *Bacillus thuringiensis*, p. 85-95. In U. N. Streips, W. R. Guide, S. H. Goodgal and G. A. Wilson. (ed.). *Genetic exchange: a celebration and a new generation*. Marcel Dekker, New York.
- Gonzalez, J. M., Jr. and B. C. Carlton, 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. *Plasmid* **11**: 28-38.
- Gonzalez, J. M., Jr., H. T. Dulmage and B. C. Carlton, 1981. Correlation between specific plasmids and δ-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* **5**: 351-365.
- Klier, A., F. Fargette, J. Ribier and G. Rapaport, 1982. Cloning and Expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain *berliner* 1715. *EMBO J.* **1**: 791-799.
- Lereclus, D., M. M. Lecadet, J. Ribier and R. Dedonder, 1982. Molecular relationship among plasmids of

Bacillus thuringiensis: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. Mol. Gen. Genet. **186**: 391-398.

Whitley, H. R., H. E. Schnepf, J. W. Kronstad and H. C. Wong, 1984. Structural and regulatory analysis of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene, p. 375-386. In A. T. Ganesan and J. A. Hoch (ed.), Genetics and biotechnology of bacilli. Academic

Press, Inc., New York.

Whitley, H. R., J. W. Kronstad and H. E. Schnepf, 1981. Cloning the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli* and localization of the gene in different strains of *B. thuringiensis*, p. 147-156. In F. Michal(ed.), Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases. UNDP/World Bank/WHO. Geneva.