

클로닝된 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 살충성 단백질 유전자의 대장균에서의 발현

황성희 · 차성철 · 유관희¹ · 이형환*

건국대학교 생물학과 및 유전공학연구소, ¹상지대학교 생물학과

Expression in *Escherichia coli* of a Cloned *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 Insecticidal Protein Gene. Hwang, Sung-Hei, Soung-Chul Cha, Kwan-Hee Yoo¹, and Hyung-Hoan Lee*. Department of Biology and Research Institute Genetic Engineering, Kon-kuk University, Seoul 143-701, Korea, ¹Department of Biology, Sanggi University, Wonju 220-702, Korea - The expression in *Escherichia coli* of a cloned insecticidal protein (ICP) gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 in pHLN1-80 (+) and pHLN2-80(-) plasmids was investigated through deletions in promoters, transcription start point, and termination region. Six recombinant plasmids were constructed in an attempt to analyze the overexpression of the ICP in relations to its gene structure. The amounts of ICP produced from the recombinants were measured by SDS-PAGE and confirmed by Western blot analysis. One clone was not overexpressed which having only -80 bp (contained BtI promoter) part of the ICP gene promoter (without *Plac* promoter), the right-oriented ICP gene and the termination region. Removal of 350 bp from upstream region of the *Plac* of the clone pHLN2-80 (-) resulted in overexpression of the ICP. One clone was not overexpressed in which the clone consisted of -72 bp part of the ICP promoter without the transcription start point and the transcriptional termination region, and having the right-oriented ICP gene sequence. One clone consisting of the inverted ICP gene sequence, the -72 bp ICP gene promoter, and without the termination region caused overexpression. One clone which consisted of the inverted ICP gene, the -72 bp ICP gene promoter and the termination sequence was overexpressed. These results indicated that the *Plac* promoter, transcription termination region, the inverted ICP gene insertion, and the -80 bp or -72 bp part of the ICP gene promoters were concerned in the overexpression of the ICP gene in the recombinant plasmid, and also the overexpression mechanism might result from the disruption of the transcription-suppressing regions in the promoter regions.

Key words: *B. thuringiensis*, overexpression, insecticidal protein gene, endotoxin crystal

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki*는 그람양성의 간균으로서 아포를 형성할 때 단백질성 결정체로 된 δ -내독소를 생산을 하며, 분자량이 약 130 kDa인 단백질로 구성되어 있고, 곤충의 유충을 치사시키는 능력을 가지고 있다[1, 6, 13]. 내독소결정체는 곤충의 유충이 섭취를 하면 중장에서 알칼리성 pH로 인하여 단백질 분해효소가 활성화되어 살충성의 단백질(insecticidal protein; ICP)로 전환이 되어 곤충을 치사시키는 특성[6, 13]을 이용해서 미생물살충제로 이용을 하고 있다[6, 10, 12, 14]. 내독소결정체 단백질 유전자는 플라스미드에 존재하는 것이 보고되었으며[5, 7, 12], ICP 유전자를 클로닝하여 세균에서 발현을 연구해왔다[8, 9, 11, 19].

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1 내독소의 살충성 단백질(ICP) 유전자를 클로닝하여 두개의 클론 pHLN1-80(+)과 pHLN2-80(-)을 만들어서 대장균에서

ICP 유전자의 발현을 연구하였다. 대장균에서 pHLN2-80(-) 클론은 pHLN1-80(+) 클론보다 ICP 발현량이 매우 높고, 살충력은 약 90배 이상으로 높은 것을 이미 보고하였다[9]. pHLN2-80(-) 클론은 ICP 유전자 서열이 클로닝 벡터의 *Plac* 프로모터(promoter)의 전사방향과 반대로 삽입이 되어 있다. 즉 *Plac* 프로모터 앞에 ICP 유전자의 전사말단 서열이 연결되어 있다. 그럼에도 불구하고 ICP 유전자의 발현은 정상 배열보다 매우 높았는데 관심이 있다. pHLN1-80(+) 클론에는 ICP 유전자 프로모터의 일부인 -80 bp를 가지고 있다. Hwang 등[9]의 보고를 Schnepf 등[23]이 결정한 ICP 유전자 염기서열을 이용하여 pHLN1-80(+) 클론에 클로닝된 제한효소 3.8 kb *NdeI* DNA 단편의 유전적인 구조를 보면, 전체 ICP 유전자 암호서열(open reading frame) 3,531 bp가 존재하며, ICP 유전자 프로모터의 일부인 -80 bp 프로모터가 존재하고, C-말단에는 해독종결암호 TAG[23], 하류에 245 bp 단편의 DNA를 가지고 있다. ICP 유전자의 프로모터에는 중복된 BtI과 BtII의 두 개의 프로모터를

*Corresponding author
Tel. 82-2-450-3426, Fax. 82-2-452-9715
E-mail: hhlee@kkucc.konkuk.ac.kr

가지고 있다[23, 27]. 그리고 *E. coli*와 *B. thuringiensis*에서의 전사 개시점인 G가 해독개시 ATG 암호에서 -77염기에 있다[23, 27]. -80 bp 프로모터에는 ICP 유전자 전사개시점 G의 3' 쪽에서부터 시작하는 BtI 프로모터만을 가지고 있고, 전사개시점G의 상류 5' 쪽에서 시작하는 BtII 프로모터가 존재한다[27]. 또한 -80 bp 프로모터에는 1 곳의 *DraI* 인식부위와 -14와 -4 염기서열 사이에 Shine-Dalgarno(S.D.) 서열이 확인되었다[23, 27]. *B. thuringiensis*의 결정체단백질의 생산은 아포를 형성하는 과정중에 아포 유전자가 연속적으로 발현 되면서 후에 내독소결정체 단백질이 생산되기 때문에 ICP 유전자 프로모터는 다른 대장균 등과는 차이가 있다. 이러한 결과를 근거로 ICP 유전자의 양 말단 프로모터와 종결부위의 염기서열의 변이가 ICP 유전자의 발현에 미치는 영향을 연구하고, 과다발현 기작을 밝히는 중요한 연구로 판단이 되어서 본 연구를 하였다.

본 연구에서는 상기의 pHLN2-80(-) 클론의 발현량을 조절하는 원인을 규명하기 위하여 살충단백질(ICP)의 아미노산 서열은 변화되지 않는 범위 내에서 pHLN1-80(+) 클론에 있는 pBluescript SK(+)*의 Plac* 프로모터와 ICP 유전자 프로모터의 일부인 -80 bp 프로모터의 염기서열의 변이와 전사개시 및 종결부위의 변이가 ICP 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용한 균주 및 플라스미드

Escherichia coli DH1/pKK232-8[4] 및 *Escherichia coli* XL1-blue/pBluescript SK(+)[25], *Escherichia coli* XL1-blue/pHLN1-80과 *Escherichia coli* XL1-blue/pHLN2-80[9] 등을 사용하였다.

플라스미드 DNA의 분리와 정제

*E. coli*에 있는 플라스미드 DNA는 알칼리 분해법[2, 18]과 CsCl-ethidium bromide 밀도기울기 초원심분리법[18]으로 분리하였다. 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 ml를 첨가하여 알칼리 분해법으로 분리하였다. DNA를 순수 정제를 하기 위해서 CsCl-ethidium bromide 밀도기울기 초원심분리법을 사용하였다. 이를 위하여 CsCl 8 g과 10 mg/ml의 ethidium bromide 용액 0.4 ml DNA용액에 첨가하여 160,000 ×g로 35시간 동안 초원심분리(Kontron Hermle Centrifuge, T-1045)한 후 형성된 DNA 밴드를 주사기로 회수하였다. Ethidium bromide는 멸균수로 포화된 *n*-butanol로 제거하

였고, CsCl은 TE 완충용액에서 투석하여 제거하였으며, 정제한 DNA는 TE완충용액에 보관하여 실험에 사용하였다.

유전자 클로닝

유전자 및 제한효소단편 DNA의 클로닝은 Maniatis 등[18] 및 Hwang 등[9]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 증류수 3 µl을 혼합한 총 50 µl을 14°C에서 18시간 동안 반응시킨 후 반응 용액을 1.0% agarose gel 전기영동[5, 8]으로 확인하였다. *E. coli* competent cell과 형질전환은 Mandel 등[17]의 방법을 사용하였다.

아가로스 및 폴리아크릴아미드 전기영동

플라스미드 DNA 및 제한효소 DNA단편들은 agarose 전기영동방법[15]를 이용하여 전개하여 정제하였다. 재조합 클론이 생산하는 130 kDa의 ICP을 조사하기 위해 클론이 생산한 단백질을 보유한 전체세포를 초음파 처리로 파쇄하였다[9]. 파쇄액에 존재하는 단백질을 Bollag 등의 방법[3]을 사용하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하여 분석하였다. 재조합 클론들의 하룻밤 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 반응시켰다. 상온에서 식힌 후 15,000 ×g로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였다. 시료 단백질의 분자량은 표준분자량 단백질(Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.)의 분자량과 비교하여 구하였다. 전개가 끝난 젤은 1시간 동안 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(Korea Manhattan Co. Seoul, Korea)로 60°C, 30 분간 건조시켜 보관하였다.

프로모터 부위의 변이를 시킨 재조합체의 제조

pHLNK-80 클론의 제조 pHLN2-80(-)에서 ICP 유전자의 양 말단에 존재하는 두 가지 프로모터(Fig. 1) 중에서 5'-말단에 존재하는 -80 bp 프로모터(BtI 프로모터 포함되어 있음)의 활성만을 측정하기 위해 자체 프로모터를 가지지 않는 pKK232-8 벡터[4]를 이용하였다. pHLN1-80을 *XhoI*으로 3.8 kb DNA 단편을 절단한 다음에 Klenow DNA 중합효소를 처리하여 양 말단을 평

평말단으로 만들고, *Bam*HI를 처리하여 3'-말단의 종결 부위에 *Bam*HI말단을 만든 3.8 kb DNA 단편을 얻었다. pKK232-8벡터를 *Hind*III으로 절단을 한 다음에 Klenow DNA 중합효소를 처리하여 평평말단을 만들고, *Bam*HI를 처리하여 5'-말단 쪽의 *Hind*III 부위를 제거하여 *Bam*HI말단이 생긴 pKK232-8을 제조하였다. 상기의 3.8 kb단편의 *Bam*HI부위와 평평말단을 벡터의 같은 제한효소부위에 각각 T4 DNA 연결효소로 연결하여 재조합클론 pHLNK-80을 제조하였다(Fig. 3A).

pHLNF1-80 클론의 제조 클론pHLN1-80에서 ICP 유전자의 5'-말단에 위치하는 *Plac* 프로모터의 활성을 측정하기 위해서 pHLNF1-80 클론을 제조하였다(Fig. 3A). pHLN1-80 클론 DNA를 *Bam*HI 제한효소로 절단을 하여 3.8 kb DNA단편을 분리하여 낸 다음에 Klenow DNA 중합효소를 처리하여 평평말단을 만들고, *Xho*I 효소를 처리하여 종결부위에 *Xho*I 말단을 갖는 -80 bp-프로모터가 있는 3.8 kb DNA 단편을 분리하였다. pBluescript SK(+)-벡터[25]를 *Sma*I과 *Xho*I으로 이중 절단하여 *Plac* 프로모터가 있는 2.9 kb DNA단편을 분리한 후에 상기의 3.8 kb DNA 단편을 *Sma*I과 평평말단끼리 각각 연결효소를 이용하여 클로닝을 하여 재조합 클론을 만들었으며, 이를 pHLNF1-80 클론이라 명명했다(Fig. 3A). pHLN1-80클론의 -80 bp 서열 중에서 ICP 유전자의 연결부위에서는 *Bam*HI-*Sma*I/*Nde*I(--GGATCC-CCC/TATG--)로 되어 있다. 상기의 pHLNF1-80 클론은 *Sma*I/*Bam*HI(--CCC/GATCC--) 서열로 변경이 되었다. 변경된 부위를 mut로 표시했다. 상기의 *Bam*HI 절단부위가 Klenow 효소처리로 평평말단이 되어 *Sma*I 부위의 평평말단과 연결이 되어서 생긴 부위인 것이다. -80 bp프로모터에 구조골격이 일부 변이 된 재조합체이다.

pHLND2-80 클론의 제조 클론 pHLN2-80(-) ICP 유전자의 과다발현 현상이 ICP 유전자의 5' 말단인 -80 bp 프로모터와 pBluescript SK(+)-의 *Plac* 프로모터 서열이 형성되어 일어난 것인지 확인하고자 했다. pHLN2-80(-) DNA에서 ICP 유전자의 5'-말단과 연결되어 있는 pBluescript SK(+)-*Plac*프로모터 쌍류쪽 5'-말단에서부터 약 350 염기 쌍을 제거한 pHLND2-80 클론을 제조하였다(Fig. 3A). 즉 pHLN1-80 클론 DNA를 *Bam*HI 제한효소로 절단을 한 다음 Klenow DNA 중합효소를 처리하여 평평말단을 만들고, *Pst*I 제한효소를 처리하여 종결부위쪽을 절단하여 *Pst*I 부위를 만든 3.8 kb DNA 단편을 분리하였다. pBluescript SK(+)-를 *Nae*I과 *Pst*I으로 이중 절단한 다음에 상기의 3.8 kb DNA 단편을 *Pst*I 부위와 평평말단끼리 연결효소를 이용하여 클로닝한 후에 재조합 플라스미드를 pHLND2-80라 명명하였다(Fig. 3A).

전사개시 및 종결부위 결실 재조합체의 제조

pHLD1-72와 pHLD2-72의 제조 재조합 클론 pHLN2-80에서 ICP 유전자 과다발현 현상에 대한 전사 개시점 부위와 종결암호부위의 역할을 알아보기 위해서 다음의 돌연변이를 유도했다. pHLN1-80 클론에는 두 개의 *Dra*I 절단 부위가 있다. 하나는 -80 bp 프로모터의 전사개시점 바로 뒤에 있고, 다른 하나는 종결암호 TGA의 바로 뒤에 있다[23]. *Dra*I를 처리하면 ICP 유전자의 전사개시점과 종결부위가 제거된다. 클론 pHLN1-80(+) DNA를 *Dra*I 제한효소로 절단하여 평평말단을 갖는 3.6 kb DNA 단편을 젤에서 회수하였다. 동시에 pBluescript SK(+)-를 *Sma*I으로 절단을 하고, CIP를 처리한 다음에 *Sma*I 부위에 상기의 3.6 kb *Dra*I 단편을 클로닝을 하였으며, 상기 벡터의 *Plac*프로모터의 발현방향과 일치되게 연결된 것은 pHLD1-72, 반대방향으로 연결된 것은 pHLD2-72라고 명명하였다(Fig. 5A).

pHLN2-72의 제조 ICP 유전자의 전사종결 부위의 역할을 검정하기 위해서 pHLN2-80 클론 DNA를 *Sac*I으로 절단하여 전사종결부위가 있는 2.4 kb 단편을 분리하였다. 한편 pHLD2-72 클론 DNA를 *Sac*I으로 절단을 하여 pBluescript SK(+)-의 *Plac* 프로모터와 -80 bp 프로모터가 들어가 있는 4.4 kb 단편을 분리 한 다음 CIP를 처리하고 상기의 2.4 kb 단편을 *Sac*I 부위에 클로닝을 하여 ICP 유전자의 3'-말단에 전사종결 부위를 다시 연결시킨 pHLN2-72를 제조하였다(Fig. 5A).

ICP 항원의 준비

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1을 100 ml의 GYS배지[20]에서 72시간 배양시켜 위상차 현미경으로 포자와 내독소결정체를 관찰한 후 10,000×g로 30 분간 원심분리한 다음 NaBr 밀도기울기 원심분리법[16]으로 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 원심분리 하였다. 형성된 각 밴드를 위상차 현미경으로 관찰한 후 내독소결정체 밴드를 파스퇴르 피펫으로 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℃에서 1시간 반응시켰다. 1 N NaOH로 pH 12로 조절한 후 28℃에서 5시간 반응한 다음 pH 7.5로 조절하고 4℃에서 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 건조시켜서 4℃에 보관하면서 사용

하였다.

ICP 항체의 준비

살충성 단백질항원 항체의 제조는 Oh 등[21]의 방법을 이용하여 Balb/c 실험쥐에 항원을 주사하여 제조를 하였다. 면역시킨 쥐의 심장에서 채혈을 한 후에 혈청을 분리하고, Immunoglobulin G를 DEAE-Affi-Gel blue (Bio-Rad Laboratory, Richmond, California) column chromatography로 정제하였다.

Western blot analysis

재조합 클론이 ICP를 발현하는지의 여부와 각 클론들의 발현 정도를 비교 측정하기 위해 Western blot 분석을 Bollag 등[3]의 방법으로 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 in 1 ml methanol, 10 ml methanol, 39 ml TN buffer, 30 μl 30% H₂O₂)에 담아 실온에서 천천히 교반하면서 반응시켰고 발색이 완성되면 즉시 증류수로 옮겨 반응을 중지시켰다.

살충성 검사

재조합 클론들을 50 ml의 영양배지(nutrient broth)에 ampicillin(50 μg/ml)을 첨가하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 5,000×g로 30분간 원심분리한 배양액 5 ml의 침전물을 0.85% NaCl 용액으로 현탁하여 재원심분리한 후에 1.0 mM EDTA와 1.0 mM dithiothreitol 용액 5 ml로 현탁한 후 200 W로 30초 간격으로 2분간 초음파 처리하였다. 파쇄액에는 5.2×10⁶ 세포가 존재하였다. 살충력을 비교 측정해 보기 위해서 상기 용액으로 10, 100, 1000배로 희석하여 Hwang 등[9]의 방법으로 생물검정을 하였다. *E. coli* XL1-blue/pBluescript SK(+)도 동일

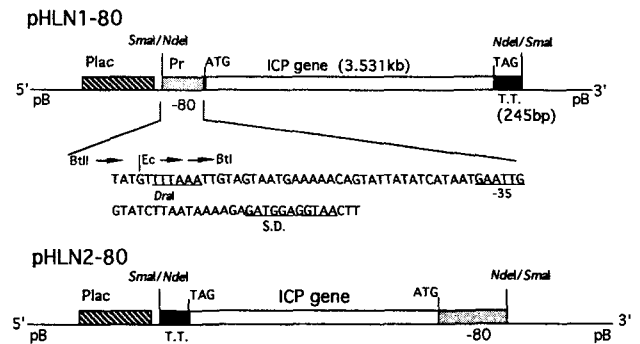


Fig. 1. Physical and functional maps of pHLN1-80(+) and pHLN2-80(-) clones.

ICP gene was cloned into the *SmaI* and *NdeI* sites in pBluescript SK(+) vector and named pHLN1-80(+) and pHLN2-80(-) 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; *Ec*, 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 *SmaI/NdeI* ligated site. A is the clones, and B is the gene maps of the clones.

하게 처리하여 살충력의 대조군으로 사용하였다. 죽은 유충의 수는 일정 시간 간격으로 24시간 동안 조사하였다.

결 과

프로모터 부위의 변이가 ICP 유전자 발현에 미치는 영향

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1 살충성 단백질 유전자를 클로닝하여 만든 두개의 pHLN1-80(+) 클론 및 pHLN2-80(-) 클론[9]의 유전자 지도를 분석한 것이 Fig. 1에 제시되어 있고, 상기 클론으로 대장균에서 발현을 조사한 결과 ICP 유전자가 역으로 삽입된 pHLN2-80(-) 클론은 pHLN1-80(+) 클론보다 ICP 발현량이 현격히 증가[9]하는 것을 확인하였다(Fig. 2). pHLN1-80(+)클론에는 3,856 bp *NdeI* 단편이 삽입되어 있고 [23], *ICP* 유전자의 ICP 생산 암호서열은 3,531 bp이었고 [23], -80 bp에는 *ICP* 유전자 *BtI* 프로모터와 -35 유사부위가 존재하였으며 [27] 종결부위에는 245 bp가 존재하였다 [23]. 본 연구에서는 상기의 pHLN2-80(+) 클론의 과다 발현량을 조절하는 원인을 규명하기 위하여 *ICP* 유전자의 염기서열이 변화되지 않는 범위 내에서 pHLN1-80(+) 클론에 있는 pBluescript SK(+)의 *Plac* 프로모터와 *ICP* 유전자의 -80 bp 프로모터의 염기서열의 변이와 전사 개시점과 종결부위의 영향을 조사하기 위하여 결실을 시켜 생산량을 조사하였다.

pHLN1-80(+)에서 *ICP* 유전자의 양 말단에 존재하는 두 가지 프로모터 즉 pBluescript SK(+) *Plac* 프로모터

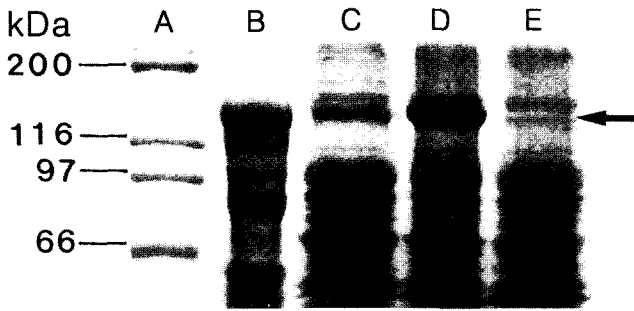


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the insecticidal proteins from lysate of the clones pHLN1-80(+) and pHLN2-80(-). Lanes A: Standard molecular weight markers, B: solubilized crystal protein, C: lysate of *E. coli* with pHLN1-80, D: lysate of *E. coli* with pHLN2-80, and E: lysate of the *E. coli* XL1-blue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

와 ICP 유전자의 프로모터 일부인 -80 bp-프로모터 중에서 5'-말단에 존재하는 -80 bp 프로모터의 활성만을 측정하기 위해 pKK232-8 벡터[4]를 사용하여 ICP 유전자의 발현을 조사한 것이 재조합 플라스미드 pHLNK-80 클론(8.9 kb)이며(Fig. 3A), Fig. 3B는 직선상으로 표시한 유전자 지도이다. 이 경우에 130 kDa ICP 생산은 매우 저조하여(Fig. 4, lane 2) *Plac* 프로모터가 없이는 과다발현이 안되는 것으로 나타났다.

또한 pHLN2-80(-)에서 *Plac* 프로모터의 영향을 조사하기 위해서 pHLN1-80(+)의 *Plac* 프로모터와 ICP 유

전자 프로모터의 구조골격을 변이 시킨 것이 pHLNF1-80 클론(6.8 kb)이다(Fig. 3A)(재료 및 방법에서 기술). Fig. 3B는 직선상으로 표시한 유전자 배열 구조이다. 이 클론을 대장균에서 발현을 시키어 SDS-PAGE와 Western blot으로 분석을 한 결과는 Fig. 4A·B, lane 3에 제시되었다. 130 kDa ICP 생산량은 pHLNK-80보다는 약간 높았으나, pHLN2-80(-)보다는 낮음을 알 수 있었다.

클론 pHLN2-80(-)에서의 ICP 유전자 과다발현 현상이 ICP 유전자의 5'-말단인 -80 염기쌍과 pBluescript SK(+) 쪽의 염기서열이 만나서 우연히 강력한 프로모터 배열이 형성되어 일어난 것인지 확인하고자 했다. pHLN2-80(-)에서 ICP 유전자의 5'-말단과 연결되는 pBluescript SK(+) 쪽의 약 350 염기쌍을 제거하여 제조한 클론이 pHLND2-80이며(Fig. 3A) 직선상으로 유전자의 배열을 표시한 것이 Fig. 3B이다. 이 클론을 대장균에서 발현을 시켜 SDS-PAGE와 Western blot으로 분석을 한 결과 130 kDa ICP 생산량은 매우 높게 과다발현이 되었으며, 그 양은 클론 pHLN2-80(-)의 생산보다 약간 더 많이 생산이 되어 과다발현 되는 것을 관찰했다(Fig. 4AB, lane 4).

전사개시 및 종결부위의 변이가 ICP 유전자 발현에 미치는 영향

재조합 클론 pHLN2-80(-)에서의 ICP 유전자 과다발현 현상에 대한 ICP 유전자의 전사개시점과 전사종결 부

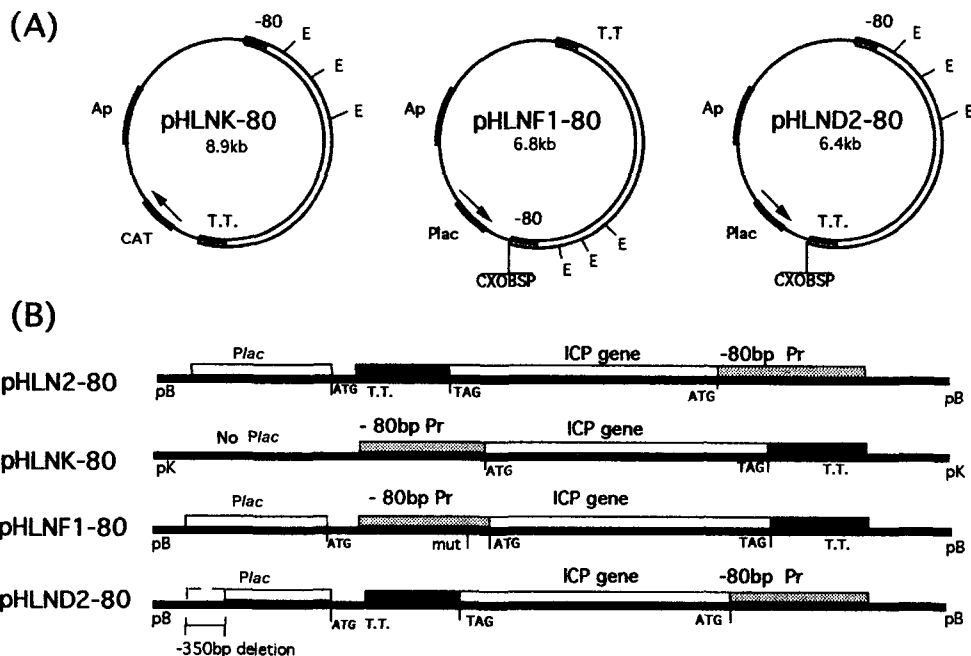


Fig. 3. Three clones concerning promoter region mutations (A) and functional gene maps of the clones(B). pHLNK-80 clone without *Plac* promoter of the pHLN1-80(+). pHLNF1-80(change of the *Bam*HI-*Sma*I sequences into *Sma*I/*Bam*HI sequence (mut) in the -80 bp promoter). pHLND2-80 clone (deletion of 350 bp region at the 5'-end of the *Plac* promoter of the pHLN1-80(+). pK: pKK232-8 plasmid frame.

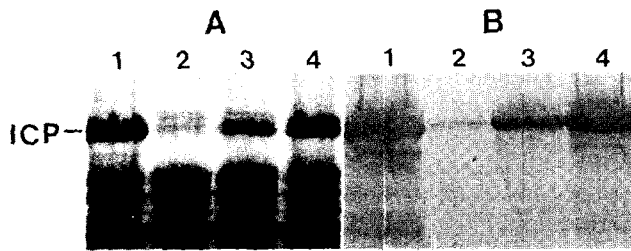


Fig. 4. Detection of the ICP productions in *E. coli* with the recombinant clones.

Lanes A1, A2, A3, and A4, ICP bands produced by pHLN2-80(-), pHLNK-80, pHLNF1-80, and pHLND2-80 clones, respectively. B plate is the Western blot of the gel A. ICP is the insecticidal protein produced by the clones, and different density shown.

위의 역할을 알아보기 위해서 pHLD1-72, pHLD2-72, 그리고 pHLN2-72를 제조하였다(Fig. 5A). pHLN1-80(+)클론 DNA를 제한효소 *Dra*I로 절단하여 -72 bp 프로모터를 만들어서 회수한 3.6 Kb DNA 단편을 pBluescript SK(+)*의 Sma*I 부위에 연결하여 벡터의 *Plac* 프로모터의 발현방향과 일치시킨 클론이 pHLD1-72이고, 반대방향으로 연결된 것은 pHLD2-72클론이다(Fig. 5A). *Dra*I 3.6 Kb DNA 단편의 5'-말단에는 -72 bp ICP 유전자 프로모터 부위만 존재하므로 해독개시 ATG 암호로부터 -77 bp에 있는 전사 개시점은 제거되었고, 3'-말단에는 ICP 유전자의 해독종결암호까지만 남아 있고 나머지 전사종결 부위는 제거되어 있다(Fig. 5A·B). Fig. 5B는 클론의 유전자배열을 나타낸 것이다. 또한 ICP 유

전자의 전사종결 부위의 역할을 검증하기 위해서 pHLD2-72의 ICP 유전자의 3' 말단에 전사종결 부위를 다시 연결시킨 클론이 pHLN2-72이고(Fig. 5A), 직선상으로 도식한 것이 Fig. 5B이다. 이 클론을 대장균에서 발현을 시켜 SDS-PAGE와 Western blot 분석을 하였다. 재조합 클론 pHLD1-72는 재조합 클론 pHLN2-80(-)가 생산한 ICP 양과 비슷하게 그리고 pHLN1-80(+)(Fig. 2 lane C)의 생산량과 유사하게 생산하여(Fig. 6A·B, lane 2) 과다 발현 되지 않음을 알 수 있었다. 재조합 클론 pHLD2-72는 재조합 클론 pHLN2-80(-)가 생산한 ICP양보다 적게 생산(Fig. 6A·B, lane 3)되었고 pHLN1-80(+)*가 생산한 ICP양*(Fig. 2, lane C) 보다는 과다발현 되었다. 재조합 클론 pHLN2-72는 모클론인 pHLN2-80(-) 보다 약간 많은 ICP 생성량을 보였다(Fig. 6A·B, lane 4). 본 결과는 종결부위가 ICP 생산에 관여하는 것으로 나타났고, 여전히 역으로 삽입된 유전자의 생산량이 많았다.

재조합 클론이 생산한 ICP의 실충성

과다발현을 하는 재조합 클론 pHLN2-72를 대장균에서 증식하여 파쇄액을 만든 후에 *Bombyx mori* 3령 유충에 대한 살충력을 검사하였다. 클론 pHLN1-80(+) 파쇄액은 1시간 때에 유충을 치사하지 않았고, 3시간 때에는 약 15%의 치사율을 나타냈다. 그러나 pHLN2-72클론 파쇄액은 1시간 내에 90%, 3시간 때에 100%의 치사율을 나타내어서 약 90배 차이의 살충력을 보였다(Fig. 7). 더욱이 10배 희석한 pHLN2-72클론의 파쇄액도 80배 차

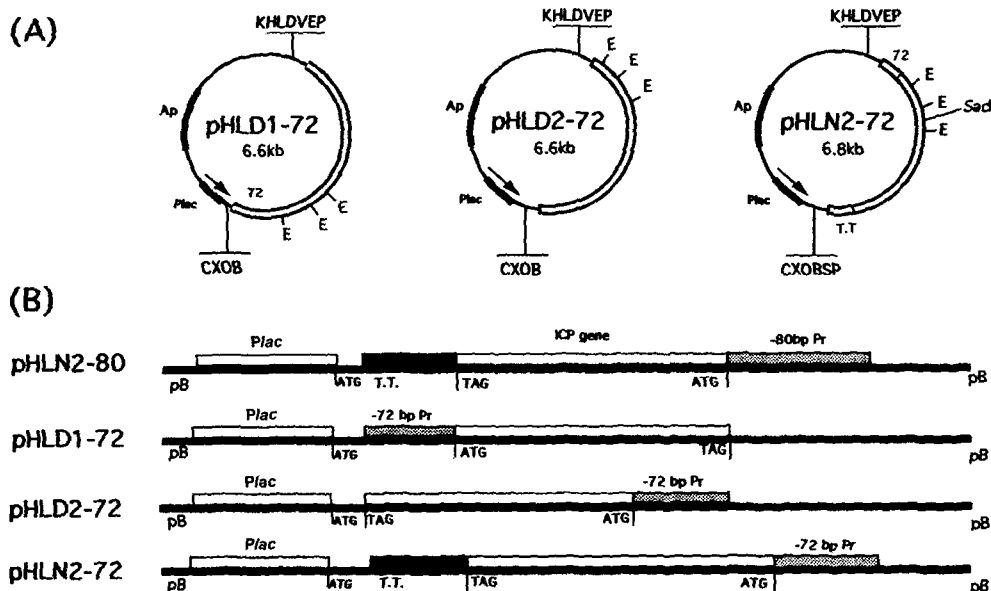


Fig. 5. Three clones deleted in the transcription initiation and termination regions (A) and gene maps of the clones(B). pHLD1-72 clone consisted of -72 bp promoter in right-orientation (deleted in the transcription initiation point "G") and no the termination region. pHLD2-72 consisted of the inverted insert of the pHLD1-72. pHLN2-72 consisted of the termination region and the inverted sequence ICP gene with the -72 bp promoter.

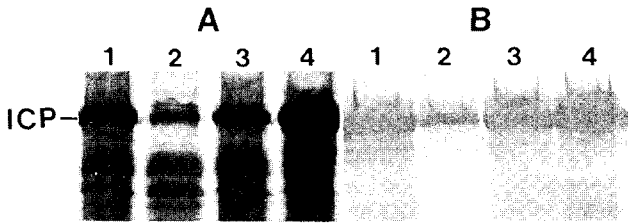


Fig. 6. Detection of the ICP productions in *E. coli* with the recombinant clones.

Lanes A1, A2, A3, and A4, ICP bands produced by clones pHLN2-80, pHLD1-72, pHLD2-72, and pHLN2-72, respectively. B plate is the Western blot of the gel A. The ICP proteins were produced by the clones and showed different densities.

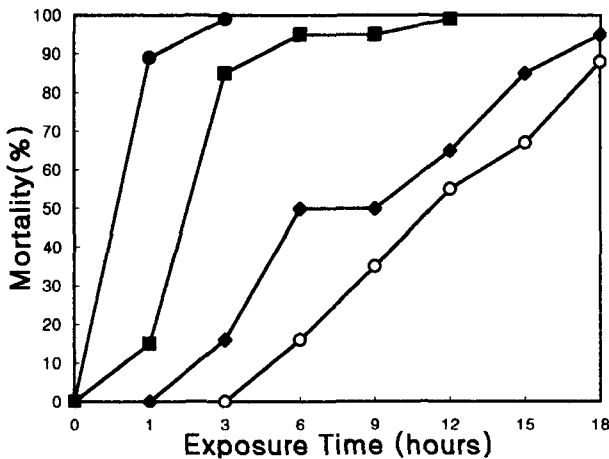


Fig. 7. Insecticidal activity of the clones pHLN1-80(+) and pHLN2-72.

Symbols: (◆), pHLN1-80(+) lysate; (●), pHLN2-72 lysate; (■), 10 fold diluted lysate of the pHLN2-72; (○), 100 fold diluted lysate of the pHLN2-72.

이의 치사율을 나타냈다. SDS-PAGE와 면역학적 분석에서 재조합 클론 pHLN2-72는 재조합 클론 pHLN2-80(-)보다 약간 많은 양의 ICP 생성량을 보였다(Fig. 6). 이 결과에서도 역클로닝이된 ICP유전자의 산물이 치사율이 높게 나타났다.

고 찰

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki*는 그람양성의 간균으로서 아포를 형성할 때에 δ-내독소를 생산을 하며, 분자량이 약 130 kDa인 단백질로 구성되어 있고, 곤충의 유충을 치사시키는 능력을 가지고 있다[1, 6, 13]. 내독소결정체는 곤충의 유충이 섭취를 하면 곤충의 중장에서 알칼리성 pH로 인하여 단백질 분해효소가 활성화되어 살충성의 단백질(ICP)로 전환이 되어 곤충을 치사시키는 특성[6, 13]이 있다. 본 연구에서는 Hwang 등[9]이 이미 보고한 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 살충성 단백질 유전자가 있는 NdeI 단편 3.8 kb를 클로닝

하여 제조한 pHLN1-80(+) 클론 및 pHLN2-80(-) 클론이 대장균에서 pHLN2-80(-)클론은 pHLN1-80(+)클론보다 ICP 발현량이 현격히 증가하는 것을 규명하고자 했다. Schnepf 등[23]이 결정한 ICP 유전자 염기서열을 이용하여 pHLN1-80(+) 클론에 클로닝된 제한효소 3.8 kb NdeI DNA 단편의 유전적인 구조를 보면, 전체 ICP 유전자 암호서열 3,531 bp가 존재하며, ICP 유전자 프로모터의 일부인 -80 bp 프로모터가 존재하고, C-말단에는 해독종결암호 TAG[23], 하류에 245 bp 단편의 DNA를 가지고 있다. ICP 유전자의 프로모터에는 중복된 BtI과 BtII의 두 개의 프로모터를 가지고 있다[23, 27]. 그리고 *E. coli*와 *B. thuringiensis*에서의 전사 개시점인 G가 해독개시 ATG 암호에서 -77염기에 있다[23, 27]. -80 bp 프로모터에는 ICP 유전자 전사개시점 G의 3' 쪽에서부터 시작하는 BtI 프로모터만을 가지고 있고, 전사개시점 G의 상류 5' 쪽에서 시작하는 BtII 프로모터가 존재한다[27]. 또한 -80 bp 프로모터에는 -14와 -4 염기서열 사이에 16s rRNA와 결합하는 부위[23, 27]인 Shine-Dalgarno (S.D.) 서열이 확인되었다. *B. thuringiensis*의 단백질 결정체 생산은 아포를 형성하는 과정에서 아포 유전자가 연속적으로 발현 되면서 후에 내독소결정체 단백질이 생산되기 때문에 ICP 유전자 프로모터는 다른 대장균 등과는 차이가 있다. Throne 등[26]은 클로닝된 ICP 유전자 프로모터의 상류를 결실 시켰을 때에 대장균에서 ICP의 생산량이 증가하는 것을 보고하였다. 또한 Schnepf 등[24]은 ICP 유전자의 전사개시점에서 -258과 -87염기사이의 염기서열을 결실 시켰을 때 과다발현되는 것을 보고하였고, -87염기까지 결실 시켰을 때 융합단백질 생산이 과다 촉진되었음을 보고하였다. 또한 Reznikoff 등[22]은 프로모터의 -35 염기부위로부터 상류의 15에서 145 염기쌍의 상류서열의 결실은 전사가 감소되는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 상기의 유전자가 역으로 삽입된 pHLN2-80(-) 클론[9]의 발현량을 조절하는 원인을 규명하기 위하여 ICP 유전자서열은 변화하지 않고 *Plac* 프로모터와 -80염기쌍 프로모터 염기서열(BtI 프로모터)의 변이와 전사 개시점과 종결부위의 결실의 영향을 조사하였다. 본 연구의 특징은 ICP 유전자 프로모터의 일부 -80 bp 및 -72 bp 프로모터(BtI 프로모터 포함)를 가진 클론체의 발현을 우선적으로 조사하는 것이 목적중의 하나였다. pHLN2-80(+)에는 ICP 유전자의 양 말단에 두 가지 프로모터 즉 *Plac* 프로모터와 -80 bp ICP 유전자 프로모터가 있다(Fig. 1AB). 이 중에서 *Plac*프로모터를 제거하고, -80 bp 프로모터만을 갖는 pHLNK-80 클론을 제조하여 ICP 생산을 관찰하였을 때 *Plac* 프로모터 없이는 -80 bp-프로모터에 의한 ICP 생산이 매우 저조하였다(Fig. 4, lane 2). 또한 pHLN2-80(-) 클론에서 *Plac* 프로모터의 영향을 조사하기 위해서 pHLN1-80(+) -80

bp 프로모터의 구조골격을 일부 변이 시킨 클론이 pHLNF1-80이며, 대장균에서 발현을 분석한 결과(Fig. 4 lane 3)는 130 kDa ICP 생산량은 과다발현 되는 pHLN2-80(-)보다는 낮았으나, pHLN1-80(+) (Fig. 2, lane C)과는 유사하여 과다발현 되지 않았다. 클론 pHLN2-80(-)에서의 ICP 유전자 과다발현 현상이 ICP 유전자의 5'-말단인 -80 bp와 pBluescript SK(+) 쪽의 염기서열이 만나서 우연히 강력한 프로모터 배열이 형성 되어 일어난 것인지 확인하고자 하여 pHLN2-80(-)클론의 ICP 유전자의 5'-말단과 연결되는 pBluescript SK(+) 쪽의 약 350 염기쌍을 제거하여 제조한 클론이 pHLND2-80이다(Fig. 3A). 이 클론은 대장균에서 130 kDa ICP 생산량이 매우 높게 과다발현이 되었으며, 그 양은 모클론인 pHLN2-80(-)의 생산보다 약간 높았다(Fig. 4AB, lane 4). 이 경우에도 ICP 유전자는 역으로 위치한 상태이다. 상기의 결과는 *Plac* 프로모터가 없이는 과다발현 되지 않는 것을 의미하며, *Plac* 프로모터의 상류 쪽은 과다발현에 별 영향이 없고, 역시 ICP 유전자가 역방향으로 클로닝이 된 경우에 과다발현 되었다. 전사 개시 상류 쪽에 결실과 삽입이 과다발현을 유도한다는 Throne 등[26]와 Schnepf 등[24]의 결과와는 정반대의 결과이며, 이들은 ICP 유전자가 정방향으로 삽입 되었을 경우만 연구를 한 차이점을 보이고 있다.

클론 pHLN2-80(-)에서의 ICP 유전자 과다발현 현상에 대한 전사개시점과 전사종결 부위의 역할을 알아보기 위해서 전사개시점이 제거된 -72 bp 프로모터와 종결부위를 제거한 pHLD1-72와 pHLD2-72를 제조하였고, 그리고 pHLN2-72는 종결부위의 영향을 보기 위하여 다시 종결부위를 연결을 시켜서 제조하였다(Fig. 5). 대장균에서 발현을 분석을 하였을 때에 클론 pHLD1-72는 클론 pHLN1-80(+)이 생산한 ICP 양(Fig. 2, lane C)과 유사한 양의 ICP를 생산하였으나(Fig. 6, lane 2) 과다발현으로 볼 수는 없다. 클론 pHLD2-72는 클론 pHLN2-80(-)이 생산한 양보다 적은 ICP를 발현하였으나, pHLN1-80(+)이 생산한 양보다 과다발현 되었다(Fig. 5, lane 3). 클론 pHLN2-72는 모클론인 pHLN2-80(-)보다도 약간 높게 과다 발현되는 ICP 생성량을 보였다(Fig. 6A·B, lane 4). 이상의 결과는 역으로 삽입이 된 ICP 유전자 클론체가 과다발현이 되었고, 종결부위의 서열이 발현을 증가시키는 것으로 생각되며, 전사 개시부위는 전혀 ICP 유전자의 발현에 관여하지 않는 것으로 생각된다. -80 bp 프로모터보다 전사 개시점 G[24]가 제거된 -72 bp 프로모터가 ICP 과다발현을 하는 것으로 판단된다. 또한 Schnepf 등[24]은 대장균의 전사 개시점에서 -258과 -87염기사이의 염기서열을 결실을 시켰을 때에 과다발현되는 것을 보고하였고, -87염기까지 결실을 시켰을 때에 융합된 ICP 단백질 생산이 최고로 촉진되는 것

을 보고하였다. 그러나 본 연구의 결과에서는 -72 bp 프로모터를 갖는 경우에도 역삽입의 경우 과다발현되는 것을 발견하여 차이점을 나타내고 있다. 또한 Schnepf 등[24]은 전사종결부위의 영향에 대해서는 연구를 한 보고가 없다. 이러한 과다발현 현상은 아마도 유전자 및 프로모터부위의 전사를 억제하는 부위의 교란 등으로 일어나는 것으로 Schnepf 등[24]은 분석을 하고 있다.

또한 이들의 살충효과를 조사하고자 누에의 3령 유충에 처리한 결과에서 클론 pHLN2-72 파쇄액은 *Bombyx mori* 3령 유충에 대한 살충력 검사에서 클론 pHLN1-80(+)보다 90배 정도의 살충력을 보였다(Fig. 7). 본 결과는 pHLN2-80(-) 클론이 클론 pHLN1-80(+)보다 약 90-100배의 살충력을 보인 결과와 유사했다[9].

이상의 결과를 요약하면 ICP 유전자의 과다발현에 *Plac* 프로모터와 종결부위가 반드시 필요하며, -72 bp ICP 유전자 프로모터가 -80 bp ICP 프로모터보다 과다 발현률이 높았으며, ICP 유전자는 반드시 *Plac* 프로모터의 전사 방향에 역방향으로 삽입 되어야 과다발현 되는 것으로 나타났다. 그러나 왜 역삽입의 경우에 과다발현이 되는지 아직은 판단하기 어려우며 앞으로 더욱 연구를 계속하여야 할 과제로 남아있다.

요 약

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1 살충성 단백질 ICP 유전자가 있는 *NdeI* 단편 3.856 kb를 클로닝하여 제조한 pHLN2-80(-) 클론이 pHLN1-80(-)에 비해서 대장균에서 ICP발현량이 과다발현되는 현상을 규명하고자 하였다. 본 연구에서는 상기의 pHLN2-80(+) 클론의 발현량을 조절하는 원인을 규명하기 위하여 ICP의 아미노산 서열은 변화되지 않는 범위 내에서 pHLN1-80(+) 클론에 있는 *Plac* 프로모터와 ICP유전자 프로모터의 일부인 -80 bp 프로모터의 염기서열, 전사 개시점과 종결부위의 변이가 ICP 유전자발현에 미치는 영향을 조사하였다. pHLN1-80(+)에 5'-말단에 존재하는 -80 bp 프로모터만을 보유한 pHLNK-80 클론은 ICP 생산은 매우 저조하였다. *Plac* 프로모터와 -80 bp 프로모터의 구조골격을 일부 변이 시킨 pHLNF1-80 클론의 ICP 생산량은 pHLN2-80(-)가 생산한 양보다는 낮아서 과다발현이 안되었다. *Plac* 프로모터 상류를 약 350 bp를 제거하여 만든 클론 pHLND2-80의 ICP 생산량은 모클론인 pHLN2-80(-) 보다 매우 높게 과다발현 되었다. ICP 유전자의 과다발현 현상에 대한 전사 개시점과 전사종결 부위의 역할을 알아보기 위해서 -72 bp ICP 유전자 프로모터를 갖는 클론 pHLD1-72는 재조합 클론 pHLN2-80(-)가 생산한 양보다 적은 양의 ICP를 생성하였고, 클론 pHLD2-72는 재조합 클론 pHLN2-80(-)보다 적은

ICP을 발현하여 과다 발현되었으며, 클론 pHLN2-72는 모클론인 pHLN2-80(-)보다 약간 높은 ICP 생산량을 보여 과다발현되었다. 클론 pHLN2-72를 증식하여 파쇄액을 만든 후에 *Bombyx mori* 유충에 대한 살충력 검사에서 클론 pHLN2-72이 생산한 ICP는 pHLN1-80(+)이 생산한 ICP보다 약 90배의 살충력을 보였다. SDS-PAGE와 Western blot 분석에서도 클론 pHLN2-72는 재조합 클론 pHLN2-80(-)보다 약간 높게 ICP가 생성이 되었었다.

이상의 결과는 과다발현에 *Plac* 프로모터와 종결부위가 반드시 필요하며, -72 bp ICP 프로모터가 -80 bp 프로모터보다 과다발현률이 높았으며, ICP 유전자는 반드시 *Plac* 프로모터의 전사 방향에 역방향으로 삽입이 되어야 하는 것으로 나타났다.

감사의 글

This paper was supported by special fund for University Research Institute from Korea Research Foundation (1994-1997).

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. Edelman. 1996. *Protein Methods*, pp. 107-227. 2nd ed. Wiley-Liss, New York.
4. Brosius, J. 1984. Plasmid vector for the selection of promoters. *Gene* **27**: 151-160.
5. Carlton, B. C. and J. M. Gonzales Jr. 1985. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*, pp. 211-249. In D. A. Dubnau (ed.), *The Molecular Biology of the Bacilli*. Vol. II. Academic Press, N.Y.
6. Dulmage, H. T. and Co-Operators. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential, pp.193-222. In H. D. Burges (ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980*. Academic Press, New York.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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. Biotech.* **26**: 358-364.
11. 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.
12. 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.
13. Kurstak, E. 1982. *Microbial and Viral Pesticides*, pp. 35-74. Marcell-Dekker, New York.
14. Lee, H. H. 1998. Formulations of *Bacillus thuringiensis* insecticides by liquid and semi-solid fermentations. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **26**: 369-372.
15. 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.
16. Lee, H. H. and Y. S. Park. 1990. Transfer of insecticidal toxin gene in plants. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 647-652.
17. Mandel, M. and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA phage infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 154-162.
18. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
19. 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.
20. 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.
21. 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. Bioengin.* **16**: 168-173.
22. Reznikoff, W. S., D. A. Siegele, D. W. Cowing, and C. Gross. 1985. The regulation of transcription initiation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* **19**: 355-387.
23. 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.
24. 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.
25. Short, J. M., M. Fernandez, J. A. Sorge, and W. D. Huse. 1988. λ ZAP; A bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic acids Res.* **16**: 7583.
26. Thorne, L., F. Garduno, T. Thompson, D. Decker, M. Zounes, M. Wild, A. M. Walfield, and T. J. Pollock. 1986. Structural similarity between Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *J. Bacteriol.* **166**: 801–811.
27. 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.

(Received November 3, 1998)