

## ***Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 *cryIVD* 유전자로 형질전환된 *Synechocystis* PCC6803의 특성과 학질모기에 대한 살충효과**

### **Characterization of *Synechocystis* PCC6803 transformed with *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 and its mosquitocidal effect on *Anopheles sinensis***

이대원 · 박현우 · 김호산 · 진병래 · 유효석 · 김근영\* · 강석권  
Lee, Dae Weon, Hyun Woo Park, Ho San Kim, Byung Rae Jin,  
Hyo Sok Yu, Keun Young Kim and Seok Kwon Kang

**ABSTRACT** For the effective control of mosquito larvae, *Anopheles sinensis*, the expression vector pCYASK5-1 containing *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 was constructed and transformed into the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. The transformants were selected on BG-11 medium containing kanamycin. The expression of *cryIVD* gene in transformant was confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis. The mortality of *A. sinensis* larvae was scored for 3 days. Furthermore, growth and distribution rate of transformant were examined. The results showed that *Synechocystis* PCC6803 transformed with *cryIVD* gene of *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 was highly toxic to *A. sinensis* larvae, demonstrating that it will be a potential agent for mosquito control.

**KEY WORDS** *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14, *Synechocystis* PCC6803, *cryIVD* gene, *Anopheles sinensis*

**초 록** *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 *cryIVD* 유전자를 포함하고 있는 발현벡터 pCYASK5-1을 제작하여 *Synechocystis* PCC6803에 형질전환시킨 후, 학질모기(*Anopheles sinensis*) 유충에 대한 독성을 검정하였다. Kanamycin이 포함된 BG-11배지에서 선발된 형질전환체의 *cryIVD* 유전자 발현은 SDS-PAGE와 Western blot 분석으로 확인하였다. 형질전환체는 *A. sinensis* 유충에 대해 높은 독성을 나타내었으며, 성장은 야생주인 *Synechocystis* PCC6803과 유사하였다. 또 수심에 따른 형질전환체의 분포도 조사에서 전체적으로 살충농도의 세포수로 분포함을 확인하였다. 이러한 결과들은 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 *cryIVD* 유전자로 형질전환된 *Synechocystis* PCC6803이 모기유충 방제에 효율적으로 이용될 수 있음을 나타내었다.

**검색어** *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14, *Synechocystis* PCC6803, *cryIVD* 유전자, 학질모기 (*Anopheles sinensis*)

파리목에 속하는 모기는 인간과 가축에 말라리아, 황열병, 뇌염, 뎅그열 등의 질병을 전파하는 주된 병원 매개충으로 알려져 있으며, 유충기에 수서생활을 하며 조류와 세균을 먹이로 섭취한다(Thiery 등 1991). 그 방제로 파리목에 독성을 나타내는 *Bacillus thuringiensis*(B.t) 내독소 단백질을 이용하려는 시도가 이루어져 왔다. 모기와 검정파리 등의 유충에 특이적인 독성을 가진 내독소 단백질을 만드는 B.t로는 1976년에 이스라엘에서 발견된 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

와 1984년에 필리핀에서 발견된 subsp. *morrisoni* PG-14 균주가 있다(Goldberg와 Margalit 1976, Padua 등 1984). 이 두 균주는 모두 4개의 내독소 단백질이 존재하며, 독성은 이들 내독소 단백질들 간의 협력작용에 의한 것으로 보고되었다(Chilcott와 Ellar 1988, Earp와 Ellar 1987, Wu와 Chang 1985, Yu 등 1987). *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 *morrisoni* PG-14의 4개의 내독소 단백질들은 이미 염기서열이 밝혀졌으며, 그 크기는 135, 125, 72, 28 kDa인데, 이들의 유전

서울대학교 농생물학과(Department of Agricultural Biology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)  
\*농촌진흥청 잠사곤충연구소(National Sericulture & Entomology Research Institute, R.D.A., Suwon 441-100, Korea)

자들은 각각 *cryIVA*, *cryIVB*, *cryIVD*, *cytA* 유전자로 명명되었다(Hofte와 Whiteley, 1989). 특히 두 균주의 *cryIVD* 유전자는 1764번째 염기에서만 차이를 보이며, 유전자 발현에 의해 나타나는 아미노산 서열에서는 차이를 보이지 않는 것으로 밝혀졌다(Frutos 등 1991).

B.t를 이용한 파리목 유충 방제에 있어 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14을 실제환경에 적용하는 데에는, 내독소 단백질의 일부인 *cytA* 유전자 산물의 용혈성으로 인한(Pfannestiel 등 1986, Visser 등 1986) 척추동물의 혈구세포 파괴와(Delecluse 등 1991, Gill과 Hornung 1987, Hurley 등 1985, Thomas와 Ellar 1983) 내독소 단백질이 모기유충의 서식처인 수서생태계에 존재하지 않고, 수면으로 부터 가라앉는 문제점이 있다. 이러한 문제점들을 해결하고자 수서생태계에서 B.t. 내독소 단백질을 효과적으로 적용시킬 수 있는 방법으로 내독소 단백질 유전자를 모기유충의 먹이로 이용되는 cyanobacteria에 형질전환하여 발현시키려는 시도가 수행되었다(Angsuthanasombat와 Panyim 1989, Raymond 등 1990, Solttes-Rak 등 1993, Tandean de Marsac 등 1987, Xudong 등 1993). 그러나 cyanobacteria 내에서 *B. thuringiensis* 내독소 단백질들의 발현을 저조와 모기유충에 대한 독성 역시 높지 않아 방제효과가 낮았다.

따라서 본 연구는 효율적인 모기방제를 위하여, 모기유충에 독성을 띠는 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 *cryIVD* 유전자를 이용하여 발현백터를 제작하고, 모기유충이 먹이로 섭취하는 *Synechocystis* PCC6803에 형질전환시켜, 학질모기(*Anopheles sinensis*) 유충에 대한 살충효과, 형질전환체의 성장 및 분포에 관하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

사용균주 *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14는 일본 Kyushu 대학의 Ohba 박사로부터, 또 cyanobacteria *Synechocystis* PCC6803은 미국 Harvard 대학의 Bogorad 박사로부터 분양받았다. *Synechocystis* PCC 6803 배양은 배지 C와 BG-11(Kratz와 Myers 1955, Murray 등 1994)을, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14는 GYS 배지(Nickerson 1974)를 이용하였다.

### 플라스미드

*E. coli-B. thuringiensis* shuttle백터 pCG5(Chang 등 1993)는 미국 California 대학의 Gill 박사로부터 얻었으며, *E. coli-cyanobacterium* 발현백터 pOV81은 국내 기초과학연구원연구소의 박영목 박사로부터 분양받았다.

### 발현백터 pCYASK5-1의 제작

발현백터 pCYASK5-1은 pCG5에서 *cryIVD*와 *cytA* 유전자를 포함하고 있는 6.87 Kb의 절편을 elution한 뒤, 제한효소 *SacI*과 *KpnI*으로 처리된 pOV81에 T4 DNA ligase(Poscochem Co.)를 이용하여 16°C에서 12시간동안 반응시켜 pCYASK5를 제작하고, 다시 pCYASK5에 제한효소 *SacI*과 *EcoRV*로 처리하여 *cytA* 유전자를 제거한 후, Klenow fragment(Poscochem Co.)와 반응시키고 T4 DNA ligase로 결합시켜 제작하였다.

### Dot blot

Dot blot은 비방사선 표지 및 탐침 Kit(Boehringer Mannheim Co.)를 이용하였으며, 탐침(probe)은 *cryIVD* 유전자를 *DraI*으로 처리하여 얻은 약 1.2 Kb DNA를 이용하였다. 또한 양성 대조구로는 pCG5를, 음성대조구는 pOV81 백터를 사용하였다. 발현백터 pCYASK5과 pCYASK5-1이 전이되고 UV-crosslinking된 나일론 membrane을 prehybridization 용액 [5× SSC, 1%(w/v) blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS]에서 68°C, 2시간동안 반응시키고, DIG(Digoxigenin)으로 표지된 탐침과 68°C에서 8시간이상 반응시킨 후, 세척용액 [2× SSC, 0.1% SDS]으로 상온에서 30분동안 3회이상 씻었다. 세척된 나일론 membrane은 anti-digoxigenin-antibody-alkaline phosphatase conjugate와 상온에서 30분동안 결합시킨 뒤, 다시 Lumigen PPD™ 용액과 반응시키고, X-ray 필름에 20~30분동안 상온에서 노출시킨 다음 현상하였다.

### Cyanobacterium 형질전환체의 선발

Cyanobacterium 형질전환은 Dzelzkans와 Bogorad (1986)의 방법을 변형하여 수행하였다. *Synechocystis* PCC6803을 배지 C에서 OD<sub>730</sub> 값이 0.8~1.2가 되도록 배양하고, 1,500 g에서 5분동안 원심분리한 후, 다시 배지 C에 부유시켜 10<sup>8</sup> cells/ml이 되도록 맞춘 다음, 5 μg pCYASK5-1 DNA를 첨가하여 28°C에서 6~12시간 동안 배양하였다. 배양 후 *Synechocystis* PCC6803은 1.

5% BG-11 평판배지에서 다시 12시간동안 배양하고 kanamycin을 농도별(5, 10, 15, 20  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하였다. 1~2주일 후, 평판배지에 나타난 콜로니들을 1차 선 발하고 kanamycin이 농도별(5, 10, 15  $\mu\text{g/ml}$ )로 첨가된 BG-11 평판배지에 다시 도말하여, 자라는 콜로니를 형 질전환체로 최종 선발하였다.

### CryIVD 단백질 발현조사

단백질 발현조사는 Murphy와 Stevens의 방법(1992)으로 수행하였다. 형질전환체를 250 ml BG-11 배양액에 접종하여 28°C에서 OD<sub>730</sub>으로 2가 될 때까지 배양하고, 배양액을 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 집 균한 후, lysozyme(5 mg/ml)이 첨가된 용해 용액 [50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl (pH8.0), 10 mM EDTA]에 부유시켜 -20°C에서 얼리고 실온에서 녹이는 방법을 2회 반복한 뒤, Laemmli의 방법(1970)에 따라 시료 용해 완충액 [60 mM Tris-Cl (pH6.8), 10 mM dithiothreitol, 2% SDS, 16% glycerol, 0.01% bromophenol blue]를 첨가하여 2분동안 끓인 후, 12.5% SDS-PAGE를 수행하였다. 대조구로는 *Synechocystis* PCC6803을 사용하였다.

Western blot은 Towbin의 방법(1979)에 따라 SDS-PAGE를 행한 gel을 blotting 완충액 [Tris 9.4 g/l, pH8.3, glycine 45 g/l, methanol 200 ml/l]에서 단백질 밴드들을 nitrocellulose membrane에 전이시키고, 1% BSA (Sigma)로 blocking 시킨 후, nitrocellulose membrane을 생쥐에서 얻은 CryIVD 항체와 1시간동안 반응시키고, PBST 완충액 [NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l, NaN<sub>3</sub> 0.2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g/l, Tween-20 0.5 ml/l]으로 5분간 3회 세척하였다. 세척된 membrane을 Goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate(Sigma)와 1시간 동안 반응시키고, PBST 완충액으로 5분간 2회 씻은 뒤, 기질이 포함된 염색용액 [2M MgCl<sub>2</sub> (5  $\mu\text{l/ml}$ ), nitro blue tetrazolium(1 mg/ml), bromochloro-indolyl phosphate(5 mg/ml)]로 발색시켰다.

### 생물검정

서울대학교 위생곤충학 연구실에서 분양받은 2~3령 학질모기(*Anopheles sinensis*) 유충에 대한 생물검정은 발현벡터 pCYASK5-1을 포함하고 있는 형질전환체를 배지 C에서 배양하여 학질모기 마리 당  $7.25 \times 10^6$ - $10^7$  cells/ml 농도로 처리한 뒤, 치사율로 조사하였다. 치사율은 24시간 간격으로 72시간동안 조사하였으며, 대조

구로는 *Synechocystis* PCC6803을 사용하였다.

### *Synechocystis* PCC6803과 형질전환체의 성장곡선 조사

*Synechocystis* PCC6803과 형질전환체의 성장은 배지 C에 OD<sub>730</sub>값이 0.1이 되도록 각각 접종하고 28°C, 160 rpm으로 배양하면서, 매 24시간마다 1 ml의 시료를 취하고 스펙트로포토미터(Phillips 8600)를 이용하여 OD<sub>730</sub>값으로 조사하였다.

### 수중 깊이에 따른 형질전환체의 분포

수중 깊이에 따른 형질전환체의 분포는 Eggersdorfer과 Hader의 방법(1991)으로 조사하였다. 형질전환체를 kanamycin(10  $\mu\text{g/ml}$ )이 첨가된 배지 C에서 OD<sub>730</sub>값이 2.0 될 때까지 배양한 다음 메스실린더에 옮겨 24시간동안 정치시킨 후, 깊이 1 cm 마다 1 ml의 시료를 취하고 스펙트로포토미터(Phillips 8600)를 이용하여 깊이에 따른 분포를 조사하였으며, ml 당 세포수는 [(O.D.-0.21)/1.48]  $\times 10^8$ 으로 산정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 발현벡터 pCYASK5-1의 제작

*B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 cryIVD 내 독소 단백질 유전자를 발현하는 형질전환체를 제작하

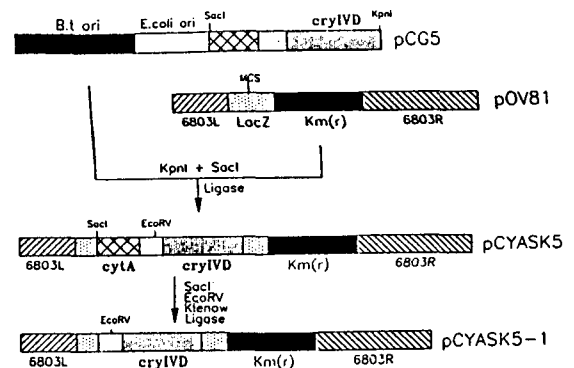
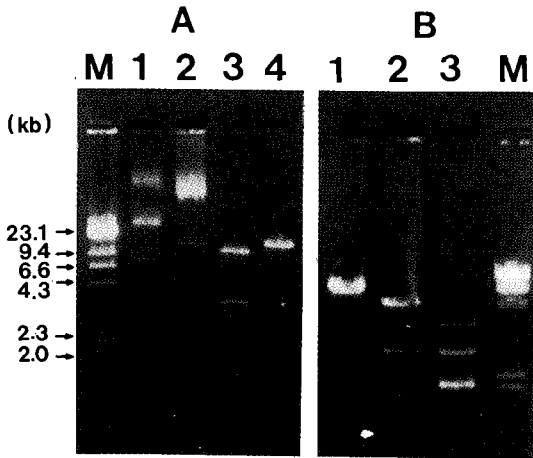


Fig. 1. Construction of expression vector pCYASK5-1. The cryIVD and cytA genes eluted from pCG5 were ligated to pOV81 digested with SacI and KpnI using T4 DNA ligase to generate pCYASK5. The expression vector pCYASK5-1 was constructed by excision of cytA gene from pCYASK5.

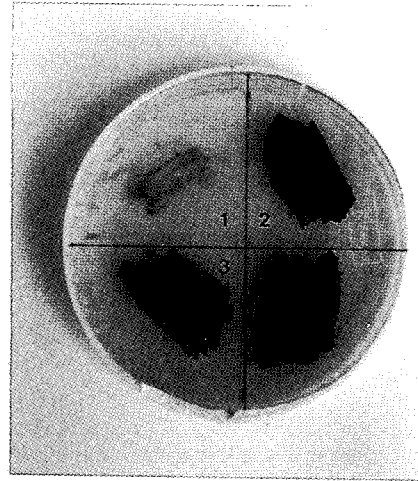


**Fig. 2.** DNA Pattern of pCYASK5(A) and pCYASK5-1(B). (A) M,  $\lambda$ -DNA digested with *Hind*III; Lane 1, pOV81; Lane 2, pCYASK5; Lane 3, pCYASK5 digested with *Kpn*I; Lane 4, pCYASK5 digested with *Sac*I. (B) M,  $\lambda$ -DNA digested with *Hind*III; Lane 1, pCYASK5-1 digested with *Bgl*II; Lane 2, pCYASK5-1 digested with *Kpn*I; Lane 3, pCYASK5-1 digested with *Kpn*I and *Spe*I.



**Fig. 3.** Dot blot analysis of expression vector. *Dra*I-restricted pCYASK5 DNA fragment harboring *cry*IVD gene was used as a probe. 1, pCYASK5 digested with *Dra*I; 2, pCYASK5 digested with *Sac*I; 3, pCYASK5-1 digested with *Bgl*II; 4, pOV81 digested with *Sac*I; 5, pCG5 digested with *Hind*III.

기 위한 발현벡터는 pCG5로부터 *cry*IVD와 *cytA* 유전자를 pOV81에 결합시켜 pCYASK5를 먼저 제작하고, pCYASK5에서 *cytA* 유전자를 제거한 뒤, 발현벡터 pCYASK5-1를 제작하였다(Fig. 1). 또 발현벡터 pCYASK5-1에 *cry*IVD 내독소 단백질 유전자의 삽입 여부는 제한효소 처리에 의한 agarose gel 전기영동(Fig. 2)과 dot blot(Fig. 3)으로 분석하였다. 이상의 결과들로 *cry*IVD 내독소 단백질 유전자가 제작된 발현



**Fig. 4.** Selection of transformant harboring pCYASK5-1 in culture plate. The concentration of kanamycin was treated with 10  $\mu$ g/ml. 1, *Synechocystis* PCC6803; 2, transformant 1-3; 3, transformant 2-13; 4, transformant 2-17.

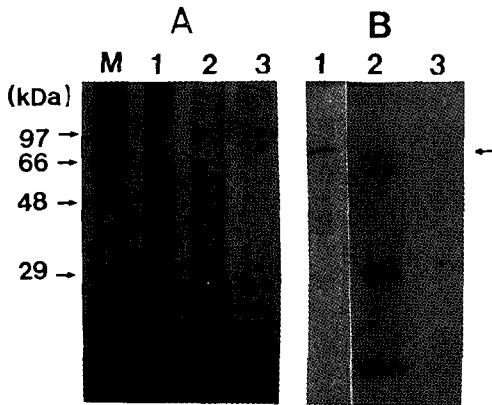
벡터 pCYASK5와 pCYASK5-1에 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 본 실험의 발현벡터 pCYASK5-1에서 *cytA* 유전자는 제거되었는데, 이는 CytA 단백질이 시험관 내에서 척추동물의 혈구세포를 파괴하는 효과가 있는 것으로 보고되었고(Pfannenstiel 등 1986, Visser 등 1986), 또 많은 연구에서 *cytA* 유전자가 독성증가에 크게 효과가 없는 것으로 보고되었기 때문이다(Delecluse 등 1991, Park 등 1995).

**형질전환체의 선발**

발현벡터 pCYASK5-1을 *Synechocystis* PCC6803에 형질전환시키고 kanamycin이 첨가된 BG-11 평판배지에서 형질전환체를 선발하였다. Fig. 4에서 보여지는 것처럼 대조구인 *Synechocystis* PCC6803은 kanamycin(10  $\mu$ g/ml)이 처리된 BG-11 평판배지에서 성장하지 않았으나, 형질전환체는 발현벡터에 존재하는 kanamycin 저항성 유전자의 발현으로 kanamycin(10  $\mu$ g/ml)이 처리된 BG-11 평판배지에서 성장하였다. 본 실험에서는 형질전환된 3개의 균주 중에서 형질전환체 1~3을 최종 선발하였다.

**형질전환체에서 내독소 단백질의 발현**

선발된 형질전환체에서 *cry*IVD 유전자의 발현은 SDS-PAGE와 Western blot으로 분석하였다(Fig. 5).

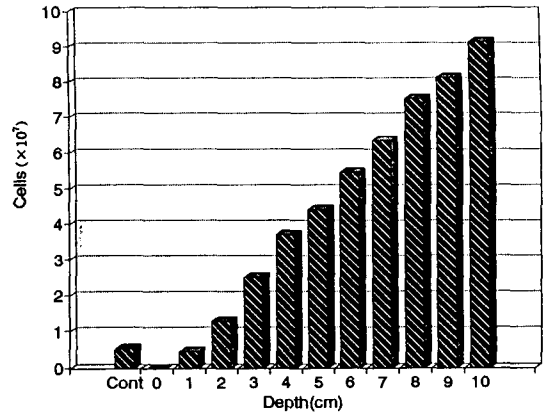


**Fig. 5.** SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of transformant harboring pCYASK5-1. Mouse-produced CryIVD protein antibody was used as a primary antibody. M, Protein size marker; Lane 1, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14; Lane 2, Transformant harboring pCYASK5-1; Lane 3, *Synechocystis* PCC6803. The arrow indicates CryIVD protein detected by mouse-produced CryIVD protein antibody.

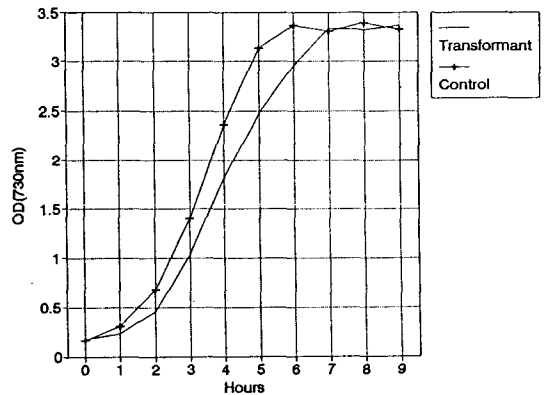
SDS-PAGE 분석에 의한 형질전환체의 *cryIVD* 유전자 발현은 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14과 비교할 때 뚜렷하게 관찰되지는 않았으나, CryIVD 단백질을 이용한 Western blot 분석 결과 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 CryIVD 단백질과 같은 분자량인 약 72 kDa의 내독소 단백질을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 발현벡터 pCYASK5-1 내에 존재하는 6803R과 6803L 부분에 의한 재조합으로 *Synechocystis* PCC6803 genome 내에 *cryIVD* 유전자의 안정적인 삽입이 이루어졌음을 나타내며, 또 본 발현 벡터에서 *cytA* 유전자가 제거되었음에도 CryIVD 단백질이 안정적으로 발현되었는데, 이는 Dervyn 등(1995)이 밝힌 19 K 유전자에 의해 불완전한 오픈된 구조를 가진 CryIVD 단백질을 발현시킨다는 보고와 일치하는 결과로 보여진다.

**형질전환체의 생물검정**

형질전환체에서 발현된 CryIVD 단백질의 학질모기 유충에 대한 살충효과를 알아보기 위하여, 형질전환체를 농도별로 접종한 결과(Fig. 6), 접종 후 1일째  $7.25 \times 10^6$  cells/ml의 처리농도구에서 68%의 치사율을 보였으며,  $7.25 \times 10^7$  cells/ml의 처리농도구에서는 82%의 높은 치사율을 나타내었다. 접종 후 2일부터는  $7.25 \times$



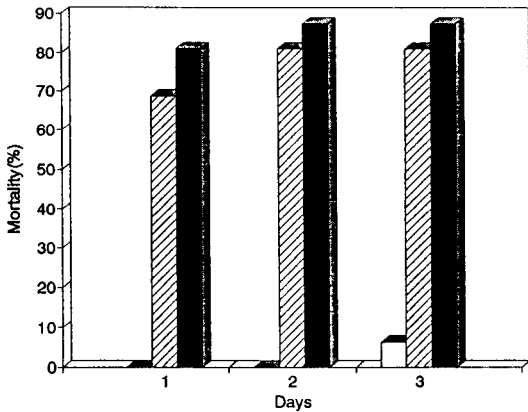
**Fig. 6.** Toxicity of *Synechocystis* PCC6803 transformed with pCYASK5-1 against *Anopheles sinensis* larvae.  
 ▨ : *Synechocystis* PCC6803 ( $7.25 \times 10^6$  cells/ml)  
 ■ : Transformant ( $7.25 \times 10^6$  cells/ml)  
 □ : Transformant ( $7.25 \times 10^7$  cells/ml)



**Fig. 7.** Growth of *Synechocystis* PCC6803 and transformant harboring pCYASK5-1.

$10^6$  cells/ml의 처리농도구에서는 81%,  $7.25 \times 10^7$  cells/ml의 처리농도구에서는 85%의 치사율을 보여 두 처리 농도구 공히 높은 치사율을 나타내었으며, 이들의 독성은 3일째까지 유지되었다. 반면에 대조구로 사용된 *Synechocystis* PCC6803의 경우는 자연치사 등의 요인에 의해 약 10%의 치사율을 보였다.

학질모기 유충에 대한 생물검정 결과는 Soltes-Rak 등(1993)이 *Bacillus* promoter와 *petF1* promoter에 *cryIVB* 유전자를 결합시켜 만든 형질전환체에서 보고한 최대 독성 증가 시간이 48시간이내인 것과 일치하며, Murphy와 Stevens(1992)가 phycocyanin promoter



**Fig. 8.** Distribution of transformant harboring pCYASK5-1. Control indicates the concentration required for mosquitocidal effect.

에 *cryIVD* 유전자를 결합한 발현벡터를 이용하여 형질 전환체에서 보고된 모기유충에 대한 50%이상의 독성은 처리 후 4일이상이 걸린 것과 비교할 때, 본 실험에서 제작된 형질전환체의 *cryIVD* 유전자 발현에 따른 독성은 매우 높은 것으로 나타났다.

**형질전환체의 성장 조사**

형질전환체의 성장을 알아보기 위하여, *Synechocystis* PCC6803와 성장을 비교하였다(Fig. 7). 성장곡선에서 보여지는 것처럼 kanamycin(10 µg/ml)이 첨가된 배지 C에서 자란 형질전환체는 *Synechocystis* PCC 6803에 비해 성장이 약 24시간정도 지연되었다. 이러한 성장의 차이는 배지 C에 처리된 kanamycin이 형질 전환체의 성장에 선택압을 형성하는 요인으로 작용했기 때문으로 보이며, 실제 야외 적용시는 kanamycin이 존재하지 않기 때문에 성장에 차이가 없을 것으로 사료된다.

**수중 깊이에 따른 형질전환체의 분포**

형질전환체의 분포는 깊이에 따른 세포수와 학질모기 유충에 대한 치사효과로 조사하였다(Fig. 8). 수면으로부터 1 cm 깊이의 세포수는 살충효과를 나타내는 농도에 비해 다소 낮았지만, 수면으로부터 깊이 2 cm 이상에 존재하는 형질전환체는 살충효과를 보일 수 있는 농도 이상으로 분포하는 것을 알 수 있다.

이러한 결과는 *B. thuringiensis* subsp *morrisoni* PG-14의 내독소 단백질이 비중에 의해 가라앉기 때문에

수서생태계에서 지속적인 살충효과를 가지지 못하는 반면, 형질전환된 *Synechocystis* PCC6803은 깊이에 따라 수직적인 농도분포를 하면서 동적인 수직이동과 수평성에 의한 동적인 평형분포를 하고 있으며 (Raymond 등 1990), 모기에 살충효과를 나타내는 농도가 수면에서 깊이 1 cm부터 분포하고, 형질전환체가 수서생태계에서 생활환을 안정적으로 유지할 수 있다는 면에서 B.t의 내독소 단백질에 비해 매우 효율적인 것으로 분석되어지며, 아울러 실제 야외 적용시험이 요구되어진다.

**감사의 글**

본 연구는 서울대학교 농업생물 신소재 연구센터와 한국과학재단의 지원으로 수행되었습.

**인용문헌**

Angsuthanasombat, C. and S. Panyim, 1989. Biosynthesis of 130-kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2428-2430.

Chang, C., Y. M. Yu, S. M. Dai, S. K. Law and S. S. Gill. 1993. High-level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 815-821.

Chilcott, C. N. and D. J. Ellar. 1988. Comparative study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2551-2558.

Delecluse, A., J. F. Charles, A. Klier and G. Rapoport. 1991. Deletion by *in vivo* recombination shows that 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *J. Bacteriol.* **173**: 3374-3381.

Dervyn, E., S. Poncet, A. Klier and G. Rapoport. 1995. Transcriptional regulation of the *cryIVD* operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* **177**: 2283-2291.

Dzelzkans, V. A. and L. Bogorad. 1986. Stable transformation of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 induced by UV irradiation. *J. Bacteriol.* **165**: 964-971.

Earp, D. J. and D. J. Ellar. 1987. *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* strain PG14: nucleotide sequence of a

- gene coding a 27 kDa crystal protein. *Nucleic Acids Res.* **15**: 3619.
- Eggersdorfer, B. and D. P. Hader. 1991. Phototaxis, gravitaxis and vertical migration in the marine dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 319-326.
- Frutos, R., C. Chang, S. S. Gill and B. A. Federici. 1991. Nucleotide sequences of genes encoding a 72,000 molecular weight mosquitocidal protein and an associated 20,000 molecular weight protein are highly conserved in subspecies of *Bacillus thuringiensis* from Israel and Philippines. *Biochem. Syst. Ecol.* **19**: 599-609.
- Gill, S. S. and J. M. Hornung. 1987. Cytolytic activity of *Bacillus thuringiensis* proteins to insect and mammalian cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* **50**: 16-25.
- Goldberg, L. J. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles serengetii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* **37**: 355-358.
- Hofte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.
- Hurley, J. M., G. L. Sung, R. E. Andrew, Jr., M. J. Klowden and L. A. Bulla. 1985. Separation of the cytolytic and mosquitocidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**: 961-965.
- Kratz, W. and J. Myers. 1955. Nutrition and Growth of several blue-green algae. *Am. J. Bot.* **42**: 282-287.
- Laemmlis, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Murphy, R. C. and Jr. S. E. Stevens. 1992. Cloning and expression of *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1650-1655.
- Murray, R. G. E., W. A. Wood, N. R. Krieg and P. Gerhardt. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology*, Washington.
- Nickerson, K. W., G. St. Julian and L. A. Bulla. 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* **28**: 129-132.
- Padua, L. E., M. Ohba and K. Aizawa. 1984. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a: 8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **44**: 12-17.
- Park, H. W., H. S. Kim, D. W. Lee, Y. M. Yu, B. R. Jin and S. K. Kang. 1995. Expression and synergistic effect of three types of crystal protein genes in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**: 602-607.
- Pfannenstiel, M. A., G. A. Gouche, E. J. Ross and K. W. Nickerson. 1986. Immunological relationship among proteins making up the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystalline toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 644-649.
- Raymond, K. C., H. Waboko, R. M. Faust and L. A. Bulla, Jr. 1990. Transfer of the *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin gene into mosquito larval food sources, p. 94-109. In H. De Barjac and D. Sutherland (ed.). Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics, and applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus spaericus*. *Rutgers University Press*. New Brunswick. N. J.
- Soltes-Rak, E., D. J. Kushner, D. D. Williams and J. R. Coleman. 1993. Effect of promoter modification on mosquitocidal *cryIVB* gene expression in *Synechococcus* sp. strain PCC 7972. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2404-2410.
- Tandeau de Marsac, N., F. de la Torre and J. Szulmajster. 1987. Expression of the larvicidal gene of *Bacillus spaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 396-398.
- Thiery, I., L. Nicolas, R. Roppka and Tandeau de Marsac N. 1991. Selection of cyanobacteria isolated from mosquito breeding sites as a potential food source for mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1354-1359.
- Thomas, W. E. and 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.
- Towbin, H. R., R. Stachelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.
- Visser, B., M. van Workum, A. Dullemans and C. Waalwijk. 1986. The mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is associated with Mr. 230,000 and 130,000 crystal proteins. *FEMS Mi-*

- crobiol. Lett.* **30**: 211-214.
- Xudong, X., K. Renqui and H. Yuxiang. 1993. High larvicidal activity of intact cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 expressing gene 51 and gene 42 of *Bacillus spaericus* sp. 2297. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**: 247-250.
- Wu, D. and F. N. Chang. 1985. Synergism in mosquitoicidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Lett.* **190**: 232-236.
- Yu, Y. M., M. Ohba and K. Aizawa. 1987. Synergistic effects of the 65-and 25-kilodalton proteins of *Bacillus thuringiensis* strain *morrisini* PG-14 (serotype 8A:8B) in mosquito larvicidal activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 459-462.

(1996년 1월 12일 접수)