

Bacillus thuringiensis serovar. *kurstaki* HD 1과 HD 73이

생산하는 내독소 단백질의 면역학적 분석

오상수^{1*}·이영종¹·김창규²⁺·구본성¹·김종배²·이형환³

¹농촌진흥청 농업기술연구소 유전공학과

²건국대학교 축산가공과 ³건국대학교 생물학과

Immunological Analysis of Endotoxin Proteins Produced by *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 and HD73

Oh, Sang-Soo^{1*} Young-Jong Lee¹, Chang-Kyu Kim²⁺, Bon-Sung Koo¹,
Jong-Bae Kim², and Hyung-Hoan Lee³

¹ Dept. of Genetic Engineering, Agricultural Sciences Institute, Suwon, 440-100 Korea

² Dept. of Animal Products Science, Kon Kuk University, Seoul, 133-140, Korea

³ Dept. of Biology, Kon Kuk University, Seoul, 133-140, Korea

Immunological analysis between endotoxin proteins produced by *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 and HD73 have been investigated by using polyclonal antibodies. The antisera against the endotoxin proteins were prepared from rabbits injected with the endotoxin protein antigens. When about 2mg/ml of the antigens were injected for 7 times, the titers were highest. The stability of the antigens was reduced to about 50% after 9 days incubation at 4°C. The sensitivity of endotoxin protein from *B. thuringiensis* HD1 and HD73 by indirect ELISA was 50ng/ml and 400ng/ml, respectively. The cross reaction of antiserum appeared that anti-HD1 partially reacted with crystal protein but anti-HD73 reacted with HD1 endotoxin about 100%.

*Bacillus thuringiensis*는 그람양성 간균으로 내독소와 외독소를 생성하여 미생물 살충제로 사용되고 있다(1-4). 이 내독소는 당단백질의 일종이며(5, 6), 연구자에 따라 다양한 하위단위체와 크기를 보고하고 있다(1). 또한 *B. thuringiensis* 균주는 H항형체에 따라 24여종의 아종으로 분류되어 있는데, 각 균주의 내독소 단백질간 교차반응성에 관한 연구는 이중면역화산법으로 그 동질성 여부를 검정하고 있으나, 이에 관한 보고는 그리 많지 않은 것 같다(8-10).

한편 내독소를 검출하거나 정량하는 방법은 현미경 검정법(3), 생물검정(11), 아포계수법(2, 12), rocket immunoelectrophoresis법 등(13)이 있다. 이러한 방법들은 실험 목적 및 여건에 따라 다르지만 대체로 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라 실험과정이

복잡하며, 감도도 낮은 편이다.

따라서 본 연구는 미생물 살충제 개발의 기초자료를 얻기 위하여 나비목 유충에 독성이 강한 것으로 알려진 *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*를 사용해서 내독소에 대한 항체 생산 실험, ELISA에 의한 내독소의 정량과 균주간 내독소의 교차반응성에 대한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 균주중 *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* (*B.t.k*) HD 1과 HD 73은(14) 미국 농무성 Dr. H. T. Dulmage로 부터, *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* (*B.t.i*) 균은 Dr. R. M. Faust로

Key words: *Bacillus thuringiensis*, delta-endotoxin, ELISA, immunological relationship

²⁺ Present address: Third Laboratory, Central Research Institute, Chong Kun Dang Co. Seoul, Korea

* Corresponding author

부터 분양받았다. *B. t. i* 내독소에 대한 항혈청은 미국 Wyoming 대학 L. A. Bulla 박사로부터 공여받았다.

내독소 결정체의 분리

내독소 결정체의 분리는 오 등(15)의 방법을 수정하여 밀도구배 원심분리법으로 분리하였다. 30°C의 YEG 고체배지상에서 1주일간 배양한 후 멸균수로 균체를 수거하여 20분간 12,000×g로 원심분리하였다. 사례(ϕ 120 mm) 10개당 10 ml의 멸균수로 현탁시킨 다음 균질화시켰다. 내독소 결정체는 50-80%의 Renografin-76 step gradient로 분리하였고 분리 정도가 불량한 경우는 30-60% NaBr 밀도구배로 재차분리하였다. 분리 정도는 amido black 10-B로 염색하여 현미경검정으로 확인하였으며(16) 분리된 내독소는 냉동건조 또는 냉동보관(-20°C)하여 사용하였다.

내독소 용해 및 항원조제

내독소 결정체의 용해는 Tyrell 등(17)의 방법을 수정하여 용해시켰다. 냉동건조된 내독소를 2% β -mercaptoethanol에 혼합한 다음 1N NaOH를 첨가하여 pH 11.7으로 조절하고 3시간 진탕반응하여 용해시켰다. 이 혼합액을 30분간 30,000 r.p.m.로 원심분리한 다음 상등액을 냉동건조하여 사용하였다. 항원조제는 냉동 건조한 시료를 10 mM 인산완충액(pH 7.9)에서 용해시킨 다음 내독소의 extinction coefficient가 $E_{280}=1.1$ 일 때 1 mg으로 정하여 실험하였다.

항혈청 조제 및 ELISA에 의한 항체생성 조사

알카리에 용해하여 냉동 건조된 내독소를 인산완충액에 녹인 다음 뉴질랜드 화이트 토기에 피하주사하였으며, 마리당 주사량은 Table 1과 같이 각각 2 마리씩 실험하였다. 최초의 항원주입은 Freund's complete adjuvant로 유화시켜 주사했고, 2회부터 Freund's incomplete adjuvant를 주사하여 1주일 간격으로 7회 주사했다. 최종주사는 보조제없이 행하였다. 매회 주사 3일후 혈액을 채취하여 다음과 같이 항체생성 여부를 관찰하였다. 내독소를 10 μ g/ml 농도로 ELISA용 plate에 150 μ l씩 분주하여 4°C에서 18시간 반응시켰다. 세척용 완충액(0.05% Tween-20, 0.5% BSA, 10 mM PBS)으로 세번 세척하고 1% BSA-PBS로 30°C에서 2시간 처리했다.

Table 1과 같이 희석한 항혈청을 150 μ l씩 분주하여 30°C에서 3시간 반응시켰다. 기질 OPD용액을 150 μ l씩 가해서 30분간 반응한 다음 3N H₂SO₄ 50 μ l를 가하여 반응을 정지시키고 490 nm에서 ELISA 판독기로 측정하였다.

내독소의 항원 안정성 실험

인산 완충용액에 녹인 내독소를 4°C에 보관하면서 경과시간에 따른 항원 안정성을 간접 ELISA로 조사했다.

내독소의 간접 ELISA에 의한 측정법

내독소의 정량은 Wie 등(18)의 방법을 수정하여 실험했다. 수정된 내용은 용해된 내독소를 0.1 M sodium barbitol(pH 9.8)로 피막처리하였으며 표준 항원은 25 μ g/ml로부터 2배로 희석하고 항혈청은 각각 1 : 20,000으로 희석하여 검정하였다.

균주간 내독소의 이중면역확산 실험

50 ml의 nutrient 배지에서 72시간 진탕 배양한 다음 12,000×g에서 원심분리했다. 침전물은 10 mM EDTA(pH 8.5) 5 ml로 현탁시켜, 1.5 ml의 lysozyme용액(20 mg/ml)을 가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 최종 pH 11.7이 되도록 1N NaOH로 조절한 다음 실온에서 150분간 독소를 진탕 용해시켰다. 2M Tris·HCl(pH 7.0)으로 중화시킨 후 원심분리하여 상등액을 0.7% agarose 젤상에서 침강 반응시켰다.

ELISA에 의한 항체의 교차반응성 조사

B. t. k. HD 1의 내독소에 대한 항혈청과 HD 73의 내독소에 대한 항혈청이 HD 73과 HD 1의 내독소 항원에 각각 반응하는 정도를 알아보기 위해서 HD 1과 HD 73 내독소 항원을 10 μ g/ml를 0.2 μ g/ml까지 2배수로 희석해서 처리했다. HD 1과 HD 73의 내독소 항체를 각각 1 : 20,000로 희석해서 반응시켰다. HD 73의 경우도 HD 1과 같은 방법으로 행하였다.

결과 및 고찰

내독소 항원량에 따른 항체 생성능

공시균주의 내독소에 대한 항원을 토끼 마리당 주입횟수와 주입량을 조사하여 *B. t.* 균의 내독소에 대

Table 1. Titers of the antibody by ELISA according to the injection volume of *B. thuringiensis* delta-endotoxin antigens.

Bleeding day after first injection	Antibody titer						
	Injection volume of HD 1			Injection volume of HD 73			
	1.0mg/ml	2.0mg/ml	4.0mg/ml	0.5mg/ml	1.0mg/ml	2.0mg/ml	3.0mg/ml
3 th day	0.03*	0.03	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03
10 th day	0.03	0.18	0.18	0.03	0.03	0.04	0.03
17 th day	0.04 (1:800)**	0.14 (1:800)	0.01 (1:800)	0.03 (1:100)	0.09 (1:100)	0.20 (1:100)	0.07 (1:100)
24 th day	0.03 (1:1600)	0.40 (1:1600)	0.19 (1:1600)	0.06 (1:6400)	0.67 (1:6400)	0.21 (1:6400)	0.43 (1:6400)
31 th day	0.01 (1:3200)	0.16 (1:3200)	0.45 (1:3200)	0.74 (1:12800)	1.70 (1:12800)	0.55 (1:12800)	0.57 (1:12800)
38 th day	—	—	—	0.93 (1:12800)	1.89 (1:12800)	0.93 (1:12800)	0.57 (1:12800)
46 th day	0.13 (1:3000)	0.43 (1:48000)	0.29 (1:12000)	—	—	—	—
53 th day	—	—	—	0.26 (1:12000)	0.07 (1:48000)	0.22 (1:12000)	0.17 (1:48000)

* Values are optical density at 490nm.
 ** Number in parenthesis indicates the antisera dilution

한 항체를 조제하는데 기초자료를 얻고자 수행한 결과는 Table 1과 같다. 항원 주입량별 항체 생성량은 일정한 경향은 없었으나 주입량에 따라 항체가 얼마간 더 생성되는 것으로 나타났다. 주입횟수별로는 4회까지는 급격히 증가하였으나 그 후는 완만히 증가했고 6~7회 주입시에 최대치를 얻을 수 있었다. 면역항체 반응은 개체마다 다르고 실험 반복수도 적은 점은 있으나, 다만 위의 결과로 미루어 보아 항체 생성량은 2mg내외의 항원을 4~7회 투여했을 때 많은 양의 항체를 얻을 수 있는 것으로 사료된다.

내독소 항원의 안정성

용해된 내독소를 4°C에 보관하면서 항원 안정성 여부를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 항원은 5일까지 그 활성이 저하되기는 하나 그 정도가 완만한 반면, 그 이후는 급격히 저하되어 9일후에는 약 50% 이상의 항원 안정성이 감소하였다. 이런 결과로 볼 때 일단 용해된 내독소는 바로 사용하는 것이 바람직하며, 이후 실험은 용해후 3일 이내에 사용했다.

간접 ELISA에 의한 내독소 단백질의 정량

간접 ELISA에 의한 내독소를 정량했을 때 HD 1 내독소 단백질의 감도는 50 ng/ml 정도이고, HD

73의 경우 400 ng/ml이었다(Fig. 2). 이 결과는 Wie 등(18)이 보고한 30 ng/ml의 감도와 비교해 볼 때 HD 73 균주는 다소 낮은 편이었으나 HD 1의 감

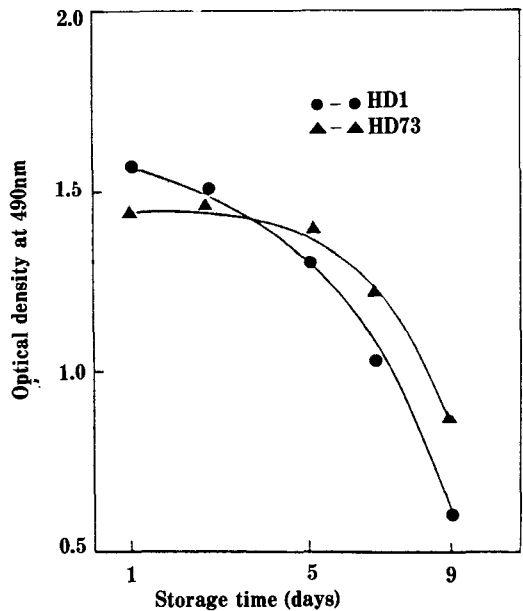


Fig. 1. Stability of *B. thuringiensis* serovar. kurstaki HD1 and HD73 endotoxin antigens at 4°C.

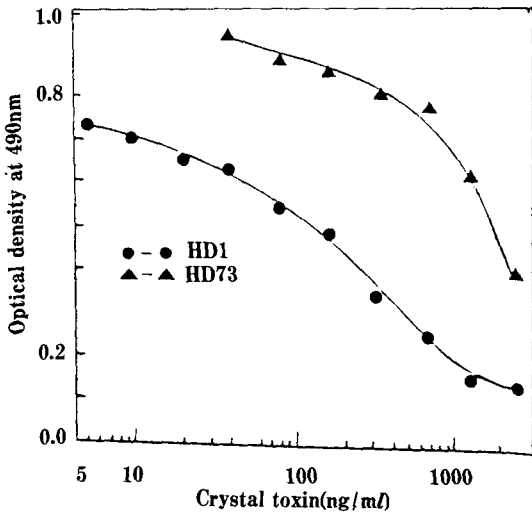


Fig. 2. Standard curve of *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 and HD73 endotoxin proteins.

도는 비슷한 수준이었다. 한편 Lee 등(19)은 sandwich 방법으로 측정했을 때 2 ng/m까지 가능하다고 했다. 이런 결과는 간접 ELISA 방법의 문제점인 항원의 피막효율이 일정치 않고 표준물질과의 경쟁이 완전하지 못하다는 점으로 볼 때 indirect ELISA 방법으로 내독소 정량의 감도를 더욱 높인다는 것은 어려우리라 생각된다. 따라서 감도를 높이기 위해서는 sandwich 방법 (19, 20)이나, 표지항원을 이용한 경쟁성 반응법(21)을 이용해야 할 것으로 사료된다.

이중 면역확산법에 의한 내독소 단백질간 면역관계

B. t. 균은 H항원에 따라 24여종의 아종으로 분류하고 있으나 동일 아종에 속한다 할지라도 그 특성이 다르다. *kurstaki*의 경우 80여종이 있는 것으로 알려져 있으며 (22) 해충에 대한 독성이 다르다고 보고되어 있다(23, 24).

이와같이 독소단백질간 면역학적 유연관계를 조사하기 위해서 실험한 결과는 Fig. 3과 같다. *B. t. k.* HD 1 균주의 내독소의 항혈청은 HD 73 균주의 내독소와 침강반응이 일어났으나, *B. t. i.* 내독소 항원과는 반응하지 않았으며, HD 73의 경우도 HD 1과 같은 양상이었다. 반면 자료화하지는 않았지만 *B. t. i.*의 항혈청은 HD 1이나 HD 73과는 전혀 반응이 일어나지 않았고, 타 연구보고와 비슷한 경향을 보여 주었다(8, 17, 19). 그러나 동일 아종에 속하는 HD 1과

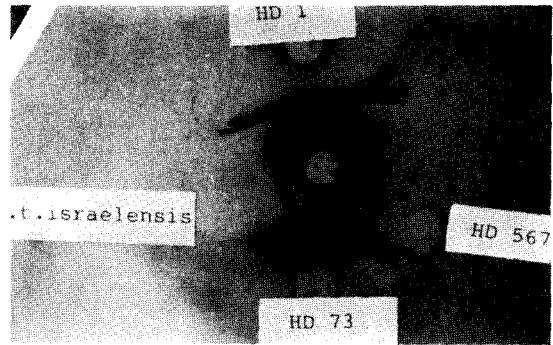


Fig. 3. Ouchterlony double diffusion test showing the reaction of identity between *B.t. serovar. kurstaki* and serovar. *israelensis* endotoxin. Center well: Antiserum of HD1

HD 73의 내독소간 동질성 정도를 분석하기는 곤란하였다.

ELISA에 의한 독소단백질의 교차반응성

B. t. k. HD 1과 HD 73의 내독소에 대한 교차반응성은 Fig. 4와 같이 HD 1 균주의 내독소 항체는 HD 73의 항원과 반응 정도가 현저히 낮았다. 그러나 HD 73에 대한 내독소의 항체는 HD 1의 내독소 항원과 거의 100% 반응하였다(Fig. 5). 본 실험으로 추론컨데 HD 1 내독소 항원은 HD 73 내독소 항원이 갖고 있지 않는, 적어도 하나 이상의 항원 결정기를 갖고 있는 것으로 추론된다. 여러 연구자 보고에 의

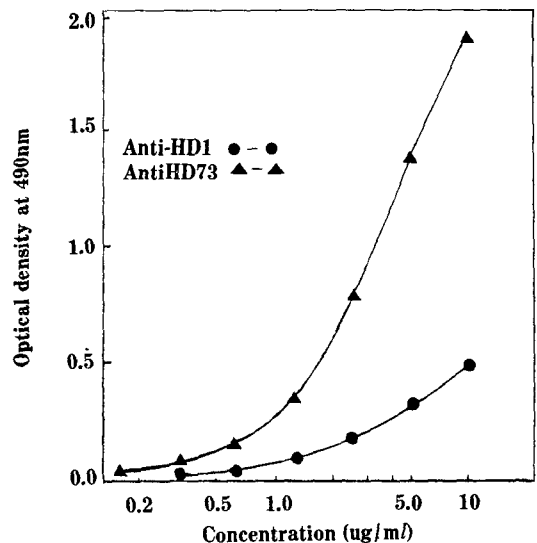


Fig. 4. Cross reaction of antiserum of *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 endotoxin against the HD73 endotoxin.

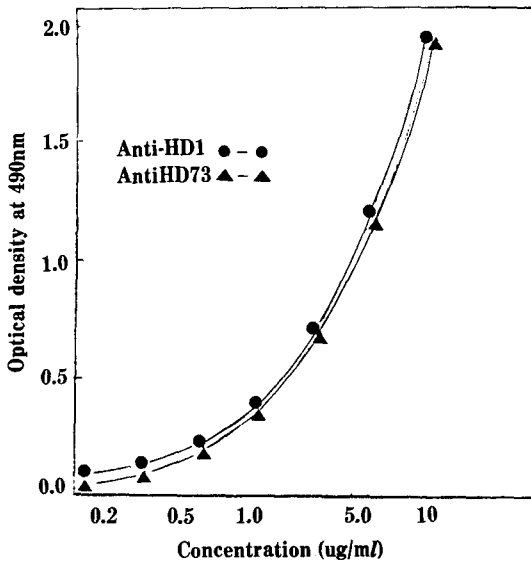


Fig. 5. Cross reaction of Antiserum of *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*. HD73 endotoxin against the HD1 endotoxin.

하면 HD 1 내독소의 subunit는 약 13.3KD과 6.8 KD 2개의 subunit로 되어 있다고 하였으며 (15, 25), HD 73의 경우 오 등(14)은 2개의 subunit로 나타났다고 보고하였으나, 타 연구자는 약 13.3KD으로 하나의 subunit로 구성되었다고 보고하였다. 이러한 차이는 단백질분해효소, 또는 높은 pH 등 여러 요인에 의하여 내독소가 분해될 가능성이 있다고 추론된다 (personal communication from Dr. C.C. Beegle, 27-30). 한편 Yamamoto(26)와 Iizuka(27)는 HD 1의 경우 6.6 KD의 내독소 단백질은 모기 유충에 대한 살충력을 갖고 있다고 하였다. 그러나 HD 73은 6.6 KD의 subunit도 없을 뿐만 아니라, 모기 치사효과가 없다고 보고하였다. 지금까지 공시균주의 살충력, subunit의 차이와 교차반응성 실험 결과로 보아 HD 1과 HD 73의 약 13.3KD의 subunit는 비슷한 구조, 즉 공통 항원 결정기를 가지고 있는 것으로 사료된다. 한편 HD 1과 HD 73은 H-flagella 항원정 반응 3a, 3b인 *kurstaki*에 속하는데 그 내독소 단백질간의 위에 고찰된 여러 요인의 차이가 있는 것으로 나타났다. 이것은 HD 1과 HD 73의 내독소 유전자는 특정 plasmid DNA상에 있고 그 크기와 gene localization이 다른 것으로 알려져 (31-33) 유전적 차이에 기인하는 것으로 추론된다.

본 실험으로 사용균주의 독소 단백질에 대한 항체 생산성, 내독소의 정량 및 정성을 할 수 있었다. 그

러나 항원 결정기의 명확한 규명을 하기 위해서는 단일클론 항체 등에 대한 연구가 더욱 수행되어야 할 과제라고 사료된다.

요 약

곤충치사 독소를 생성하는 *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD 1과 HD 73 균주에 대한 내독소 단백질의 특성을 규명하기 위하여 독소단백질의 항체 생산성, 항원 안정성, 정량 및 교차반응실험을 수행하였다. 곤충치사 내독소 단백질에 대한 항체는 토끼 마리당 약 2mg의 내독소 항원을 4회 주사했을 때 급격히 증가하여 6~7회 투여시에 최대치의 항체가 생성되었다. 내독소의 항원 안정성을 ELISA로 조사했을 때 5일 이내는 안정하였으나 9일 이후는 급격히 감소하였다. 간접 ELISA에 의한 *B.t.k.* HD 1과 HD 73 내독소의 정량 감도는 각각 50 μ g/ml, 400 ng/ml이었다. HD 1과 HD 73 균주의 내독소 단백질에 대한 항혈청은 *B.t. serovar. israelensis*와 침강반응이 일어나지 않았다. *B.t.k.* 균주의 동일 아종간 내독소 단백질에 대한 항체의 교차반응에서 HD 1 내독소 항체는 HD 73 균주의 내독소 항원과 부분적으로 반응하였으나 HD 73 내독소 항체는 HD 1 항원과 100% 반응하였다.

참고문헌

1. Faust, R.M. and L.A. Bulla, Jr.: *Microbial and viral pesticides* Marcel Dekker Inc., New York, 75 (1982).
2. Dulmage, H.T.: *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980* Acad. Press, New York, 193 (1981).
3. Faust, P.G.: *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980* Acad. Press, New York, 223 (1981).
4. Oh, S.S., Y.H. Kim, T.Y. Chung, and R.M. Faust: *Res. Rep. RDA (P.M. & U)* 29, 66 (1987).
5. Bulla, Jr., L.A., L.I. Davidson, K.J. Kramer, and B.L. Jones: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 1123 (1980).
6. Pfannenstiel, M.A., G. Muthukumar, G.A. Couche, and K.W. Nickerson: *J. Bacteriol.* 169, 796 (1987).
7. Dean, D.H.: *Biotech & Gent. Engin. Rev.* 2, 341 (1984).
8. Krywienstiel, M.A., P.G. Fast: *J. Invert. Pathol.* 36,

- 139 (1980).
9. Pfannenstiel, M.A., G.A. Chouche, E.J. Ross, and K.W. Nickerson: *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 644 (1984).
 10. Lynch, M.J. and P. Baumann: *J. Invert. Pathol.* **46**, 47 (1985).
 11. Klowden, M.J. and L.A. Bulla, Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 665 (1984).
 12. Brezgunov, V.N., N.V. Shvets, A.N. Alekseev, D.E. Svetogorov, A.N. Schepkina, and L.N. Karabanova: *Mikrobiologiya* **55**, 1036 (1986).
 13. Andrews, R.E., J.J. Iandolo, B.B. Campbell, L.I. Davidson, and L.A. Bulla, Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 644 (1980).
 14. Burges, H.D.: *Mosquito News* **44**, 66 (1984).
 15. Oh, S.S. and H.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **13**, 51 (1985).
 16. Smironff, W.A.: *J. Insect Pathol.* **4**, 384 (1962).
 17. Tyrell, D.J., L.A. Bulla, Jr., R.E. Andrews, Jr., K.J. Kramer, L.I. Davidson, and P. Nordin: *J. Bacteriol.* **145**, 1025 (1981).
 18. Wie, S.I., R.E. Andrews, Jr., B.D. Hammock, R.M. Faust, and L.A. Bulla, Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 891 (1982).
 19. Lee, J.Y., H.Y. ark, S.S. Kang, J.I. Kim, M.H. Han: *Kor. Biochem. J.* **19**, 6 (1985).
 20. Bainard, G., J.B. Kim, J.L. Brockelbonk, W.P. Collins, F. Kohen, and B. Geier: *Clin. Chem. Microbiol.* **30**, 538 (1984).
 21. Brockelbonk, J.L., G. Bainard, J.B. Kim, W.P. Collins, and I. Eshhar: *Ann. Clin. Biochem.* **21**, 284 (1984).
 22. Dulmage, H.T. and C.C. Beegle: *USDA-ARS Agricultural Reviews and Manuals*, ARM-S-30 (1982).
 23. Krywienczyk, J., H.T. Dulmage, and P.G. Fast: *J. Invert. Pathol.* **31**, 372 (1978).
 24. Japquet, F., R. Hutter, and P. Luthy: *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 500 (1987).
 25. Yamamoto, T. and R.E. McLaughlin: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**, 414 (1981).
 26. Yamamoto, T. and T. Iizuka: *Arch. Biochem. Biophys.* **227**, 233 (1983).
 27. Iizuka, T. and T. Yamamoto: *FEMS Microbiol. Lett.* **19**, (1983).
 28. Luthy, P.: *FEMS Microbiol. Lett.* **8**, 1 (1980).
 29. Bulla, Jr., L.A., K.J. Kramer, D.J. Cox, B.L. Jones, L.I. Davidson, and G.L. Lookhart: *J. Biol. Chem.* **256**, 3000 (1981).
 30. Couche, G.A., M.A. Pfannenstiel, and K.W. Nickerson: *J. Bacteriol.* **169**, 3281 (1987).
 31. Oh, S.S., B.S. Koo, S.H. Yoon, B.Y. Yi, Y.N. Park, J.C. Ryu: *Kor. J. Pl. Tiss. Cult.* abstract (1987).
 32. Gonzalez, Jr., J.M., H.T. Dulmage, and B.C. Carlton: *Plasmid* **5**, 351 (1981).
 33. Kronstad, J.W., H.E. Schnepf, and H.R. Whitely: *J. Bacteriol.* **154**, 419 (1983).

(Received December 21, 1987)