

Bacillus thuringiensis cryIAa1 Type Gene의 클로닝과 발현

이형환* · 황성희 · 권혁한 · 안준호 · 김혜연 · 안성규 · 박수일
건국대학교 이과대학 생명과학과

Cloning and Expression of *Bacillus thuringiensis cryIAa1* Type Gene. Lee, Hyung Hoan*, Sung-Hei Hwang, Hyuk Han Kwon, Joon Ho Ahn, Hye Yun Kim, Seong Kyu Ahn, and Sooil Park. Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea – The over-expression in *E. coli* of the pHLN1-80(+) and pHLN2-80(-) plasmids cloned an insecticidal crystal protein (ICP) gene (*cryIAa1* type) from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 was investigated through in part, the deletion of -80 bp promoter and an alternative change of cloning vector system. Two recombinant plasmids were constructed in an attempt to analyze the over-expression of the ICP in relations to its gene structure possessing only -14 bp [Shine-Dalgarno (SD) sequence of -80 bp promoter]. Also, another two recombinant plasmids similarly cloned the *icp* gene in a different vector system. The amounts of ICP produced from the recombinants were measured by SDS-PAGE and confirmed by Western blot analysis. One clone, pHLRBS1-14 clone in which only the SD sequence in the inverted orientation *icp* gene appeared, was more evident than the pHLRBS2-14 clone in which only the -14 bp SD sequence of the right orientated *icp* gene was shown to exist. The pHLN2-80(-) clone produced more ICP proteins than the pHLRBS1-14 clone. In the two clones, pHLNUC1-80 right-oriented *icp* gene and the pHLNUC2-80 clone inverted-orientation *icp* gene in a new different vector, the pHLNUC2-80 produced more ICP proteins in *E. coli* system. These results indicate that the *Plac* promoter, the inverted *icp* gene insertion and -80 bp promoter (-66 bp part of the *icp* gene promoters), were concerned with the expression of the *icp* gene in the recombinant plasmids. In addition, the expression mechanism might result from the disruption of the transcription-suppressing regions in the promoter regions.

Key words: *B. thuringiensis*, over-expression, insecticidal protein gene, endotoxin crystal

*Bacillus thuringiensis*는 아포를 형성할 때에 단백질성 결정체로 된 δ -endotoxin(insecticidal crystal protein; ICP)를 생산을 하며, 분자량이 약 130 kDa인 단백질로 구성되어 있고, 곤충의 유충을 치사시키는 능력을 가지고 있다[1, 5, 12]. 내독소결정체는 곤충의 유충이 섭취를 하면 중장의 알칼리성 pH하에서 단백질 분해효소에 의해 활성화되어서 곤충을 치사시키는 특성[5, 12]을 이용해서 미생물살충제로 이용을 하고 있다[5, 9, 11, 13]. 내독소결정체 단백질 *icp*유전자는 플라스미드에 존재하는 것이 보고 되었으며[4, 6, 11], *icp*유전자를 클로닝하여 대장균등에서의 발현을 연구해왔다[7, 8, 10, 17].

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1 내독소의 살충성 결정체 단백질(ICP) 유전자 *cryIAa1* type를 클로닝하여 두 개의 클론 pHLN1-80(+)과 pHLN2-80(-)을 만들어서 대장균에서 *icp*유전자의 발현을 연구하였다[8]. 대장균에서 *icp* 유전자의 전사개시 부위가 역방향으로 클로닝된 pHLN2-80(-) 클론은 *icp*유전자의 전사개시 부위가 정방향으로 클로

닝된 pHLN1-80(+) 클론보다 ICP 발현량과 살충성이 높게 나타났다[8]. pHLN1-80(+) 클론에는 *icp* 유전자 프로모터의 일부인 -80 bp 프로모터를 가지고 있다. 또한 -80 bp 프로모터에는 1곳의 *DraI* 인식부위와 -14와 -4 염기서열 사이에 Shine-Dalgarno(SD) 서열이 존재한다[20, 21, 24]. *B. thuringiensis*의 결정체 단백질의 생산은 아포를 형성하는 과정 중에 아포 유전자가 연속적으로 발현이 되면서 후에 내독소결정체 단백질이 생산되기 때문에 *icp*유전자 프로모터는 다른 대장균등과는 차이가 있다고 본다. 이러한 결과를 근거로 pHLN1-80(+) 클론내의 *icp*유전자 -80 bp 프로모터의 SD서열 상류부위 염기서열의 결실이 대장균에서 *icp*유전자의 발현에 미치는 영향과, pBluescript SK(+) 이외의 다른 클로닝 운반체에서도 전사부위가 역방향으로 클로닝이 되었을 때에 대장균에서 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용한 균주 및 플라스미드

Escherichia coli XL1-blue/pBluescript SK(+)[24], *E. coli* XL1-blue/pHLN1-80과 *E. coli* XL1-blue/pHLN2-80[8], *E. coli* XL1-blue/pUC18, *E. coli* XL1-blue/pUC19 등을

*Corresponding author

Tel: 82-2-450-3426, 1235, Fax: 82-2-452-971
E-mail: hhlee@konkuk.ac.kr

Table 1. Primers used to modify the insecticidal protein gene.

Primer	Polarity	Sequences (5' → 3')	Objectives
A	+	5'-GATGGAGGTTAACTTATGG-3'	Shin-Dalgano sequence
B	-	5'-TACAGTCCTAAAGCTTCC-3'	<i>Hind</i> III site
C	+	5'-AATTGGATACATATGGACAACAACCCGAAC-3'	<i>Nde</i> I site
D	-	5'-CCCCCTCGAGCTAGTTAATATGATAATCCG-3'	<i>Xho</i> I site/UAG stop codon

사용하였다.

Oligonucleotides 및 PCR

본 연구에 사용한 oligonucleotide는 Table 1에 제시되었다. SD서열까지의 프로모터 부위를 가지는 살충성 단백질 유전자와 프로모터 부위가 모두 제거된 활성 독소 단백질 유전자를 클로닝하기 위해 PCR법을 이용하였다[25]. SD서열까지의 프로모터 부위를 가지는 살충성 단백질 유전자를 클로닝하기 위한 주형 DNA로는 살충성 단백질 유전자가 운반체의 발현방향과 일치되게 연결된 재조합 플라스미드 DNA를 만들기 위하여 primer-A와 B(Table 1)를 사용하였다. primer-A는 SD서열부터 구조유전자 쪽으로의 20 염기이고, primer-B는 살충성 단백질 유전자 내부의 *Hind*III 인식부위를 포함한 20 염기가 되도록 제조하였다.

플라스미드 DNA의 분리와 정제

*E. coli*에 있는 플라스미드 DNA는 알칼리 분해법[2, 16]과 CsCl-ethidium bromide 밀도기울기 초원심분리법으로 분리하였다[8]. 500 ml의 세포 배양액을 5,000×g로 원심분리하여 침전된 세포를 10 ml의 GET 완충용액(50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)에 현탁한 후 0.2 N NaOH와 1.0% SDS의 혼합물 20 ml을 첨가하여 알칼리 분해법으로 분리하였다. DNA를 순수 정제를 하기 위해서 CsCl-ethidium bromide 밀도기울기 초원심분리법을 사용하였다. 이를 위하여 CsCl 8 g와 10 mg/ml의 ethidium bromide 용액 0.4 ml을 DNA용액에 첨가하여 160,000×g로 35시간 동안 초원심분리(Kontron Hermle Centrifon, T-1045, Germany)한 후 형성된 DNA 밴드를 주사기로 회수하였다. Ethidium bromide는 멸균수로 포화된 *n*-butanol로 제거하였고, CsCl은 TE 완충용액[8, 16]에서 투석하여 제거하였으며, 정제한 DNA는 TE완충용액[8, 16]에 보관하여 실험에 사용하였다.

유전자 클로닝

유전자 및 제한효소단편 DNA의 클로닝은 Maniatis 등[14, 16] 및 Hwang 등[8]의 방법을 약간 수정하여 다음과 같이 수행하였다. 삽입할 DNA 15 µl(0.2 µg), 운반체 DNA 20 µl (0.1 µg), 5 mM ATP 5 µl, 10X T4 DNA ligase 완충용액 5 µl, T4 DNA ligase 2 µl (1.8 units/µl), 그리고 증

류수 3 µl을 혼합한 총 50 µl을 14°C에서 18시간동안 반응시킨 후 반응 용액을 1.0% agarose gel 전기영동으로 확인하였다[4, 7]. *E. coli* competent cell과 형질전환은 Mandel 등[15]의 방법을 사용하였다.

Agarose 및 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

플라스미드 DNA 및 제한효소 DNA단편들은 agarose 전기영동방법[14]를 이용하여 전개하여 정제하였다. 재조합 클론이 생산하는 130 kDa의 ICP을 조사하기 위해 클론이 생산한 단백질을 보유한 전체세포를 초음파 처리로 파쇄하였다[8]. 파쇄액에 존재하는 단백질을 Bollag 등의 방법[3]을 사용하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하여 분석하였다. 재조합 클론들의 12시간 배양액 25 ml을 5,000×g로 30분간 원심분리하여 얻은 세포 침전물은 멸균수 1.0 ml과 2X glycerol 완충용액(30% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS, pH 6.8, 0.1% bromophenol blue, 125 mM Tris-HCl) 1.0 ml로 현탁한 후 초음파 처리하여 파쇄한 용액을 끓는 물에서 10분간 처리하였다. 상온에서 식힌 후 15,000×g로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였다. 시료 단백질의 분자량은 표준분자량 단백질(Bio-Rad Laboratories; Richmond, California, USA)의 분자량과 비교하여 구하였다. 전개가 끝난 젤은 1 시간동안 염색용액(0.1% Coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)에서 염색하였고, 2시간 동안 탈색용액(10% methanol, 10% glacial acetic acid)에서 탈색한 후 젤 건조기(Model OPR-TDU-8612, Kyunggido, Korea)로 60°C에서 30 분간 건조시켜 보관하였다.

ICP 항원의 준비

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1을 100 ml의 GYS 배지[18]에서 72시간 배양시켜 위상차 현미경으로 포자와 내독소결정체를 관찰한 후 10,000×g로 30분간 원심분리한 다음 NaBr 밀도기울기 원심분리법으로 내독소결정체를 정제하여 항원으로 사용하였다. 냉각된 멸균수로 3번 세척한 세포 침전물을 0.01% Triton X-100을 포함한 1 M NaCl 6 ml에 현탁한 후 200 W에서 30초 간격으로 5회 초음파 처리하였다. 3 ml의 파쇄액을 30~70% NaBr 밀도구배에 넣고 20,000×g로 2시간 원심분리하였다. 형성된 각 밴드를 위상차 현미경으로 관찰한 후 내독소결정체 밴드를 파스퇴르 피

펫으로 회수하고 멸균수로 3회 세척하여 NaBr을 제거하였다. SDS-urea 완충용액(1% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 6 M urea, 100 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.2) 10 ml에 침전물을 현탁하고 30°C에서 1시간 반응시켰다. 1 N NaOH로 pH 12로 조절한 후 28°C에서 5시간 반응한 다음 pH 7.5로 조절하고 4°C에서 PBS 완충용액(140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4)으로 1일간 투석하였다. 투석액은 분말 상태가 될 때까지 냉동 건조기[Model OPR-FDU-8612, Operon Co., Kyunggido, Korea]로 건조를 시켜서 4°C에 보관하면서 사용하였다.

ICP 항체의 준비

살충성 단백질을 항체의 제조는 Oh 등[19]의 방법을 이용하여 Balb/c 실험쥐에 항원을 주사하여 제조를 하였다. 면역시킨 쥐의 심장에서 채혈을 한 후에 혈청을 분리하였고, immunoglobulin G를 DEAE-Affi-Gel blue(Bio-Rad Laboratory, Richmond, California, USA) column chromatography로 정제하였다[3].

Western blot analysis

재조합 클론이 ICP를 발현하는지의 여부와 각 클론들의 발현 정도를 비교 측정하기 위해 Western blot 분석을 Bollag 등[3]의 방법을 수정하여 실시하였다. 염색하지 않은 SDS-PAGE 겔에 전개된 전체 세포단백질들을 TG 완충용액(15.6 mM Tris-base, pH 8.3, 120 mM glycine)에서 50 V로 2시간 동안 구멍의 크기가 0.45 μm인 nitrocellulose 여과지(Millipore, Bedford, MA)에 전이시켰다. 전체 세포단백질들이 결합된 nitrocellulose 여과지의 모든 남은 면을 단백질로 덮어주기 위해 3% bovine serum albumin(BSA)을 함유한 TN 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)에서 1~2시간 동안 100 rpm으로 교반시켜 준 다음 TN 완충용액으로 3번 세척하였다. 0.5% BSA와 살충성 단백질에 대한 항체를 첨가한 TN 완충용액에서 16시간 동안 100 rpm으로 교반한 후 TN 완충용액으로 3번 세척하였다. ICP 항체가 결합된 nitrocellulose 여과지를 horse radish peroxidase로 표식된 2차 항체와 0.5% BSA를 첨가한 TN 완충용액에서 16시간 동안 100 rpm으로 교반하였으며 불필요한 2차 항체는 TN 완충용액으로 세척하였다. 세척된 nitrocellulose 여과지를 발색용액(30 mg chloronaphthol 11 ml methanol, 39 ml TN buffer, 30 μl 30% H₂O₂)에 담아 실온에서 천천히 교반하면서 반응시켰고 발색이 완성되면 즉시 증류수로 옮겨 반응을 중지시켰다.

결과 및 고찰

pHLN1-80(+)과 **pHLN2-80(-)** clones의 특성

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1 살충성 결정

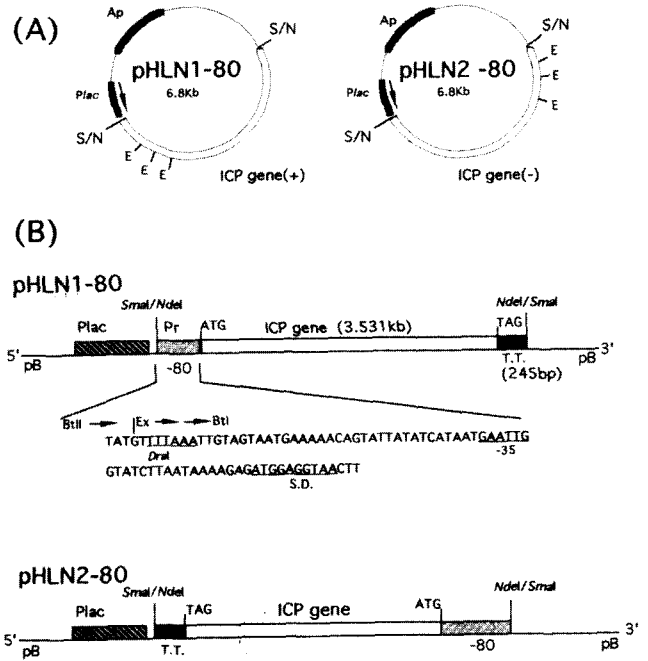


Fig. 1. Physical and functional maps of pHLN1-80(+) and **pHLN2-80(-)** clones. *icp* gene was cloned into the *Sma*I and *Nde*I sites in pBluescript SK(+) vector and named pHLN1-80(+) and pHLN2-80(-) clones. A is the clones, and B is the gene maps of the clones. Abbreviations: *Plac*, pBluescript SK(+) promoter; -80 bp pr, 80 base-pairs part of the *icp* gene promoter of *B. thuringiensis* HD1; ATG, translation start codon of the *icp* gene; Ex, transcription start point; pB, pBluescript; SD, Shine-Dalgarno sequence; BtI, RNA I type synthesis; BtII, RNA II type synthesis T.T., transcription termination region of the *icp* gene; -35 region of promoter; two enzymes *Sma*I/*Nde*I ligated site.

체 단백질 *icp*유전자(*cryIAa1* type)를 클로닝하여 두개의 클론 pHLN1-80(+) 및 pHLN2-80(-)의 유전자 지도를 분석한 것이 Fig. 1에 제시되었다[8]. 대장균시스템에 클로닝된 재조합 유전자의 발현 연구를 통하여 *icp*유전자의 발현 양상을 연구하고자 하였다. pHLN1-80(+) 클론에서는 *icp*유전자 전사개시부위가 정방향으로 클론이 되었고, *icp*유전자 프로모터의 일부인 -80 bp 프로모터를 가지고 있고, pHLN2-80(-) 클론은 *icp*유전자 전사개시부위가 역방향으로 클로닝이 되었다(Fig. 1). 상기 두 클론을 대장균에서 발현을 조사한 결과 *icp*유전자가 역으로 삽입된 pHLN2-80(-) 클론은 pHLN1-80(+) 클론보다 ICP 발현량이 현저히 증가하는 것을 확인하였다[8](Fig. 2).

pHLN1-80(+) 클론에 클로닝된 3.8 kb *Nde*I DNA 단편의 유전적인 구조를 Schnepf 등[20, 21]이 결정한 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 *icp*유전자 염기서열과 비교하여보면, 전체 *icp*유전자 암호서열(open reading frame) 3,531 bp가 존재하며, *icp*유전자 프로모터의 일부인 -80 bp 프로모터가 존재하였고, C-말단에는 해독 종결암호 TAG[20, 21, 24], 하류에 245 bp 단편의 DNA를 가지고 있다. *icp*유전자의 프로모터

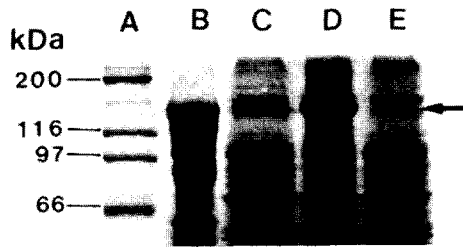


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the insecticidal proteins from the lysates of the clones pHLN1-80(+) and pHLN2-80(-). Lanes A: Standard molecular weight markers, B: solubilized crystal protein, C: lysate of *E. coli* with pHLN1-80, D: lysate of *E. coli* with pHLN2-80, and E: lysate of the *E. coli* XL1-blue with pBluescript SK(+). Arrow indicates insecticidal crystal proteins (ICP) produced by clones.

에는 중복된 *BtI* 과 *BtII*의 두 개의 프로모터를 가지고 있었다[21, 24]. 그리고 *E. coli*와 *B. thuringiensis*에서의 전사 개시점인 G가 해독개시 ATG 암호에서 -77염기에 있다[21, 24]. 상기의 -80 bp 프로모터에는 *icp*유전자 전사 개시점 G의 3' 쪽에서부터 시작하는 *BtI* 프로모터만을 가지고 있고, 전사 개시점 G의 상류 5' 쪽에서 시작하는 *BtII* 프로모터가 존재한다[24]. 또한 -80 bp 프로모터에는 1곳의 *DraI* 인식 부위와 -14와 -4 염기서열 사이에 SD서열이 존재한다[21, 24]. *icp*유전자가 클로닝된 pHLN2-80(-) 플라스미드에서의 -80 bp 프로모터에있는 SD서열까지만 유지를 하고, 그 이상의 상류부위를 결실을 시키어도 동일한 *icp*유전자의 과다발

현 현상이 일어나는지 또는 상이한 운반체를 사용하였을 때에도 발현 현상이 나타나는지를 아래와 같이 연구를 하였다.

-80 bp promoter에 있는 Shine-Dalgarno서열 상류부위를 결실한 pHLRBS1-14와 pHLRBS2-14 클론의 제조

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1의 *icp*유전자가 클로닝된 pHLN2-80(-) 플라스미드에서의 -80 bp 프로모터에있는 SD서열(-14 bp sequences)까지만 유지를 하고, 그 이상의 상류부위를 결실을 시키어도 동일한 *icp*유전자의 과다발 현 현상이 일어나는지 조사하기 위해 *icp*유전자가 역방향으로 클로닝된 pHLRBS1-14와 *icp*유전자가 정방향으로 클로닝된 pHLRBS2-14를 제조하였다(Fig. 3A, B).

Shine-Dalgarno(SD) 서열(-14 bp) 직전을 절단할 수 있는 적절한 제한효소 인식부위가 없으므로 PCR에 의해 이 부위까지만 가지는 DNA 단편을 얻었다. 즉 primer-A와 B(Table 1) 그리고 pHLN1-80(+)을 주형 DNA로 사용하여 방법에서와 같이 PCR을 실시하여 1.7 Kb DNA 단편을 얻었다. 이 단편을 Klenow중합효소와 *HindIII*의 순으로 처리한 1.7 Kb DNA 단편을 회수하여 *SmaI*과 *HindIII*로 이중절단한 pBluescript SK(+)와 연결시켰으며 이를 CloneR 플라스미드라 명명하였다(데이터 생략). CloneR을 *BamHII*과 *HindIII*로 이중절단 후 Klenow중합효소로 처리하여 얻은 1.7 Kb DNA 단편을 pBluescript SK(+)의 *SmaI* 인식부위에 결합시켰다. 전사개시부위가 정방향으로 연결된 것을 CloneR1, 전사부위가 역방향으로 연결된 것을 CloneR2라 명명하였다

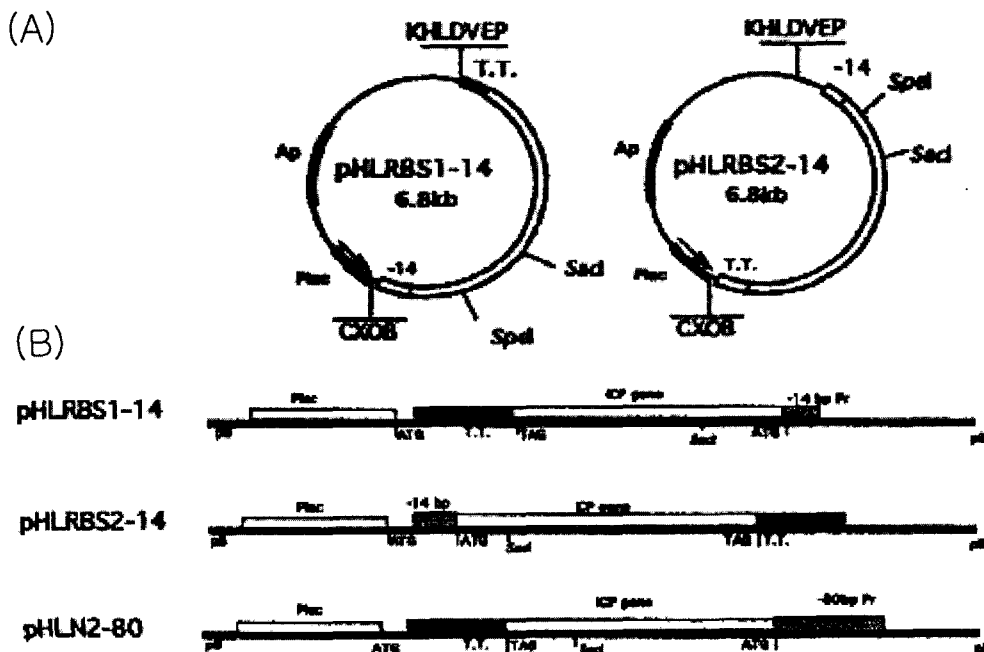


Fig. 3. Constructions of two clones with -14 bp Shine-Dalgarno (SD) sequence in the -80 bp promoter region (A) and functional gene maps of the clones (B). pHLRBS1-14 clone with the -14 bp SD sequence removed upstream SD sequence area (-66 bases) of the pHLN2-80(-). pHLRBS2-14 clone with the -14 bp SD sequence removed upstream SD sequence area (-66 bases) of the pHLN1-80(+).

(테이터 생략). CloneR1을 *SacI*으로 절단하여 얻은 1.5 Kb DNA 단편과 pHLN1-80 플라스미드를 *SacI*과 CIP로 처리하여 얻은 5.3 Kb DNA 단편을 연결하였고 이를 pHLRBS1-14(6.8 kb)라 명명하였다(Fig. 3A). CloneR2를 *SacI*과 CIP로 처리하여 얻은 4.4 Kb DNA 단편과 pHLN2-80(-) 플라스미드를 *SacI*으로 절단하여 얻은 2.4 Kb DNA 단편을 연결하였고 이를 pHLRBS2-14(6.8 kb) 재조합플라스미드라 명명하였다(Fig. 3A). Fig. 3B는 pHLRBS1-14와 pHLRBS2-14 클론의 직선형 모델이다.

pHLNUC1-80과 pHLNUC2-80클론의 제조

pBluescript SK(+)를 클로닝 운반체를 사용하여 제조한 재조합 클론 pHLN2-80(-) 플라스미드에서 일어난 살충성 단백질 유전자의 과다발현 현상이 다른 pUC18과 pUC19 클로닝 운반체에서도 일어나는지 알기위해 pHLN1-80(+)와 pHLN2-80(-) 플라스미드에서와 동일한 구조가 되도록 살충성 단백질 유전자를 pUC18과 pUC19 플라스미드로 각각 클로닝한 pHLNUC1-80과 pHLNUC2-80 재조합플라스미드를 제조하였다(Fig. 5A). pUC18 플라스미드를 *EcoRI*, Klenow 중합효소, 그리고 *SmaI*의 순으로 처리하여 회수한 2.7 Kb DNA 단편을 자가 연결시켰고 이를 CloneA라 명명하였다(테이터 생략). pHLN1-80(+) 플라스미드를 *BamHI*, Klenow 중합효소, 그리고 *PstI*의 순으로 처리하여 회수한 3.8 Kb DNA 단편을 *XbaI*, Klenow 중합효소, 그리고 *PstI*의 순으로 처리한 CloneA와 연결시켰으며 이것을 pHLNUC1-80 재조합플라스미드라 명명하였다(Fig. 5)(테이터 생략). pHLN1-80(+)를 *BamHI*, Klenow 중합효소, 그리고 *PstI*으로 처리하고 회수한 3.8 Kb DNA 단편을 *SmaI*과 *PstI*으로 이중 절단한 pUC19 플라스미드와 연결하였고 이를 pHLNUC2-80 재

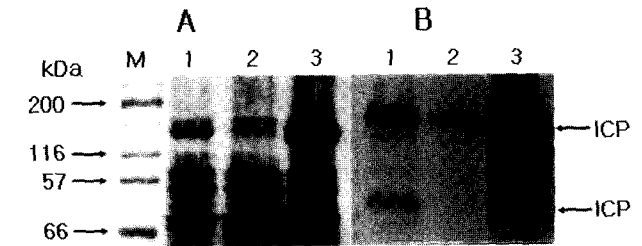


Fig. 4. Detection of the ICP productions in *E. coli* with the recombinant clones. Lanes A1, ICP bands produced by pHLRBS1-14 clone; A2, ICP produced by pHLRBS2-14 clone; A3, ICP produced by pHLN2-80 clone. B plate is the Western blot of the gel A. Arrows indicate ICP produced by clones.

조합플라스미드라 명명하였다(Fig. 5A).

-80 bp promoter의 Shine-Dalgarno 서열 상류부위의 결실과 운반체의 차이가 발현에 미치는 영향

B. thuringiensis 살충성 결정체 단백질 *icp* 유전자를 클로닝한 pHLN1-80(+)와 pHLN2-80(-)클론을 대장균에서 발현을 하여 추출물을 SDS-PAGE와 Western blot를 하여 얻은 결과 Fig. 2에 제시되었다. pHLN2-80(-)클론(Fig. 2 lane D)이 pHLN1-80(+)클론(Fig. 2 lane C) 보다 ICP 생산량이 현저히 높은 것을 알 수가 있다. *icp* 유전자가 전사방향의 역으로 삽입된 pHLN2-80(-) 플라스미드가 ICP 생산량을 정상 삽입된 유전자 보다 많이 생산하는 것을 조사하기 위하여 -80 bp promoter의 변이를 하여 연구하였다.

pHLN1-80(+)플라스미드의 -80 bp 프로모터에서 SD서열 (-14 bp sequences)이 정상으로 유지하면서 상류부위의 결실이 되어있는 재조합클론이 *icp* 유전자의 과다발현 현상에 대한 어떠한 영향을 주는지를 조사하기 위하여 재조합클론

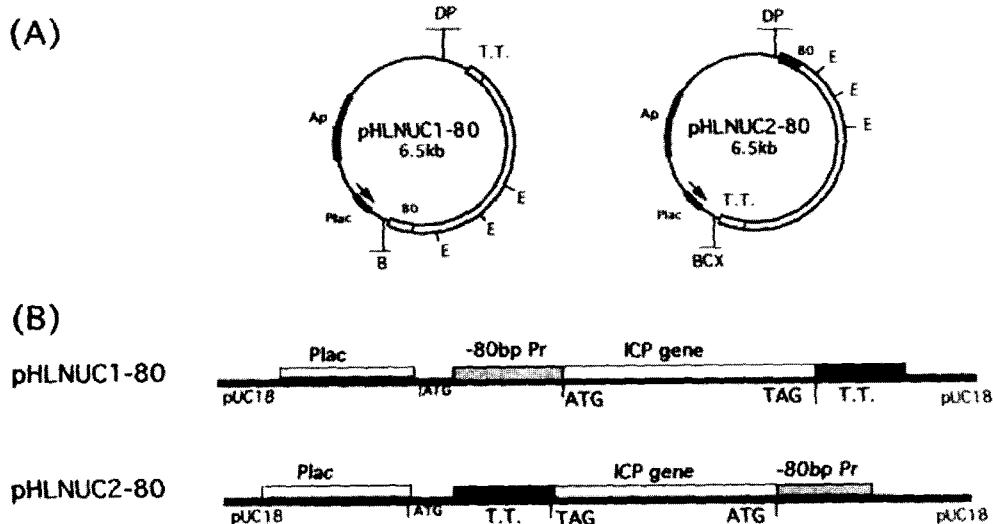


Fig. 5. (A) Constructions of two clones, pHLNUC1-80 and pHLNUC2-80 and (B) linear gene maps of the two clones. The pHLNUC1-80 clone consisted of right-orientation *icp* gene sequence with -80 bp promoter. pHLNUC2-80 clone consisted of the inverted *icp* gene sequence with -80 bp promoter.

pHLRBS1-14과 pHLRBS2-14 재조합클론을 제조하였다 (Fig. 3 lanes A, B). 재조합 클론 pHLRBS1-14과 pHLRBS2-14클론을 대장균에서 발현을 시킨 후에 파쇄하여 SDS-PAGE와 Western blot의 면역학적 분석을 하였다(Fig. 4). 재조합 클론 pHLRBS1-14(Fig. 14 lanes A2, B2)는 재조합클론 pHLRBS2-14(Fig. 4 lanes A1, B1)보다 많은 양의 ICP를 생산하였고, pHLRBS1-14는 pHLN2-80(-) (Fig. 4 lanes A3, B3)보다 적게 ICP살충성 단백질을 생성하였다. 이러한 발현 현상은 -80 bp promoter의 결실된 상류부위가 발현에 직접적인 영향을 주고 있다는 것을 의미한다.

pHLN2-80(-) 클론에서 일어난 *icp*유전자의 과다발현이 pBluescript SK(+) 이외의 다른 클로닝 운반체에서도 일어나는지 알기 위해 pHLNUC1-80과 pHLNUC2-80을 제조하였다 (Fig. 5). *icp*유전자를 pUC18 플라스미드에 정방향으로 연결한 pHLNUC1-80은 β -galactosidase 유전자와 살충성 단백질 *icp*유전자간의 구조골격을 일치시킨 것이다. 살충성 결정체단백질 *icp*유전자가 정방향으로 연결된 pHLNUC1-80 (Fig. 6 lanes A1, B1)이 역방향으로 클로닝된 pHLNUC2-80 클론(Fig. 6 lanes A2, B2)보다 적게 살충성 단백질(ICP)의 발현을 유발하였다. 이 결과는 상기 클론이 *icp*유전자 과다발현이 특정 클로닝 운반체에만 국한되어 일어나는 것이 아니며 유전자와 프로모터 간의 구조적 배열에 의해 일어난 것임을 시사한다.

Schnepf 등[22]은 살충성 단백질 유전자의 프로모터를 단계적으로 절단하고 이들을 β -galactosidase와 oxidase의 구조 유전자 직전에 각각 연결하였으며 이때 생성되는 효소의 활성을 측정하여 절단된 각 프로모터들의 활성을 측정하였다. 이들은 살충성 단백질 유전자의 해독개시 ATG 암호에서 -164염기까지의 프로모터 활성은 -77염기까지의 프로모터 활성보다 약 9배인 것으로 보고하였다. 이 결과에서 살충성 단백질 유전자 프로모터 부위의 152 염기쌍이 80 염기쌍보다 더 강한 프로모터 활성을 가진다는 것을 알 수 있다.

결론적으로 말하면 이상의 결과를 요약하면 pHLN2-80(-)에서 *icp*유전자의 과다발현에 *Plac* 프로모터와 종결부위가 반드시 필요하며[8], *icp*유전자는 반드시 *Plac* 프로모터의 전

사 방향에 역방향으로 삽입이 되어야 과다 발현이 되는 것으로 나타났으며, 또한 *icp*유전자의 -80 bp promoter의 SD 염기서열도 과다 발현에 양성적 영향을 주고 있었고, 상이한 운반체를 이용하였을 때에도 과다 발현이 일어나고 있었다. 클로닝 운반체의 promoter와 *B. thuringiensis*의 *icp*유전자의 promoter가 서로 상승 작용으로 과다 발현이 생기거나 프로모터에 있는 transcription-suppressing regions이 교란되어서 일어나는 것으로 고려된다. 그러나 왜 전사개시부위가 역삽입의 경우에 과다발현이 되는지 아직은 판단하기 어려우며 앞으로 더욱 연구를 계속하여야 할 과제로 남아있다.

요 약

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1 살충성 결정체 단백질 *icp*유전자를 클로닝하여 두개의 클론 pHLN1-80(+) 및 pHLN2-80(-)을 제조하였으며, pHLN1-80(+) 클론에는 *icp* 유전자의 전사개시부위가 정방향으로 클론이 되었고, *icp*유전자 프로모터의 일부인 -80 bp를 가지고 있고, pHLN2-80(-) 클론은 *icp*유전자의 전사개시부위가 역방향으로 클로닝이 되었다. 상기 두 클론을 대장균에서 발현을 조사한 결과 *icp*유전자가 역으로 삽입된 pHLN2-80(-) 클론은 pHLN1-80(+) 클론보다 ICP 발현량이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. pHLN2-80(-) 플라스미드에서의 -80 bp 프로모터에서 SD서열(-14 bp sequences) 상류부위를 제거한 후 동일한 살충성 결정체 단백질 *icp*유전자의 과다발현 현상이 일어나는지 조사하기 위해 *icp*유전자가 역방향으로 클로닝된 pHLRBS1-14와 *icp*유전자가 정방향으로 클로닝된 pHLRBS2-14 클론을 제조하였다. 또한 상이한 클로닝 운반체에서도 과다 발현이 일어나는지를 보기위하여 pHLN1-80(+)과 pHLN2-80(-) 플라스미드에서와 동일한 구조가 되도록 *icp*유전자를 pUC18과 pUC19플라스미드에 각각 클로닝하여 pHLNUC1-80과 pHLNUC2-80 클론을 제조하였다. pHLRBS1-14과 pHLRBS2-14클론을 대장균에서 발현을 시킨 후에 파쇄하여 SDS-PAGE와 Western blot으로 분석을 한 결과는 클론 pHLRBS1-14는 클론 pHLRBS2-14보다 많은 양의 ICP를 생산하였고, pHLRBS1-14는 pHLN2-80(-) 클론 보다는 적게 ICP를 생산하였다. 이러한 발현 현상은 -80 bp promoter에서 결실된 SD서열의 상류부위가 발현에 직접적인 영향을 주고 있다는 것을 의미 한다. pHLNUC1-80이 역방향으로 클로닝된 pHLNUC2-80 클론보다 적게 ICP의 발현을 하였다. 이 결과는 상기 클론이 *icp*유전자 과다발현이 특정 클로닝 운반체에만 국한되어 일어나는 것이 아니며 유전자와 프로모터 간의 구조적 배열에 의하거나 프로모터에 있는 transcription-suppressing regions이 교란되어서 일어난 것임을 시사한다. 그러나 왜 전사개시부위가 역삽입의 경우에 과다발현이 되는지 아직은 판단하기 어려우며 앞으로 더욱 연구를 계속하여야 할 과제로 남아있다.

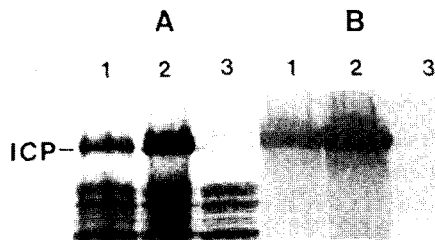


Fig. 6. Detection of the ICP productions in *E. coli* with the recombinant clones pHLNUC1-80 and pHLNUC2-80 by SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B). Lanes A1, ICP produced by clone pHLNUC1-80; A2, ICP produced by clone pHLNUC2-80; and A3, *E. coli* XL-blue/pUC18.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구지원(R01-2000-00140)로 이루어졌음.

REFERENCES

1. 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.
2. Birnboim, H. C. and J. Dolly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
3. Bollag, D. A., M. D. Rozycki, and S. J. Edelstein. 1996. *Protein Methods*. pp. 107-227. 2nd ed. Wiley-Liss, New York.
4. Carlton, B. C. and J. M. Gonzales, Jr. 1985. *The genetics and molecular biology of Bacillus thuringiensis*, In D. A. Dubnau ed. *The molecular biology of the Bacilli*. Vol. II. pp. 211-249. Academic Press, N.Y.
5. Dulmage, H. T. and Co-Operators. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential, In H. D. Burges ed. *Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980*. pp. 193-222, Academic Press, New York.
6. Gonzales, J. M. Jr., H. T. Dulmage, and B. C. Carlton. 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* **5**: 351-365.
7. Held, G. A., L. A. Bulla, Jr., E. Ferrari, J. Hoch, A. I. Aronson, and S. A. Minnich. 1981. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 6065-6069.
8. Hwang, S. H., K. H. Yoo, E. S. Moon, S. C. Cha, and H. H. Lee. 1998. Overexpression of insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1. *Kor. J. Microbiol.* **36**: 289-295.
9. Kim, H. S., J. Y. Roh, D. W. Lee, J. H. Chang, Y. H. Je, S. D. Woo, J. K. Kim, Y. M. Yu, and S. K. Kwon. 1998. Formulation of a *Bacillus thuringiensis* strain NT0423. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 358-364.
10. Klier, A., F. Fergette, J. Ribier, and G. Rapoport. 1982. Cloning and expression of the protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain Berliner 1715. *EMBO J.* **7**: 791-799.
11. Kronstad, J. W., H. E. Schnepf, and H. R. Whiteley. 1983. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.* **154**: 419-428.
12. Kurstak, E. 1982. *Microbial and Viral Pesticides*. pp. 35-74. Marcell-Dekker, New York.
13. Lee, H. H. 1998. Formulations of *Bacillus thuringiensis* insecticides by liquid and semi-solid fermentations. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 369-372.
14. Lee, H. H., H. J. Lee, and K. H. Yoo. 1990. Restriction map of the genome of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus. *J. Kor. Soc. Virol.* **20**: 145-152.
15. Mandel, M. and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA phage infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 154-162.
16. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular cloning*. Cold Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
17. McLinden, J. H., J. R. Sabourin, B. D. Clark, D. R. Gensler, W. E. Workman, and H. D. Dean. 1985. Cloning and expression of an insecticidal k-73 type crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* into *Escherichia coli*. *J. Appl. Environment. Microbiol.* **50**: 623-628.
18. Nickerson, K. W. and L. A. Bulla, Jr. 1974. Physiology of sporeforming bacteria association with insects: Minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **27**: 439-447.
19. Oh, S. S., Y. J. Lee, C. K. Kim, B. S. Koo, J. B. Kim, and H. H. Lee. 1988. Immunological analysis of endotoxin proteins produced by *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 and HD73. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 168-173.
20. Schnepf, E. and H. R. Whiteley. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 2893-2897.
21. Schnepf, H. E., H. C. Wong, and H. R. Whiteley. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J. Biol. Chem.* **260**: 6264-6272.
22. Schnepf, H. E., H. C. Wong, and H. R. Whiteley. 1987. Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 4110-4118.
23. Uh, H. S., J. K. Park, H. Kang, S. Y. Kim, and H. H. Lee. 2001. Sequencing and baculovirus-based expression of the glycoprotein B2 gene of HSV-2(G). *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 482-490.
24. Wong, H. C., H. E. Schnepf, and H. E. Whiteley. 1983. Transcriptional and translation start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* **258**: 1960-1967.
25. Cha, S. C., Y. S. Kim, J. K. Cho, J. Cho, S. Y. Kim, H. Kang, M. H. Cho, and H. H. Lee. 2002. Enhanced protection against HSV lethal challenges in mice by immunization with a combined HSV-1 glycoprotein B:H:L gene DNAs. *Virus Research* **86**: 21-31.

(Received Apr. 8, 2004/Accepted June 7, 2004)