

*Bacillus thuringiensis*의 CryI과 CytA 단백질의 형태와 용해도에 대한 숙주의 영향

안병구* · 김무기

전북대학교 농화학과

초 록 : *B. thuringiensis*에서 분리된 *cryIB*, truncated *cryIB*[*cryIB*(α)], *cryIA*(b), 및 *cytA* 유전자를 *E. coli*-*Bacillus*의 shuttle vector인 pBES에 cloning하여 이 유전자의 동종 혹은 이종발현과 이들 형질전환된 균주에서 생성되는 살충성 결정 단백질의 형태와 특성을 조사하였다. *E. coli*와 *Bacillus*의 형질전환은 electroporation으로 이루어졌으며, 효과적인 형질전환을 위한 field strength와 resistance는 *E. coli*의 경우 11.0 kV/cm와 129 ohms였고, *Bacillus*의 경우에는 4.5 kV/cm와 48 ohms였다. *E. coli*나 *Bacillus*에서 형성되는 살충성 결정 단백질의 전자현미경적인 형태는 원래의 숙주에서 형성된 것과 동일하여 CryIB와 CryIA(b)는 bipyramid 형이고, CytA는 부정형이었으며, 크기는 *E. coli*에서 형성된 것이 *Bacillus*에서 형성된 것 보다 작았다. Alkaline pH에서의 살충성 결정 단백질의 용해도는 *E. coli*의 경우 pH의 증가에 따라 점진적으로 증가되었으나, *Bacillus*의 경우에는 pH 9까지는 점진적으로 증가하다가 pH 9 이상에서는 큰 폭으로 증가하여 *E. coli*의 경우보다 2배 이상의 차이를 보였다. (1997년 11월 20일 접수, 1997년 12월 22일 수리)

서 론

*Bacillus thuringiensis*는 포자를 형성하면서 동시에 결정성 단백질을 생성하는 gram 양성 세균이다.^{1,2)} 이 결정성 단백질들은 나비목 유충, 파리목 유충 및 딱정벌레목 유충에 대해 독성³⁾을 나타내지만 꿀벌, 포식성곤충, 기생충, 포식성 응애와 거미 등을 포함한 다른 생물에는 안전하기 때문에 살충제로 이용하여 왔다.⁴⁾

Schnepf와 Whiteley⁵⁾가 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 살충성 결정 단백질 유전자를 *E. coli*에 cloning한 이후로 *B. thuringiensis*의 살충성 결정 단백질 특성 연구에 사용되는 단백질 재료를 대부분 *E. coli*에 형질전환시켜 사용하여 왔다.^{6,7)} 그러나 형질전환 기술의 발달로 *B. thuringiensis*의 살충성 결정 단백질을 유전자를 형질전환할 수 있는 여러 가지 방법들이 발표되었고,^{2,8-10)} *B. thuringiensis* 균주간에, *B. thuringiensis*와 다른 *Bacillus*간에 plasmid 교환이 가능하게 되었다.^{11,12)} 이로 인해 유전자의 발현과 살충성 결정 단백질 연구에 많은 도움이 되고 있으며, 이 중에서 electroporation 방법은 형질전환이 쉽고 효율이 높기 때문에 *B. thuringiensis*의 살충성 결정 단백질 유전자를 *E. coli*에 형질전환하는데 이용하고 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 하지만 *E. coli*에서 이종발현되어 생성된 살충성 결정 단백질의 구조적인 특성과 성질이 원숙주에서 생성된 것과 어떠한 차이가 있는지에 대해서는 면밀히 검토된 보고가 극히 드물다. 이 문제는 살충성 결정 단백질 유전자의 발현기작과 단백질의 생성 및 특성에 대한 기초적인 연구뿐만 아니라 *B. thuringiensis*에서 생성되는 살충성 결정 단백질의 생물공학적 또는 산업적 응용을

위해서도 반드시 검토되어야 할 사항이다.

따라서 본 연구에서는 *B. thuringiensis*의 살충성 결정 단백질 생성과 그 특성에 대한 숙주의 영향을 조사하기 위해 *E. coli*와 *Bacillus*를 동시에 형질전환시킬 수 있는 binary vector를 사용하여 *cryI*과 *cytA* 유전자가 *E. coli*와 *B. thuringiensis*를 포함한 *Bacillus* 숙주에서 어떻게 살충성 결정 단백질을 생성하는지를 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 cry(crystal negative), *B. thuringiensis* 407(crystal negative), *B. cereus* 569, *B. sphaericus* 2362, 및 *E. coli* GM 48, DH5 α , JM83, JM109 등 이었고, *B. thuringiensis*와 *B. cereus* 배양에는 G-tris 배지,¹⁶⁾ *B. sphaericus* 배양에는 MBS 배지,¹⁷⁾ *E. coli* 배양에는 Luria-Bertani(LB) broth²⁰⁾를 사용하였으며, 모든 배지는 121°C에서 15분간 습식살균하여 사용하였다.

유전자 및 plasmid

살충성 결정 단백질 CryIB, CryIA(b) 및 CytA를 각각 생성하는 *cryIB*, *cryIA*(b) 및 *cytA* 유전자와 *cryIB*(α)(*cryIB*의 PvuII-HindIII 부분, 3.2 kb) 유전자를 shuttle vector인 pBES¹⁹⁾에 Fig. 1과 같이 삽입하여 균주를 형질전환하는데 사용하였다. 이 유전자들은 미국 Washington 대학교의 R. D. Bradley 박사로부터 분양받았다.

찾는말 : *Bacillus thuringiensis*, *E. coli*, 살충성 결정 단백질, 형질전환, 용해도

*연락처

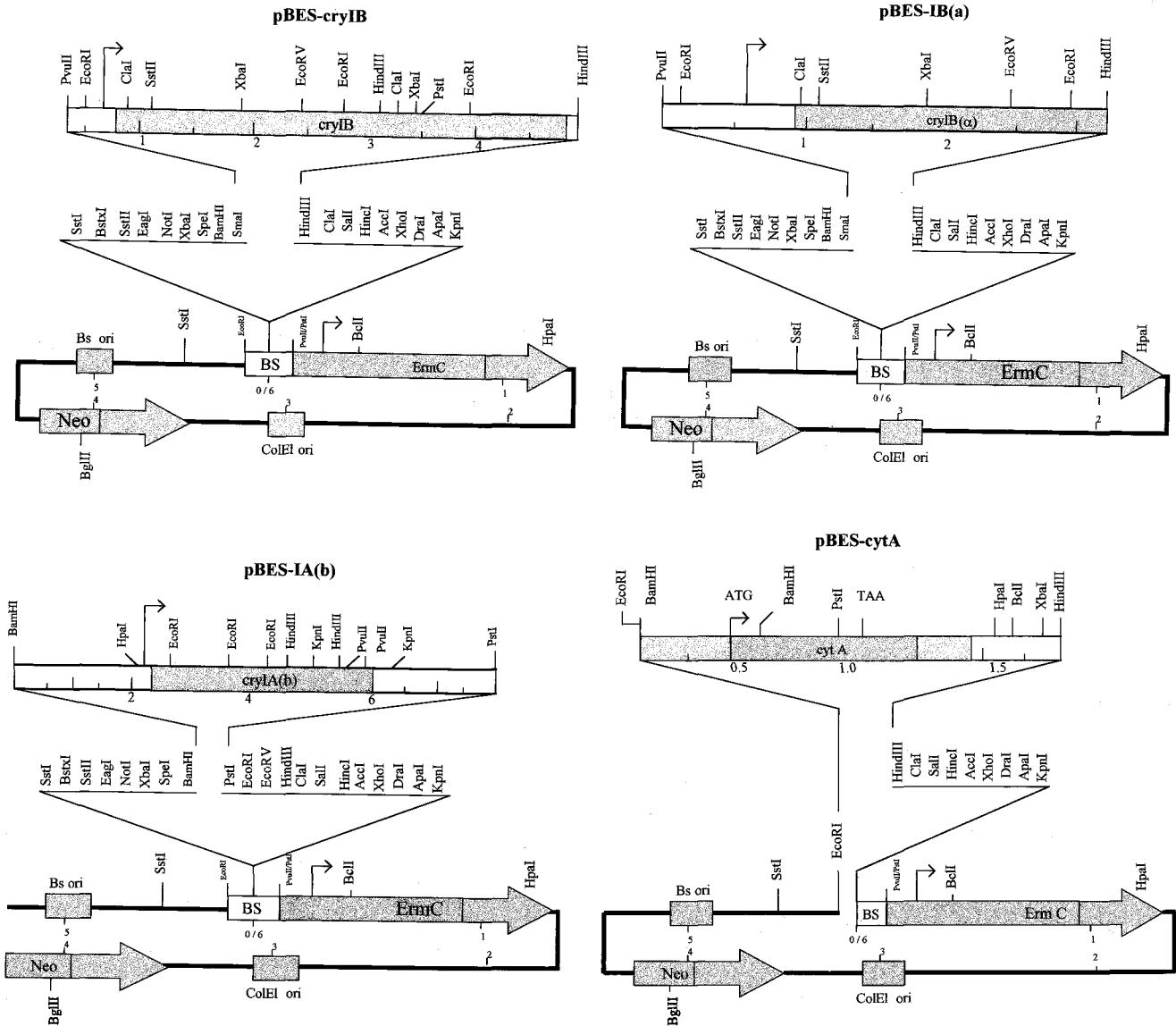


Fig. 1. Restriction maps of plasmids pBES-cryIB, pBES-cryIB(α), pBES-cryIA(b), and pBES-cytA.

pBES는 neomycin과 erythromycin에 대한 저항성을 지니고 있어 형질전환된 *E. coli*는 neomycin 20 g/ml에서, *Bacillus*는 neomycin 10 g/ml와 erythromycin 5 g/ml를 동시에 함유하는 배지에서 선발하였다.

형질전환

cryIB, *cryIB(α)*, *cryIA(b)* 및 *cytA* 유전자를 *E. coli*와 *Bacillus*에 형질전환시키기 위해 Dower 등¹⁹⁾과 Bone과 Ellar²⁰⁾의 방법을 변형하여 Electro cell manipulator ECM 600 (BTX Inc, CA, USA)을 사용하여 electroporation 방법으로 실시하였다.

*Bacillus*와 *E. coli*를 미리 30°C와 37°C로 조정된 L-broth (pH 7.0, 1% bactotryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl)에 각각 접종·배양하면서 균체밀도가 spectrophotometer의 OD₆₀₀이 0.3~0.5에 이르렀을 때 원심분리(4°C, 4,000 rpm, 5분)하여 회수하였다.

회수된 *Bacillus*는 HG buffer(1 mM HEPES, pH 7.0, 10% glycerol)로 세척한 다음 균체밀도가 10⁹~10¹⁰ cells/ml 수준이 되도록 HG buffer로 현탁시켜 얼음에 보관하고, 이 현탁액 100 μl를 1.5 ml microfuge tube에 옮기고 DNA 1 μl(0.2 μg/μl)를 첨가한 다음 얼음에서 10분간 보관한 후 미리 차갑게한 0.2 cm gap electroporation cuvette에 옮기고 pulse를 가하였다. Pulse가 끝난 직후 바로 얼음에 넣어 10분간 보관한 다음 2배 농도의 LB broth(1% glucose 함유) 400 μl를 cuvette에 가하고, 조심스럽게 현탁시켜 1.5 ml의 microfuge tube에 옮기고 30°C에서 1시간 동안 진탕 배양하다가 0.24 μg/ml erythromycin이 들어 있는 2배 농도의 LB broth (1% glucose 함유) 500 μl를 가하고 다시 30분동안 진탕 배양하였다. 이 배양액 150 μl를 취해서 10 μg/ml의 neomycin과 5 μg/ml의 erythromycin이 함유되어 있는 LB-agar 배지에 펼쳐 30°C에서 24시간 배양하고, 생성된 colony 수를 조사하여 형질전환 효율(transformation efficiency)을 계

산하였다.

회수된 *E. coli*는 살균수로 세척하고, 여과살균된 10% glycerol로 현탁시켜 원심분리한 후 세포 밀도가 $10^9 \sim 10^{10}$ cells/ml 수준이 되도록 10% glycerol로 현탁시켜 얼음에 보관하고, 이 현탁액 50 μ l를 미리 차갑게한 0.2 cm gap electroporation cuvette에 넣고 DNA 0.5 μ l(0.2 μ g/ml)를 첨가하여 1분간 얼음에 보관한 후 cuvette에 pulse를 가하고난 즉시 0.95 ml의 차가운 SOC(2% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) broth를 가하고 37°C에서 1시간 동안 200 rpm으로 배양하였다.

이 배양액 150 μ l를 취해 20 μ g/ml의 neomycin이 함유되어 있는 LB-agar 배지에 펼치고 37°C에서 하룻밤 배양하여 생성된 colony 수를 조사하여 형질전환 효율을 계산하였다.

살충성 결정 단백질의 분리과 정제

형질전환된 *Bacillus*를 G-tris 배지와 MBS 배지에 접종 배양하여 포자형성과 세포용해가 완료되면 수확하고, 60%, 65%, 72%, 80% sucrose 농도 구배 원심분리 방법(4°C, 20,000 rpm, 2시간)으로 정제하였고, 형질전환된 *E. coli*는 LB-broth에 24시간 배양한 후 수확하고 lysis solution(0.01% lysozyme, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 가하고 30초씩 초음파처리를 하면서 위상차 현미경(x1000)으로 cell lysis를 확인하고 원심분리하여 정제하였다.

살충성 결정 단백질의 형태 관찰

형질전환된 균주를 각각의 배지에 접종 배양하면서 형질전환된 *Bacillus*는 세포내 포자와 결정 단백질의 형태가 위상차 현미경(x1000)으로 관찰될 때, *E. coli*는 24시간이 경과했을 때 회수하여 Bechtel의 방법²¹⁾으로 처리한 후 transmission electron microscopy(TEM, EM10C, Carl Zeiss)로 관찰하였다. 한편 scanning electron microscopy(SEM, JSM-5410W, JEOL) 관찰용 시료는 형질전환된 균주에서 분리 정제한 살충성 결정 단백질을 gold coating하여 관찰하였다.

살충성 결정 단백질의 용해도 조사

정제된 살충성 결정 단백질의 용해도를 조사하기 위해 0.1M Na₂CO₃와 0.1% 2-mercaptoethanol로 된 buffer를 HCl과 NaOH로 pH 6.0~12.5까지 0.5 단위씩 pH를 조절하였다. pH가 단계별로 조정된 buffer와 정제된 살충성 결정 단백질(1.5 mg/ml in H₂O)을 1:1로 혼합하고 65°C에서 2분 동안 열처리하여 protease를 불활성화시키고, 37°C에서 1시간동안 배양하고 5분동안 원심분리후 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 비색정량²²⁾으로 용해된 단백질을 정량하였다.

결과 및 고찰

Electroporation에 의한 형질전환

살충성 결정 단백질의 유전자들을 electroporation으로 세

Table 1. Electro-transformation efficiency of host strains

Host strains	<i>cryIB</i> <i>cryIB</i> (α) ^a <i>cryIA</i> (b) <i>cytA</i>			
	-log ₁₀ transformants/ μ g DNA-			
<i>E. coli</i> GM48	8.45	7.81	8.51	4.09
<i>E. coli</i> DH5 α	8.29	7.38	8.18	3.55
<i>E. coli</i> JM83	7.87	7.12	7.82	3.63
<i>E. coli</i> JM103	8.57	8.45	8.03	4.39
<i>B.t. kurstaki</i> HD-1 <i>cry</i> ^b	4.97	4.62	3.70	1.16
<i>B. thuringiensis</i> 407 <i>cry</i> ^c	4.53	4.25	4.53	1.30
<i>B. cereus</i> 569	2.98	- ^c	2.63	1.10
<i>B. sphaericus</i> 2362	1.88	-	1.70	-

^aTruncated *cryIB*

^b*cry*, crystal negative

^cNo transformant

균에 형질전환한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 vector pBES를 사용하여 *cryIB*, *cryIB*(α), *cryIA*(b) 및 *cytA* 유전자를 *E. coli*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* 및 *B. sphaericus*의 동종 및 이종숙주에 빠르고, 쉽게 도입시킬 수 있어서 세균의 형질전환을 위한 electroporation의 효율성^{13,20,23)}을 잘 입증해주고 있다. 또한 electroporation의 형질전환 효율은 사용되는 DNA의 종류와 양, 숙주의 종류, 세포밀도, 세포 조제방법, 또는 사용되는 기기의 특성화 조건 등의 요인에 따라 크게 영향을 받는다는 사실^{10,24-27)}도 입증되었다.

또한 *Bacillus*의 경우보다는 *E. coli*의 경우에 형질전환 효율이 높았으나, 같은 숙주에서도 DNA에 따라 큰 차이가 있었다. *E. coli*의 형질전환율($10^7 \sim 10^8$ transformants/ μ g DNA)은 다른 연구결과와 비슷하나, *Bacillus*의 경우는 좀 낮은 편이라고 볼 수 있다.^{10,13)} 특히 *B. sphaericus*는 여러 균주를 시도했으나 *B. sphaericus* 2362에서 *cryIB*와 *cryIA*(b) 유전자의 경우에만 형질전환이 가능했고, 전환효율도 지극히 낮았다. 형질전환된 모든 숙주에서 분자량이 제일 작은 *cytA*의 경우가 형질전환 효율이 가장 낮은 것은 다른 연구결과^{15,28,29)}에서도 나타났는데, 형질전환 효율이 DNA 분자의 크기만으로 결정되는 것은 아니라는 것을 보여주고 있다.

효과적인 형질전환을 위한 electroporation의 조건은 field strength와 resistance는 *E. coli*의 경우 11.0 kV/cm와 129 ohms였고, *Bacillus*의 경우에는 4.5 kV/cm와 48 ohms였다. *E. coli*나 *Bacillus*의 형질전환 효율을 증대시키기 위해서는 field strength와 resistance를 증대시킬 필요가 있었지만, electroporation 후 세포의 생존율은 비례적으로 감소하였다(data 미제시).

한편 형질전환된 *E. coli*와 *Bacillus* 숙주들을 각각의 배지에 접종 배양하여 SDSPAGE와 Western blot으로 분석한 결과 각각 131 kDa(CryIB), 89 kDa[CryIB(α)], 131 kDa[CryIA(b)], 또는 27 kDa(CytA) 단백질을 생성하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

살충성 결정 단백질의 형태적 특성

cryIB, *cryIB*(α), *cryIA*(b), 및 *cytA* 유전자로 형질전환된 *E. coli* 또는 *Bacillus*에서 생성된 CryIB, CryIB(α), CryIA(b) CytA 단백질의 구조를 전자현미경으로 조사하였다. Figs

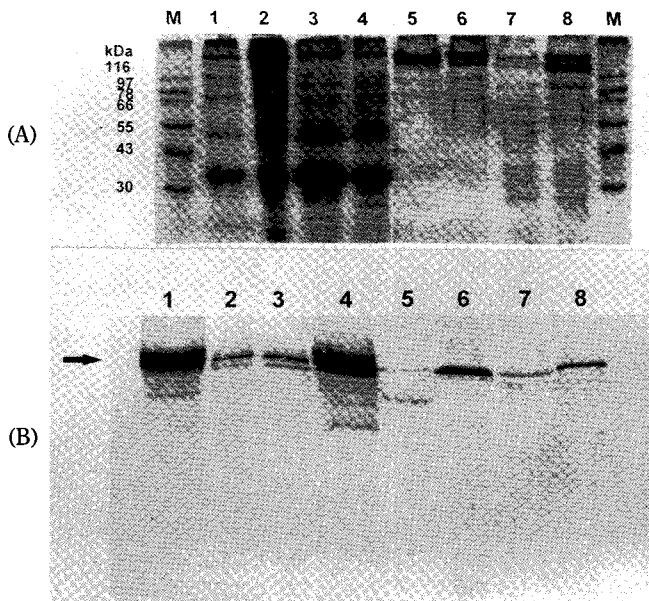


Fig. 2. SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of CryIB protein produced by recombinant *E. coli* and *Bacillus* strains. Lanes : M, standard protein maker; 1, *E. coli* GM48; 2, *E. coli* DH5 α ; 3, *E. coli* JM83; 4, *E. coli* JM103; 5, *B.t. kurstaki* HD-1 cry; 6, *B. thuringiensis* 407; 7, *B. cereus* 569; 8, *B. sphaericus* 2362.

3과 4에서 보는 바와 같이 *E. coli*에서 형성되는 살충성 결정 단백질들은 *Bacillus*에서 형성되는 단백질 보다 크기는 작지만, 모양은 같은 형태를 이루고 있었다. Shimizu와 Ohkawa³⁰도 *B.t. aizawai*의 130 kDa 단백질을 *E. coli* JM 103에 재조합시켜 bipyramid 형태의 살충성 결정 단백질이 생성됨을 확인했었다.

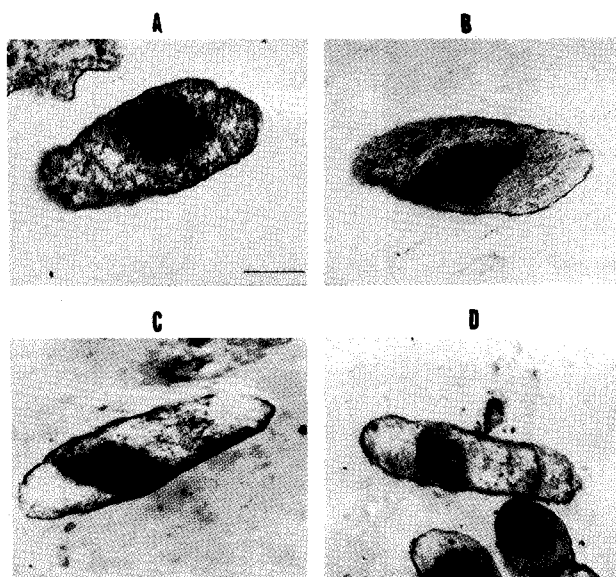


Fig. 3. Transmission electron micrographs of CryIB(A), CryIB(α)(B), CryIA(b)(C), and CytA(D) insecticidal crystal proteins from transformed *E. coli* DH5 α . Bar represents 100 nm (x40,000).

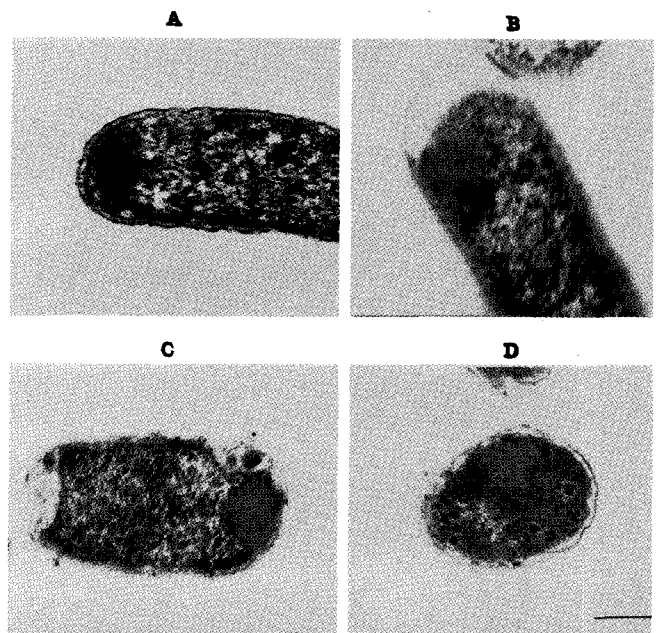


Fig. 4. Transmission electron micrographs of CryIB(A), CryIB(α)(B), CryIA(b)(C), and CytA(D) insecticidal crystal proteins from transformed *E. coli* JM103. Bar represents 100 nm (x40,000).

형질전환된 *E. coli* GM48 균주에서 생성되는 CryIB, CryIB(α), CryIA(b) 단백질을 scanning electron microscopy 로 관찰한 결과 Fig. 5와 같이 bipyramid 형태를 이루고 있었고, CytA 단백질은 일정하지 않은 비정형 형태를 이루고 있었는데, 이는 *cytA* 유전자를 *B. subtilis*, *B. megaterium*, 및 *B. thuringiensis*에 재조합시킨 후 생성된 CytA 단백질의 크기는 포자보다 훨씬 작았고, 모양은 불규칙한 형태이었다는 보고³¹⁻³³와 일치했다.

한편 Fig. 6, 7, 및 8에서 보는 바와 같이 재조합 *B. thuringiensis*, *B. cereus* 569, *B. sphaericus* 2362에서 생성되

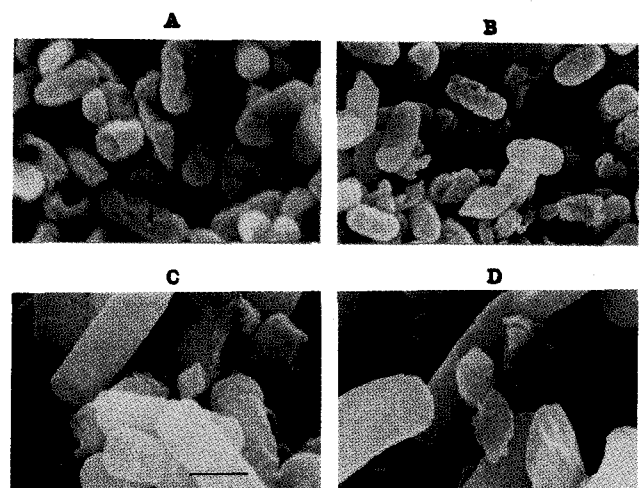


Fig. 5. Scanning electron micrographs of CryIB(A), CryIB(α)(B), CryIA(b)(C), and CytA(D) insecticidal crystal proteins from transformed *E. coli* GM48. Bar represents 1 nm (x35,000).

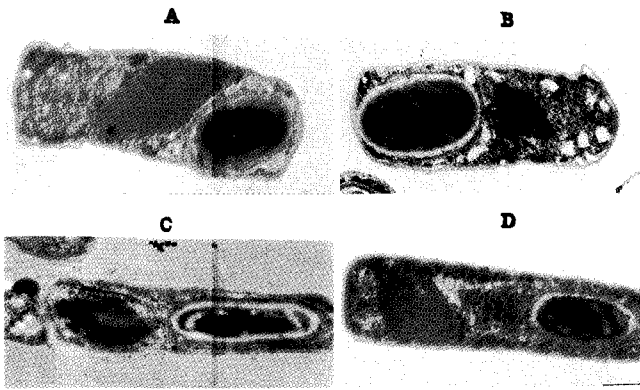


Fig. 6. Transmission electron micrographs of CryIB(A), CryIB(α)(B), CryIA(b)(C), and CytA(D) insecticidal crystal proteins from transformed *B.t. kurstaki* HD-1 cry. Bar represents 200 nm(x25,000).

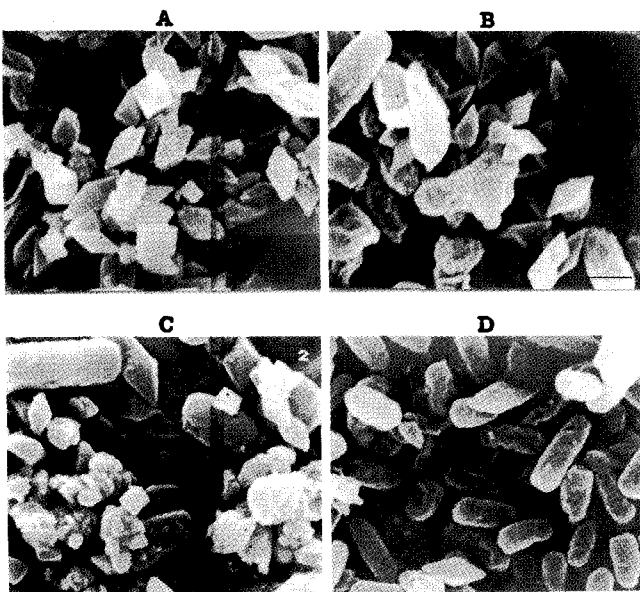


Fig. 7. Scanning electron micrographs of CryIB(A), CryIB(α)(B), CryIA(b)(C), and CytA(D) insecticidal crystal proteins from transformed *B. thuringiensis* 407 cry. Bar represents 1 nm(x15,000).

는 CryIB, CryIB(α), CryIA(b) 단백질들 모두 bipyramid 형태를 이루고 있었지만, CytA 단백질은 약간 둥근 형태였다.

이상의 전자현미경적 관찰로 볼 때 *B. thuringiensis*에서 생성되는 살충성 결정 단백질은 숙주를 변환시켜도 형태적으로는 변화가 없었지만, 살충성 결정 단백질의 크기는 *Bacillus*에서 생성된 것 보다 *E. coli*에서 생성되는 것이 작았음을 알 수 있었다.

살충성 결정 단백질의 화학적 특성

*B. thuringiensis*의 살충성 결정 단백질의 유효성은 당해 곤충의 장내 alkaline pH에서 그 단백질의 용해도에 좌우된다.³⁴⁾ 즉 *B. thuringiensis*에서 생성된 결정 단백질 가운데 살충성이 있는 것은 pH 9.5~10.5 범위의 완충용액에서 잘 용해되고, 비독성인 결정 단백질은 pH 12 이상에서만 용해되

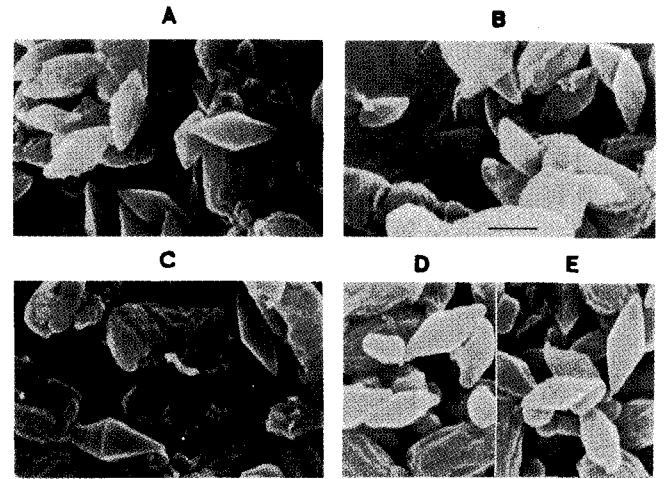


Fig. 8. Scanning electron micrographs of CryIB(A), CryIA(b) (B), and CytA(C) insecticidal crystal proteins from transformed *B. cereus* 569, and CryIB(D) and CryIA(b)(E) insecticidal crystal proteins from transformed *B. sphaericus* 2362. Bar represents 1 nm (x15,000).

는 화학적 특성을 나타낸다. 따라서 형질전환된 *E. coli*와 *Bacillus*에서 생성된 *B. thuringiensis*의 결정 단백질의 살충성 여부는 alkaline pH에서의 용해도를 기준으로 예측할 수 있다.

CryIB, CryIB(α), CryIA(b) 및 CytA 단백질 모두 사용된 모든 균주에서 *E. coli*의 경우 보다 *Bacillus*의 경우가 pH 9.5 이상에서의 용해도는 월등히 컸다(Fig. 9).

또한 pH 증가에 따른 용해도의 증가가 *E. coli*에서는 점진적으로 이루어졌으나 *Bacillus*의 경우에는 pH 9을 중심으로 용해도의 증가가 급진적으로 이루어졌다. 특히 *E. coli*의 경우에는 균주간이나 pH 상승에 따른 용해도 정도는 큰 차이가 없는데 반하여 *Bacillus*에서는 균주간에 큰 차이를 보여 주고 있다. 이와같은 용해도의 차이와 pH 변화에 따른 용해도 변화의 형태가 각 결정 단백질의 실제 살충능력과 어떤 관계가 있는 것인가에 대해서는 별도의 연구검토가 필요하다고 본다.

Bradley 등³⁵⁾은 pH 9.5 이상에서 용해된 CryIB 단백질이 감자나방(*Phthorimaea operculella*)과 배추흰나비(*Artogeia rapae*) 유충에 독성이 있었고, 형질전환된 *E. coli*에서 생성된 CryIB 단백질도 똑같이 독성이 있었다고 했고, Brizzard 등³⁶⁾도 형질전환된 *E. coli*에서 생성된 CryIB 단백질이 *Artogeia rapae* 유충에 독성이 있다고 했다. 김 등³⁶⁾은 *cryIA(b)* 유전자를 *E. coli*에 형질전환 시켰을 때 본래의 CryIA(b) 단백질과 같은 구조와 특성을 나타냈고, *P. fluorescense*에서도 bipyramid 형태의 모양이 관찰되었다고 했다. McLean과 Whiteley¹⁴⁾도 *cytA* 유전자로 형질전환된 *E. coli*의 추출물에서 용혈성과 *Aedes aegypti* 유충에 대해 독성이 있다고 했고, 다른 연구³⁷⁾에서도 *cytA* 유전자를 *E. coli*에 형질전환시킨 후 이 균주의 추출물이 용혈성과 독성이 있다고 하였다.

이상에서 검토한 바와 같이 *cryIB*, *cryIB(α)*, *cryIA(b)* 및 *cytA* 유전자들은 electroporation을 통하여 *E. coli* 혹은 *Ba-*

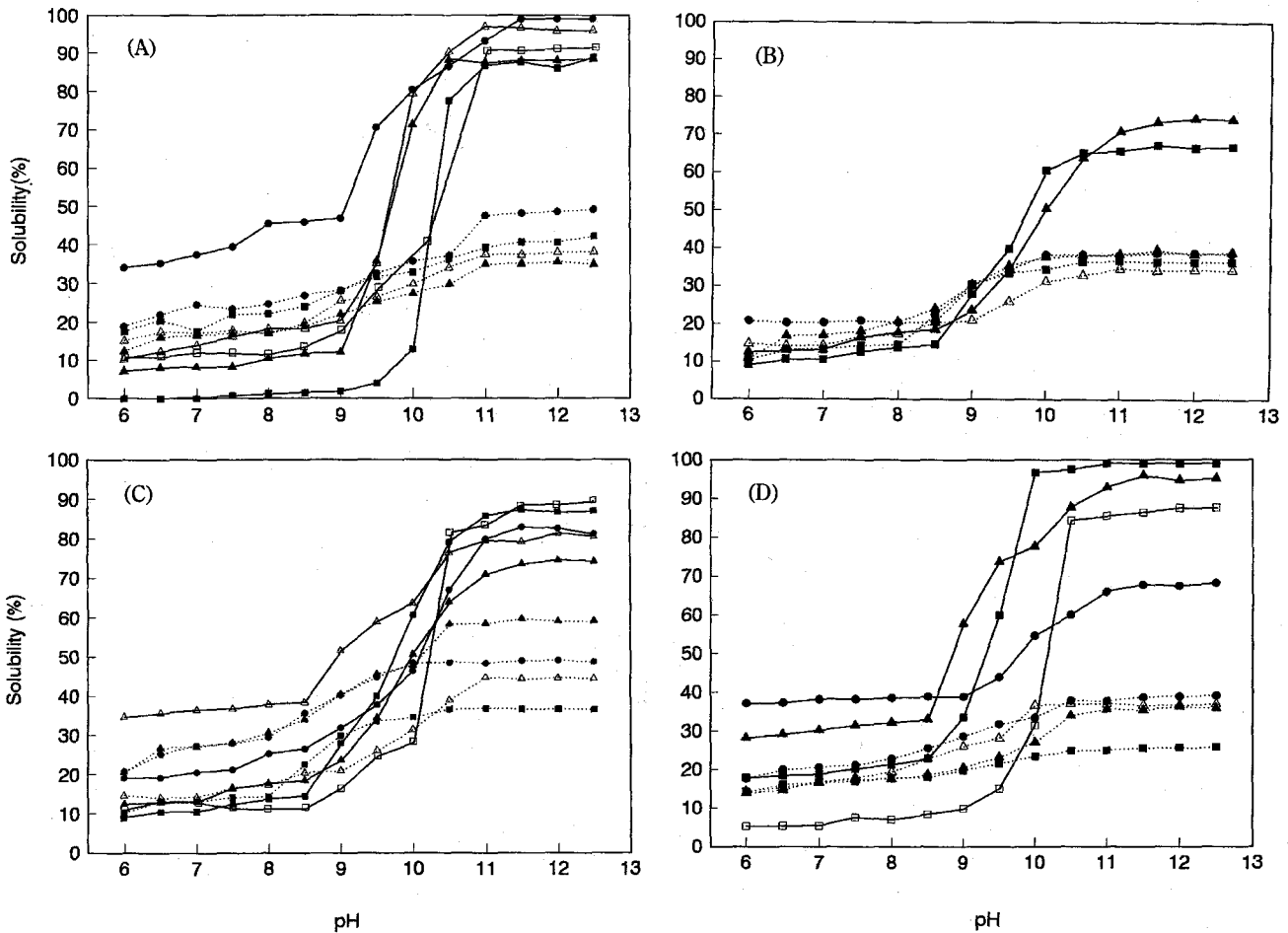


Fig. 9. The solubility of CryIB(A), CryIB(α)(B), CryIA(b)(C) and CytA(D) insecticidal crystal proteins from transformed *E. coli* and *Bacillus* strains. \square — \square , native protein; \blacksquare — \blacksquare , *E. coli* GM48; \blacktriangle — \blacktriangle , *E. coli* DH5 α ; \bullet — \bullet , *E. coli* JM83; \triangle — \triangle , *E. coli* JM103; \blacksquare — \blacksquare , *B. t. kurstaki* HD-1 cry; \blacktriangle — \blacktriangle , *B. thuringiensis* 407 cry; \bullet — \bullet , *B. cereus* 569; \triangle — \triangle , *B. sphaericus* 2362.

*cillus*에서 다같이 형질전환되어 각각 고유의 형태로 동중 혹은 이종 숙주에서 발현되어 살충성 결정 단백질을 생성하였는데 그 형태적인 특성은 숙주간에 차이가 없었지만, 용해도는 pH 9.5 이상에서 2 배 이상의 차이를 보였다.

참고문헌

1. Bullar, Jr, L. A., A. W. Nickerson, T. L. Mounts and J. J. Iandole (1985) In Spores IV, p. 250. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
2. Aronson, A. I., W. Beckman and P. Dunn (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**, 1-24.
3. Höfte, H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242-255.
4. Bernhard, K. and R. Utz (1993) Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. In *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice (P. F. Entwistle, Eds.), p. 256-267. John Wiley & Sons Ltd.
5. Schnepf, H. and H. R. Whiteley (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 2893-2897.
6. McLinden, J. H., J. R. Sabourin, B. D. Clark, D. R. Gensler, W. E. Warkman, and D. H. Dean. 1985. Cloning and expression of an insecticidal k-73 type crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* into *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 623-628.
7. Angsuthanasombat, C., W. Chungjatupornchai, S. Kertbundit, P. Luxananil, C. Settasatian, P. Wilarirat, and S. Panyim. 1987. Cloning and expression of 130-kd mosquito larvicidal δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 384-389.
8. Barsomian, G. D., N. J. Robillard and C. B. Thorne (1984) Chromosomal mapping of *Bacillus thuringiensis* by transduction. *J. Bacteriol.* **157**, 746-750.
9. Heierson, A., R. Landen, A. L. vgren, G. Dalhammar and H. G. Boman (1987) Transformation of vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **169**, 1147-1152.
10. Schurter, W., M. Geiser and D. Mathe (1989) Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* via electroporation: transformation of acrylliferous strains with a cloned delta-endotoxin gene. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 177-

- 181.
11. Gonzalez, J. M., B. J. Brown and B. C. Carlton (1982) Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 6951-6955.
 12. Jarrett, P. and M. Stephenson (1990) Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1608-1614.
 13. Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.
 14. McLean, K. M. and H. R. Whiteley (1987) Expression in *Escherichia coli* of a cloned crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* **169**, 1017-1023.
 15. Visick, J. E. and H. R. Whiteley (1991) Effect of a 20-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on production of the CytA protein by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 1748-1756.
 16. Aronson, A. I., N. Angelo and S. C. Holt (1971) Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T: characterization of mutants producing altered amounts of protease. *J. Bacteriol.* **106**, 1016-1025.
 17. Kalfon, A., I. Larget-Thierry, J. F. Charles and H. de Barjac (1983) Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 168-173.
 18. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) Molecular cloning a laboratory manual(2nd Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 19. Bradley, D., M. A. Harkey, M. K. Kim, K. D. Biever and L. S. Bauer (1995) The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **65**, 162-173.
 20. Bone, E. J. and D. J. Ellar (1989) Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**, 171-178.
 21. Bechtel, D. B. and L. A. Bulla, Jr (1976) Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **127**, 1472-1481.
 22. Bradford, M. M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
 23. Sawahel, W. and D. Cove (1992) Gene transfer strategies in plants. *Biotechnol. Adv.* **10**, 393-412.
 24. Belliveau, B. H and J. T. Trevors (1989) Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1649-1652.
 25. Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux and M. M. Lecadet (1989) Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**, 211-218.
 26. Mahillon, J., W. Chungatupornchai, J. Decock, S. Dierickx, F. Michiels, M. Peferoen and H. Joos (1989) Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**, 205-210.
 27. Masson, L., G. Prefontaine and R. Brousseau (1989) Transformation of *Bacillus thuringiensis* vegetative cells by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**, 273-278.
 28. Adams, L. F., J. E. Visick and H. R. Whiteley (1981) A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 521-530.
 29. Wu, D. and B. A. Federici (1993) A 20-kilodalton protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **175**, 5276-5280.
 30. Shimizu, M. and H. Ohkawa (1990) Insecticidal activity and molecular breeding of *Bacillus thuringiensis*. *Nippon No-geikagaku Kaishi.* **64**, 1607-1611.
 31. Wong, H. C., H. E. Schnepf and H. R. Whiteley (1983) Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* **258**, 1960-1967.
 32. Donovan, W. P., C. C. Dankocsik and M. P. Gilbert (1988) Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* **170**, 4732-4738.
 33. Crickmore, N., E. J. Bone and D. J. Ellar (1990) Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis*; towards an improved pesticide. *Aspects Appl. Biol.* **24**, 17-24.
 34. Du, C., P. A. W. Martin and K. W. Nickerson (1994) Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystal. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3847-3853.
 35. Brizzard, B. L., H. E. Schnepf and J. W. Kronstad (1991) Expression of the *cryIB* crystal protein gene in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 59-64.
 36. Kim, Y. Y., Y. H. Rhee and H. S. Kang (1992) Expression of *Bacillus thuringiensis* HD-1 gene in rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* KR164. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **35**, 227-231.
 37. Ward, E. S. and D. L. Ellar (1988) Cloning and expression of two homologous genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* which encode 130-kilodalton mosquitocidal proteins. *J. Bacteriol.* **170**, 727-735.

Effects of Host Cell on the Morphology and Solubility of CryI and CytA Protein of *Bacillus thuringiensis*

Byung-Koo Ahn and Moo-Key Kim (Department of Agricultural Chemistry, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea)

Abstract : The *cryIB*, truncated *cryIB*[*cryIB*(α)], *cryIA*(*b*), and *cytA* genes, encoding 135-, 89-, 131-, and 27-kDa proteins, respectively, from *Bacillus thuringiensis* were cloned into a shuttle vector pBES and expressed in *E. coli* and *Bacillus* species. The morphology and solubility in alkaline buffer of the insecticidal crystal proteins were investigated. Transformation of intact cells of *E. coli* and *Bacillus* species was achieved by electroporation. High field strength of 11.0 kV/cm and resistance of 129 ohms were required for efficient transformation of *E. coli* strains and 4.5 kV/cm and 48 ohms for *Bacillus* species. Strains of recombinant *E. coli* and *Bacillus* species produced the insecticidal crystal proteins and accumulated as the same bipyramidal and irregular structures as those of CryIB and IA(*b*) and CytA of *B. thuringiensis*, respectively. The insecticidal crystal proteins accumulated in recombinant *E. coli* were smaller in size than those in recombinant *Bacillus* species. The solubility in alkaline buffer of the insecticidal crystal proteins of recombinant *E. coli* increased gradually as the pH increased, whereas in the case of *Bacillus* species the solubility increased gradually as the pH increased up to 9 and then the solubility increased greatly up to two times higher than that of *E. coli* proteins.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, *E. coli*, Insecticidal crystal protein, electroporation, solubility

*Corresponding author