

Bacillus thuringiensis serovar. *darmstadiensis*의 곤충치사독소 유전자분리 및 구조해석

김도영 · 구본성* · 도대홍**

충청전문대 식품영양과, *농업과학기술원, **충청전문대 식품공업과

Isolation and Analysis of *Bacillus thuringiensis* serovar. *darmstadiensis* Insecticidal Protein Gene

Do-Young Kim, Bon-Sung Gu* and Dae-Hong Do**

Dept. of Food Nutrition, Chungcheong College, Cheongweon 363-890, Korea

* National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suweon 440-707, Korea

** Dept. of Food Sci. and Tech., Chungcheong College, Cheongweon 363-890, Korea

Abstract

Bacillus thuringiensis serovar. *darmstadiensis* produced bipyramidal endo toxin. The toxin protein was purified by Renografin-76 step gradient centrifugation and investigated by electron microscope. Analysis of total plasmid DNA patterns showed that four different size of plasmids existed in wild type *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*. Total plasmids DNA was isolated and transformed into *pst* I site of pBR322 cloning vector. Ten clones containing crystal toxin gene were first screened colony hybridization by using PUYBT 9044 probe obtained *B. thuringiensis kurskaki* HD 1 toxin gene. Cloned-DNA was digested with EcoR1 and Hind III and transformed to pIBI30 sequencing vector. Finally, 2.6kb and 3.6kb size fragments contained toxin-gene were cloned with restriction analysis.

Key words : insecticidal toxin, crystallization, toxin-gene clone,

서 론

*Bacillus thuringiensis*는 그람 양성균으로 아포를 형성하며 외독소와 내독소를 생산하는 고초균의 일종이다.^{1,2,3)} *B. thuringiensis*가 생산하는 내독소는 여러가지 인시목과 쌍시목 곤충의 유충에 강력한 살충력을 나타내고 있으나, 곤충 이외의 동물이나 식물에는 전혀 해가 없어, 선진국에서는 이미 무공해 살충제로 개발하여 사용하고 있는 유용한 미생물이다.^{3,4,5,6)} *B. thuringiensis*는 H-flagella의 항혈청반응에 따라 24여종의 아종으로 분류되고⁷⁾ 내독소, 생성유전자가 플라스미드에 존재한다는 보고가 있다.^{8,9,10,11,12)}

일본에서는 greater wax moth의 사체에서 모기유충과 파리유충 등에 살충력이 있는 serotype-10이라는 내독소를 분리하여 보고^{13,14,15,16)} 하였을 뿐이다. 본 연구는 아직까지 내독소 유전자가 클로닝되어 있지 않은 것으로 알려진 *B. thuringiensis* serovar. *darmstadien-*

*sis*균 독주의 내독소 유전자를 *B. thuringiensis kurskaki* HD1의 내독소 유전자와의 상동성을 이용하여 클로닝하여 얻은 결과이다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

균주는 *Bacillus thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*를, 형질전환은 *E. coli* DH 5 α 를 사용하였다. 벡터는 pBR 322 및 pIBI 30를 사용하였다. *Bacillus*는 BHI (Brain Heart Infusion)배지에, *E. coli*는 LB배지에 배양하였다.

2. 내독소 분리

B. thuringiensis serovar. *darmstadiensis*의 내독소는 밀도 기울기 원심분리법으로 분리하였다.^{17,18)} 500ml의 GYS배지를 30°C에서 48시간동안 진탕배양한 후

10,000×g로 30분간 원심분리한 뒤 1M NaCl로 현탁하여 세척하고 다시 멸균수로 세척하였다. 세척한 침전물을 6ml의 멸균수에 현탁한 후 50~80%의 Renografin 76으로 단계적 기울기를 만든 후 25,000×g, 3시간동안 원심분리(Beckman SW 28)하여 생긴 밴드를 주사기로 뽑아 멸균수로 세척 후 현미경으로 관찰하였다.^{19,20)}

3. 내독소의 현미경 검경

Renografin 76밀도기울기 원심분리로 분리한 내독소를 멸균수로 세척 후 amido black-10B로 염색하여 광학현미경으로 검경하였다. 전자현미경 관찰용은 GYS배지 10ml에 균을 접종하여 30℃에서 3일간 진탕 배양한 배양액을 12,000×g에서 원심분리하여 균체를 수거하였다. 수거한 균체에 1.0M NaCl로 현탁하고 멸균수로 현탁한 현탁액 20μl를 슬라이드 유리상에서 건조하여 ion coater에서 순금으로 포말하고 주사전자현미경으로 (Hitachi S-570) 관찰하였다.

4. 플라스미드 분리

B. thuringiensis serovar. *darmsadiensis*의 플라스미드 DNA를 분리하기 위하여 BHI 배지 40ml에 접종한 균을 30℃에서 12시간 배양한 후 4,000×g로 원심분리하여 회수된 균체를 E 완충용액(40mM Tris-base, 2mM EDTA, 15% sucrose, 50mM Tris-HCl, pH 7.9)에 현탁하고 다시 원심분리하였다. 침전물을 E완충용액 0.5ml에 다시 현탁한 후 lysozyme(10vg/ml)을 첨가한 E용액 1ml를 가하여 3ml를 가하고 60℃에서 20분 반응시킨 뒤 proteinase K(100g/ml) 0.8ml를 넣고 pH 8.3~8.5로 조절한 후 37℃에서 30분 반응시킨 다음 phenol/chloroform 10ml를 처리하여 15,000×g로 10분간 원심분리한 상정액을 0.6% 아가로스 겔 전기영동하여 확인하였다. 다량의 플라스미드 DNA의 분리는 위 방법으로 분리한 DNA를 에탄올침전 후 10ml의 TE완충용액에 녹여 cesium chloride 밀도기울기 원심분리법으로 분리하여 EtBr 및 cesium chloride를 제거한 후 사용하였다.

5. 프로브 조제

B. thuringiensis serovar. *kurskaki* HD1의 toxin gene이 클로닝된 pUYBT 9044(농업유전공학연구소에서 분양 받았음)를 이용하여 프로브를 조제하였다. 정제된 DNA 12μl, dNTP 10μl, 10×buffer 5μl, 효소 혼합액 5μl와 ³²P-α dCTP 5μl를 혼합하여 총량이 50μl가 되게 멸균수를 첨가하고 15℃의 항온수조에서 2시간 동안 반응시킨 후 0.25M EDTA 5μl를 첨가하여 반응

을 정지시키고 65℃에서 15분간 열처리시켰다. 표지된 프로브 DNA회수를 위하여 Sephadex G-50 컬럼의 겔 크로마토그래피로 얻어진 프로브만을 사용하여 하이브리드화하였다.^{12,21)}

6. Colony Hybridization

Colony hybridization은 Grustein 등²²⁾의 방법에 따랐다. Tetracycline이 첨가된 평탄배지에서 자란 클론을 멸균된 팁으로 다시 master plate에 옮겨 24시간 동안 37℃에서 배양하였다. LB평판배지위에 N.C. 필터를 놓고 replica tool을 이용하여 배양된 집락을 master plate로 옮겨 0.5N NaOH로 포화시킨 3MM paper위에서 7분간 용균시켰다. 용균된 필터를 1M Tris-HCl(pH 7.4)로 포화된 3MM paper에 2분간 두었다가 다시 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl(pH7.4)에 4분간 중화시키고 클로로포름 100ml로 세척시킨 후 80℃의 진공오븐에서 2시간동안 진공건조시켜 하이브리드화시켰다.

7. 대장균내 형질전환

대장균 *E. coli* DH 5α를 대수증식기가 될 때까지 배양한 다음 원심분리하여 세포를 모으고 0.1M CaCl₂로 현탁시켜 4℃에서 30분 방치시킨 후 Maniatis의 방법²³⁾으로 형질전환시켰다.

8. 유전자 구조해석

형질전환체의 플라스미드 DNA를 추출한 후 여러가지 제한효소로 절단하여 toxin 유전자의 제한 효소지도를 작성하고 그 구조를 탐색하였다.

결과 및 고찰

1. 내독소 대량분리

F. thuringiensis serovar. *darmsadiensis* 내독소의 대량분리는¹⁷⁾ renografin-76을 50%, 60%, 70%, 80%의 네 단계로 만들어 배양한 균을 10mM NaCl에 농축하여 가하고 25,000×g로 3시간 원심분리한 결과 Fig. 1과 같이 내독소 결정체들이 55~60%사이에 형성되었고 spore는 그 아래층에 형성되었다. 형성된 내독소 결정체를 주사기로 회수하여 분리하였다. 내독소의 대량분리법으로 NaBr을 사용한 분리방법은 Nickerson 등이 보고한 바 있고,¹⁹⁾ Zonal 원심분리기를 이용한 방법도 보고되어 있다.²⁴⁾

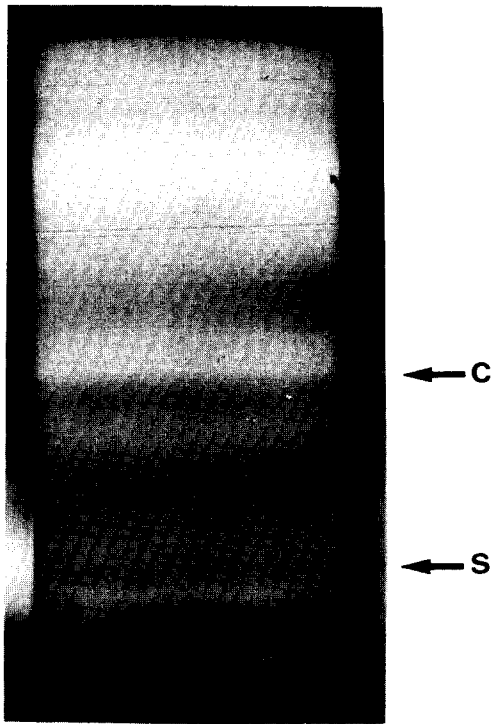


Fig. 1. Separation of endo toxin crystals and spores in *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis* by 50~80% renografin-76 density gradient centrifugation. c : crystal toxin, s : spore.

2. 내독소의 현미경 검경

광학현미경 검경은 공시균을 nutrient평판배지에 4~7일간 배양한 다음 소량의 멸균수에 침지한 멸균면 봉으로 균주를 슬라이드 글라스위에 점적하여 화염으로

고정시켜 amido black 10B로 3~5분간²⁵⁾ 염색한 다음 1000배율로 내독소를 검정한 결과 Fig. 2-A와 같이 내독소 결정체가 남청색으로 염색되었다. 염색시간에 따라 색깔에 차이가 있었으며 염색하지 않은 결정체의 검경에 비해 모양이 더욱 선명하였다. 내독소를 대량분리하여 전자현미경으로 관찰한 Fig. 2-B는 더욱 선명하였다. 전자현미경으로 검경한 결과 결정체의 표면이 약간 불규칙하였고 지금까지 보고된 대부분의 내독소 결정체 처럼 이중 피라미드형 구조로 확인되었다. 이외에도 내독소의 형태가 타원형 입방체 및 구형에 가까운 것도 관찰된 보고가 있으나²⁰⁾ 동일한 혈청형에 속한 균주라 하더라도 플라스미드 양상과 내독소 형태가 서로 다른 것으로 보고한 이도 있다.¹⁷⁾

3. 플라스미드 DNA분리

B. thuringiensis serovar. *darmstadiensis* 균주의 플라스미드 존재 유무를 확인하기 위하여 대장균 V517과 플라스미드의 크기가 밝혀진 HD2 및 HD567을 기준으로 플라스미드 DNA를 분리하여 0.6% 아가로스겔로 전기영동한 결과 Fig. 3과 같이 공시균주인 *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*는 4개의 플라스미드 밴드를 확인할 수 있었다. 1개의 플라스미드가 존재한다는 Iizuka²⁴⁾ 등의 보고와 5개의 존재를 보고한 Kronstad¹⁶⁾의 보고와는 플라스미드의 크기와 갯수가 달랐다. 인노 플라스미드 추출방법의 차이 및 균주에 따라서 자연적인 curing 등에 원인이 있는 것으로 추정된다.

4. Colony Hybridization

B. thuringiensis serovar. *darmstadiensis*의 총 플라스미드 DNA를 추출하여 제한효소 pStI으로 절단하고 pBR 322에 접합한 후 대장균에 형질전환하였다. Tet-

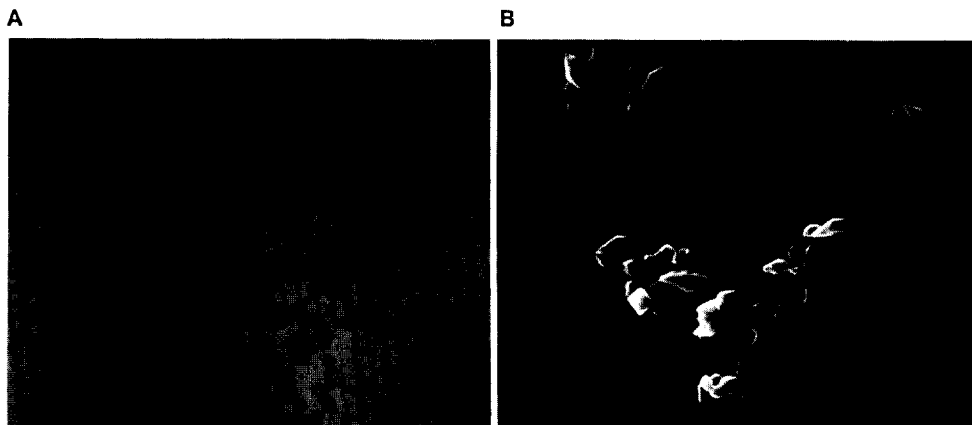


Fig. 2. Microscopic observation of the crystal toxin produced by *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*.

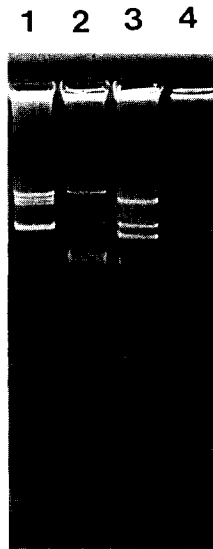


Fig. 3. Plasmid DNA patterns of *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*. 1 : *B. thuringiensis* darmstadiensis, 2 : *B. thuringiensis* islaensis HD 567, 3 : *B. thuringiensis* serovar. *thuringiensis* HD2, 4 : *E. coli* V 517.

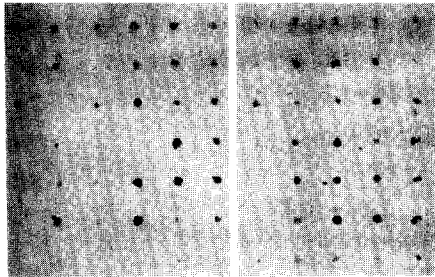


Fig. 4. Colony hybridization of transformants by using ^{32}P labelled pUYBT 9044 probe.

racycline이 첨가된 LB평판배지에 자라는 집락을 선발하여 master plate를 만들고 replica tool을 이용하여 NC(Nitro-cellulose) membrane위에서 배양하여 용균시켜 *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1의 toxin gene이 클로닝된 pUYBT 9044를 동위원소로 표시하여 colony hybridization한 결과는 Fig. 4와 같다. *B. thuringiensis* 균주 들은 내독소 단백질간에 동질성이 있고 *B. thuringiensis* IPL균주와 *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1의 내독소 단백질간에도 동질성이

있다는 보고¹⁶⁾를 근거로 *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1의 내독소 생성유전자가 3.6kb정도 클로닝되어 있는 pUYBT 9044를 프로브로 이용하여 *B. thuringiensis* *kurstaki*의 toxin유전자와 상동성이 있는 10여개의 집락을 선발하였으나 서로 비슷한 크기의 DNA를 갖고 있었다. 이같은 clone(pBS 19라고 명명)들을 선발하여 plasmid DNA를 분리하고 *pst*I 제한효소로 절단하여 확인한 결과 약 7.5Kb의 DNA단편이 클로닝된 것을 확인하였다.

5. Southern Hybridization 확인

Colony hybridization으로 선발한 클론을 *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Cla*I, *Sph*I 등의 제한효소로 절단하고 전기영동하여 NC filter에 블롯팅하고 pUYBT 9044를 프로브로 사용하여 서던 하이브리드화한 결과는 Fig. 5와 같다. 제한효소마다 1개의 밴드만이 toxin 유전자를 함유한 것으로 나타났으나, 본 실험에서는 크기가 비교적 작은 *Eco*RI 및 *Hind*III로 절단하였을 때 나타나는 약 2.7Kb DNA 단편 및 3.5Kb DNA 단편만을 sequencig vector인 pBI 30에 클로닝하였다. 대장균 *E. coli* DH 5 α 에 클로닝된 클론들을 X-gal, IPTG로 선발하여 2.7Kb단편 및 3.5Kb DNA단편이 클로닝된 것을 확인하기 위해 이들 형질전환체들의 플라스미드 DNA를 추출하여 제한효소 *Eco*RI 및 *Hind*III로 절단한 클론 19 DNA를 동일한 제한효소로 절단한 것과 같

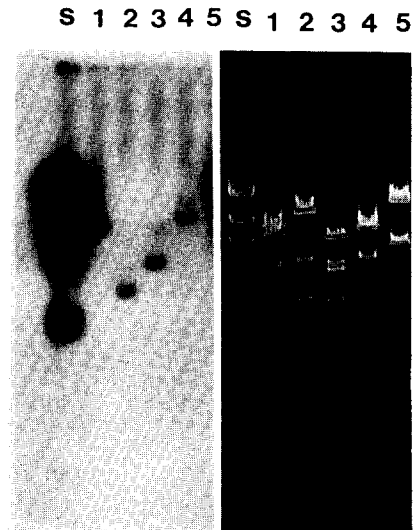


Fig. 5. Southern hybridization of pBS19-DNA by ^{32}P labeled pUYBT 9044. 1 : *Cla*I, 2 : *Eco*RI, 3 : *Hind*III, 4 : *Pst*I, 5 : *Sph*I.

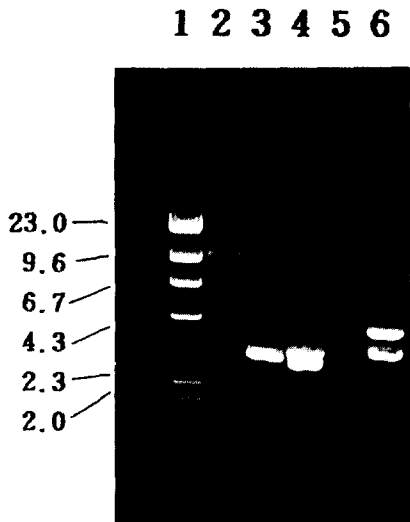


Fig. 6. Restriction fragment patterns of pBS 20 and pBS 21 clone cut with *EcoR* I and *Hind* III. 1 : standard DNA marker, 2 : pBs 19cut with *EcoR*I, 3 : pBI 30 cut with *EcoR* I, 4 : pBS 20 cut with *EcoR* I, 5 : pBS 19cut with *Hind* III, 6 : pBS 21 cut with *Hind* III.

아가로오스 겔 전기영동으로 확인한 결과 클론 19 DNA의 *EcoR*I 제한효소 단편인 약 2.7Kb(pBS 20이라 명명) 및 약 3.5Kb *Hind* III 단편(pBS 21이라 명명) 이 모두 클로닝된 것을 확인할 수 있었다.(Fig. 6)

6. 제한효소 지도작성

*EcoR*I과 *Hind* III로 절단하여 클로닝한 클론 20 및

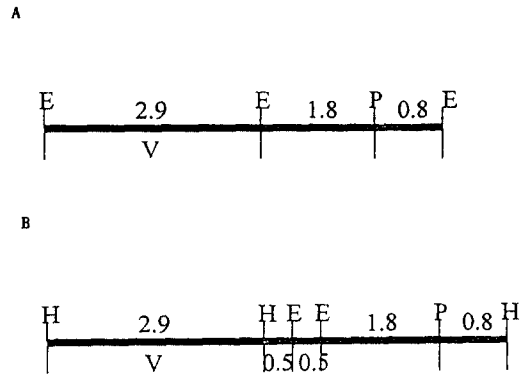


Fig. 8. Physical maps of pBS 20 and pBS 21 clone. A : pBS 20clone, B : pBS 21 clone, E : *EcoR* I, P : *Pst* I, H : *Hind* III, V : vector(pBI 30).

클론21의 플라스미드 DNA를 각각 여러가지 제한효소로 단일 및 이중으로 절단하여 서틴 하이브리드화시킨 결과 Fig. 7과 같이 pBS 20 및 pBS 21의 하이브리드 플라스미드는 모두 살충성 단백질 생성유전자를 함유하나 그 크기에서 pBS 21의 insert DNA가 조금 큰 단편이 클로닝된 것으로 나타났다.

이 결과를 토대로 physical map을 작성하여 보면 Fig. 7의 결과와 동일하게 pBS 21은 3.6Kb, pBs 20은 2.6Kb *EcoR* I insert DNA를 갖고 있어 pBS 21이 pBS 20보다 1.0kb단편이 더 삽입된 클론으로 나타났으며(Fig. 8), 이 결과로 미루어 보아 살충성 단백질 생성유전자는 pBS 20의 *EcoR*I-Pst I 단편 및 pBS 21의 *EcoR*I-Pst I 단편인 약 1.8Kb DNA단편내에 동일하게 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

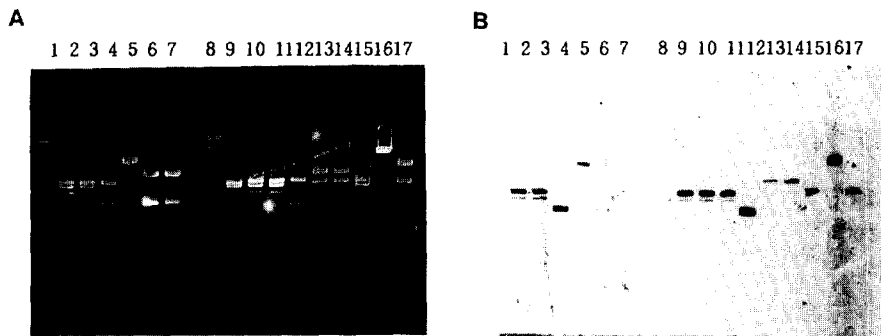


Fig. 7. Hybridization analysis of crystal toxin gene in pBS 20 and pBS 21 clone. A : Electrophoresis patterns, B : Southern gybridization, 1, 8: standard DNA, 2: pBS 20 cut with *EcoR* I & *Kpn*I, 3: pBS 20cut with *EcoR* I & *Sal*I, 4: pBS 20 cut with *EcoR* I & *Pst*I, 5: pBS 20 cut with *Kpn*I & *Sal*I, 6: pBS 20 cut with *Kpn*I & *Pst*I, 7: pBS 20 cut with *Sal*I & *Pst*I, 9: pBS 21 cut with *EcoR* I & *EcoR* I & *Hind* III, 10: pBS 21 cut with *EcoR* I & *Kpn*I, 11: pBS 21 cut with *EcoR* I & *Sal*I, 12: pBS 21 cut with *EcoR* I & *Pst*I, 13: pBS 21 cut with *Hind* III & *Kpn*I, 14: pBS 21 cut with *Hind* III & *Sal*I, 15: pBS 21 cut with *Hind* III & *Pst*I, 16: pBS 21 cut with *Kpn*I & *Sal*I, 17: pBS 21 cut with *Sal*I & *Pst*I.

요 약

지금까지 많은 연구가 되어 있지 않던 *Bacillus thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*의 내독소를 Renografin-76 단계적 기율기 원심분리로 분리하여 전자현미경으로 관찰하여 이중피라미드 구조를 가진 독소 단백질질을 확인하였으며 *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1의 독소 생성유전자와 *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*의 유전자가 유사성이 있다는 보고를 근거로 하여 *B. thuringiensis* serovar. HD1의 독소 생성유전자를 가진 프로브(pUYBT 9044)로 이용하여 colony hybridization 및 Southern hybridization한 결과 2.6Kb EcoRI 단편 및 3.6Kb Hind III 단편을 선별할 수 있었다. 이들 단편들은 *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 독소 유전자와 hybridization시 유사성이 있었다. 특히 3.5Kb Hind III 단편은 2.6Kb EcoR I 단편에 클로닝되어 있는 1.8Kb의 HD1 독소 유전자와 유사성이 있는 부분을 공유하고 있었으며 1.0Kb 정도의 EcoR I-Hind III 부분이 더 삽입한 것을 알 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 1995학년도 충청전문대학 교내연구비에 의하여 수행되었다. 이에 감사드린다.

참고문헌

1. Faust, R. M., and Bulla L. A. : Bacteria and their toxins as insecticides, in *Microbial viral pesticides*. Edited by E. Kurstak, Marcel Dekker Inc., New York, p75~208(1982).
2. Bechtel, D. B. and Bulla, L. A. : Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacterial.*, 127, 1472~1481(1976).
3. Dulmage, H. T. : Genetic manipulation of pathogens, selection of different strains, in *genetics and related to insect management*. Edited by Hoy, M. A. and Makelvey, J. J., New York, p116~127(1979).
4. Bailey, L. : The safety of pest-insect pathogens for beneficial insects, in *Microbial control of insect and mites*. Edited by Burges, H. K. and Hussey, N. W., Acad. press, p491~505(1971).
5. Hemipel, A. M : Safety of insect pathogens for man and vertebrate, in *microbial control of insect and mites*. Edited by Burges H. K. and Hussey, N. W., Acad. press, p469-489(1971).
6. Siegel, J. P., Shaddock, J. A. and Szabo J. : Safty of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. *J. Econ. Entomol.*, 80, 717-723(1987).
7. Dean, D. H. : Biochemical genetics of the bacterial insect control agent *Bacillus*. *Genet. Engen. Rev.* 2, 431~363(1984).
8. Gonzalez Jr, J. M., Brown, B. J. and Carlton, B. C. : Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmid coding delta-endotoxin among strains fo *B. thruingiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6851-6855(1982).
9. Lee, H. H., Kang, T. S., Yoo, K. H. : E. M. Visualization and electrophoresis analysis of *B. thuringiensis* var. *Kurskaki* and *B. thruingiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin. *Kor. J. Appl. Microbial*, 13, 315-319(1985).
10. Stahly, D. P., D. W., Dingman, R. L., Fiel, C. C., Feiss, M. G. and Smith, G. L. S. : Multiple extrachromosomal DNA molecule in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS, Microbial. Lett.*, 3, 139-141(1978).
11. Ward, E. S. and Ellar, D. J. : Assignment of the delta-endotoxin gene of *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. *FEBS*, 158, 45~49(1983).
12. kronstad, J. W., Schneff, H. E. and Whitely, H. R. : Diversity of location for *B. thuringiensis* crystal protein gene. *J. Bacterial.*, 154, 419~428(1983).
13. Krieg, A., de Barjac, H. and Bonnefoi, A. : A new Serotype of *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*. *J. Inverteb. pathol.*, 10, 428~430(1968).
14. Reeves, E. L. and Carcia, G. : Susceptibility of Aedes mosquito larvae to certain crystalliferous *B. Pathogens*. *Proc. Calif. Mosq. Control Assoc.* 118~120(1971).
15. lawrence, A. L. and Oldacer, S. L. : The effect of temperature larval age and speues of mosquito on the activity of an isolation of *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis* toxic for mosquito larvae. *Mosquito News*, 43, 176~180(1983).
16. Kim, K. H., Ohba, M. and Aizawai, K. : Purification of the toxic protein from *B. thruingiensis* serotype 10 isolates demonstraing a preferential laticidal activity to mosquito. *J. Inverteb. pathol.* 44, 214~219(1984).
17. Oh, S. S. and Lee, H. H : Studies on the isolation of delta endotoxin and plasmids in *B. thuringiensis*. *Kor. J. Appl. Microbial.*, 13, 51~57(1985).
18. Oh, S. S., Lee, Y. J., Kim, C. K., Koo B. S., Kim, J. B. and Lee, H. H. : Immunological analysis of endotoxin proteins produced by *B. thuringiensis* serovar. *Kurstaki* HD1 and HD73. *Kor. J. Appl. Microbial.*, 16, 168~173(1988).
19. Nickerson, K. W. and Bulla Jr, L. A. : Physiology of Sporeforming bacteria associated with insect: Mineral nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation in *B. thruingiensis*. *Appl. Microbial.*, 28 124~128(1974).
20. Yamanoto, T. and McLaughlin, R. E. : Isolation of a protein from the parasporal crystal *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* toxic to the mowquito larvae, aedeataeniorhynchbus. *Biochem. Biophy. Res. Commum.*, 103, 414~421(1981).

21. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : *Molecular cloning, Cold spring Harbor Lab., New York (1982)*.
22. Grunstein, M. and Hogness, D. S. : *Colony hybridization : A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 3961~3965(1975)*.
23. Iizulaca, T. and Yamamoto, T. : Possible location of the entomocidal protein in the crystal preparation of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *FEMS3. Microbiol. Lett.*, **19**, 187~192(1983).
24. Ang, B. J. and Nikerson, K. W. : Purification of the protein crystal from *B. thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 625~626(1978).
25. Smirnof, W. A. : A Staining method for differentiating spores crystals and cells of *B. thuringiensis*. *J. Insect pathol.*, **4**, 384~386.(1962).

(1996년 11월 29일 접수)