

Immuno-Affinity Chromatography에 의한 *B. thuringiensis* H9B균주의 모기살충성 내독소 단백질의 정제

김광현 · 배수장 · 이광배*

동의대학교 미생물학과 · *대구보건전문대학 보건위생과

Purification of a Mosquitocidal Toxic Protein from *B. thuringiensis* strain H9B by Immuno-Affinity Chromatography.

Kwang-Hyeon Kim · Soo-Jang Bae · Kwang-Bae Lee*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

*Department of Health Hygiene, Taegu Health College, Taegu 702-260, Korea

Abstract

For purification of a 70kDa toxic protein of mosquitocidal delta-endotoxin from *B. thuringiensis* strain H9B, immuno-affinity chromatography was performed. After separation of 70kDa toxic proteins from the delta-endotoxin of the strain H9B on SDS-PAGE, the 70kDa toxic protein was subcutaneously injected into rabbit for making a polyclonal antibody. A anti-70kDa toxic protein was purified by a column chromatography packed with proteinA-sepharose 4B gels. The 70kDa toxic protein from delta-endotoxin of the strain H9B was also purified by an immuno-affinity chromatography packed with CNBr-activated sepharose 4B gels conjugated anti-70kDa toxic protein after elution with 1/10M citric acid-1/5M Na₂HPO₄ buffer(pH3.2) containing 0.5M NaCl. The 70kDa toxic protein was purified through only one step-separation system, was demonstrated by SDS-PAGE and immunoblot.

I. 서론

*Bacillus thuringiensis*균주는 포자형성기간 중에 단백질성 내독소를 생성한다¹⁾. 이들 내독소는 숙주에 대한 특이성이 있어 나방류²⁾, 모기류³⁾, 및 풍뎅이류⁴⁾의 유충에 독성을 나타내고 있다. 또한 *B. thuringiensis*균주가 생성하는 내독소는 그 구성단백질이 대단히 복잡하다⁵⁾. 특히 모기에만 특이성을 가지는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*(Bti)균주의 내독소는 모기에 특이적으로 독작용을 하는 몇가지 단백질성분 이외에도 비특이적으로

독작용을 가지는 용혈성 단백질도 있다⁶⁾. 본 연구실에서는 Bti균주의 내독소와는 면역학적으로 차이가 있으나, 숙주인 모기에만 특이적으로 독성을 가진 *B. thuringiensis*중 H9B균주를 분리하였다⁷⁾. 또한, H9B균주는 편모항혈청반응으로 동정한 결과도 Bti균주와는 달리 serotype 10에 속하였으며, H9B균주가 생산하는 내독소 역시 SDS-PAGE상에서 70, 77 및 135kDa 크기의 단백질만으로 구성되어 있어 Bti균주의 내독소의 구성단백질 양상이 달랐다.

따라서 동일한 숙주에 특이적으로 독작용이 있으나, 면역학적으로 독소단백질에 차이가 있으므로 내독소 단백질에 대한 숙주의 특이성에 관한 차이점을 규명하는 일환으로 우선 H9B균주의 내독소중 70kDa단백질은 immunoaffinity chromatography를 사용하여 정제코자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양방법

사용균주는 본 연구실에서 분리된 모기유충에 살충력이 있는 내독소를 생산하는 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* strain H9B를 사용하였다⁷⁾. 또한 내독소 생성용 배지는 PYG천천배지(peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, glucose 1.0%, pH7.0)를 사용하였으며, 배양조건은 28°C에서 3일간 정치배양하였다.

2. 내독소 분리

H9B균주의 내독소는 Chung과 Hammock의 방법⁸⁾에 따라 sucrose-stepwise gradient에 의한 원심분리(6800rpm, 30분)로 분리하고, 분리된 내독소는 위상차 현미경으로 그 순도를 측정하였다.

3. 항원 및 항혈청의 조제

분리된 내독소는 0.1N NaOH용액에 넣어서 37°C에서 2시간 동안 용해시킨 후 15% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 행하고, coomassie brilliant blue R-250(Sigma, St. Louis)로 염색하여 Amero⁹⁾등과 Gilson¹⁰⁾등이 기술한 바와같이 70kDa의 단백질이 함유된 gel 단편을 절단하고 진공동결시켜 보관하면서 이를 항체 생산용 항원으로 사용하였다.

분말화된 항원은 saline에 완전히 현탁하여 토끼의 피하에 1주일간격으로 4회 주사하였다. 최종 주사한 날로부터 1주일후에 토끼의 혈액을 채취하고 혈청을 모은후 비등화시켜서 Na_2SO_4 로 염색하고 20mM 인산완충액(pH7.0)으로 투석(4°C, overnight)하여 투석용액을 70kDa 내독소 단편에 대한 항혈청으로 사용하였다.

4. 항체의 정제

상기의 투석된 항혈청을 이용하여 Kruger¹¹⁾등이 기술한바와같이 ProteinA Sepharose 4B(Sigma p9424)로 70kDa내독소 단편에 대한 항체를 정제하였다. 즉, 5ml용 column($\phi 1.5 \times 5.0$ cm)내에 ProteinA Sepharose 4B(Sigma

p9424) 1ml를 packing하였다. 증류수 10ml를 사용하여 column을 씻고, 다시 10ml의 결합용 완충액(3M NaCl, 1.5M glycine; pH9.0)으로 씻었다. 투석한 항혈청 용액은 결합용 완충액으로 2배 희석하여 ProteinA Sepharose 4B가 함유된 column에 통과시키고 IgG를 부착시킨 후 30ml 결합용 완충액으로 column을 세척하였다. 미리 중화용 완충액이 1ml씩 함유된 각 시험관에 10ml의 용출용 완충액(0.1M citric acid, 5N NaOH; pH3.0)으로 IgG를 용출하였다. 각 분리된 용출액은 A_{280} 에서 흡광도를 측정하고 4°C에 보관하면서 사용하였다.

5. Affinity chromatography

5.1. CNBr-activated Sepharose 4B에 IgG부착

먼저 Yu¹²⁾등이 기술한 바와같이 CNBr-activated Sepharose 4B(Sigma p9424) 2.5g을 1mM HCl 100ml에 팽윤시키고(20°C, 20min), glass filter(G_3)상에서 여과시켰다. 그후 Sepharose gel은 0.5M NaCl이 함유된 0.1M $NaHCO_3$ (pH8.5)로 세척(3회)하였다(팽윤 gel/ml당 20ml사용함). 세척된 gel은 즉시 column($\phi 1.5 \times 5.0$ cm)에 packing하고 정제된 항체는 0.5M NaCl이 함유된 0.1M $NaHCO_3$ (pH8.5)와 동량을 섞어서 packing된 gel에 loading(4°C, 6hr, continually circulating)함으로서 IgG를 Sepharose 4B에 부착시켰다. 70kDa내독소에 대한 IgG를 Sepharose 4B의 CNBr부분에 흡착시킨 후 0.5M NaCl이 함유된 0.1M $NaHCO_3$ (pH8.5)로 3회(10ml/ml gel) 그 column을 씻고, IgG가 부착되지 않은 CNBr부분은 0.1M ethanolamine-HCl(pH8.6) 25ml를 사용하여 blocking하였으며, column에 남아있는 ethanolamine을 제거하기 위해 다시 0.5M NaCl이 함유된 0.1M $NaHCO_3$ (pH8.5)로 세척(3회)하였다. 그후 20ml의 1/15M PBS(pH7.2)로 다시 column을 씻었다.

5.2. 내독소 항원의 조제 및 흡착

Oh¹³⁾등이 기술한바와같이 결정성 내독소는 0.1N NaOH로 37°C에서 2시간동안 용해시키고, 1N HCl로 pH8.0-8.5까지 중화시킨후 상기의 항체로 결합된 CNBr-activated Sepharose 4B column내로 loading(4°C, 6hr, continually circulating)하여 항원을 항체에 부착시켰다. 그후 0.5M NaCl이 함유된 0.1M $NaHCO_3$ (pH8.5)로 세척하고 0.05M ethanolamine(pH11.5)로 항원을 용출시켰다. 이때 용출액은 1ml씩 분취하였고, 분취용기 내에는

미리 중화완충액(1M Tris-HCl, pH9.6)이 1ml씩 함유되어 있었다.

6. 정제된 70kDa 단백질의 순도 측정

6.1. SDS-Polyacrylamide 전기영동

Lammili 방법¹⁴⁾에 따라 15% SDS-polyacrylamide gel 상에 분리된 70kDa 단백질 단편을 주입하여 전기영동하였다(25mA, 5hr). 이때 염색은 Bolag¹⁵⁾가 기술한 방법에 따라 silver 염색을 행하였다. 또한 단백질의 분자량을 측정하기 위해 표준 단백질로서는 Sigma사의 myosin(205 kDa), β -galactosidase(116 kDa), phosphorylase b(97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), and carbonic anhydrase(29 kDa)가 사용되었다.

6.2. Immuno-blot

SDS-PAGE를 행하여 분리된 항원은 다시 nitrocellulose에 transfer시키고, peroxidase antirabbit-antibody가 함유된 Immunoblot kit(Bio-Red product)를 가지고 Bio-Red 사의 안내서에 따라 blotting한 후 antirabbit conjugated peroxidase에 의해 분리된 항원을 염색하여 재확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 항체의 정제

H9B균주의 내독소 중 토끼로부터 조제된 70KDa 단백질에 대한 항혈청을 Na₂SO₄에 침전시킨 후 투석하고, 투석된 항혈청은 미리 proteinA-sepharose 4B로 채운 후 결합용 완충액으로 셋은 5ml용 column(ϕ 1.5x5.0cm)에

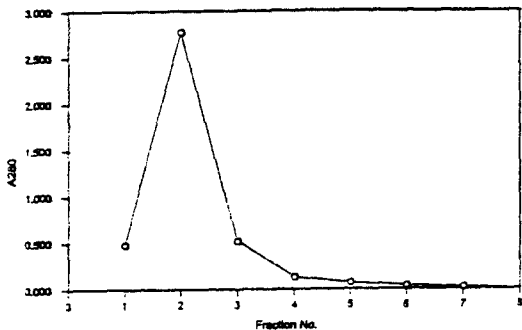


Fig. 1. Purification of anti-70kDa toxic protein from strain H9B by proteinA-sepharose 4B.

loading하여 IgG만을 proteinA-sepharose 4B에 결합시켰다. 그 후 용출용 완충액으로 protein A에 결합된 IgG를 용출시켜 1ml/tube씩 분획하고 분획된 IgG는 A_{280nm}에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 Fig.1에서 보는 바와같이 단 하나의 단백질 peak만이 존재함을 알 수 있었으며, fraction 2에서 가장 흡광도가 크게 나타났다. 이 단백질 peak는 70kDa의 내독소 단백질에 대한 항체라고 추정하였다.

2. 항원의 분리 및 정제

CNBr-activated Sepharose 4B에 proteinA-sepharose 4B로부터 정제된 항70kDa의 독소단백질을 결합시키고, 결합된 항원-항체복합물로부터 70kDa의 단백질항원 단편만을 분리하기 위하여 0.5M NaCl이 함유된 1/10M citric acid-1/5M Na₂HPO₄ 완충액(pH3.2)으로 column을 용출시켰다. 그 결과 Fig.2에서 보는 바와같이 pH3.2의 완충액으로 용출시킨 fraction 11-15에서 단일 peak의 단백질이 용출되었다.

이때 protein A로 정제한 IgG를 CNBr-activated sepharose 4B에 흡착시키고자 할 때는 반드시 용출완충액인 ethanol amine은 dialysis등으로 제거해야한다. 그 이유는 CNBr은 amino기에 비특이적으로 결합하기 때문에 완충액내에 존재하는 ethanol amine이 IgG가 CNBr와 결합하는 것을 방해하기 때문이다. 또한 amino methane기가 함유되어 있는 tris 완충액의 사용도 동일한 이유로 반드시 피해야 하였다.

따라서 CNBr로 활성화된 sepharose 4B에 항체를 결합시키고, 결합된 항체에 용해된 H9B균주의 delta-endotoxin

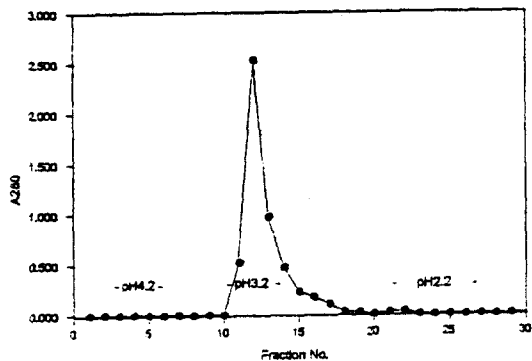


Fig. 2. Affinity Purification of a 70kDa toxic protein by CNBr-Sepharose 4B conjugated Anti-70kDa toxic protein.

을 loading하여 70kDa 단백질을 부착시키고자 하였다. 그 결과 0.5M NaCl이 함유된 1/10M citric acid-1/5M Na₂HPO₄ 완충액(pH3.2)으로 용출하였을 때만 항원이 용출되었다. 한편 pH2.2의 0.5M NaCl이 함유된 1/10M glycine-1/10M HCl 완충액이나, pH4.2의 0.5M NaCl이 함유된 1/10M citric acid-1/5M Na₂HPO₄ 완충액이 사용되었으나, 이들 완충액은 모두 CNBr과 결합된 항체로부터 항원을 분리가 이루어지지 않았다.

3. SDS-Polyacrylamide gel 전기영동 및 immunoblot

상기 Fig.2의 용출분획중에 fraction No.12를 전기영동용 시료로 사용하였다. 그 결과 Fig.3 A에서 보는 바와같이 분획된 단백질의 대부분은 70kDa의 단백질(lane 1)로 확인되었다. 이는 lane 2의 H9B균주의 내독소중 135kDa의 단백질과는 뚜렷이 구별되며, 70-77kDa의 단백질에 걸쳐서 존재하였다. 또한 SDS-PAGE gel상의 내독소 단백질은 nitrocellulose에 전기적으로 blotting하여 70kDa항체와 결합시켜 반응시킨 결과 Fig.3 B에서 보는 바와같이 Bti의 내독소와는 전혀 반응을 나타내지 않았지만(lane 6), H9B균주의 내독소(lane 5) 및 immuno-affinity

chromatography를 행하여 정제된 70kDa(lane 4)와는 면역학적으로 반응이 나타났다. 이는 H9B의 내독소중 70kDa의 단백질은 적어도 동일한 내독소에 존재하는 130kDa 단백질과는 항원성에 차이가 있으며, 아종이 다른 Bti균주의 내독소에 존재하는 4가지 단백질과도 면역학적으로 전혀 반응이 나타나지 않았다. 또한 Lee 등⁷⁾이 기술한 H9B균주의 내독소 단백질은 Bti내독소 단백질과는 immunodouble diffusion에서 흐릿한 침강선이 형성되었다고 하였으나, 본인이 정제한 H9B균주의 70kDa의 항체와 Bti내독소와는 immunoblot상에서 면역학적으로 전혀 반응이 나타나지 않았으므로 적어도 H9B균주의 내독소 단백질중에 70kDa 단백질은 Bti균주의 내독소와는 전혀 면역학적으로 다르다고 사료된다.

IV. 결론

B. thuringiensis H9B균주가 생산하는 모기에 특이적인 내독소에 함유된 70kDa 단백질을 정제하기 위하여 immuno-affinity chromatography를 행한 결과는 다음과 같다.

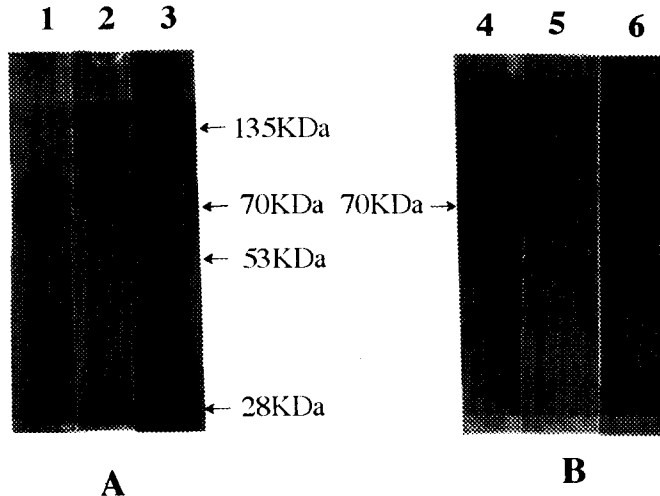


Fig.3. SDS-PAGE and immuno-blot pattern against anti-70kDa toxic protein of strain H9B. Symbols: A; SDS-PAGE pattern, lane 1; the purified 70kDa toxic protein, lane 2; delta-endotoxin from strain H9B, lane 3; delta-endotoxin from Bti, B; Immuno-blot against anti-70kDa toxic protein, lane 4; the purified 70kDa toxic protein, lane 5; delta-endotoxin from SDS-PAGE, lane 6; delta-endotoxin from Bti.

1. 내독소를 SDS-Polyacrylamide gel상에서 전기영동을 행하고 70kDa단백질을 분리하였으며, 분리된 70kDa단백질은 토기에 피하주사를 행하고, 70kDa 단백질에 대한 polyclonal 항체를 만들었다. 70kDa단백질에 대한 항체는 조제된 항혈청을부터 proteinA-sepharose 4B gel을 충전시킨 column으로 정제하였다.
2. 정제된 70kDa항체는 CNBr로 활성화된 sepharose 4B gels에 결합시키고, 항체가 부착된 sepharose 4B gel을 column에 충전하여, 70kDa항원에 대한 affinity chromatography를 행하였다. 그 결과 부착된 70kDa항원은 0.5M NaCl이 함유된 1/10M citric acid-1/5M Na₂HPO₄ buffer(pH3.2)로 용출하였을 때 항체로부터 분리할 수 있었다.
3. 정제된 70kDa항체는 SDS-PAGE와 immunoblot에 의해 확인되었다.

감사의 말씀

이 논문은 1997년 동의대학교 생물생산연구소 연구비로 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Bulla, L. A., Jr., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson, and P. C. Fitz-James : Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*, Crit. Rev. Microbiol. 8, 147-204, 1980.
2. Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio : The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins, Annu. Rev. Entomol. 37, 615-636, 1992.
3. Kawalek, M. D., S. Benjamin, H. L. Lee, and S. S. Gill : Isolation and identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathan*, Appl. Environ. Microbiol., 61, 2965-2969, 1995.
4. Ohba, M., H. Iwahana, S. Asano, N. Suzuki, R. Sato, H. Hori : A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles, Lett. Appl. Microbiol. 14, 54-57, 1992.
5. Aronson, A. I., W. Beckman, and P. Dunn : *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens, Microbiol. Rev., 50, 1-24, 1986.
6. Porter, A. G., E. W. Davidson, and J. W. Liu : Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes, Microbiol. Rev. 57, 838-861, 1993.
7. Lee, G. H., K. H. Kim, and B. W. Kim : Characterization of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain H9B, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 393-398, 1993.
8. Cheung, P. Y. and B. D. Hammock : Microlipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* delta-endotoxin for control of mosquito larvae, Appl. Environ. Microbiol., 50, 984-988, 1995.
9. Amero, S. A., T. C. James, and S. C. R. Elgin : Production of antibodies using proteins in gel bands. In Methods in molecular biology, vol. 3., New protein techniques. (edit) J. M. Walker, Humana Press · Clifton, New Jersey, 342-355, 1988.
10. Gilson, D. R., and R. W. Gracy : Extraction of proteins and peptides from Coomassie blue-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, Analytical Biochem, 96, 352-354, 1979.
11. Kruger, N. J., and J. B. W. Hammond : Purification of immunoglobulins using protein A-Sepharose, In Methods in molecular biology, vol. 3, New protein techniques, edited by J. M. Walker. Humana Press · Clifton, New Jersey, 356-363, 1988.
12. Yu, Y. M., M. Ohba, and K. Aizawa : Affinity purification of a 65-kilodalton parasporal protein from *Bacillus thuringiensis* PG-14 that shows mosquitocidal activity, Antonie van Leeuwenhoek, 54, 257-265, 1988.
13. Oh, T. K. : Purification of *Tricoderma viridae* cellobiohydrolase by immunoaffinity chromatography, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 18, 390-393, 1990.

14. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature(Lodon)*, 227, 680-685, 1970.
15. Bollag, D. M., S. J. Edelstein : Gel electrophoresis under denaturing conditions, *In Protein method*, A John Wiley & Sons INC. Publication, 117-127, 1991.