

새로운 곤충병원성 *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* 균주의 유전학적 특성

서미자¹ · 윤영남¹ · 유용만¹ · 김기수^{2*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과, ²(주)차메디텍 생물소재팀

Genetic characteristics of the novel insect pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* strain

Mi Ja Seo¹, Young Nam Youn¹, Yong Man Yu¹, Ki Su Kim^{2*}

¹Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea;

²Bio Matertial Deptment, CHAMEDITECH, CO. Daejeon, 305-500, Korea

Received on 28 October 2014, revised on 3 December 2014, accepted on 15 December 2014

Abstract : For identifying the plasmid DNA coding *cry* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 with high insecticidal activity against *Spodoptera exigua*, mutant isolates with no crystal protein were produced by 42°C incubation condition and then mutant plasmid DNA band patterns were compared with those of KB098. KB098 isolates had 4 *cry* genes, *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIC*, *cryID*, and also had been found seven plasmid DNA. Though the SDS-PAGE experiment, it was confirmed that mutant didn't produce 130~145kDa protein band involved in bipyramidal shape crystal. Also, five mutant isolates had no *cry* genes coding plasmid DNA in PCR. In result of comparison the plasmid DNA of KB098 and 5 mutant isolates, only 1 plasmid DNA band was left out in mutant plasmid DNA pattern, so that the missing band was extracted from the gel. The missing(disappeared) plasmid DNA was the largest molecular size among the 7 plasmid DNA of KB098 and it was also confirmed this plasmid DNA had all 4 *cry* genes through PCR.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, Plasmid DNA, *Spodoptera exigua*, Insecticidal activity, PCR

I. 서론

*Bacillus thuringiensis*는 다양한 작물의 환경친화적 방제에 사용되는 곤충병원성미생물이다. *B. thuringiensis*의 crystal protein은 곤충의 중장액과 반응하여 독성단백질로 분해되어 세포막에 작은 구멍을 형성해 폐혈증을 일으켜 살충활성을 보이는 작용기작을 가지고 있다(Jurat-Fuentes and Adang, 2006; Bravo et al., 2007).

*B. thuringiensis*가 형성하는 crystal protein은 130~145 kDa의 분자량을 갖는 bipyramidal 형태는 주로 나비목해충에 활성을 나타내고, 100 kDa의 분자량을 갖는 cuboidal 형태는 주로 딱정벌레목해충에 활성이 있으며(Bravo et al., 1998), 그리고 65 kDa의 분자량을 갖는 spherical 형태는

주로 파리목해충에 활성이 있다(Ibarra and Federici, 1986).

*B. thuringiensis*에서 대상해충에 살충활성을 나타내는 crystal protein을 형성하는데 관여하는 *cry* gene은 주로 plasmid DNA상에 존재한다. *B. thuringiensis*내에서 존재하는 plasmid DNA는 최대 17개로 이루어져 있고, 길이는 2~250 kb정도이다. Plasmid DNA는 균주마다 보유하고 있는 개수가 다양하고 길이 또한 다양하게 나타난다. 이와 마찬가지로 *cry* gene은 모든 균주에서 항상 같은 크기의 plasmid DNA에 존재하는 것이 아니라 균주마다 서로 다른 위치의 plasmid DNA에 존재한다(Aronson et al., 1986; Kronstad et al., 1983).

Cry gene은 주로 큰 size의 plasmid DNA상에 위치하고, molecular weight 40~110 Mdal사이에 존재한다(Iizuka et al., 1989). *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1과

*Corresponding author: Tel: +82-10-5526-9619

E-mail address: polux619@chamc.co.kr

HD-244, IS5056의 *cry* gene은 75 Mdal에 위치하고(Mclinden et al., 1985; Swiecicka et al., 2008), HD-2는 molecular weight 75 Mdal, HD-73은 50 Mdal, HD-263은 44 Mdal에 위치한다(Gonzalez et al., 1982). *Cry* gene은 주로 plasmid DNA상에서 존재하는 것이 많지만 *B. thuringiensis berliner* 1715균주의 경우에는 plasmid DNA와 chromosomal DNA의 양쪽에서 존재한다(Lereclus et al., 1984).

Crystal-coding plasmid DNA는 같은 *Bacillus* 종 사이에서 쉽게 이주하는 특성을 가지고 있다. *B. thuringiensis*와 *B. cereus*, *B. anthracis* 3가지 균들은 독성을 나타내는 기주나 증독증상이 서로 다른데 *B. thuringiensis*와 *B. anthracis*를 액체배지에서 같이 배양하면 crystal-coding plasmid DNA의 이주결합이 일어나 살충활성을 갖는 *B. anthracis*를 만들 수 있다. Crystal-coding plasmid DNA의 이주결합이 일어난 *B. anthracis*를 *B. cereus*와 같이 배양하면 살충활성을 갖는 *B. cereus*를 만들 수 있고, 이를 *B. thuringiensis*와 같이 배양하면 다시 crystal-coding plasmid DNA가 *B. thuringiensis*로 이동하게 된다(Mun et al., 2003; Yuan et al., 2010). 이렇듯 쉽게 이주하는 crystal-coding plasmid DNA의 특성을 이용한 방법이 plasmid curing이다.

*B. thuringiensis*는 42°C에서 48 h 배양하게 되면 spore 생산 능력이 저하되거나 plasmid curing이 일어나 crystal protein이 생성되지 않는 mutant를 얻을 수 있다(Yousten et al., 1978; Mclinden et al., 1985; Kim et al., 1993).

한편, *B. thuringiensis*는 많은 subspecies가 존재하는데 같은 subspecies내에서도 살충활성과 기주범위가 서로 다르게 나타나는 경우가 많다. 그 중에서도 시판중인 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*계통인 NT0423과 같은 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*계통으로 분리되고 동정된 충남대학교 농업생명과학대학 생물적해충방제 실험실에서 보관중인 KB098균주와의 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 2령충에 대한 LC₅₀값은 약 72배정도의 차이가 나는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2009).

본 연구는 해충제어실험실에서 분리 동정된 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098균주가 지금까지 보고된 Bt균주보다 파밤나방과 담배저세미나방의 두 종류의 해충에 활성이 높게 나타나므로 이를 유전학적으로 구명하고자 crystal-coding plasmid DNA의 sequence 비교를 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시곤충

본 실험에서 사용된 나비목 해충인 파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 농촌진흥청 농업기술과학원으로부터 분양받아 유충은 인공사료를 성충은 10% (v/v) 설탕물을 사용하여 실험실에서 누대 사육하여 사용하였다. 모든 곤충은 온도 25±2°C, 광주조건 16L:8D, 상대습도 50-60%의 조건에서 사육되었다.

2. *Bacillus thuringiensis*

토양에서 분리하여 충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과 생물적해충방제 실험실에서 보관중인 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주를 Nutrient agar plate에 streaking 한 후 위상차현미경으로 관찰하여 활성이 좋은 colony를 선발하여 사용하였다(Kim et al., 2009).

3. Plasmid curing

Nutrient agar plate에 배양된 colony 중 위상차현미경으로 관찰하였을 때 bipyramidal형태의 crystal protein이 가장 뚜렷한 colony를 선발하여 LB배지에서 24 h, 27°C, 180 rpm으로 진탕 배양하여 spore를 cell상태로 만든 후 멸균수를 이용하여 1×10² cfu/ml 농도로 희석하고 NA배지에 200 μl를 spreading하여 42°C 배양기에서 48 h배양한 colony 중 위상차현미경 관찰을 통해 crystal protein을 형성하지 않는 colony를 선발하였다. 선발된 균주를 NA배지에 streaking 한 후 27°C 배양기에서 4-5일간 배양하여 위상차현미경을 통해 crystal protein 형성유무를 확인하여 없는 것으로 선발하였다(Fig. 1).

4. 생물활성검정

B. thuringiensis subsp. *aizawai* KB098균주와 Cry-mutant균주인 MKB098-91, MKB098-108, MKB098-110, MKB098-125, MKB098-130 등 5개를 NA배지에 spreading하여 27°C 배양기에서 5일간 배양한 후 위상차현미경으로 autolysis가 일어난 것을 확인한 후, 일회용 백금으로 집균

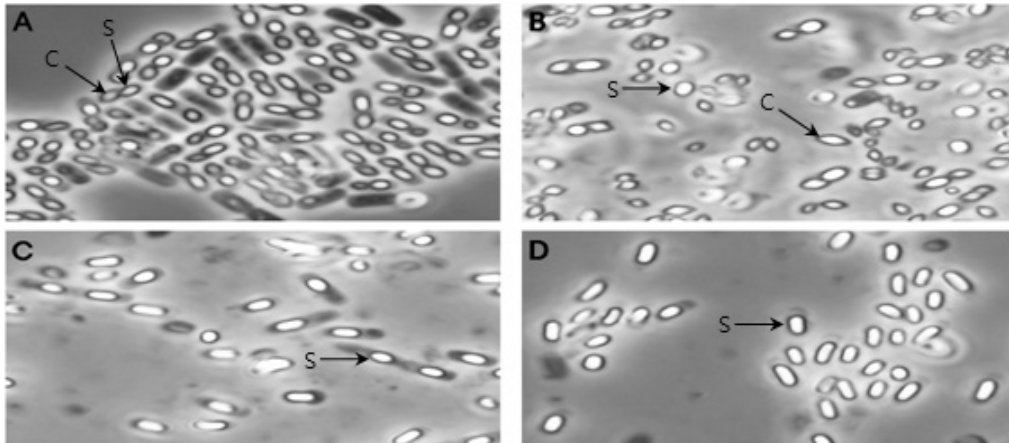


Fig. 1. Phase-contrast microscope photograph of *Bacillus thuringiensis* crystal. A, B: *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098, C, D: Mutant mated from *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098.

Table 1. Mortality of each *B. thuringiensis* strain against *Spodoptera exigua* 2nd larvae.

10^7	control	KB098	MKB-91	MKB-108	MKB-110	MKB-125	MKB-130
Mortality (%)	4	100	4	8	4	12	4

하였다. 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후에 상청액을 버리고 5 ml의 멸균수를 첨가하여 spore-crystal 혼합액을 만들어 실험에 사용하였다. 농도는 KB098균주의 100% 사출율이 나오는 농도인 10^7 cfu/ml으로 실험하였다. 각각의 petri dish에 0.5 g의 인공사료를 넣고 10^7 cfu/ml 농도의 균을 100 μ l씩 살포하였고, 2 h 음건 후에 petri dish당 파밤나방 2령 유충을 5마리씩 접종하였고 6반복으로 치사율을 조사하였다. 생물검정은 5일간 실시하였고 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 광주조건 16L:8D, 상대습도 50-60%의 조건에서 보관하였다(Table 1).

5. SDS-PAGE

KB098균주와 5개의 mutant균주를 NA배지에 spreading 하여 27°C 배양기에서 5일간 배양한 후 autolysis가 일어난 것을 확인한 후 일회용백금으로 집균하였다. 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상청액 제거 후 5 ml의 멸균수를 첨가하여 spore-crystal 혼합액을 만들고 모든 샘플은 washing I (500 mM NaCl, 2% Triton X-100) 용액에서 2번, washing II (500 mM NaCl)용액에서 3번 세척되어졌다. 상청액을 버리고 멸균수를 첨가한 후에 실험에 사용하기 전까지 -20°C 에서 보관하였다. SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 약간 수정하여 12% separating gel (30%

Acrylamide/Bis, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS, TEMED, 10% Ammonium Persulfate)과 4% stacking gel (30% Acrylamide/Bis, 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, TEMED, 10% Ammonium Persulfate)로 SDS-PAGE를 수행하였다. 60 V에서 140분간 전기영동을 실시하였고, 전기영동이 끝난 gel은 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색하여 band pattern을 확인하였다(Fig. 2).

6. PCR analysis

B. thuringiensis subsp. *aizawai* KB098균주와 Cry-mutant의 cry gene 존재유무를 확인하기 위해 gene-specific primer set를 사용하였다(Jung et al., 2010)(Table 2). PCR 증폭은 Thermal Cycler C1000™ (BIO-RAD)을 사용하였다. PCR증폭에는 DNA polymerase, dNTPs, reaction buffer등이 함유된 premix (Bioneer)에 주형 DNA 1 μ l, primer set 각각 1 μ l, 증류수 17 μ l를 혼합하여 최종볼륨을 20 μ l로 하여 수행하였다. PCR condition은 94°C 5분, 30 cycles, 94°C 1분, 57°C 1분, 72°C 1분, 72°C 5분으로 수행하여 PCR product를 생산하였으며 1.5% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다(Yang et al., 2011; Abdullah et al., 2009; Ye et al., 2009)(Fig. 3, 4).

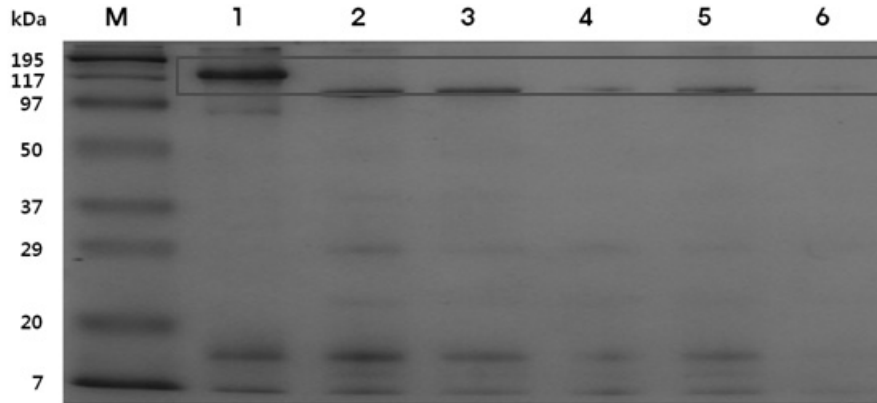


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of each *Bacillus thuringiensis* strain crystal. M, Broad range marker; Lane1, KB098; Lane 2, MKB-91; Lane3, MKB-108; Lane4, MKB-110; Lane5. MKB-125; Lane6, MKB-130.

Table 2. List of crystal protein gene-specific primers for PCR analysis.

Cry genes	primer sequences	Size of product (bp)
<i>cryIAa</i>	5'GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTACACC3'	782
<i>cryIAb</i>	5'TCGAATTGAATTTGTTC3'	238
<i>cryIAc</i>	5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3'	550
<i>cryIB</i>	5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3'	902
<i>cryIC</i>	5'CAACCCTATTTGGTGCAGGTTTC3'	288
<i>cryID</i>	5'GGTACATTTAGATGTTTACAGCCAC3'	465
<i>cryIE</i>	5'CTTAGGGATAAATGTAAGTACAG3'	961
<i>cryIF</i>	5'CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC3'	383
<i>cryI3'</i>	5'ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTTGACTTTCTC3'	-
<i>cryIG5'</i>	5'ATATGGAGTGAATAGGGGG3'	235
<i>cryIG3'</i>	5'TGAACGGCGATTACATGC3'	-
<i>cryII5'</i>	5'GCTGTCTACCATGATTCGCTTG3'	1584
<i>cryII3'</i>	5'CAGTGCAGTAACCTTCTCTTGC3'	-
<i>cry25'</i>	5'CAGATACCCTTGCTGGTGTAA3'	1073
<i>cry23'</i>	5'ATAGCCCCGTGCTCCACCAGG3'	-
<i>cry9A5'</i>	5'GTTGATACCCGAGGCACA3'	571
<i>cry9A3'</i>	5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT3'	-
<i>cry9B</i>	5'TCATTGGTATAAGAGTTGGTCTATAGAC3'	402
<i>cry9C</i>	5'CTGCTCCCTTCAATCC3'	306
<i>cry9D</i>	5'CCGAGCTCTATGAATCGAAATAATCAAAATGAAT3'	1917
<i>cry9BCD3'</i>	5'CCTCCTAGACACAGGGATGATTTCAATTC3'	-

7. Plasmid DNA 추출

KB098균주와 5개의 mutant균주들의 plasmid DNA추출은 QIAGEN midi kit의 protocol을 변형하여 사용하였다. 균주를 LB배지 5 ml에 접종하여 27°C 180 rpm으로 8시간 배양한다. 배양액 50 µl를 LB배지 50 ml에 넣고 동

일한 조건으로 16시간 배양한다. 배양된 균은 6,000 g, 15분, 4°C의 조건으로 원심분리한다. 상청액을 버리고 P1 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 µg/ml of RNase A) 4 ml을 넣고 vortexing 하여 펠렛을 풀어준다. P2 buffer (0.2 M NaOH, 1% SDS) 4 ml을 넣고 튜브를 4~6번 뒤집어 주어 혼합하고 15~25°C배양기에서 5분

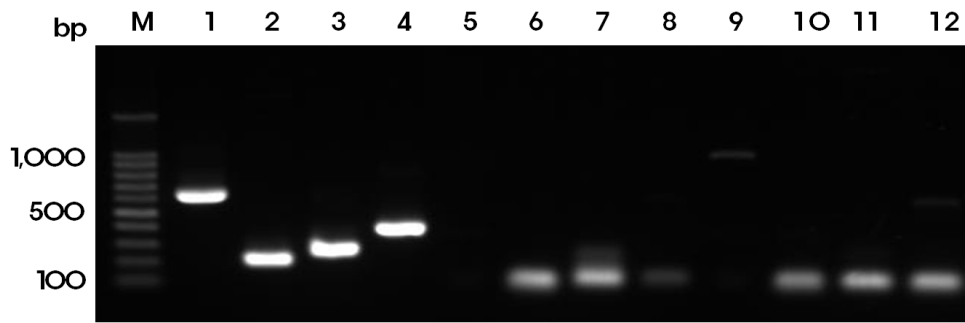


Fig. 3. PCR analysis of *Bacillus thuringiensis*. M, 100bp ladder KB098; Lane1, *cryIAa*; Lane2, *cryIAb*; Lane3, *cryIC*; Lane4, *cryID*; MKB-91: Lane5, *cryIAa*; Lane6, *cryIAb*; Lane7, *cryIC*; Lane8, *cryID*; MKB-108: Lane9, *cryIAa*; Lane10, *cryIAb*; Lane11, *cryIC*; Lane12, *cryID*.

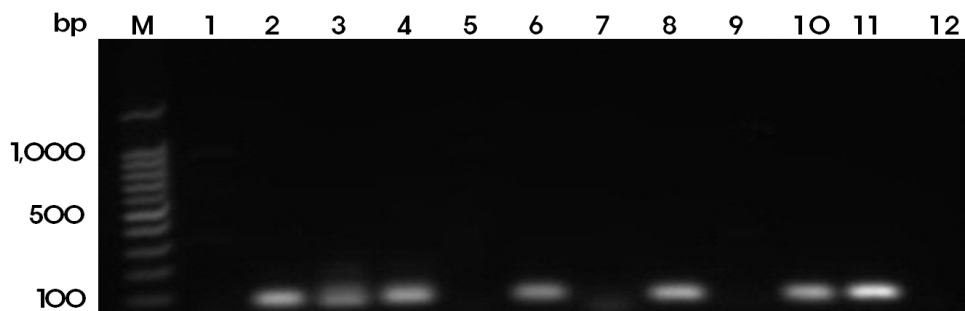


Fig. 4. PCR analysis of *Bacillus thuringiensis*. M, 100bp ladder MKB-110; Lane1, *cryIAa*; Lane2, *cryIAb*; Lane3, *cryIC*; Lane4, *cryID*; MKB-125: Lane5, *cryIAa*; Lane6, *cryIAb*; Lane7, *cryIC*; Lane8, *cryID*; MKB-130: Lane 9, *cryIAa*; Lane10, *cryIAb*; Lane11, *cryIC*; Lane12, *cryID*.

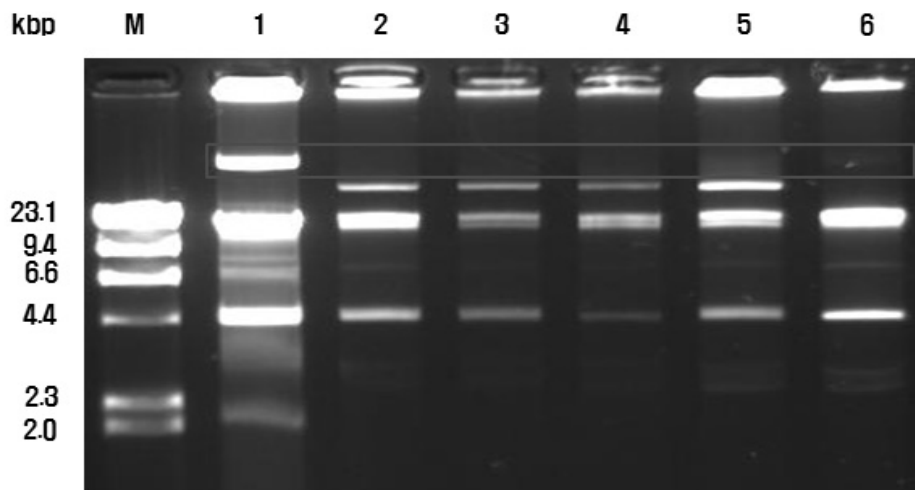


Fig. 5. Plasmid DNA patterns of *Bacillus thuringiensis*. M, Lamda Hind III marker; Lane1, KB098; Lane2, MKB-91; Lane 3, MKB-108; Lane4, MKB-110; Lane5, MKB-125; Lane6, MKB-130.

간 배양한다. 냉각한 P3 buffer (4 M guanidine hydrochloride, 0.5 M potassium acetate, pH 4.2) 4 ml을 넣고 4-6번 뒤집어 주어 혼합하고 얼음에서 15분간 배양한다. 30분간 15,000 rpm, 4°C로 원심분리한 후, 상청액을 새 튜브로 옮긴다. 15분간 15,000 rpm, 4°C로 원심분리한 후, QIAGEN-

tip 100을 수평으로 놓고 QBT buffer (50 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% Triton X-100) 4 ml을 넣어 통과시킨 컬럼에 원심분리한 상청액을 넣는다. 상청액이 컬럼을 완전히 통과하면 QC buffer 10 ml로 두 번 QIAGEN-tip 100을 washing 한다. QF

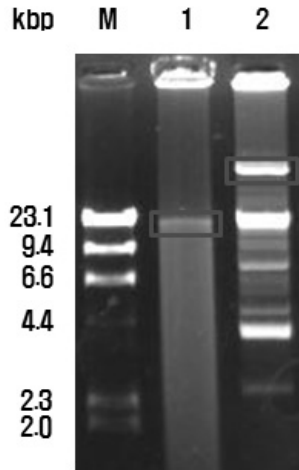


Fig. 6. Gel extraction sample of *Bacillus thuringiensis* KB098 strain. M, Lamda Hind III marker; Lane1, Extraction sample; Lane2, KB098 strain.

buffer 5 ml로 DNA를 녹여서 분리한다. 상온의 isopropanol 3.5 ml을 첨가하여 DNA를 침전시키고 30분간 15,000 rpm, 4°C로 원심분리한다. 상청액을 버리고 70% 에탄올 2 ml을 첨가하여 DNA 펠렛을 washing 한 후 10분간 15,000 rpm, 4°C로 원심분리한다. 상청액을 버리고 5~10분간 공기건조 시키고 3차증류수 200 µl를 넣어 plasmid DNA를 다시 녹인다. plasmid DNA를 3차 증류수와 혼합시킨 후 멸균한 Eppendorf Tube에 넣고 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. 전기영동은 agarose를 1×TAE buffer에 0.8% 비율로 혼합하여 열을 가해 녹인 후 gel tray에 붓고 20분간 굳힌 agarose gel을 사용하였다. 전기영동장치에 gel과 동일한 1×TAE buffer를 gel 위로 3~5 mm정도 올라오게 붓고 loading dye와 loading star를 5:1의 비율로 섞은 혼합액과 plasmid DNA sample을 1:5의 비율로 혼합하여 각각의 well에 넣고 50 V에서 60분간 전기영동한 후 UV를 쬐어 band pattern을 확인하였다(Fig. 5).

8. Gel extraction

Crystal-coding plasmid DNA를 agarose gel에서 재추출하기 위해 Qiaquick gel extraction kit를 사용하여 gel extraction하였고 Qiaex II gel extraction kit는 Qiaquick gel extraction kit를 이용한 결과가 정확한지를 확인하기 위해 사용하였다. Qiaquick gel extraction kit는 protocol대로 사용하였다. KB098균주의 plasmid DNA를 전기 영동한 agarose gel로부터 crystal-coding plasmid DNA band를 날카로운 메스로 절단하였다. QG buffer를 gel 무게의 3배 volume으로 넣고 50°C에서 2분 간격으로 vortexing하며 10분간 녹인다. Isopropanol을 gel 무게만큼 첨가한 후 collection tube와 결합시킨 컬럼에 넣고 13,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 컬럼을 통과시킨다. Collection tube를 비우고 QG buffer 500 µl를 컬럼에 넣고 13,000 rpm으로 1분간 원심 한다. Collection tube를 비우고 PE buffer 750 µl를 컬럼에 넣고 13,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 washing 하고 collection tube를 비운 후, 다시 13,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 남은 ethanol을 제거한다. Collection tube를 버리고 1.5 ml eppendorf tube설치한 후 EB buffer를 20 µl 컬럼에 넣은 후 1분간 반응시키고 13,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 DNA를 용출시킨 후 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. Gel extraction sample의 확인은 0.8% agarose gel에서 50 V로 60분간 전기영동 하여 band를 확인하였고(Fig. 6), crystal-coding plasmid DNA band의 *cry* gene 확인은 PCR을 수행한 후 1.5% agarose gel에서 50 V로 35분간 전기영동 하여 확인하였다(Fig. 7). Qiaex II gel extraction kit는 protocol대로 사용하였다. KB098균주의 plasmid DNA를 전기 영동한 agarose gel로부터 crystal-coding plasmid DNA band를

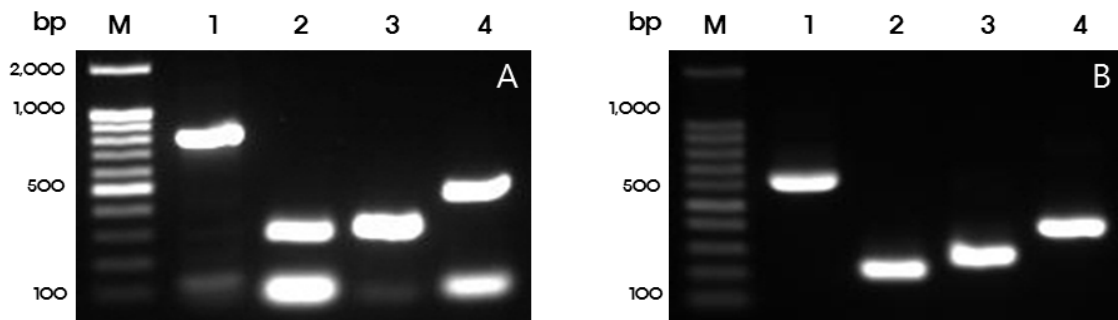


Fig. 7. PCR analysis of *Bacillus thuringiensis*, A: Gel elution sample; M, 100bp ladder; Lane1, *cry1Aa*; Lane2, *cry1Ab*; Lane3, *cry1C*; Lane4, *cry1D*; B: KB098; M, 100bp ladder; Lane1, *cry1Aa*; Lane2, *cry1Ab*; Lane3, *cry1C*; Lane4, *cry1D*.

날카로운 메스로 절단하였다. QX1 buffer 600 μ l, 3차 증류수 400 μ l 첨가한다. Qiaex II 30 μ l 첨가 후 30초 vortexing하여 현탁시킨다. 50°C에서 10분간 incubate하여 gel을 녹인다. 30초간 원심분리하고 상청액을 피펫으로 조심스럽게 제거한다. 500 μ l QX1 buffer를 넣고 vortexing하여 펠렛을 세척한다. 30초간 원심분리하고 상청액을 제거한다. 500 μ l PE buffer를 넣고 vortexing한 후 30초간 원심분리 과정을 두 번하여 펠렛을 세척한다. 펠렛을 30분 공기 건조한다. 3차 증류수 20 μ l 넣고 펠렛을 재현탁 한다. 30초간 원심분리한 후 상청액을 새튜브로 옮긴다.

9. Sequencing

Crystal-coding plasmid DNA plasmid DNA의 sequence는 주식회사 마크로젠에 의뢰하여 primer walking 분석을 통해 sequence를 읽어내었다. Sequence는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 NT0423과의 차이점을 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

1. KB098균주와 mutant균주의 위상차현미경 관찰

B. thuringiensis subsp. *aizawai* KB098균주는 위상차현미경의 관찰결과 나비목 해충에 살충력을 나타낸다고 알려져 있는 bipyramid 형태의 crystal protein을 형성하는 특징을 가지고 있는 것으로 나타났다. KB098균주는 autolysis가 일어나기 전에는 cell안에 spore와 crystal protein을 가지고 있다가 autolysis이후에 spore와 crystal protein이 cell밖으로 나출되는 것이 관찰되었다. KB098균주를 42°C에서 배양하여 얻은 Cry-mutant균주는 위상차현미경 관찰결과 autolysis 전과 후에서 모두 spore만이 관찰되어 crystal protein을 생성하는 능력이 소실되었음을 확인하였다.

2. KB098균주와 mutant균주의 살충활성 검증

KB098균주와 Cry-mutant균주와의 살충활성 비교를

통해 mutant균주의 살충활성 능력이 결여되었음을 확인하였다. KB098균주의 spore-crystal 현탁액이 100% 사충율을 나타내는 10^7 cfu/ml 농도를 인공사료에 처리한 후 파밤나방 2령충을 대상으로 생물활성검정을 실행하였을 때 mutant균주에서는 최대 12%의 사충율이 나타나 살충활성 능력이 없는 것으로 평가되었다. 이는 mutant균주가 crystal protein을 생성하지 못함을 의미한다.

3. SDS-PAGE

파밤나방에 높은 활성을 나타내는 KB098균주의 crystal protein 분자량 확인과 curing 과정을 통해 생성된 mutant의 crystal protein 존재유무를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다. KB098균주는 다른 문헌에서와 마찬가지로 bipyramid 형태의 crystal protein 분자량에 해당하는 130~145 kDa의 band가 형성되는 것을 확인하였다. Crystal protein을 형성하지 않는 mutant는 130~145 kDa의 band가 형성되지 않음을 확인하였다. Mutant 균주들의 경우 crystal protein을 형성하지 않기 때문에 KB098균주가 갖는 band에서 결실이 나타남을 확인할 수 있었다.

4. PCR analysis

PCR분석은 mutant균주가 crystal protein을 형성하지 못하는 원인이 *cry* gene의 결실에 있는지 확인하기 위하여 수행하였다. KB098균주의 모든 plasmid DNA를 대상으로 수행한 PCR에서는 보고된 바와 같이 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D* 4가지의 *cry* gene에서 증폭이 일어남을 확인할 수 있었다. 이는 다른 문헌들의 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 계통이 갖는 *cry* gene과 거의 유사한 결과이다 (Mommaerts et al., 2010; Chankhamhaengdecha et al., 2008, Thammasittirong and Attathom, 2008). 1.5% Agarose gel을 이용한 전기영동 결과 PCR산물의 크기는 알려진 바와 같이 *cry1Aa*가 782 bp, *cry1Ab*가 238 bp, *cry1C*가 288 bp, *cry1D*가 465 bp로 나타났다. Mutant균주의 모든 plasmid DNA를 대상으로 수행한 PCR에서는 어떠한 *cry* gene도 증폭이 되지 않았다. 이는 Mutant균주의 plasmid DNA에는 *cry* gene이 존재하지 않음을 의미하고 crystal-coding plasmid DNA의 결실이 일어났음을 예상할 수 있다.

5. Crystal-coding plasmid DNA

나비목에 높은 활성을 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098균주의 crystal-coding plasmid DNA의 위치를 확인하기 위해 42°C 배양을 통하여 얻어진 mutant 균주와의 plasmid DNA band pattern을 비교하였다. 0.8% Agarose gel 전기영동을 통해 KB098균주와 5개의 mutant 균주들 간에 plasmid DNA band pattern을 확인한 결과 KB098균주가 갖는 가장 큰 size의 plasmid DNA가 mutant에서 결실이 일어났음을 확인하였다. Mutant 균주들은 crystal-coding plasmid DNA의 결실이 일어났음이 PCR을 통해 확인되었기 때문에 42°C 배양을 통해 결실된 plasmid DNA는 crystal-coding plasmid DNA이고, 그 위치는 KB098균주의 가장 큰 size이다.

6. Gel extraction

Cry gene이 암호화 되어있는 23.1 kbp 이상의 가장 큰 plasmid DNA만을 추출하기 위해 agarose gel에서 직접 plasmid DNA를 추출하는 gel extraction 기법을 사용하였다. Crystal-coding plasmid DNA band는 23.1 kbp 이상에 존재하는 KB098균주에서 가장 큰 size의 plasmid DNA이다. Qiaquick gel extraction kit를 이용하여 gel extraction을 하였고, 산물의 크기는 23.1 kbp 위치에서 band가 형성됨을 확인하였다(Fig. 6). 산물의 크기를 재확인하기 위해 Qiaex II gel extraction kit를 사용하였고 결과는 Qiaquick gel extraction kit와 동일하게 23.1 kbp에서 band가 형성됨을 확인하였다.

Crystal-coding plasmid DNA band안에 존재하는 *cry* gene은 4종류의 primer를 사용한 PCR을 통해 확인하였다. PCR산물은 1.5% agarose gel 전기영동을 통해 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D*의 존재를 확인하였다(Fig 7). 이 결과를 통해 KB098의 *cry* gene은 가장 큰 size의 plasmid DNA에 암호화 되어 있음을 증명하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원에 의해 “곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제”(과제번호: PJ010029)로 이에

감사를 드립니다.

참고 문헌

- Abdullah MAF, Moussa S, Taylor MD, Adang MJ. 2009. *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) cadherin fragments function as synergists for Cry1A and Cry1C *Bacillus thuringiensis* toxins against noctuid moths *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *Pest Management Science* 65: 1097-1103.
- Aronson AI, Beckman W, Dunn P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological reviews* 50: 1-24.
- Bravo A, Gill SS, Soberon M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49:423-435.
- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Pena G, Nunez-Valdez ME, Soberon M, Quintero R. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and environmental microbiology* 64:4965-4972.
- Chankhamhaengdech ST, Tantichodok A, Panbangred T. 2008. Spore stage expression of a vegetative insecticidal gene increase toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* SP41 against *Spodoptera exigua*. *Journal of Biotechnology* 136:122-12.
- Gonzalez JM, Brown BJ, Carlton BC. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *PNAS* November 79(22):6951-6955.
- Ibarra JE, Federici BA. 1986. Isolation of a Relatively Nontoxic 65-Kilodalton Protein Inclusion from the Parasporal Body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology* 165:527-533.
- Iizuka T, Arakida M, Kikuta H, Isida K, Uyeda I, Shikata E. 1989. Electron microscopic observation of the plasmid DNA bearing insecticidal crystal protein gene in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Seric Science Japan* 58(6):448-456.
- Jung SY, Seo MJ, Youn YN, Yu YM. 2010. Characteristics of δ -Endotoxin protein produced from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* KB099 isolate showing High Bioactivity against *Spodoptera litura*. *The Korean journal of pesticide science* 14(4):446-455.
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 92:166-171.
- Kim CY, Kim SH, Kim YH, Kang SK. 1993. Determination of plasmids encoding crystal toxic protein gene in *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-1. *Korean Journal of seric science* 35(2):120-128.
- Kim TH, Kim DA, Kim KS, Seo MJ, Youn YN, Yu YM. 2009. Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*

- CAB109 isolate with bioactivities to *Spodoptera litura* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Korean Journal of Applied Entomology 48(4):509-517.
- Kronstad JW, Schnepf HE, Whiteley HR. 1983. Diversity of Locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. Journal of bacteriology 154:419-428.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lereclus D, Lecadet MM, Ribier J, Dedonder R, 1982. Molecular Relationships Among Plasmids of *Bacillus thuringiensis*: Conserved Sequences Through 11 Crystalliferous Strains. Mol Gen Genet 186:391-398.
- Lereclus D, Ribiert J, Klier A, Menou G, Lecadet MM. 1984. A transposon-like structure related to the 6-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. The EMBO Journal 3(11):2561-2567.
- Mclinden JH, Sabourin JR, Clark BD, Gensler DR, Workman W E, Dean DH. 1985. Cloning and Expression of an Insecticidal k-73 Type Crystal Protein Gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* into *Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology 50:623-628.
- Mommaerts V, Kris Jans K, Smaghe G. 2010. Impact of *Bacillus thuringiensis* strains on survival, reproduction and foraging behaviour in bumblebees (*Bombus terrestris*). Pest Management Science 66(5):520-525.
- Mun SH, Yoo CK, Oh HB, Seong WK, Chun JH, Yu JY, Lee S S. 2003. Genetic Diversity among virulent mega plasmids pXO1 and pXO2 of *Bacillus anthracis* isolated in Korea. Journal of bacteriology and virology 33(4):253-264.
- Swiecicka I, Bideshi DK, Federici BA, 2008. Novel Isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produce a quasicuboidal crystal of cry1Ab21 toxic to larvae of *Trichoplusia ni*. Applied and environmental microbiology 74:923-930.
- Thammasittirong A and Attathom T. 2008. PCR-based method for the detection of cry genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. J. Inverteb. Patholo., 98:121-126.
- Yang, Z, Chen H, Tang W, Hua H, Lin Y. 2011. Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes. Pest Management Science. 67: 414-422.
- Ye R, Huang H, Yang Z, Chen T, Liu L, Li X, Chen H, Lin Y. 2009. Development of insect-resistant transgenic rice with Cry1C-free endospore. Pest Management Science 65:1015-1020.
- Yousten AA. 1978. A method for the isolation of asporogenic mutants of *Bacillus thuringiensis*. Canada journal of microbiology 24:492-494.
- Yuan Y, Zheng D, Hu X, Cai Q, Yuan Z. 2010. Conjugative Transfer of Insecticidal Plasmid pHT73 from *Bacillus thuringiensis* to *B. anthracis* and Compatibility of This Plasmid with pXO1 and pXO2. Applied and environmental microbiology 76:468-473.