

## *Bacillus thuringiensis* 살충성 결정단백질 유전자(*cry II A*)의 형질전환 식물 제작

이정민 · 류종석<sup>1</sup> · 권무식\*

성균관대학교 생명자원과학대학 유전공학과, <sup>1</sup>웨인주립대학 유전 및 분자생물학과

### Generation of Transgenic Plant (*Nicotiana tabacum* var. Petit Havana SR1) harboring *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein Gene, *cry II A*

LEE, Jeong Min · RYOU, Chongsuk<sup>1</sup> · KWON, Moosik\*

Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon, 440-746, Korea:

<sup>1</sup>Department of Genetics & Molecular Biology, Center for Molecular Medicine & Genetics, School of Medicine, Wayne State University, Detroit, MI, 48201, U.S.A. \*Corresponding author.

*Bacillus thuringiensis*, a gram-positive soil bacterium, is characterized by its ability to produce crystalline inclusions during sporulation. The crystal proteins exhibit a highly specific insecticidal activity. An insecticidal crystal protein (ICP), Cry II A, is specifically toxic to both lepidopteran and dipteran insects. In this study, tobacco plants transformed by the *cry II A* gene have been generated. The Cry II A crystal protein was purified from *E. coli* JM103 harboring *cry II A* gene by differential solubility. The activated Cry II A was prepared by tryptic digestion. The purified protoxin (70 kDa) and the activated toxin (50 kDa) were analyzed by SDS-PAGE. To generate the transgenic tobacco having *cry II A* gene, the *cry II A* gene was subcloned to a plant expression vector, pSRL2, having two CaMV 35S promoters. The recombinant plasmid was transformed into tobacco (*N. tabacum* var. Petit Havana SR1) by *Agrobacterium*-mediated leaf disc transformation. Through the regeneration, six putative transgenic tobacco plants were obtained and three transformants were confirmed by Southern blot analysis. It has been found that one plant had single copy of *cry II A* gene, another had two copies of the gene, and the third had a truncated gene. After the immunochemical confirmation of *cry II A* expression in plants, the transgenic tobacco plants will be used to study the genetics of future generation with the insecticidal crystal protein gene, *cry II A*.

Key words: Transgenic tobacco, Insecticidal crystal protein, Cry II A

## 서 론

형질전환을 이용한 식물 분야, 특히 작물 육종의 연구는 식물의 전형성능과 재조합 DNA 기법을 이용한 외래 유전자의 식물체 내 도입 및 신작물 개발을 가능케 하고 있다. 이러한 유용 작물의 개발에 있어서 최근 주목되고 있는 것은 내충성을 가진 식물체의 개발이다(Höfte and Whiteley, 1989). 화학 살충제의 남용으로 인하여 야기되는 환경오염과 이충(利蟲)의 피해 등을 줄이고자 하는 노력의 일환으로, 특정 해충에만 작용하고 자연에 2차적 오염원으로 작용하지 않

며 지속적인 살충성을 나타내는 생물학적 살충제 및 내충성 작물의 개발이 근래에 시도되고 있다(Vaeck et al., 1987).

*Bacillus thuringiensis*는 그람 양성 토양 세균으로, 특정 곤충에 대한 살충성으로 인해 연구의 대상이 되어 왔다. *B. thuringiensis*는 현재 850종 이상 동정되었는데, 살충성의 범위에 따라서 인시류, 쌍시류, 갑충류에 대해 기본적으로 다섯 가지의 병원군 그룹으로 나뉘고 있으며, 각 병원군 그룹은 살충성을 나타내는 유전자의 염기 서열 및 단백질 구조의 상동성에 따라 몇 개의 하위 그룹으로 분류되고 있다(Höfte and Whiteley, 1989). *B. thuringiensis*는 포자형성시 크

기가 비교적 큰 팔면체 형태의 결정과 크기가 작은 육면체의 결정을 내포체(inclusion bodies)로 형성한다. 이 내포체를 구성하는 결정단백질이 살충성을 나타내는데(Aronson et al., 1986), 근래에 이들 살충성 결정단백질(Insecticidal crystal protein, ICP)의 유전자인 *cry* 유전자가 클로닝 되고 그 염기 서열이 결정되었다(Whiteley and Schnepf, 1986). 결정단백질은  $\delta$ -endotoxin이라고도 불리며 protoxin의 형태로 생성되는데, 곤충 유충의 중장에서 용해되고 trypsin-like protease에 의해 절단되어 N-말단 쪽의 단편(50-70 kDa)이 독성을 갖는 toxin으로 전환된다. 활성화된 결정단백질은 중장 상피세포의 세포막에 존재하는 수용체에 결합하여  $K^+$ -channel을 형성하는데, 이는 상피세포의 삼투압 평형을 방해하여 유충을 죽게 한다(Gill et al., 1992). 이 살충성 결정단백질의 곤충 특이성은 바로 유충 중장의 상피세포에 존재하는 수용체에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다(Hofmann et al., 1988; Ge et al., 1989).

1987년 처음으로 살충성 결정단백질 *cry I Ab* 유전자를 형질전환시킨 담배 식물이 만들어진 이후로 결정단백질 유전자를 식물체 내로 도입한 곤충 저항성 식물의 개발이 활발히 시도되고 있다(Vaek et al., 1987). 나방이나 잠충류에 피해를 입는 감자, 목화, 땅콩 등의 작물에 대하여 형질전환을 통한 내충성 식물체의 개발 연구도 진행되고 있다(Jenkins et al., 1993; Salm et al., 1994).

*Cry II A* 결정단백질은 다른 결정단백질과는 달리 인시류와 쌍시류 곤충의 유충에 모두 특이적으로 작용하며, protoxin 및 활성화된 toxin의 분자량이 다른 결정단백질에 비해 작은 것으로 알려져 있다. *Cry II A* 결정단백질은 처음 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1에서 분리되었고, *cry II A* 유전자가 포함된 3.95 kb의 DNA 단편의 클로닝과 염기서열 결정이 수행되었다(Widner and Whiteley, 1989). 또한 *cry II A* 유전자의 발현에 관련된 chaperonin에 대한 연구도 수행되었다(Crickmore and Ellar, 1992).

본 연구에서는 *cry II A* 유전자의 식물체 내 형질전환을 위하여 식물 발현 벡터를 구성하고, 이를 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환법으로 모델 식물인 담배 내에 도입하여 형질전환 식물체를 형성하였으며, 형질전환 여부를 Southern blot을 통해 확인하였다. 본 연구를 통하여 얻어진 *cry II A* 형질전환 식물체는 살충성 검정 등을 통하여 내충성 식물 생산 및 후대 유전 양상 분석을 위한 기초 자료로 이용될 것이다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

본 연구에서는 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1에서 분

리된 *cry II A* 유전자가 포함된 플라스미드(pSB304)를 미국 오하이오 주립 대학의 *Bacillus* Genetic Stock Center로부터 분양 받아 사용하였다. 형질전환에 사용된 담배(*Nicotiana tabacum* var. Petit Havana SR1)와 식물 발현 벡터 구성에 사용된 pGA643, pBI121 벡터 및 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404는 농촌진흥청 농업과학기술원으로부터 분양 받아 사용하였다. 대장균 균주(*Escherichia coli* JM103)는 Stratagene Cloning Systems(미국)에서 구입하여 사용하였다.

### Cry II A 결정단백질의 분리

*B. thuringiensis*의 *Cry II A* 결정단백질을 분리하기 위하여, *cry II A* 유전자가 pTZ18R 벡터에 삽입된 재조합 플라스미드인 pSB304를  $CaCl_2$ 를 이용한 미생물의 형질전환 방법으로 *E. coli* JM103에 형질전환 시킨 후, ampicillin (50  $\mu$ g/mL)이 첨가된 배지에서 형질전환체를 선발하였다. Alkaline lysis 방법으로 pSB304 플라스미드를 형질전환체로부터 분리한 후, 제한효소 처리를 통해 *cry II A* 유전자를 확인하였다(Sambrook et al., 1989; Kwon and Oshima, 1992).

*Cry II A* 결정단백질은 *E. coli* 형질전환체로부터 용해도의 차를 이용하여 분리하였다(Lee et al., 1992). pSB304 플라스미드를 함유한 *E. coli* JM103 형질전환체를 항생제를 포함한 LB 배지에서 37°C, 48시간 동안 현탁배양 하였다. 배양액을 원심분리(10,000 $\times$ g, 4°C, 10분)한 후 pellet을 20 mL의 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 15% sucrose, pH 8.0)에 녹이고 최종 농도가 1 mg/mL가 되도록 lysozyme을 처리한 후, 얼음으로 냉각하면서 3분 30초 동안 3회 반복하여 초음파 분쇄하였다. 현탁액을 원심분리(10,000 $\times$ g, 4°C, 10분)하여 pellet을 모으고, 냉 처리된 2% Triton X-100과 0.5 M NaCl에 현탁시킨 후, 다시 원심분리(10,000 $\times$ g, 4°C, 10분) 하였으며 이 단계를 3회 반복하였다. 모아진 pellet을 0.5 M NaCl에 현탁시킨 후, 원심분리(10,000 $\times$ g, 4°C, 10분) 하였고 이 단계를 5회 반복하였다. 다시 pellet을 증류수에 현탁시킨 후, 원심분리(10,000 $\times$ g, 4°C, 10분)하는 과정을 2회 반복하였다. 여러 단계의 세척을 거친 후, 얻어진 pellet을 solubilization buffer (10 mM dithiothreitol, 50 mM sodium carbonate buffer, pH 9.5)에 녹이고 2시간 동안 37°C에서 용해시킨 후, 원심분리(12,000 $\times$ g, 4°C, 10분)하고 상층액을 취하여 *Cry II A* 결정단백질을 전체 *E. coli* 단백질로부터 분리하였다. Trypsin과 protoxin의 부피비가 1대 50이 되도록 trypsin을 첨가하고 37°C에서 2시간 처리하여 toxin 형태의 *Cry II A* 결정단백질을 분리하였다.

### 형질전환 식물체의 제작

*Cry II A* 결정단백질 유전자에 대한 식물 발현 벡터는 pGA643을 기본으로 하여 두 개의 CaMV 35S promoter를

가지는 벡터를 구성한 후, *Xba*I 과 *Hpa*I 으로 절단한 2.2 kb의 *cry II A* 유전자 절편을 삽입하여 14.4 kb 크기의 식물 발현 벡터 pSRL2를 제작하였다(Figure 4). 이 벡터를 CaCl<sub>2</sub> 에 의한 freezing과 thawing 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환한 후, kanamycin과 tetracycline이 첨가된 YEP 배지에서 형질전환체를 선발하였다(Cho, 1995).

담배(*N. tabacum* var. Petit Havana SR1)의 엽편형질전환은 다음과 같이 수행하였다. 기내에서 50일 가량 성숙시킨 담배의 잎을 절취하여 1 cm<sup>2</sup> 정도 크기의 절편으로 절단하고 이를 *cry II A* 유전자의 식물 발현 벡터 pSRL2이 도입된 *Agrobacterium* 균주 배양액에 1분간 담귀 감염시킨 후, 6-benzylaminopurine (6-BAP)가 최종 농도 1 µg/mL가 되도록 첨가된 Murashige-Skoog (MS) 한천 배지에서 28°C 암조건 하에서 3일간 기내 배양하였다. 잎 절편들을 6-BAP (1 µg/mL), cefotaxime (200 µg/mL)와 kanamycin (100 µg/mL)이 첨가된 MS 한천 배지에 치상한 후 28°C에서 3일간 암처리하고, 이를 28°C 광조건하에 두어 신초 형성을 유도하였다. 배양 약 20일 후 발생한 신초를 잎 절편으로부터 분리하고 항생제가 첨가된 신초 유도 배지에서 여러 번의 재선별을 거친 후, cefotaxime (200 µg/mL)과 kanamycin (100 µg/mL)이 첨가되고 성장 호르몬은 첨가되지 않은 1/2 농도의 MS 한천 배지에 치상하고 이를 28°C 광조건 하에서 기내 배양함으로써 발근을 유도하였다.

### 형질전환 식물체의 검정

담배에 도입된 *cry II A* 유전자의 존재 여부를 확인하기 위하여 Southern blot을 수행하였다. 담배에서 전체 DNA를 분리하는 방법은 Tai와 Tanksley (1990)의 방법을 변형하여 이용하였으며, 식물 DNA를 *Xba*I 또는 *Xba*I 과 *Kpn*I 으로 절단한 후, 각각에 대하여 Southern blot을 수행함으로써 담배 내에 도입된 *cry II A* 유전자의 수를 분석하였다. pSB304에 클로닝된 *cry II A* 유전자의 일부분인 1.4 kb *Ban*II DNA 절편을 random hexamer 방법(Feinberg and Vogelstein, 1984)으로 표지하여 핵산 탐침으로 사용하였으며, Southern blot 및 Southern hybridization은 McCouch 등(1988)의 방법에 따라 수행하였다.

### 결과 및 고찰

여러 곤충에 대한 특이적인 독성으로 인하여 *B. thuringiensis*의 생물학적 살충제로의 이용 가능성은 일찍부터 주목되었다. 미생물이 나타내는 살충성이 결정단백질에 의한 것이라는 사실이 밝혀지고 결정단백질의 유전자가 클로닝 됨에 따라 유전자의 조작을 통해 살충성 결정단백질

을 대량 생산하여 살충제로 이용하려는 연구가 진행되어 왔다(Aronson et al., 1986; Aronson, 1993). 그러나, 결정단백질을 이용한 살충제의 개발에 있어서 살충제로서의 형성과 포장 살포시의 지속성 등에 문제가 제기 됨에 따라, 최근 유전공학적으로 이 유전자를 조작하여 식물체 내에 직접 도입하려는 연구가 진행되고 있다(Höfte and Whiteley, 1989; Lambert and Peferoen, 1992). 본 연구에서는 *B. thuringiensis*의 살충성 결정단백질 유전자인 *cry II A* 유전자를 *E. coli* 내에서 발현시켜 Cry II A 결정단백질을 분리하였으며, 이 *cry II A* 유전자를 식물체에 도입하기 위한 식물 발현 벡터를 구성하고 이를 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 통해 식물체(담배) 내에 도입하여 형질전환 식물체를 얻고자 하였다.

### Cry II A 결정단백질의 분리

*B. thuringiensis*의 Cry II A 결정단백질을 분리하기 위하여, *cry II A* 유전자가 삽입된 플라스미드를 확보하고, 이를 *E. coli*에 형질전환한 후, 선발된 형질전환체로부터 Cry II A 결정단백질을 분리하였다. *cry II A* 유전자는 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1으로부터 분리된 것으로, *orf1* 및 *orf2*와 함께 유전자의 발현에 필요한 promoter부위를 포함하여 전체 3.95 kb 크기의 절편으로 재조합 되었음을 확인하였다(Figure 1, 2). pSB304는 *cry II A* 유전자 외에도 *orf1*과 *orf2*를 포함하고 있는데, 지금까지는 그 중요성이 간과되어져 왔으나 최근의 연구에서 이들은 *B. thuringiensis* 내에서 *cry II A* 유전자의 발현 및 전사 후 mRNA의 안정성에 관여하는 것으로 알려졌다(Crickmore and Ellar, 1992).

결정단백질은 유충 중장의 알칼리 조건하에서 단백질 내의 이황화 결합이 절단되면서 결정이 용해되고, 용해된 결정단백질은 중장 내의 protease에 의해 절단되어 활성을 갖는 형태의 toxin이 된다(Du et al., 1994). 이러한 성질을 이용하여 *E. coli*에서 발현된 Cry II A 결정단백질을 알칼리 용

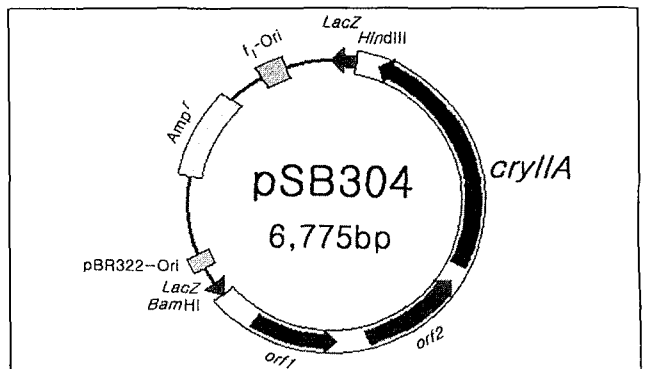
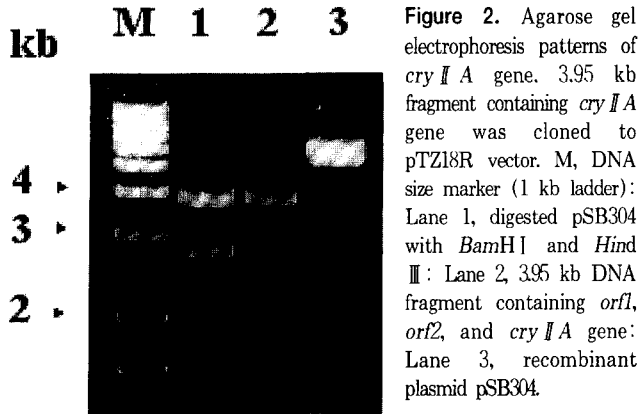


Figure 1. Restriction map of pSB304 harboring *cry II A* gene. The *cry II A* gene was cloned to pTZ18R vector including *orf1* and *orf2*.

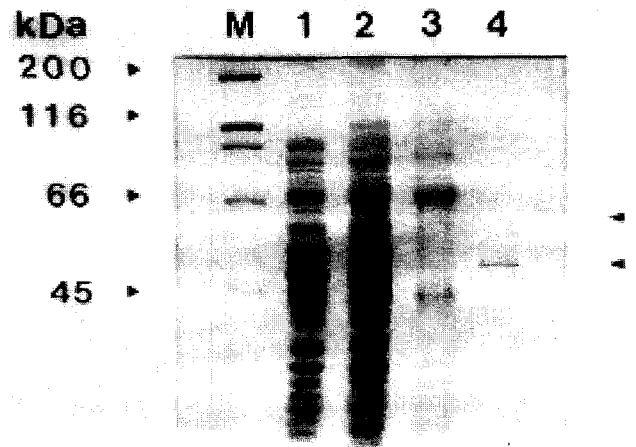


**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis patterns of *cry II A* gene. 3.95 kb fragment containing *cry II A* gene was cloned to pTZ18R vector. M, DNA size marker (1 kb ladder): Lane 1, digested pSB304 with *Bam*HI and *Hind*III; Lane 2, 3.95 kb DNA fragment containing *orf1*, *orf2*, and *cry II A* gene; Lane 3, recombinant plasmid pSB304.

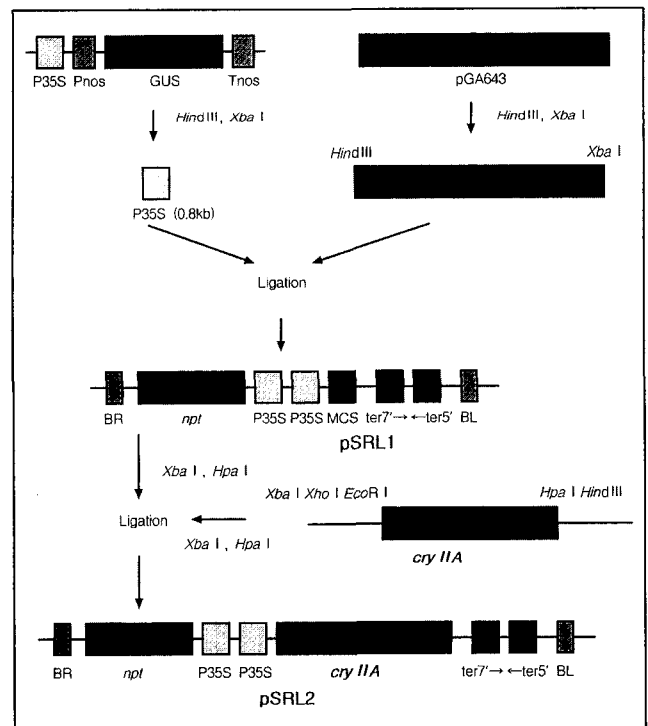
액에 대한 용해도 차이를 통해 전체 단백질로부터 분리하였다. 분리된 Cry II A 결정단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과, 약 70 kDa의 protoxin 형태의 Cry II A 결정단백질인 것으로 확인되었으며, 이를 trypsin으로 처리하여 활성화된 50 kDa의 toxin 단편을 얻을 수 있었다(Figure 3). Cry II A는 다른 결정단백질(120-130 kDa)에 비해 분자량이 작으므로, 이를 식물체 내로 도입하였을 때 전사 수준에서 또는 해독 수준에서 발생하는 식물체의 외부 유전자 발현에 대한 저항성 -- mRNA의 분해, 단백질의 분해 -- 에 대하여 다른 결정단백질보다 덜 민감하여 비교적 높은 발현을 및 지속성을 가질 수 있을 것으로 예측된다. *B. thuringiensis* 내에서 결정단백질의 발현 정도는 매우 높아서 포자형성시 전체 단백질의 30% 이상 차지하는 것으로 알려져 있으나(Agaisse and Lereclus, 1995), *E. coli* 내에서의 *cry II A* 유전자의 발현 정도는 이에 비해 비교적 낮은 것으로 확인되었다. 이는 *cry II A* 유전자의 발현 기작 중 전사에 관여하는 RNA polymerase의  $\sigma$  factor의 차이로 인하여, *B. thuringiensis*와 *E. coli*에서 유전자의 발현에 차이를 나타내는 것으로 보인다(Brown and Whiteley, 1990).

**형질전환 식물체의 제작**

형질전환에 있어서 중요한 것은 재분화율인데, *Agrobacterium*을 이용한 형질전환은 쌍자엽 식물에서 좋은 재분화율을 나타낸다(An et al., 1988). *Agrobacterium*이 감염하여 Ti 플라스미드를 전달하는데 필요한 기작이 쌍자엽 식물에만 국한되어 있다는 사실로 인해 주요 곡물인 단자엽 식물에서는 이 방법 외에 bombardment나 원형질체 융합을 통한 재분화 방법 등이 사용되고 있다. 최근 Ti 플라스미드의 전이 기작이 부분적으로 밝혀짐에 따라, 주요 곡물인 단자엽 식물에서도 인위적으로 wounded factor인 acetosyringone을 처리함으로써 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 가능하다는 것이 보고되고 있다(Sheng and Citovsky, 1996). 본 연구에서는 *Agrobacterium*을 매개로한



**Figure 3.** SDS-PAGE analysis of Cry II A crystal protein. Cry II A crystal protein was purified from *E. coli* JM103 harboring pSB304 by differential solubility in alkaline solution. The purified Cry II A crystal protein was activated by tryptic digestion. M, protein molecular weight marker: Lane 1, total proteins of the non-transformed *E. coli*; Lane 2, total proteins of the transformed *E. coli* harboring pSB304; Lane 3, the partial purified Cry II A crystal protein; Lane 4, the activated Cry II A crystal protein by tryptic digestion.



**Figure 4.** Construction of plant expression vector, pSRL2, for the transformation of *cry II A* gene into tobacco. pSRL2, for generation of transgenic tobacco having *cry II A* gene was constructed based on pGA643 and pBI121.

염편형질전환법으로 살충성을 가지는 형질전환 식물체를 제

작하고자 하였다.

식물체 내에서 *cry II A* 유전자를 발현시키기 위하여 *cry II A* 유전자에 대한 식물 발현 벡터를 제작하였다. *cry II A* 유전자의 식물 내 발현율을 높이기 위하여 Kay 등(1987)의 방법을 참조하여 두 개의 CaMV 35S promoter에 의해 유전자의 발현이 조절되는 벡터를 제작하여 *cry II A* 유전자의 형질전환에 이용하였다(Figure 4).

담배 식물의 형질전환시 *Agrobacterium* 감염 후 신초 유도 배지에서 20일 정도의 기내 배양을 거쳐 신초가 형성되어 나오는 것을 확인할 수 있었으며, 신초가 생성되는 부위 외의 잎 절편의 부위는 항생제 저항성이 없으므로 누렇게 되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 5). 선별 배지에서 1차적으로 60여 개의 신초들을 선별할 수 있었고, 항생제의 농도를 높여서 여러 번의 재선별을 거쳤다. 60여일에 거쳐 생성된 이들 신초들은, 뿌리 형성을 유도하기 위하여 농도를 절반으로 낮춘 MS 한천 배지로 옮긴 후, 25°C 광조건 하에서 기내 배양하였다. 20여일의 배양기를 거쳐 형질전환된 것으로 예상되는 여섯 개체를 얻을 수 있었다(Figure 5).

형질전환 식물체의 검정 : Southern Blot

유전자의 도입 여부를 확인하고자 담배 잎으로부터 genomic DNA를 분리한 후, 이를 제한효소 *Xba*I 또는 *Xba*I 과 *Kpn*I 으로 절단하고 전기영동하여 Southern blot을 수행하였다. 침자로는 *cry II A* 유전자의 일부분인 1.4 kb *Ban* II 제한효소 절편을 사용하였다. Southern blot을 수행한 결과, 제한효소 *Xba*I 과 *Kpn*I 으로 식물체 DNA를 절단한 경우, 2.2 kb 부근에서 침자로 사용한 *cry II A* 유전자와 상동성을 가지는 band를 형성함을 여섯 개체 중 두 개체(형질전환식물 C와 식물 E)에서 확인하였다(Figure 6). 이는 식물 발현 벡터를 *Xba*I 과 *Kpn*I 으로 처리했을 때 얻어지는 *cry II A* 유전자의 DNA 절편 길이와 동일한 것이다. 한 개체(식물 A)는 이와는 다른 크기의 band가 확인되었는데, 이는 *cry II A* 유전자의 일부가 전이되었기 때문인 것으로 여겨진다. 나머지 세 개체에서는 *cry II A* 유전자의 도입되지 않은 것으로 확인되었다. 제한효소 *Xba*I 만으로 절단한 경우, 식물 C는 두 개의 band가, 식물 E는 하나의 band가 *cry II A* 유전자와 상동성이 있는 것으로 나타났으며, 식물 A는 식물 C, E와는 다른 크기의 영역에서 상동성 있는 band가 확인되었다(Figure 6). 현상된 필름에 나타난 방사성 동위원소의 감광도를 고려해 볼 때, 식물 C는 두 개의 *cry II A* 유전자가 genome 상의 서로 다른 위치에 삽입된 것으로, 식물 E는 한 개의 유전자가 삽입된 것으로 분석된다. 이러한 유전자 copy 수의 차이가 유전자 발현 및 산물의 생산에 미치는 영향 등은 앞으로 더 연구할 부분이라 사료된다. 도입된 *cry II A* 유전자의 genome 내 안정화를 위해서는 자가 교배를 통한 *cry II A* 유전자의 우성화가 필요하며, 유전자 수의 차

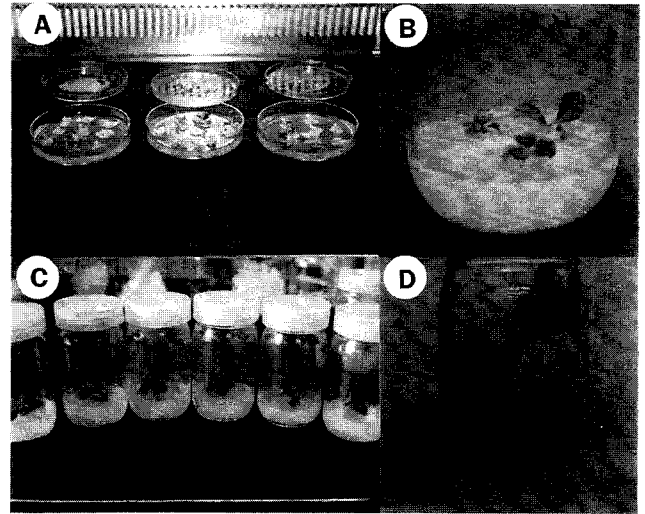


Figure 5. Regeneration of the transformed tobacco. Tobacco was transformed by *Agrobacterium*-mediated leaf disc transformation. A, Plant regeneration from leaf disc cultures: B, Shoot elongation on shoot induction media: C, Root induction on root induction media: D, Complete regeneration.

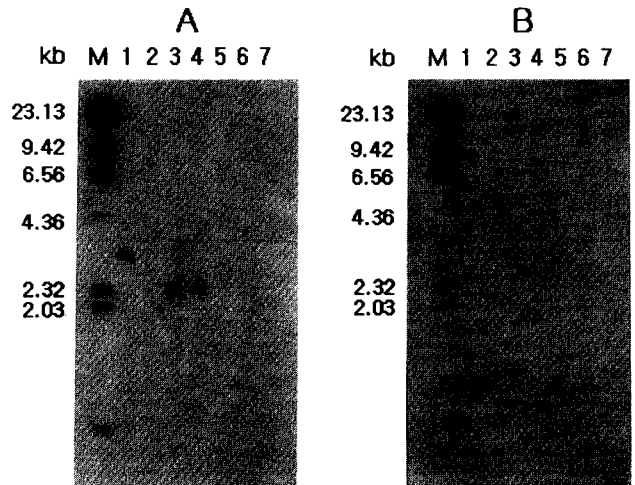


Figure 6. Southern blot analysis of the putative transgenic tobacco. DNA blots were probed with <sup>32</sup>P-labelled *cry II A* gene sequence. A, M, molecular weight marker ( $\lambda$ /*Hind*III): Lanes 1-6, transgenic tobacco plants digested with *Xba*I and *Kpn*I (transformants A-F): Lane 7, control tobacco plant digested with *Xba*I and *Kpn*I. B, M, molecular weight marker ( $\lambda$ /*Hind*III): Lanes 1-6, transgenic tobacco plants digested with *Xba*I (transformant A-F): Lane 7, control tobacco plant digested with *Xba*I.

이를 보이는 개체들의 역교배 및 자가 교배 등을 통해 생성되는 후대 개체들은 외래 유전자의 후대 유전 양상을 연구하는데 매우 중요한 재료로 이용될 수 있을 것이다.

식물체 내에서 결정단백질의 발현 정도가 낮은 것은 그 유전자가 미생물에서 기원하여 식물과는 다른 codon usage의 선호도 및 G+C 비율을 가지기 때문인 것으로 보고되었

다(Perlak et al., 1991). 또 *cry II A* 유전자 내에 가지는 A,T의 염기 배열이 식물에서의 polyadenylation signal 과 유사하여 mRNA를 불안정하게 하기 때문인 것으로 보인다(Perlak et al., 1991). 식물 내에 존재하는 transgene silence system도 형질전환 식물에서 외래 유전자의 효율적 발현을 어렵게 하는 요인으로 보고되고 있다(Matzke and Matzke, 1995). 그러므로 식물체 내에서의 살충성 결정 단백질의 발현을 높이고 살충성을 지속적으로 갖게 하기 위해서는 식물에 도입하는 결정단백질 유전자의 염기 서열을 아미노산의 변화 없이 식물의 codon usage 선호에 맞게 치환하는 유전자의 합성 및 재조합의 과정이 필요하리라 본다. 또한 결정단백질의 밝혀진 구조를 응용하여 살충성을 나타내는 활성 부위만을 형질전환하는 것도 비교적 길이가 긴 유전자 염기 서열로 인해 생기는 불안정성을 줄이는 방법이 될 수 있을 것이다(Agaisse and Lereclus, 1995).

본 연구에서는 살충성 유전자로 알려진 *cry II A* 유전자의 *E. coli* 내 발현을 통해 Cry II A 결정단백질을 분리하였다. 또한 *cry II A* 유전자의 식물체 내 발현을 위하여 벡터를 구성하고 이를 *Agrobacterium*을 통해 담배 식물에 도입, 재분화의 과정을 거쳐 얻은 재분화 식물체 중 세 개체의 형질전환 여부를 Southern blot을 통해 확인하였다. 이 형질전환 식물은 면역학적 검정을 통하여 단백질의 생성 여부 및 정도를 분석한 후, 후대 양산을 통해 살충성 식물체의 계통화 및 살충성 결정단백질 유전자의 후대 유전 양상 연구에 이용될 수 있을 것이다.

## 적 요

*Bacillus thuringiensis*는 그람 양성 토양 세균으로 포자형성 시 결정화된 내포체를 형성하는데, 이 내포체를 구성하는 결정단백질은 각 곤충에 대하여 특이적인 독성을 나타낸다. 살충성 결정단백질 중 Cry II A 결정단백질은 인시류와 쌍시류 곤충에 모두 특이적으로 작용한다. 결정단백질은 살충체로서 불안정하고 포장에서 지속성이 낮은 단점을 가지고 있으므로, 본 연구에서는 Cry II A 결정단백질 유전자가 형질전환된 담배 식물체를 제작하고자 하였다. *cry II A* 유전자가 삽입된 벡터를 대장균에 형질전환한 후, 알칼리 용액에 대한 용해도의 차이를 이용하여 Cry II A 결정단백질(70 kDa)을 분리하였고, 분리한 Cry II A 결정단백질을 trypsin 처리하여 활성화된 Cry II A (50 kDa)를 확인하였다. 식물 형질전환을 위하여 두 개의 CaMV 35S promoters에 의해 발현이 조절되는 식물 발현 벡터에 *cry II A* 유전자를 클로닝 하였다. 이 식물 발현 벡터를 *Agrobacterium*을 이용한 엽편형질전환을 통해 담배(*N. tabacum* var. Petit Havana SR1)에 형질전환 시켰으며, 재분화 과정을 거쳐 여섯 개체의 형질전환 식물체를 얻었다. Southern blot을 통하여 분석한 결과

세 개체 내에 *cry II A* 유전자가 존재하였는데, 한 개체에는 하나의 *cry II A* 유전자가, 또 한 개체에는 두 개의 *cry II A* 유전자가, 다른 한 개체에는 잘려진 형태의 *cry II A* 유전자가 존재함을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 얻어진 *cry II A* 형질전환 식물체는 살충성 검정 등을 거친 후 내충성 식물 생산 및 후대 유전 양상 분석을 위한 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

## 인용문헌

- Agaisse H, Lereclus D (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? J Bacteriol 177: 6027-6032
- An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary vectors, In Plant Molecular Biology Manual, Publishing staff, eds, Kluwer Academic Publishers, Belgium, pp A3: 1-19
- Aronson AI (1993) The two faces of *Bacillus thuringiensis* : insecticidal proteins and post-exponential survival. Mol Microbiol 7: 489-496
- Aronson AI, Beckman W, Dunn P (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol Rev 50: 1-24
- Brown KL, Whiteley HR (1990) Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. J Bacteriol 172: 6682-6688
- Cho HS (1995) Transformation of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) with a Bt insecticidal gene. PhD dissertation, Kyungpook National University, Daegu, Korea.
- Crickmore N, Ellar DJ (1992) Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned Cry II A  $\delta$ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. Mol Microbiol 6: 1533-1537
- Du C, Martin PAW, Nickerson KW (1994) Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Appl Environ Microbiol 60: 3847-3853
- Feinberg AP, Vogelstein B (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132: 6-13
- Ge AZ, Shivarova NI, Dean DH (1989) Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin protein. Proc Natl Acad Sci USA 86: 4037-4041
- Gill SS, Cowies EA, Pietrantonio PV (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu Rev Entomol 37: 615-636
- Höfmann C, Luthy P, Hutter R, Pliska V (1988) Binding of delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur J Biochem 173: 85-91
- Hofte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev 53: 242-255

- Jenkins JN, Parrott WL, McCarty JC Jr, Callahan FE, Berberich SA, Deaton WR (1993) Growth and survival of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton containing a truncated form of the delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol* **86**: 181-185
- Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**: 1299-1302
- Kwon M, Oshima RG (1992) JunB does not inhibit the induction of c-Jun during the retinoic acid induced differentiation of F9 cells. *Developmental Dynamics* **193**: 193-198
- Lambert B, Peferoen M (1992) Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience* **42**: 112-122
- Lee MK, Milne RE, Ge AZ, Dean DH (1992) Location of *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *J Biol Chem* **67**: 115-3121
- Matzke MA, Matzke AJM (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? *Plant Physiol* **107**: 679-685
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* **76**: 815-829
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3324-3328
- Salm T, Bosch D, Hon e G, Feng L, Munsterman E, Bakker P, Stiekema WJ, Bert V (1994) Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis cry I Ab* and *cry I C* genes: a resistance management strategy. *Plant Mol Biol* **26**: 51-59
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Preparation and transformation of competent *E. coli*. In *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp 1.74-1.84
- Sheng J, Citovsky V (1996) *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell* **8**: 1699-1710
- Tai HT, Tanksley SD (1990) A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Mol Biol Report* **8**: 297-303
- Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, De Beuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, Leemans J (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* **328**: 33-37
- Whiteley HR, Schnepf HE (1986) The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann Rev Microbiol* **40**: 549-576
- Widner WR, Whiteley HR (1989) Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J Bacteriol* **171**: 965-974

(1997년 6월 27일 접수)