

모기유충 방제균 *Bacillus sphaericus* 1593의 형질전환 조건

한길환 · 김상달*

영남대학교 농축산대학 응용미생물학과

Transformation of Mosquito Larvicidal *Bacillus sphaericus* 1593 by Plasmid pGB215-110ΔB

Kil-Hwan Han and Sang-Dal Kim*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract — *Bacillus sphaericus* 1593 is pathogenic to the larvae of a number of mosquito species that are known as important vectors for the transmission of certain human and animal diseases. As a preliminary experiment for developing a multifunctional *B. sphaericus* 1593 as a potent antagonist, we investigated the conditions for the protoplast transformation system of *B. sphaericus* 1593 using the plasmid pGB215-110ΔB. The protoplast of *B. sphaericus* 1593 were obtained most efficiency by treating the cells with 500 μg/ml of lysozyme in the SMM buffer containing 0.5 M sucrose at pH 8.0 and 40°C for 60 minutes. The cell wall was regenerated on the plate containing 1.2% agar and 0.8 M mannitol. Under the best condition for protoplast formation and regeneration established in the work the highest frequency of transformation was achieved with the 40% PEG (M.W 4,000) treatment for 15 minutes of incubation at 4°C, and subsequently for 120 minutes incubation at 30°C for phenotypic expression. The highest transformation efficiency were observed at 1.0 μg/ml of the final concentration of the plasmid DNA and the plasmids were found to be fairly stable since about 70% of the plasmids were maintained after 8 successive daily transfers onto the fresh medium.

모기 등 질병 매개위생 곤충이나 농작물의 유해곤충을 방제하기 위해서 막대하게 사용되는 화학살충제의 피해가 날로 증가되고 있다. 이러한 화학 살충제에 의한 환경오염과 공해로부터의 피해를 줄이기 위한 노력의 일환으로서 *Bacillus popilliae*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus thuringiensis* 등의 천적 미생물 자원을 이용하는 유해곤충의 생물학적 방제 방법이 오래 전부터 연구되어 오고 있다(1).

*Bacillus sphaericus*도 *Culex*, *Anopheles* 등의 모기 유충을 살충할 수 있고 인체에 무독성인 결정성 독소 단백질을 생산한다는 사실이 알려진 이래(2) *Bacillus sphaericus*의 살충성 독소 단백질의 뛰어난 효력(3)과, 수계 및 토양에서의 양호한 생육, 다른 방제균과 달리 자외선에 대한 강한 내성 등의 살충특성을 알았으며(4), 이러한 장점을 이용하기 위해 최근에는 유전자 조작을 이용한 다기능 방제균주의 개발이 활발히 진행되고 있다(5). 그러나, *B. sphaericus*는 외부 유전자

도입을 위한 형질전환이 어렵고, 형질전환 균주의 안정성도 낮아 대규모의 실용화에는 아직 해결해야 할 문제가 많다고 생각되어진다(6).

본 연구에서는 이러한 외부유전자 도입의 어려움을 해결하기 위해 돌연변이제인 ethidium bromide을 이용하여 모기유충 방제균 *B. sphaericus* 1593 균주내에 내재된 cryptic plasmid를 제거(curing)시킨 후, 적합한 plasmid vector를 선정하여 최적 조건을 검토, 형질전환 효율을 높이고 또한 형질전환 균주의 plasmid vector 안정성을 확인하여 향후 유전자 조작 기법에 의한 생물 방제균 개발의 기초를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

본 실험에 사용된 host 균주는 미국 Arizona 대학 미생물학과에서 분양받은 모기유충 방제균인 *Bacillus sphaericus* 1593을 사용하였으며, 형질전환에 사용한 plasmid vector는 *E. coli* HB101에 내재된 *E. coli*-Ba-

Key words: *Bacillus sphaericus* 1593, mosquitoicidal-line, crystal protein

*Corresponding author

cillus 용 shuttle vector인 pGB215-110 Δ B(Km^r, Amp^r, 8.5 Kb)이었다.

배지

Protoplast 재생용 배지로는 mannitol regeneration 배지(casamino acid 2 g, yeast extract 2 g, agar 3.2 g, 1 M mannitol 280 ml, gelatin 8 g, 50% glucose 4 ml, 1 M MgCl₂ 8 ml, 5% K₂HPO₄ 40 ml, 증류수 60 ml)를 넣은 배지를 pH 8.0으로 마춘 다음 115°C 에서 20분간 멸균)를 사용하였다. Lysozyme 처리시에는 SMM buffer(0.5 M sucrose, 0.02 M malate, 0.02 M MgCl₂)를 사용하였으며, 삼투압 안정제로서는 SMMP 용액(2× SMM와 4×Penassay broth를 동량 혼합)을 사용하였다.

원형질체 형성 및 재생

모기방제균 *Bacillus sphaericus* 1593에 내재된 cryptic plasmid를 curing 시킨 숙주 균의 원형질체 형성을 위해서 Penassay broth 50 ml에 종배양액(3×10⁸/ml)을 1% 되게 접종한 후 30°C 에서 160 rpm으로 6시간 배양하고 6,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 수거하였다. 이 균체를 SMMP 용액으로 2번 세척한 후 lysozyme(500 µg/ml) 으로 40°C 에서 60분간 처리시켰으며, 원형질체 재생은 형성된 원형질체를 mannitol regeneration agar(MRA) 배지상에서 30°C 에서 4일간 배양하여 재생시켰다. 원형질체 형성율은 원형질체화 된 세포수를 lysozyme 처리 전의 세포수로 나눈 값을 백분율로 나타내었으며, 재생율은 MRA 배지에서 나타난 colony 수에서 원형질체화 되지 않은 세포수를 뺀 값으로 나누어 백분율로 나타내었다.

형질전환

Bacillus sphaericus 1593의 형질전환은 Cohen 등(7)의 방법에 준하여 수행하였으며 원형질체 형질전환의 빈도는 kanamycin(50 µg/ml)을 포함한 MRA 배지에서 배양된 colony 수를 항생제가 포함하지 않은 MRA 배지에서 배양된 colony 수로 나눈 값으로 나타내었다.

형질전환체로부터 plasmid 분리 및 확인

Plasmid pGB215-110 Δ B에 의해 형질전환된 형질전환체 내에서의 plasmid 분리는 Birnbiom과 Doly의 방법(8)에 따랐으며, 0.8% horizontal agarose gel 상에서 5 v/cm 약 2시간 전기영동하여 ethidium bromide(1 mg/ml)로 15분간 염색후 UV illuminator(TR-

302, 302 nm) 상에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

원형질체 형성조건

pH의 영향 먼저 처리액의 pH가 원형질체 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SMM buffer를 0.1 N NaOH로 pH 5.0에서 9.0까지 조절한 후 lysozyme(500 µg/ml)으로 40°C 에서 1시간 반응시켜 본 결과 Fig. 1에서 나타난 결과와 같이 pH 8.0에서 원형질체 형성율이 가장 높은 것으로 나타났다. 이 결과는 *Bacillus* sp. K-17의 원형질체 형성율이 pH 7.0에서 가장 높다는 성 등의 보고(9)와 또한 *Brevibacterium lactofermentum*의 경우 pH 7.5에서 가장 높게 나타났다는 보고(10)와 조금 상이 하나 일반적으로 *Bacillus* 속의 경우 pH 7.0에서 8.0 사이에서 원형질체 형성율이 가장 높다는 결과(11)와는 유사하다.

배양시간의 영향 *Bacillus sphaericus* 1593의 생육 시기에 의한 원형질체 형성의 영향을 조사하기 위하여 15시간 배양시킨 종 배양액(3×10⁸) 1%를 Penassay broth에 접종하여 30°C 에서 배양시키면서 각 배양시

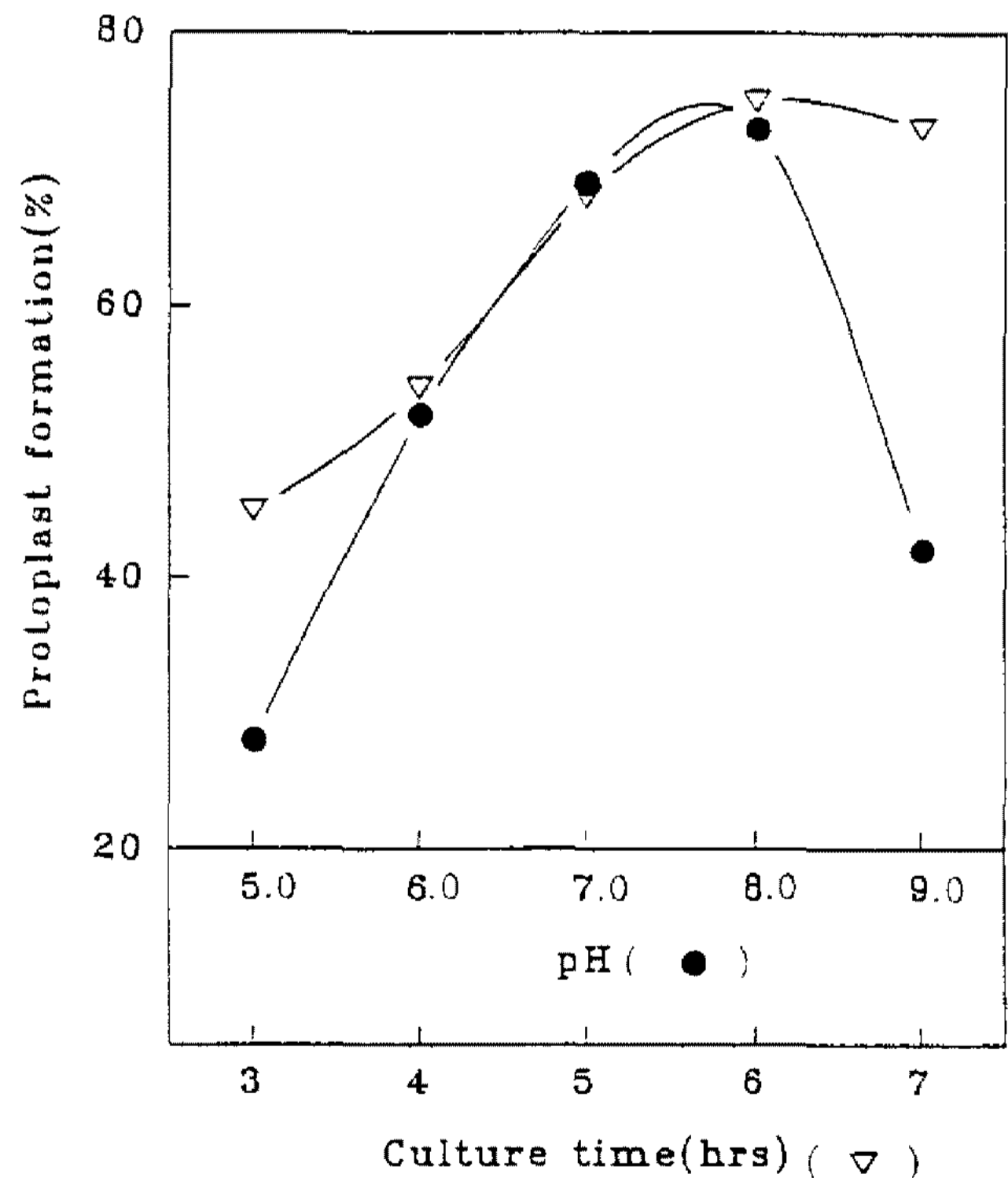


Fig. 1. Effect of pH and culture time on the protoplast formation by lysozyme treatment.

Log phase cells (4.5×10^8) of *B. sphaericus* 1593 were inoculated in SMM buffer containing lysozyme (final conc. of 500 µg/ml) at 40°C. Protoplast formation (%) = $[1 - (\text{osmotically stable cells}/\text{input bacteria})] \times 100$.

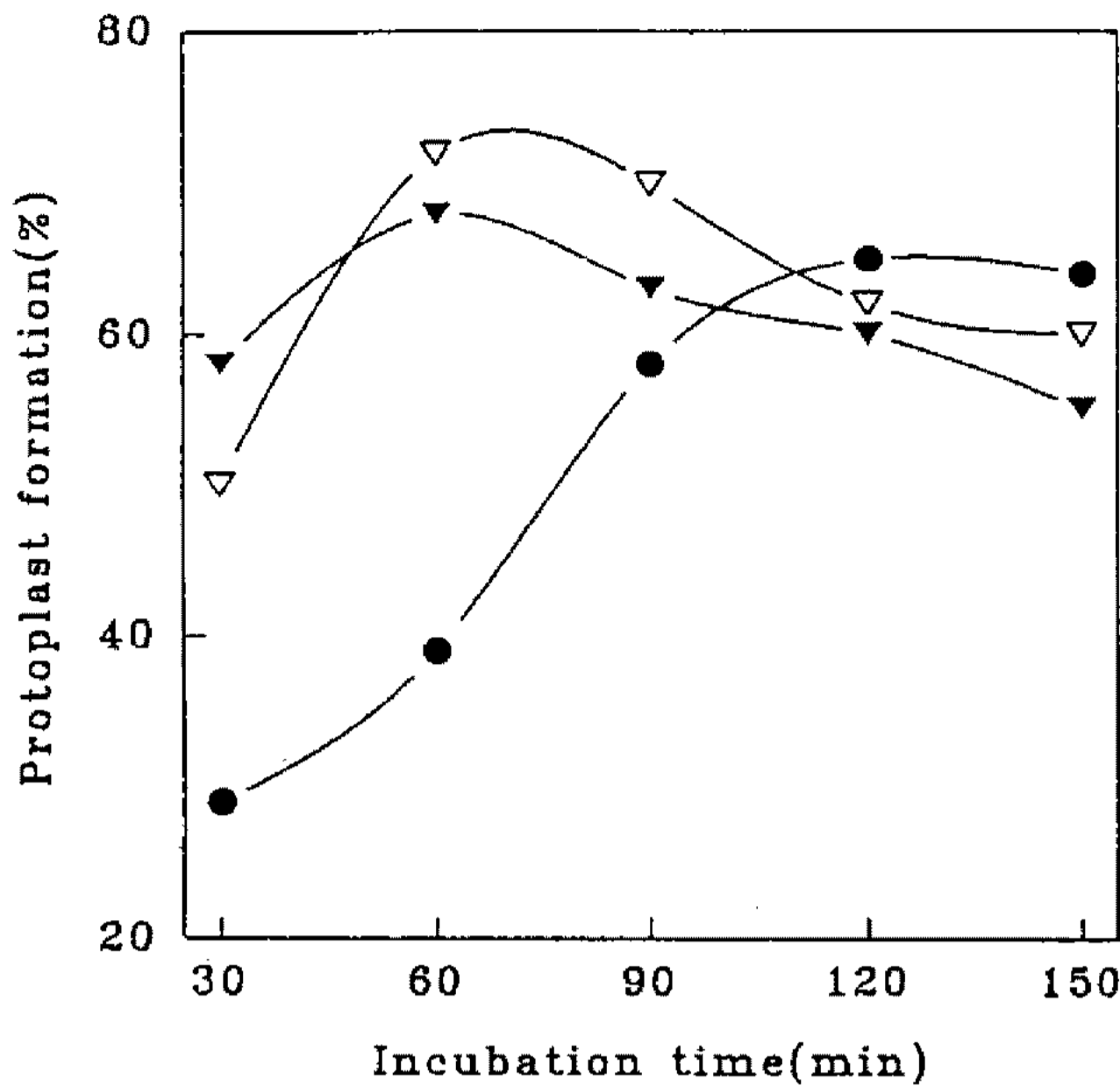


Fig. 2. Effect of lysozyme treatment time on the protoplast formation.

B. sphaericus 1593 cells (3×10^8) were incubated in SMM buffer (pH 8.0) with lysozyme concentration of 200 µg/ml (●), 500 µg/ml (▽), and 1000 µg/ml (▼) for various times at 40°C. Protoplast formation (%) = $[1 - (\text{osmotically stable cells}/\text{input bacteria})] \times 100$.

간별로 균체를 수거하여 lysozyme(500 µg/ml)을 처리해 본 결과 원형질체 형성율은 Fig. 1에서 나타난 것과 같이 6시간 배양 균체에서 최고의 형성율을 나타내었다. 이러한 결과는 4시간에서 5시간 배양시 최고의 형성율을 갖는다는 *Bacillus* sp. K-17(9)과 5시간 배양시 최고의 형성율을 갖는다는 *Bacillus* sp. YBL-7의 경우(11)와 상이하나 4시간에서 6시간 배양시 최고의 형성율을 갖는다는 *Bacillus subtilis*의 결과(12)와 유사하였다. 이 결과는 6시간 이상 배양시킬 경우 배양시간이 연장됨에 따라 세포벽의 두께가 두꺼워져서 원형질체 형성에 악영향을 미친다는 보고(13)를 뒷받침 할 수 있었다.

Lysozyme 처리시간 및 농도의 영향 Lysozyme 처리에 의한 균체의 원형질체 형성시 세포벽의 제거 정도에 따라서 재생율과 형질전환율이 크게 영향을 받는다(14). 그러므로 원형질체 형성이나 형질전환에 가장 효율적인 원형질체를 얻기 위하여 lysozyme 농도를 200, 500, 1000(µg/ml)로 달리하여 시간별로 반응하면서 원형질체 형성율을 조사해 본 바 Fig. 2와 같이 500 µg/ml에서 60분간의 처리 경우에서 원형질체 형성율이 70% 이상의 높은 값을 나타내었다. 이 결과는 *Bacillus subtilis*의 경우 45분간 250 µg/ml의 lysozyme 처리(14), *Streptomyces cattleya*의 경우 90분간 2.5 µg/ml의 lysozyme 처리(15), *Staphylococci*의

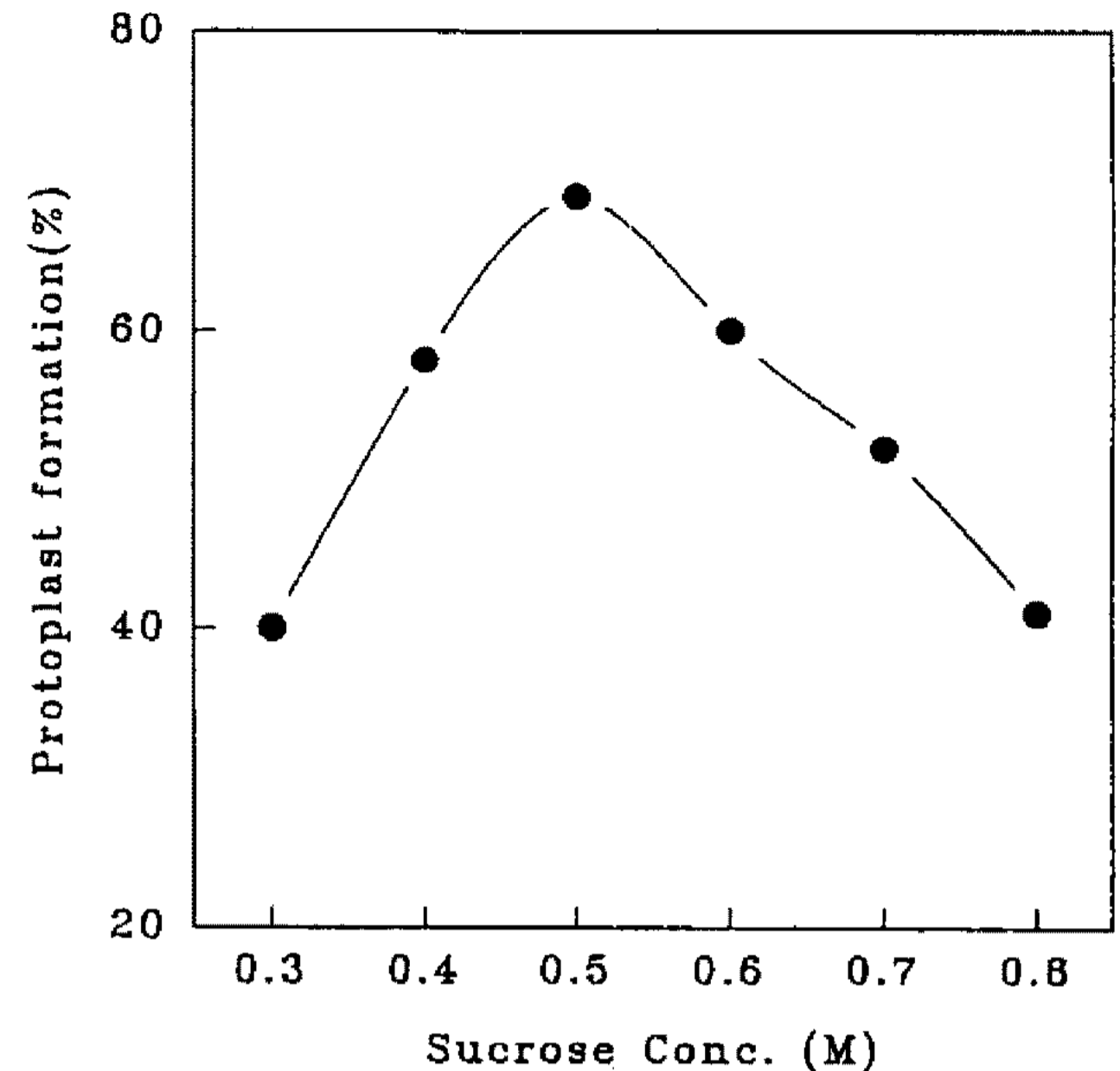


Fig. 3. Effect of sucrose concentration on the protoplast formation.

B. sphaericus 1593 cells were incubated in SMM buffer containing lysozyme (500 µg/ml) with different amounts of sucrose for 6 hr at 40°C. Protoplast formation (%) = $[1 - (\text{osmotically stable cells}/\text{input bacteria})] \times 100$.

경우 3시간 2 mg/ml의 lysozyme 처리에서 최고치를 나타낸다는 보고(12)에서와 같이 균종에 따라서 lysozyme 농도와 반응시간이 다소 차이가 있으나 *Bacillus* 속의 경우 90분간 200 µg/ml의 lysozyme 처리에서 가장 좋은 형성율을 나타내었다는 보고(12)로 미루어 볼 때 본 균주의 원형질체 형성을 위해서는 lysozyme의 농도가 다소 높고 긴 처리 시간이 요구되는 결과를 나타내었다.

Sucrose 농도의 영향 Protoplast 형성시 삼투압 안정제로 자주 사용되는 sucrose(17)의 농도가 원형질체 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 sucrose 농도를 0.3 M에서 0.7 M까지 조절하여 원형질체 형성율을 조사한 결과 Fig. 3에서 나타난 것과 같이 0.5 M의 sucrose 농도에서 최대의 원형질체 형성율을 나타내었다. 이 결과는 *Bacillus megaterium*의 0.2 M(18)과 *Staphylococci*의 0.7 M에서 가장 효과가 높았다는 결과(15)와는 다소 상이하나, *B. subtilis*(7, 16), *Bacillus* sp. YBL-7(11)와 *Streptococcus lactis*의 경우 0.5 M의 sucrose 농도에서 최고의 원형질체 형성율을 갖는다는 보고(19)와 일치하였다.

원형질체 재생조건

Agar 농도의 영향 원형질체로 된 *B. sphaericus* 1593의 세포가 lysozyme에 의해 분해된 세포벽을 재

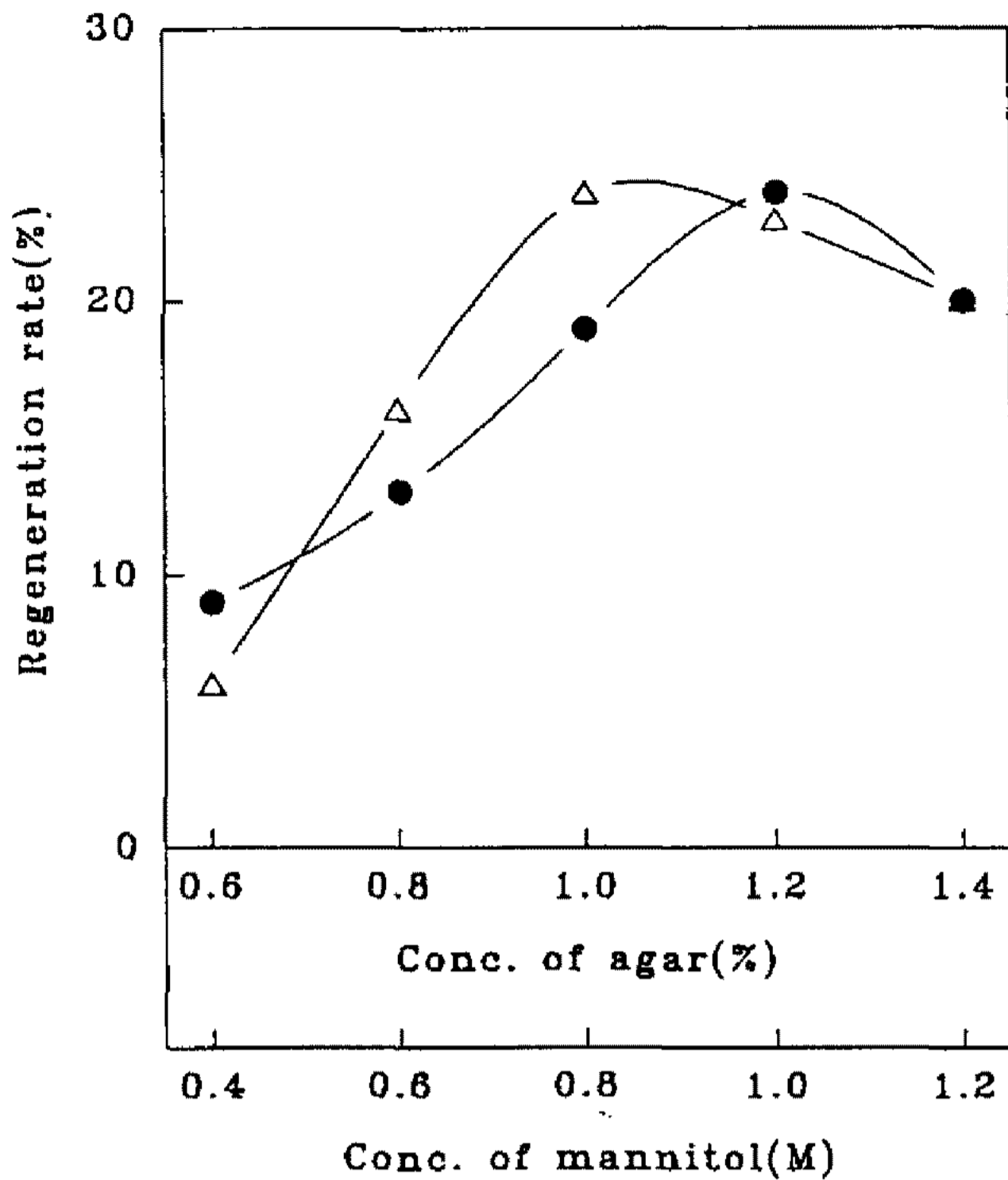


Fig. 4. Effect of agar and mannitol concentrations on the cell wall regeneration.

B. sphaericus 1593 was incubated in SMM buffer containing lysozyme (500 µg/ml) for 60 min at 40°C. The protoplast suspension was grown on mannitol regeneration agar with different amounts of mannitol (△) or agar (●) for 48 hr at 40°C. Regeneration efficiency = regenerants/(input bacteria-osmotically stable cells) × 100.

생하는 과정에서 세포벽 재생배지인 mannitol regeneration agar 배지상에서 고형제로 첨가되는 agar의 농도가 원형질체의 안정성에 큰 영향을 미친다고 생각되므로, 재생용 배지에 첨가한 agar 농도가 원형질체의 세포벽 재생율에 어떠한 영향을 미치는가를 조사해 보았다. 재생배지에 agar 농도를 0.6%에서 1.4%까지 농도별로 첨가한 후 재생율을 조사해 본 바 Fig. 4에서 나타난 바와같이 1.2%의 agar 농도에서 그 재생율이 가장 높게 나타났다. 이와같은 결과는 *Staphylococci*의 경우 0.4%의 첨가(16)와 *Bacillus* sp. K-17의 경우 0.8%의 첨가했을 경우 최고의 재생율을 나타낸다는 보고(9)와 크게 상이한 결과이나 Akamatsu 등(20)에 의한 *Bacillus subtilis*의 경우와 *Bacillus* sp. YBL-7의 경우 1.2%에서 재생율이 가장 높게 나타난다는 보고(11)와는 일치함을 감안해 볼 때 *B. sphaericus* 1593의 경우는 *B. subtilis*와 같이 고장력의 배지조건하에서 원형질체 재생율이 가장 높은 것으로 생각되어진다.

Mannitol 농도에 의한 영향 Mannitol은 원형질

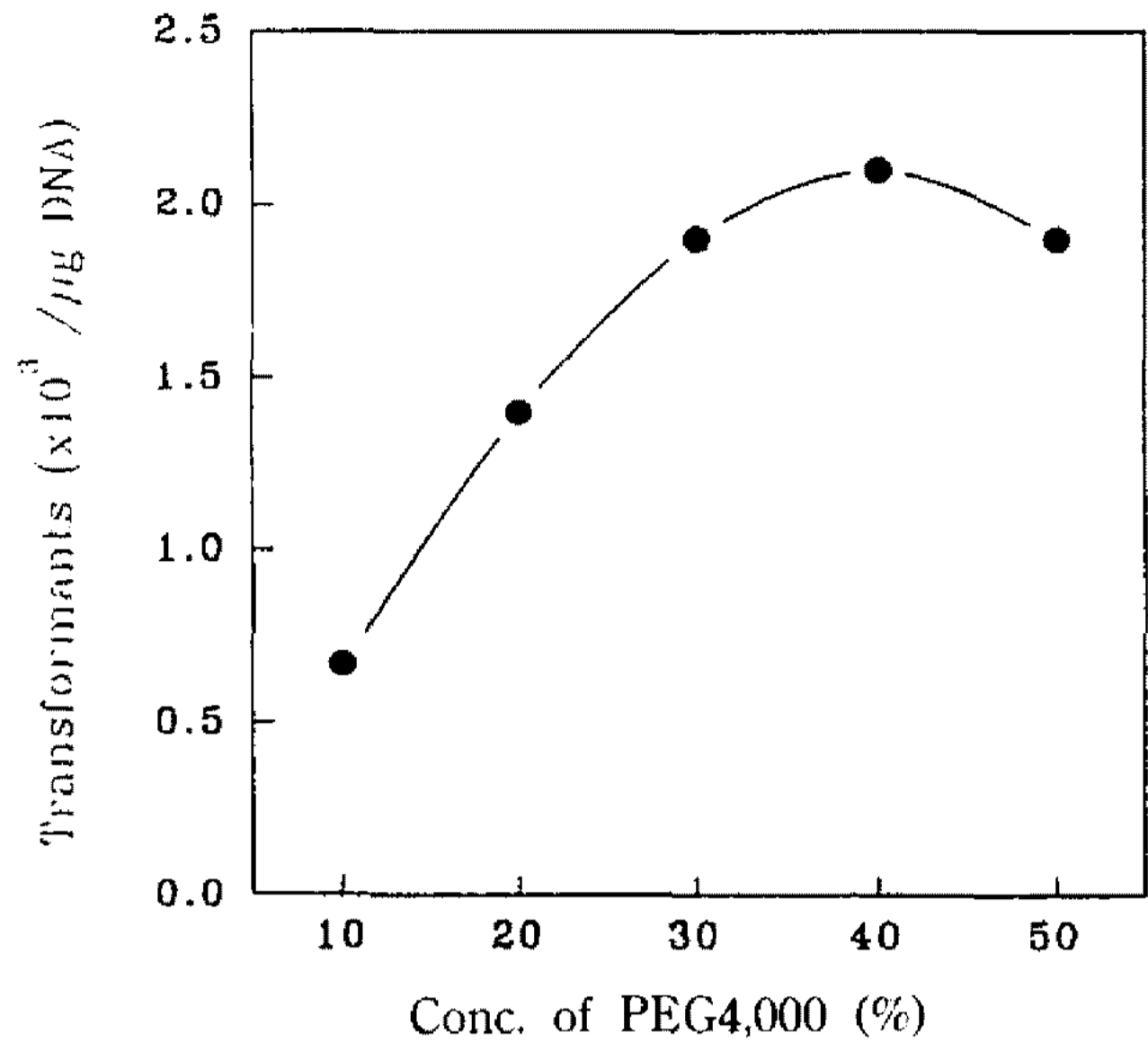


Fig. 5. Effect of PEG4,000 concentrations on the transformation of *B. sphaericus* 1593 by the plasmid pGB 215-110ΔB.

Protoplast suspension (0.5 ml) was mixed with pGB 215-110ΔB plasmid stock solution (1 µg/ml) followed by the addition of 1.5 ml of various PEG4000 concentration in SMM buffer. After incubation for 10 min at 4°C, the protoplast was centrifuged off, suspended in 1 ml of SMMP, and incubated for 120 min at 30°C. Transformation efficiency = (transformants/protoplasts) × 100.

체 재생시에 삼투압조절물질로 매우 중요하다고 알려져 있다. 따라서 재생배지에 첨가되는 mannitol의 농도가 원형질체의 재생에 어떠한 영향을 미치는가를 확인하여 본 결과 Fig. 4에서 나타난 것과 같이 0.8 M이 되게 첨가했을 경우 재생율이 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 김 등(21)에 의한 mannitol 농도 조사결과와 일치하는 것으로 확인되었는데, 일반적으로 세균세포의 삼투압과 등장조건을 위해서는 mannitol 0.8 M이 가장 적합하다는 그 동안의 결과들과 일치함을 알 수 있다.

형질전환의 최적조건

PEG 농도의 영향 Polyethylene glycol(PEG)에 의해 형질전환을 유도하는데 중요한 역할을 하며 그 확실한 기작은 아직 밝혀져 있지 않았으나, PEG가 DNA의 세포벽 투과를 유도하거나 DNA 분자의 형태학적 변화를 유도한다는 보고(18, 22)가 있으므로 *B. sphaericus* 1593의 형질전환시 PEG 농도에 의한 형질전환율의 영향을 조사한 결과 Fig. 5에서 나타난 결과와 같이 PEG(MW4,000)을 40% 되게 첨가했을 경우 가장 그 형질전환율이 높게 나타났다. 이 결과는 *Streptomyces*의 경우 PEG 농도가 20%(W/V)에서 가장

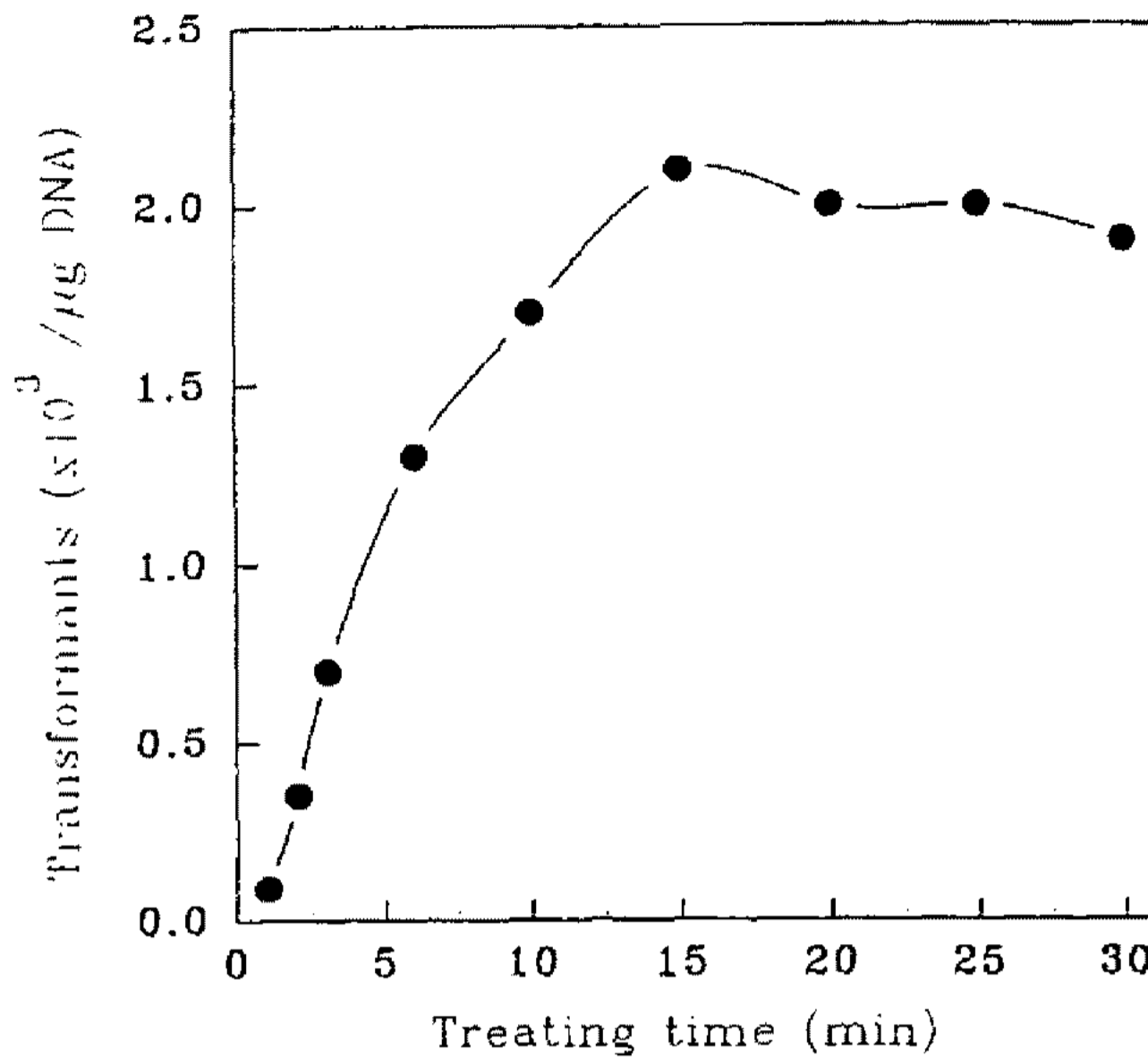


Fig. 6. Effect of PEG4,000 (40%) treating time on the transformation of *B. sphaericus* 1593 by the plasmid pGB215-110 Δ B.

Protoplast suspension (0.5 ml) was mixed with the plasmid pGB215-110 Δ B (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and followed by the addition of 1.5 ml of 40% (W/V) PEG4,000 concentration in SMM buffer for various times. Transformation efficiency = (transformants/protoplasts) \times 100.

높게 나타났다는 Ward 등의 보고(22)와 *B. lactofermentum*, *Streptococcus lactis*의 경우 25%에서 가장 높게 나타났다는 보고(12, 18)와 상이 하였으나, 대부분의 *Bacillus* 속의 경우는 일반적으로 PEG 4,000을 40% (W/V) 첨가하는 것이 가장 형질전환율이 높다는 보고(9, 11, 14)들과 일치하였다. 이것으로 미루어 보아 *B. sphaericus* 1593의 경우도 다른 *Bacillus* 속과 같이 40%의 PEG 농도에서 가장 전환율이 높다고 믿어진다.

DNA 접촉시간의 영향 *B. sphaericus* 1593의 원형질체에 plasmid DNA인 pEG215-110 Δ B를 첨가시켜 PEG4,000으로 처리 도입을 촉진시키는데 걸리는 시간을 조사해 본 결과 Fig. 6에서 나타난 것과 같이 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 놓아 두었을 경우 가장 높은 형질전환율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 *Streptococcus lactis*의 경우 20분 간의 접촉(19)과 *Bacillus megaterium*의 경우 2~3분 접촉으로 가장 높은 형질전환율을 나타낸다는 보고(22)와는 상이하나 *Bacillus sphaericus* 1593의 경우는 15분 정도 접촉시키는 것이 가장 좋다고 사료된다. 또한 온도에 있어서는 상온에서와 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 차이가 없는 것으로 확인되었다.

발현시간 DNA plasmid를 도입시킨 후 항생제 내성인자의 발현에 필요한 시간을 알기 위하여 PEG 유도로 DNA를 도입시킨 후 SMMP로 세척하고 배

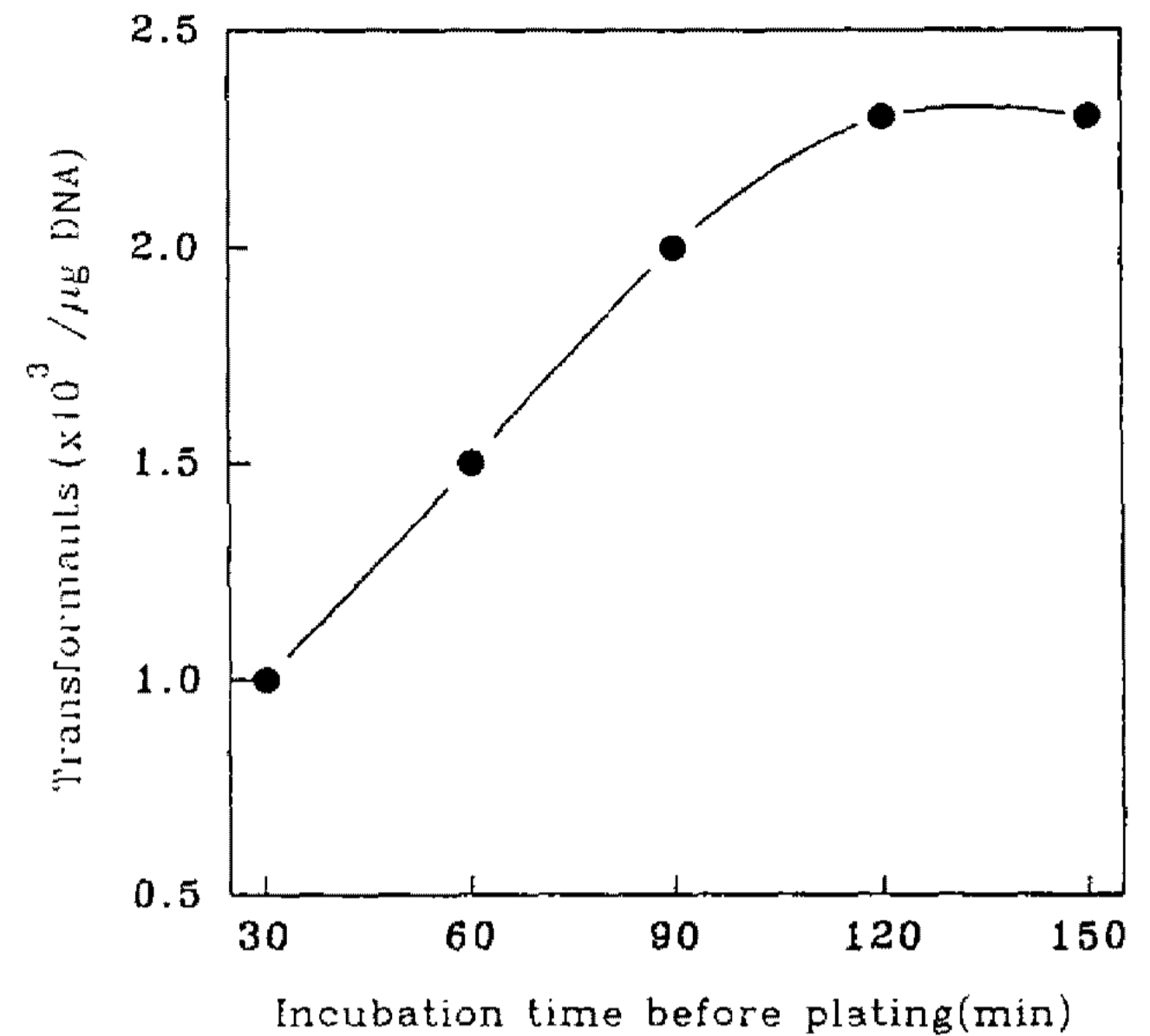


Fig. 7. Effect of expression time on the antibiotic resistance phenotype in pGB215-110 Δ B.

The protoplasts of *B. sphaericus* 1593 were achieved under the conditions of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of pGB215-110 Δ B plasmid. Transformed cells were allowed to incubate for various times in liquid medium of SMMP at 30 $^{\circ}\text{C}$, and plated on mannitol regeneration agar containing ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Transformation efficiency = (transformants/protoplasts) \times 100.

양시간별로 그 형질전환율을 조사한 결과 Fig. 7에서 나타난 것과 같이 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 120분 배양시킨 경우 가장 높게 나타났다. 이 결과는 방선균 *streptomyces lactis*의 30분 배양으로 그 효과가 가장 높다는 Kondo 등의 보고(19)와 큰 차이가 있으며, 대부분 *Bacillus*의 경우 90분 이후가 가장 효과가 높았다는 보고와 유사하게 나타났다. 따라서 DNA 도입 후 항생제 첨가 배지에 배양시킬 때까지는 비교적 긴 배양시간이 요구됨을 알 수 있었다.

DNA 첨가농도의 영향 DNA 농도가 형질전환율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DNA 농도를 각각 1 ng/ml에서 10,000 ng/ml 되게 첨가하여 형질전환시켜 본 결과 Fig. 8에서 나타난 것과 같이 1,000 ng/ml 이상의 농도에서 최고의 형질전환율을 나타내었다. 이와같은 결과는 *Streptococcus lactis*의 경우 50 ng/ml에서 가장 높은 형질전환율을 나타낸다는 보고(19)와 상이하며 *Bacillus megaterium*의 경우 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 가장 높은 형질전환율이 나왔다는 보고(23)와 *Bacillus subtilis*의 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DNA 농도에서 형질전환율이 더 이상 증가되지 않는다는 결과와도 상이하게 나타났다(7).

Plasmid의 안정성 및 확인 *Bacillus sphaericus* 1593이 plasmid pGB215-110 Δ B에 의해 형질전환된

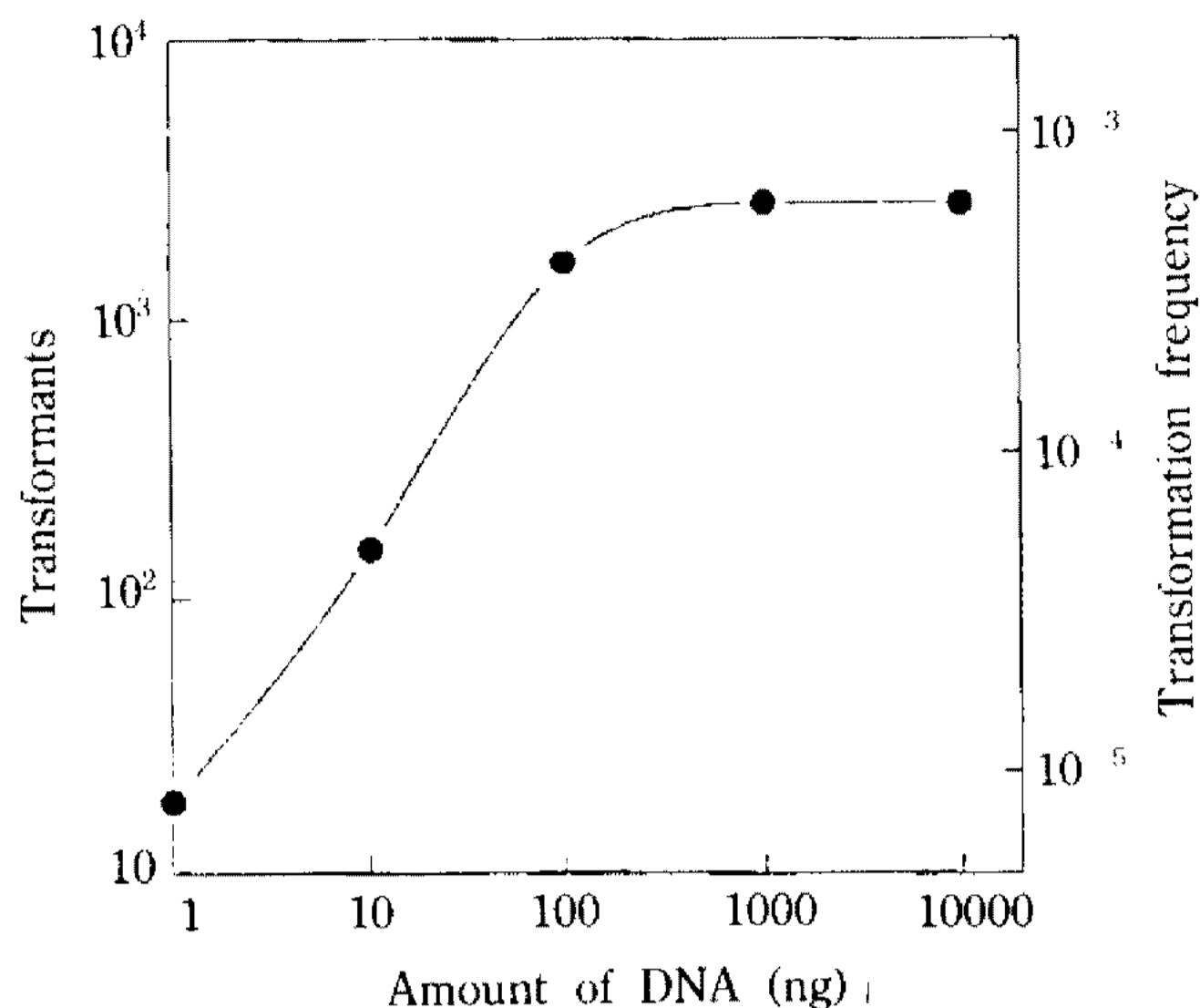


Fig. 8. Effect of the pGB215-110ΔB DNA concentrations on the transformation efficiency of *B. sphaericus* 1593.

The protoplasts of *B. sphaericus* 1593 were treated by varying concentrations of pGB215-110ΔB plasmid. The concentrations of pGB215-110ΔB were determined by serial dilution and spectrophotometric method. Transformation efficiency = (transformants/protoplasts) × 100.

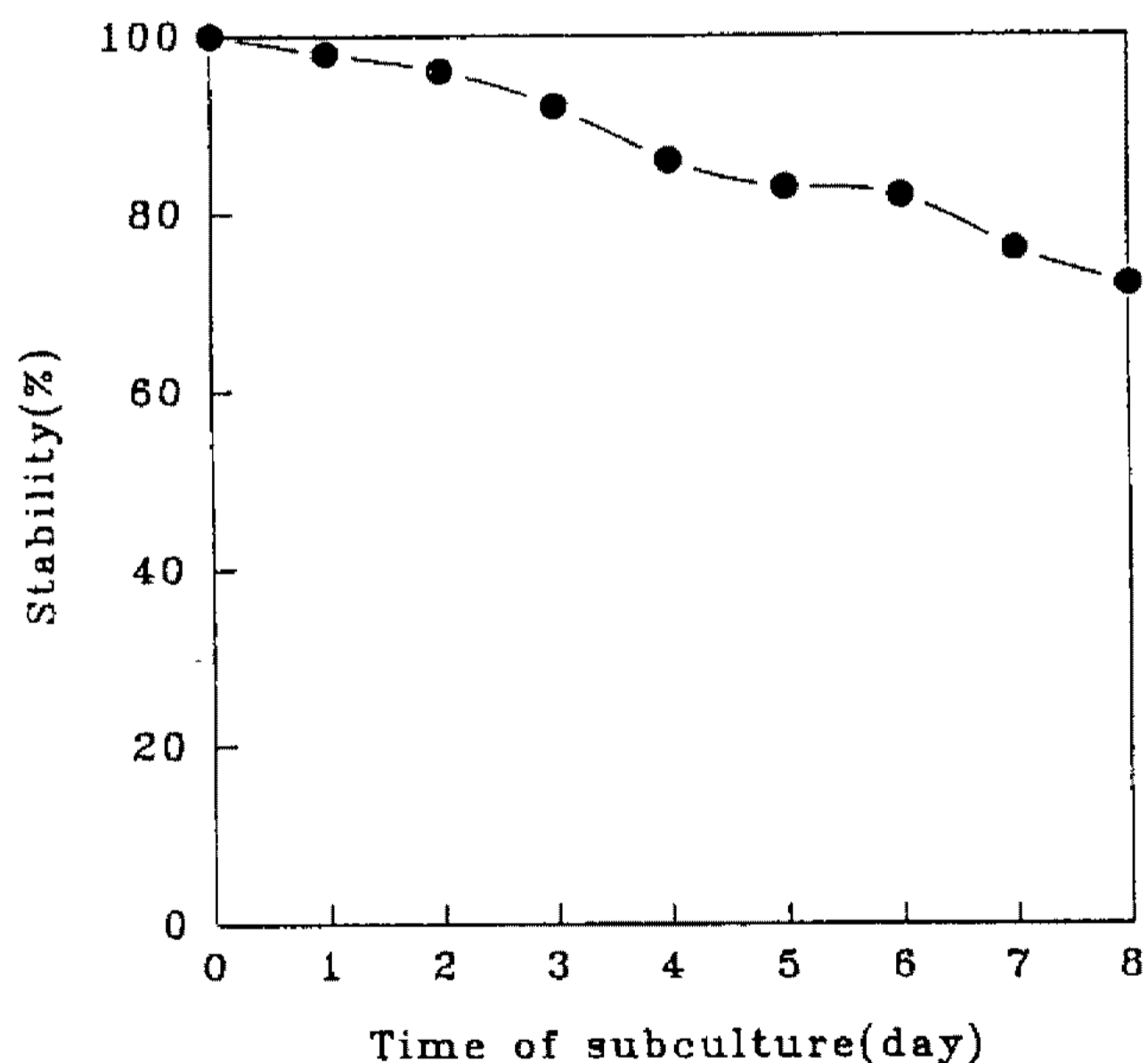


Fig. 9. Plasmid stability in the transformants.

B. sphaericus 1593 carrying pGB215-110ΔB was subcultured daily on LB broth without kanamycin (50 μg/ml), and the transformants counted on LBA with and without kanamycin (50 μg/ml). The numbers of bacteria were determined every day for eight day.

후 그 형질전환체 내에서 plasmid가 어느 정도 안정하게 유지되는가를 조사하기 위하여 kanamycin이 함유되어 있지 않은 LB agar 평판배지상에서 계속

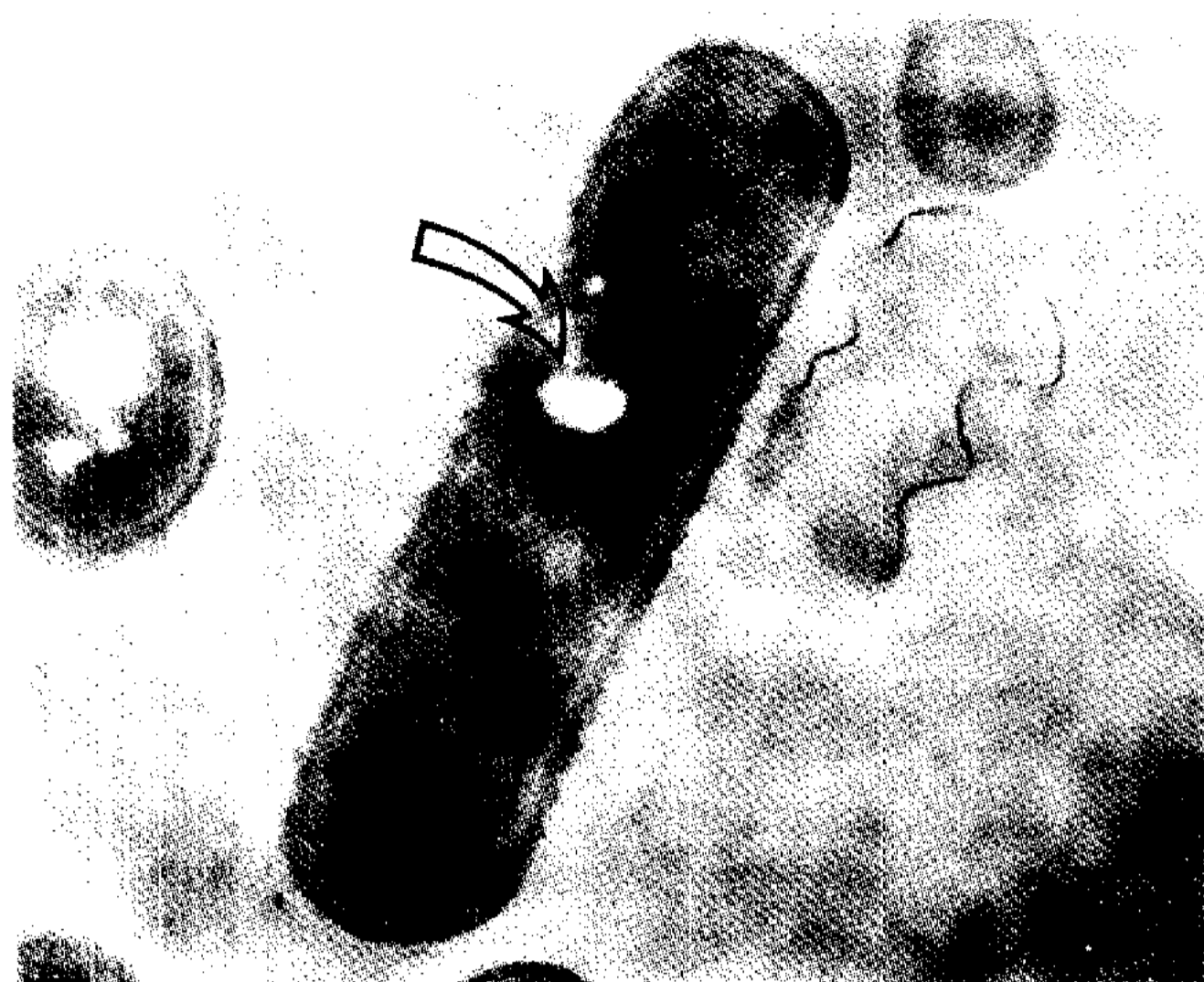


Fig. 10. Electron microscopy of a thin section showing the inclusion of larvicidal crystal protein (arrow) in the *B. sphaericus* 1593 transformants (pGB215-110ΔB).

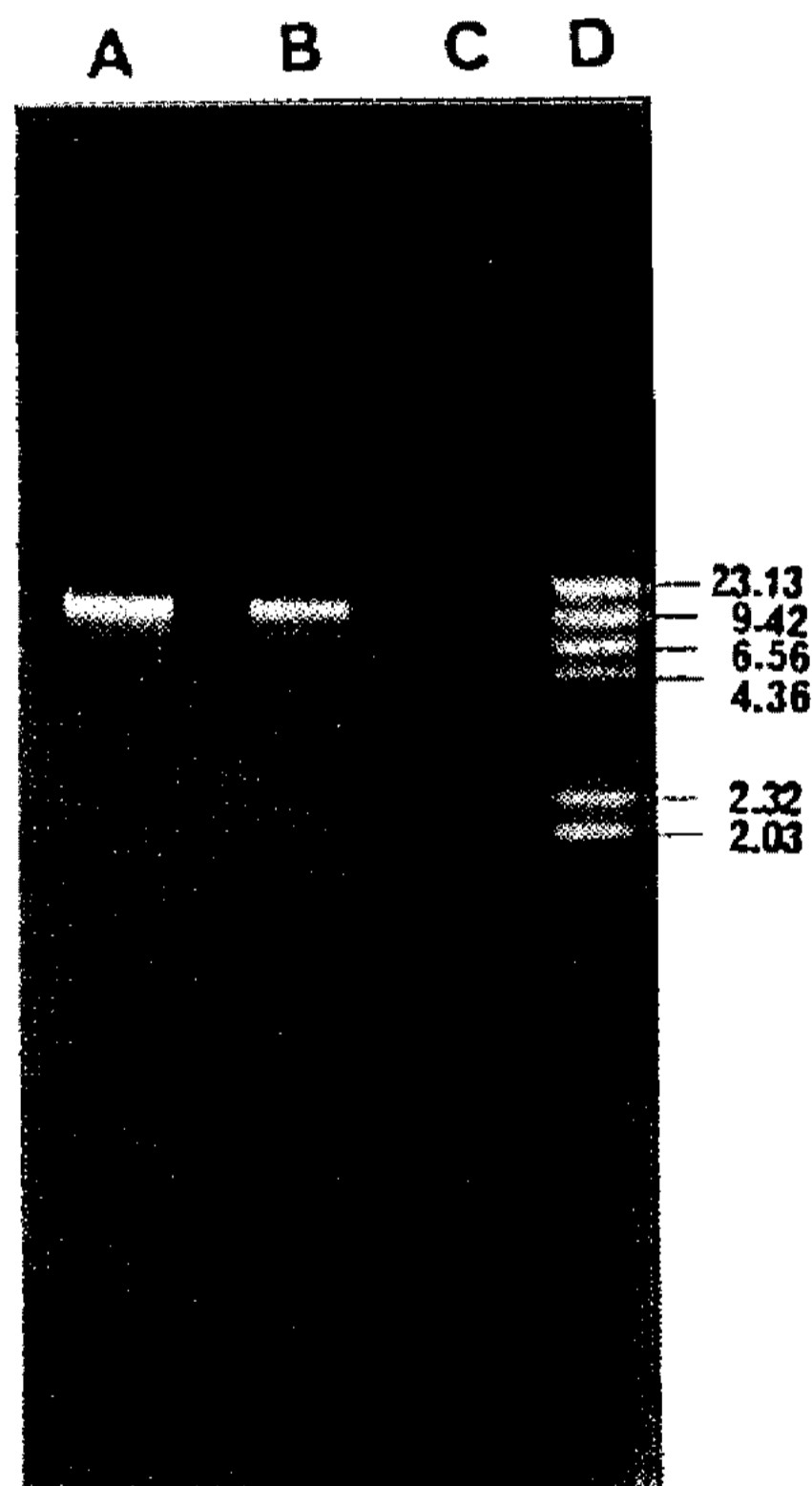


Fig. 11. Analysis of pGB215-110ΔB isolated from the transformants of *B. sphaericus* 1593.

Lane A: purified pGB215-110ΔB, Lane B: pGB215-110ΔB plasmid in the transformants, Lane C: cured *B. sphaericus* 1593, Lane D: λDNA digested *Hind*III

해서 계대배양시킨 후 항생물질에 대한 내성형질 상실빈도를 replica 법으로 조사하였으며 이 상실빈도를 백분율로 나타내 본 결과 Fig. 9와 같다. 여기서 나타난 결과와 같이 8일 동안 매일 계대배양하여도 70% 이상의 높은 내성형질을 유지하였다. 이와같은 결과는

B. subtilis 내에서 pTB90의 안정성이 약 33% 밖에 미치지 못한다는 보고(24)에 비해 모기유충방제균 *B. sphaericus* 1593 내에서 plasmid pGB215-110ΔB은 아주 안정하게 유지되는 것으로 사료된다. 또한 외부 유전자가 도입된 형질전환체인 *B. sphaericus* 1593의 모기유충 억제물질인 결정성 단백질의 생성을 Fig. 10에서 나타난 것과 같이 전자현미경상에서 확인하였다.

한편 형질전환된 형질전환체 내에서의 pGB215-110ΔB의 존재를 확인하기 위하여 모기유충 방제균 *B. sphaericus* 1593으로부터 plasmid pGB215-110ΔB을 분리, 확인해 본 결과 Fig. 11과 같이 pGB215-110ΔB의 고유 plasmid DNA를 확인할 수 있었다.

요 약

Culex, *Anopheles* 등 유해 모기의 유충을 강력히 살충할 수 있는 *Bacillus sphaericus* 1593을 보다 더 강력하고 더 넓게 살충하는 모기방제균주로 육종하기 위하여 *B. sphaericus* 1593의 형질전환 조건을 확립하고자 하였다. 이를 위해 이 균주에 내재된 cryptic plasmid를 ethidium bromide로 제거하였으며 plasmid curing 된 *B. sphaericus* 1593에 형질전환율이 높은 타 plasmid를 도입하기 위해 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector 인 pGB215-110ΔB을 이용하여 효율적인 형질전환 조건을 확립하였다. 모기유충 방제균 *B. sphaericus* 1593의 원형질체 형성의 최적조건은 6시간 배양된 균체를 사용함으로써, 최종농도가 500 μg/ml 인 lysozyme을 40°C 에서 60분간 처리 함으로써 원형질체 형성율이 가장 높았다. 삼투압 안정 완충제인 SMM 완충액 내의 sucrose 농도는 0.5 M에서 가장 효율적이었으며 mannitol 재생배지에서 원형질체의 세포벽을 재생시켰을 경우는 첨가된 agar의 농도가 1.2%에서, mannitol 농도는 0.8 M 농도에서 가장 재생율이 높았다. 또한 형질전환율에 있어서는 poly- ethylene glycol(4,000) 농도가 40%(W/V) 일 때 가장 높았으며, plasmid DNA와의 접촉시간과 발현 배양시간은 각각 15분, 120분에서 가장 효과가 좋았다. Plasmid DNA 농도는 1.0 μg/ml 첨가에서 가장 높았으며 형질전환된 균주 *B. sphaericus* 1593 내의 pGB215-110ΔB는 70% 이상 안정하게 유지되었으며, agarose gel 상에서도 plasmid pGB215-110ΔB를 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Singer, S. 1980. *Bacillus sphaericus* for the control of Mosquitoes. *Biotech. Bioeng.* **11**: 1335-1355.
2. Lois K. Miller, A.J. Lingg, Lee A. and Bulla, Jr. 1983. Bacterial, Viral, and Fungal Insecticides. *Science* **219**: 715-721.
3. Myers, P.S. and A.A. Yousten. 1980. Localization of a Mosquito-Larval Toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 1205-1212.
4. Elizabeth, W.D., M. Urbina, J. Payne, Mir, S. Mula, H. Darwazeh, H.J. Dulmage, and J.A. Correa. 1984. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 Spores Used as Larvicides in the Aquatic Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 125-129.
5. Baumann, P., Baumann, L., Bowditch, R.D. and A.H. Broadwell. 1978. Cloning of the Gene for the Larvicidal Toxin of *Bacillus sphaericus* 2362: Evidence for a family of Related sequences. *J. Bacteriol.* **169**: 4061-4067.
6. Berry, C., J.Y. Jeannette, C.O. and J. Hindley. 1989. Nucleotide sequence of two toxin genes from *Bacillus sphaericus* IAB59: sequence comparisons between five highly toxinogenic strain. *Nucleic Acids Research.* **17**: 7561.
7. Chang, S. and S.N. Cohen. 1979. High Frequency Transformation of *Bacillus subtilis* Protoplasts by Plasmid DNA. *Molec. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
8. Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* **100**: 243-255.
9. 성낙제, 정운상, 고태룡, 정정희. 1987. 호알칼리성 *Bacillus* 속 K-17의 형질전환조건. *산업미생물학회지* **17**: 213-218.
10. Santamaria, R.L., J.A. Gil and J.F. Martin. 1985. High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplast by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **162**: 463-476.
11. Han, K.H., B.G. Jung and J.F. Martin. 1992. Genetic Transformation of Biocontrol Agent *Bacillus* sp. YBL-7 by Plasmid pE194. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 384-389.
12. Chang, S. and S.N. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
13. Frehel, C., A.M. Lheritier, R.C. Sanchez and P. Schaeffer. 1979. Electron microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriol.* **137**: 1354-1361.
14. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi. 1982. Transformation of *Bacillus* protoplasts by plasmid pTP4 DNA. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1617-1621.
15. Song, E.K. and Y.H. Park. 1987. A study on optimal conditions for protoplast formation and regeneration of *Streptomyces cattleya*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 61-67.
16. Lindberg, M., S. Ahrne and F. Gotz. 1982. Plas-

- mid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* **145**: 74-81.
17. Gabor, M.H. and R.D. Hochkiss. 1979. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplast. *J. Bacteriol.* **37**: 1346-1353.
18. Foder, K. and L. Alfoldi. 1976. Fusion of protoplast of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**: 2147-2150.
19. Kondo, J.K. and L.L. McKay. 1984. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: Optimization and use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 252-259.
20. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi. 1981. Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2887-2894.
21. Kim, S.D. and J. Spizizen. 1985. Transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by recombinant plasmid DNA. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 345-348.
22. Ward, J.M., M.J. Bibb and D.A. Hopwood. 1978. Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature.* **274**: 398-400.
23. Shapira, R., A. Ordentlich, H. Chet and A.B. Openheim. 1987. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. *Phytopathol.* **79**: 1246-1249.
24. Uorobjeva, I.P., I.A. Khmel and I. Alfoldi. 1980. Transformation of *Bacillus megaterium* protoplasts by plasmid DNA. *FEMS Lett.* **7**: 261-263.

(Received 2 November 1994)