

담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에 높은 살충활성을 나타내는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주의 내독소 단백질 특성

정선영 · 서미자¹ · 윤영남¹ · 유용만^{1*}

농촌진흥청 국립농업과학원 농자재평가과, ¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

(2010년 10월 9일 접수, 2010년 11월 30일 수리)

Characteristics of δ -Endotoxin Protein Produced from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 Isolate Showing High Bioactivity against *Spodoptera litura*

Sun Young Jung, Mi Ja Seo¹, Young Nam Youn¹ and Yong Man Yu^{1*}

Agro-Materials Safety Evaluation Division, National Academy of Agricultural Science Department of Agro-Food Safety, Rural Development Administration, Suwon, 441-707, Korea, ¹Dept. Applied Biology, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

Abstract

The characteristics of parasporal inclusion body from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 isolate which is high bioactive to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*, were examined. Parasporal inclusion of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 isolate showed only 1 band at 130 kDa compared with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 isolate producing 2 protein bands at 130 kDa and 60 kDa from by SDS-PAGE analysis without any enzyme treatment. Also, we confirmed that gut extract of sensitive *S. litura* KB099 isolate had digested only 60 kDa δ -endotoxin protein. When the digestive enzyme of sensitive insect responsible for parasporal inclusion from KB099 and HD-1 isolate was treated to each of them, protein band 60 kDa of KB099 was maintained up to 12 hours but all bands of HD-1 were disappeared within 6 hours. In KB099 isolate, 6 genes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C, Cry1D and Cry1I) were identified by PCR analysis. Also, Cry mutant of KB099 isolate was investigated by phase-contrast microscope, SDS-PAGE and PCR.

Key words *Bacillus thuringiensis*, Bioactivity, PCR, Plasmid DNA, *Spodoptera litura*

서 론

곤충병원성 미생물로서 *Bacillus thuringiensis*는 주요 농업해충의 방제에 사용되며 Gram-양성균으로 내세포자를 형성하는 간균이다. 이 균주의 분포는 토양(Ohba와 Aizawa,

1978; Martin과 Travers, 1989), 곡물 저장소(Kim 등, 1998), 곤충 사체(Krieg 등, 1983), 식물 표면(Smith와 Couche, 1991), 주요 서식토양(Kim 등, 2006; Kim 등, 2008) 등 자연 생태계의 다양한 장소로부터 분리되고 있다(Schnepf 등, 1998). Schnepf(1995)는 다양한 장소에서 분리된 균주들이 생산하는 내독소 단백질은 균주에 따라 대상 해충에 대한 독성이 다양하게 달라지는 기주특이성을 보고하였다. 이러한 내독소

*연락처 : Tel. +82-42-821-5763, Fax. +82-42-823-8679
E-mail: ymyu@cnu.ac.kr

단백질들은 *B. thuringiensis*의 세포질 내부에서 포자가 형성되는 동안 생성되고 주로 하나 또는 두개의 Crystal(Cry)과 Cytolytic(Cyt) toxins으로 구성되어 있음이 보고되고 있다(Ohgushi 등, 2005; Glare와 O'Callaghan, 2000).

곤충병원성 세균으로부터 생산된 내독소 단백질은 Cry genes에 의해 오늘날까지 300개 이상 분류되고 있으며 각각 45%, 75%, 95%로 아미노산 유사도에 따라서 54개의 아그룹으로 구분되어 있다(Crickmore 등, 1998; http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). 최근까지 분류된 내독소 단백질 중에서 Cry1, Cry2, Cry9 그리고 Cry15 등 4개의 유전자를 소유하는 것으로 나타난 그룹은 나뭇잎 해충인 집시나방(Peyronnet 등, 2001), 담배박각시나방(Zeigler, 1999), 담배거세미나방(Kumar 등, 1998), 담배나방(Jalali, 2004)에 기주 특이적으로 활성을 나타낸다. 다른 한편으로는 Cry1, 2, 4, 10, 11, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 39 그리고 40등 18개는 파리목에 활성을 보이고, 또한 Cry1, 3, 7, 8, 9, 14, 23, 34 그리고 35등 9개는 콜로라도 감자잎벌레, 딱정벌레, 서양옥수수뿌리벌레, 느릅나무잎벌레와 다른 딱정벌레목에도 살충성을 나타낸다고 보고되었다. Cry5 독소는 벌목에 또는 일부 내독소 단백질은 매미목, 메뚜기, 털이목에 독성을 나타낸다. Cyt 단백질은 파리목에만 활성을 가지며 포유동물 세포분해를 야기 시킬 수 있다고 보고하였다(Hurley 등, 1987). *B. thuringiensis* 균주에서 생산된 내독소 단백질 중에 나뭇잎에 독성을 나타내는 Cry1A와 Cry1C 그룹은 135 kDa의 전독소가 특이성을 보이는 곤충의 중장 내에서는 소화되어 65 kDa으로 만들어지면서 활성 독소로 나타낸다(Schnepf 등, 1998). 최근에는 새롭게 찾아내는 곤충병원성 세균인 *B. thuringiensis*을 분류 하는데 있어서 독특한 활성을 찾고 동정하기 위하여 Cry 유전자의 분류법을 많이 사용하고 있다. *B. thuringiensis*의 살충 병원성은 박테리아 genome 내에 Cry gene의 존재를 확인함으로써 예상할 수 있으며(Ben-Dov 등, 1997, Carozzi 등, 1991), *B. thuringiensis*의 Cry genes은 특정 primers를 이용하여 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 확인하고 있다(Edyta 등, 2007).

최근 국내에서 문제가 되는 담배거세미나방인 *Spodoptera litura*(tobacco cutworm 또는 common cutworm)는 나뭇잎(Lepidoptera) 밤나방과(Noctuidae)의 *Spodoptera*속에 속하는 아시아 지역에서 대표적인 농업해충으로 모든 채소류와 전작물을 가해하는 다식성 해충으로 약 40과 100종 이상의 식물을 가해하는 것으로 알려져 있다(Minamikawa, 1937; Mochida와 Okada, 1974). 담배거세미나방은 우리나라에서는 1990년 이후부터 발작물의 주요 해충으로 인식되기 시작

하여 시설재배지에서 주로 발생하고 있으며 콩이나 들깨, 토마토, 카네이션, 거베라 등을 가해하여 큰 피해를 주고 있다. 담배거세미나방은 1~2령 유충까지는 군집하여 잎 뒷면에서 엽육을 식해 하다가 3령 이후부터는 분산하고 노숙유충이 되면 낮에는 토양 속에 숨어 있다가 밤에 활동하는 행동적 특성을 가지고 있어 주로 낮에 살포되고 있는 살충제로는 방제하기가 매우 어려운 해충이다(Kim 등, 2009). 이러한 특성을 가지고 있음에도 불구하고 농가에서는 담배거세미나방의 방제에 대부분이 살충제에 의존하고 있기 때문에 방제효과도 떨어지고 있을 뿐만 아니라 이에 따른 해충의 약제저항성이 증가되고 주변 환경오염과 이에 따른 생태계 파괴 등의 문제를 야기하고 있다. 따라서 방제효과를 높이고 생태계 보호를 위하여 종합적 해충방제 방법이 도입 되고 살충제의 사용이 억제됨에 따라 생물학적 방제에 관심이 매우 높아져 있다. 국내에서 농업해충으로 문제가 되어온 담배거세미나방에 대한 *B. thuringiensis*의 생물활성에 대한 실험은 활발히 이루어지지 않았으며 다른 나라에서도 활성이 있다고 밝혀진 Cry 유전자는 Cry1C가 대표적이다(Rajagopal 등, 2002; Neema 등, 2002). 본 연구에서는 담배거세미나방 유충을 방제할 목적으로 새로운 *B. thuringiensis* 균주를 다수 분리하여 이 가운데서 담배거세미나방에 높은 활성을 나타내는 균주를 선발하였다(Choi 등, 2008). 본 연구에서는 담배거세미나방에 생물독성 효과가 높은 균주의 살충성 단백질의 특성과 Cry 독소 단백질에 관련한 유전자의 연구를 수행하여 미생물 농약으로서의 발전 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

시험곤충

본 실험에서 사용된 담배거세미나방(*S. litura*)은 농촌진흥청 국립농업기술과학원으로부터 분양받았으며, 온도 25±2℃, 광주조건 16L:8D, 상대습도 50~60% 조건으로 누대 사육하였다. 등근 플라스틱 케이지에 성충을 넣어 교미시켜 알을 얻었으며, 설탕물 10%(v/v)을 매일 공급하였다. 알에서 깨어난 유충은 인공먹이를 충분히 공급하였으며 2령부터 생물검정에 사용하였다.

B. thuringiensis 균주

담배거세미나방에 높은 활성을 보이는 KB099 균주(CAB133 균주와 동일한 균주로 실험실에서 보관을 위하여 2010년부터 개명)는 충남대학교 생물적해충제어 실험실에서 토양으로부터

분리한 것으로 M. Obha 박사(Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyusu University, Fukuoka, Japan)에 H serotype을 의뢰하여 혈청형이 3abc인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 로 동정되었다(Choi 등, 2008). 비교 균주로는 기준균주인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 균주를 사용하였다.

생물검정 및 반수치사농도

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* KB099 균주를 Nutrient Agar배지에 접종하고 27°C에서 4~6일 동안 배양 후 내독소 단백질이 형성되었을 때 균을 모아 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 남은 펠릿에 멸균수 2 ml을 첨가하여 약 1.5×10^7 (cfu/ml)에 해당하는 균액을 정성적 생물검정에 사용하였다. 생물활성 검정에는 10배로 희석하여 각각 0.5 g의 인공사료에 100 μ l씩을 첨가하여 petri dish에 각각의 적정령 유충을 5마리씩 넣고 5일 동안 치사율을 조사하였으며 실험은 4반복으로 실시하였다.

반수치사약량(LD₅₀)값을 구하기 위해 5마리씩 4반복 실시하였으며, 희석약량은 담배겨세미나방 유충의 치사율이 0%에서 100%되는 약량까지 5~7개의 범위를 조사하였다. 사출율을 구한 후 probit 계산법을 이용하여 PC 프로그램(Raymond, 1985)로 반수치사약량(LD₅₀)를 산출하였다.

SDS-PAGE

배양된 균주가 NA배지상에서 autolysis가 일어난 것을 위상차현미경으로 확인 한 후, PBS buffer를 사용하여 원심튜브에 집균하였다. Crystal washing buffer I(500 mM NaCl/ 2% Triton X-100)으로 15,000 rpm, 4°C, 10분간 원심분리 후 같은 조건으로 2회 처리하고, crystal washing buffer II(500 mM NaCl)로 3회 세척한다. 상층액은 버리고 멸균수를 첨가한 후 실험에 사용할 때 까지 -20°C에 저장한다. SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법에 따라 10% separating gel과 4% stacking gel을 사용하여 전기영동 후 Coomassie blue R25(sigma, St. Louis, MO)로 염색한 후 탈색과정을 거쳐 확인하였다.

Trypsin 처리는 50 mM NaOH(pH 12.5)에 균주의 parasporal inclusion을 넣어 용해시킨 후, 1 mg/ml trypsin을 처리한 후, 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 아이스에 넣어 반응을 억제시킨 후 SDS-PAGE를 통해 확인하였다(Zhong 등, 2000). *S. litura*의 중장추출액 처리는 sample과 50 mM NaOH 수용액을 상온에서 5분간 반응시킨 후 원심 분리하여

상층액을 버리고 담배겨세미나방의 중장액과 멸균수를 1:1로 혼합하여, 37°C에서 15분간 반응시킨 후 시험에 사용하였다. 중장액 추출은 담배겨세미나방의 5령 유충을 -4°C에 10초간 둔 후, 멸균한 해부용 칼을 이용하여 중장만을 분리하여 원심 튜브에 넣고 13,000 rpm, 4°C, 15분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용할 때까지 -20°C에 보관한다(Zhong 등, 2000; Zouari와 Samit, 1997).

PCR analysis

B. thuringiensis 균주의 내독소 단백질 유전자의 Cry형을 동정하기 위하여 gene-specific primer set(Table 1)를 사용하였다. PCR의 증폭은 Thermal Cycler C1,000™ (BIO-RAD)을 사용하였다. 반응액은 완충액 성분과 dNTP등이 함유된 premix(Bioneer)에 주형 DNA 1.0 μ l, primer set 각각 1.0 μ l, 증류수 17 μ l를 혼합하여 최종 볼륨을 20 μ l로 하여 수행하였다. PCR condition 94°C에서 5분 총 30cycle로 94°C에서 1분, annealing 54°C에서 45초, 72°C에서 1분 72°C에서 5분으로 진행하여 PCR product DNA를 생산하였으며 각 실험마다 대조균을 만들었다. PCR 산물 DNA는 x6 Loading buffer와 x6 Loading star를 혼합하여 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였다.

Plasmid DNA 추출

KB099 균주의 plasmid DNA를 확인하기 위하여 alkaline lysis 방법(Jensen 등, 1995; Porcar 등, 1999)을 이용하여 추출하였다. Ampicillin이 60 μ g/ml로 첨가된 LB배양액에 균의 colony를 접종하여 37°C에서 진탕 배양한다. 집균은 2 ml 마이크로 튜브에 균이 완전히 자란 배양액을 1.5 ml 담고 1,500 rpm으로 1분간 원심 분리하여 균을 침전시킨다. 상층액을 완전히 제거하고 남은 균 용액을 다시 넣어 침전시킨 후 solution I(50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA)을 넣고 진탕하여 부유시킨다. 그 후 solution II(0.2N NaOH, 1% SDS)를 첨가하고 뚜껑을 닫은 후 시험관을 아래위로 천천히 혼합하여 상온에 5분간 둔다. Solution III(5M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, distilled water 28.5 ml)를 첨가하여 잘 섞은 후 얼음 속에 10분간 보관한 후 15,000 rpm, 4°C, 10분간 원심 분리하여 상층액을 깨끗한 마이크로 튜브에 옮겨 담는다. 상층액의 0.6~1배 부피의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 상온에 20분정도 둔 다음에 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 완전히 제거한다. RNase A가 50 μ g/ml 함유된 TE

Table 1. List of crystal protein gene-specific primers for PCR analysis

Cry genes	primer sequences	Size of product (bp)
<i>cry1Aa</i>	5'GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTACACC3'	782
<i>cry1Ab</i>	5'TCGAATTGAATTTGTTCC3'	238
<i>cry1Ac</i>	5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3'	550
<i>cry1B</i>	5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3'	902
<i>cry1C</i>	5'CAACCCTATTTGGTGCAGGTTTC3'	288
<i>cry1D</i>	5'GGTACATTTAGATGTTTACAGCCAC3'	465
<i>cry1E</i>	5'CTTAGGGATAAATGTAAGTACAG3'	961
<i>cry1F</i>	5'CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC3'	383
<i>cry13'</i>	5'ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTTGACTTTCTC3'	-
<i>cry1G5'</i>	5'ATATGGAGTGAATAGGGGG3'	235
<i>cry1G3'</i>	5'TGAACGGCGATTACATGC3'	-
<i>cry1I5'</i>	5'GCTGTCTACCATGATTTCGCTTG3'	1584
<i>cry1i3'</i>	5'CAGTGCAGTAACCTTCTCTTG3'	-
<i>cry25'</i>	5'CAGATACCCTTGCTGGTGTAA3'	1073
<i>cry23'</i>	5'ATAGGCCCGTGTCCACCAGG3'	-
<i>cry9A5'</i>	5'GTTGATACCCGAGGCACA3'	571
<i>cry9A3'</i>	5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT3'	-
<i>cry9B</i>	5'TCATTGGTATAAGAGTTGGTCTATAGAC3'	402
<i>cry9C</i>	5'CTGCTCCCTTTCAATCC3'	306
<i>cry9D</i>	5'CCGAGCTCTATGAATCGAAATAATCAAAATGAAT3'	1917
<i>cry9BCD3'</i>	5'CCTCCTAGACACAGGGATGATTTCAATTC3'	-

완충, pH 8.0 용액 20~100 μ l를 가하여 DNA 침전물을 녹이고 37°C에서 20~30분간 방치한다. 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)용액을 넣고 진탕한 다음 2분간 원심 분리하고 상층액을 새 마이크로 튜브로 옮긴다. 이 과정을 2~3번 반복하여 단백질을 제거한다. 0.1 부피의 3M sodium acetate, pH 5.2와 2.5 부피의 순수한 에탄올을 첨가하고 -20°C에 20분 이상 두어 DNA를 침전시킨다. 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 완전히 제거한 다음 70% 에탄올을 첨가하여 다시 원심 분리하여 세척한다. 상층액을 완전히 제거하고 5분정도 말린 다음 TE, pH 8.0 용액을 넣어 녹인 후 사용한다.

결과 및 고찰

나비목에 활성을 나타내는 *B. thuringiensis* 균주에서 생산된 살충성 내독소 단백질의 형태는 거의 대부분이 이중피라미드형 크리스탈을 형성한다. HD-1기준균주도 bipyramidal로 cuboidal 타입의 함입되어 있는 것이 주사자현미경 관찰

되었다(Martin과 Travers, 1989; Karamanlidou 등, 1991). HD-1기준균주에서 살충성 내독소 단백질의 구성성분의 Cry1 유전자는 나비목과 딱정벌레목에 활성을 보이며 cuboidal crystals 단백질은 Cry2와 관련되어 나비목과 파리목에 활성을 보이는 것으로 보고되었다(Brian과 Federici, 1998). 살충성 내독소 단백질의 형태적인 모습에서 KB099 균주는 HD-1과 매우 유사한 패턴을 나타내고 있으나 HD-1에 있는 cuboidal 타입의 결정성단백질이 확인되지 않아서 Cry2 단백질은 존재하지 않는 차이가 확인되었다(Fig. 1).

나비목에 활성을 나타내는 bipyramidal형의 살충성 내독소 단백질을 구성하는 Cry 유전자는 해충에 특이적인 독성을 나타낸다. 그리고 이 독소의 작용은 일반적으로 몇 가지 과정을 통해 생물활성의 효과가 나타난다(Burton 등, 1999). Cry 전독소 단백질이 감수성 유충에 섭취되면 중장 세포 간극 안에서 용해되고 중장액의 높은 pH와 단백질분해효소에 의해 분해되어 130-140 kDa의 전독소가 60 kDa의 활성 독소단백질로 소화되어지고 이 활성 독소가 중장 세포내 수용체에 삽입된다. 일부 나비목 유충은 cadherin-like 단백질이 독소

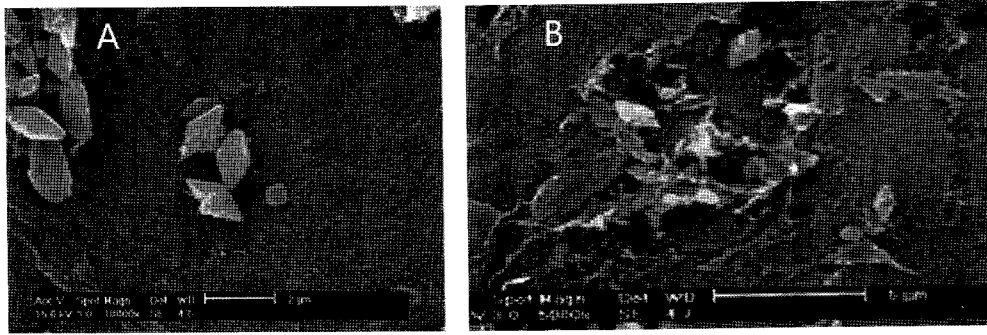


Fig. 1. Scanning electron microscopy of spore-crystal mixtures of *B. thuringiensis* strains. A: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1; B: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099; cb: bipylamidal crystal; cc: cuboidal crystal.

에 높은 일치성을 보이며 primary 수용체와 같은 기능을 하게 되어 곤충을 치사에 이르게 한다(Vadlamudi 등, 1995).

담배거세미나방에 높은 살충성을 나타낸 KB099 균주는 혈청학적으로 HD-1과 같은 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3abc)로 동정되었으나, 생물활성 범위 및 효과에 차이를 보이므로 SDS-PAGE를 이용 내독소 단백질의 특성을 확인하였다(Fig. 2). 그 결과 KB099 균주의 전 내독소 단백질은 HD-1균주에서 보이는 주요 밴드인 130 kDa가 확인되었으나 65 kDa의 밴드는 보이지 않았으며 이는 전독소 단백질이 일반적인 방법으로는 쉽게 소화되지 않는 특성을 암시한다. 따라서 담배거세미나방의 주요 소화효소인 trypsin을 처리하

였을 때 HD-1균주와 유사한 약 60 kDa의 독소단백질의 밴드를 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 KB099 균주는 130 kDa의 전독소 단백질은 감수성곤충인 담배거세미나방의 중장에서 높은 알칼리성과 단백질분해효소에 의해 용해되면 60 kDa의 내독소 단백질로 활성을 나타내는 것을 암시한다(Fig. 2). 새로운 KB099 균주가 생산하는 130 kDa의 전독소 밴드가 증장추출액에 의해 충분히 분해되면 60 kDa의 주요 밴드가 나타났으며 HD-1균주에서도 유사한 밴드가 나타났다. 그러나 두 균주 사이에서 나타나는 생물활성의 차이는 매우 현저하게 차이가 나타나므로 이러한 특성을 구명하기 위하여 담배거세미나방 증장액으로 소화되는 과정을 검토한 결과는 다음과 같다. 그림 3에서 볼 수 있듯이 담배거세미나방 증장액속에서 소화되는 HD-1균주의 살충활성 내독소 단백질은 소화시작 3시간이 지나면서부터 60 kDa의 밴드가 점점 흐려

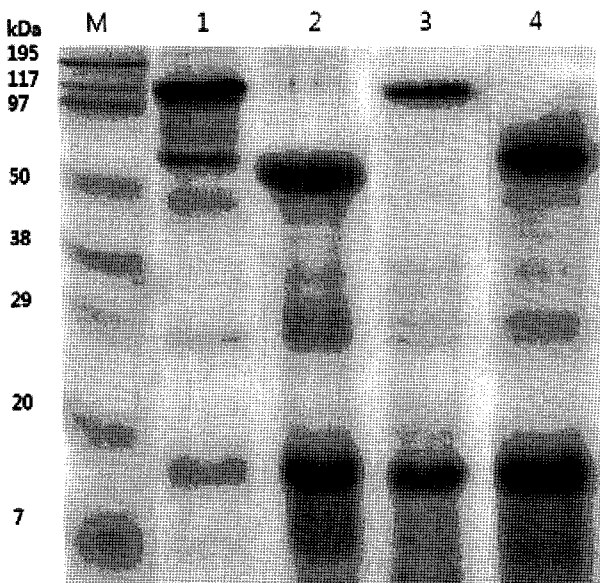


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of solubilized crystal proteins digested with trypsin. Lane 1: undigested *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1; Lane 2: digested *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1; Lane 3: undigested *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099; Lane 4: digested *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099; M: Molecular marker.

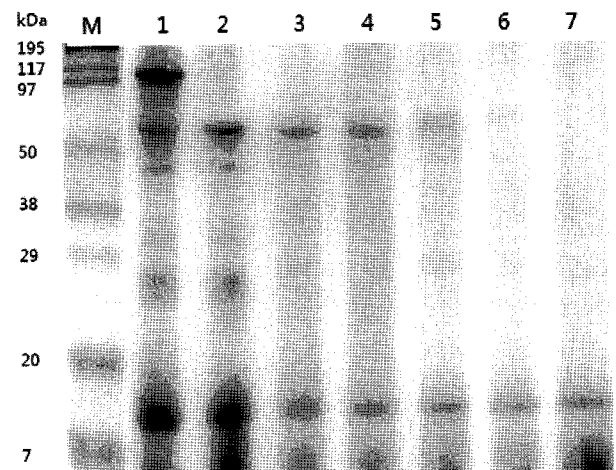


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of solubilized crystal proteins digested with *S. litura* gut extract of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Lane 1: undigested HD-1 and Lane2-7: digested HD-1 (Lane 2: 15 min; Lane 3: 1h; Lane 4: 3h; Lane 5: 6h; Lane 6: 12h; Lane7: 24h).

져 6시간정도면 거의 사라졌다. 그러나 담배거세미나방에 독성이 높게 나타나는 KB099 균주는 12시간이 지나고 24시간이 되어야 주요밴드가 용해되어 사라지는 것이 확인되었다 (Fig. 4). 따라서 HD-1균주보다 높은 활성을 보이는 KB099 균주는 담배거세미나방의 중장소화액에서 천천히 소화되면서 높은 활성을 나타내는 것으로 판단되었다. 즉 활성을 나타내는 내독소 단백질의 60 kDa부분이 중장속에서 오래 동안 존재할 수 있는 것이 활성에 관계되는 것을 암시한다. 그러나 HD-1의 경우 곤충 중장액의 소화과정에서 빠르게 강하게 소화되어 활성을 나타내는 60 kDa의 밴드가 작은 조각의 밴드로 변화되어 활성이 떨어지는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 내독소 단백질이 기주곤충에 대한 활성을 나타내는데 있어서 내독소 단백질과 감수성곤충의 소화액에 의한 소화과정이 매우 중요함을 암시한다. 따라서 혈청화적인 분류방법에서는 동일균주로 나타났으나 기주에 대한 생물활성에서는 많은 차이가 나타나 분자생물학적인 방법에 의해 기주 특이성의 차이를 설명하려고 시도하였다. 두 종류의 *B. thuringiensis*가 가지고 있는 내독소 단백질을 생산하는 유전자를 확인하기 위해 PCR 분석을 이용하였다(그림 5). HD-1균주는 전형적으로 CryIAa, CryIAb, CryIAc, Cry2A 그리고 CryII 등 5개의 protoxin 유전자를 가지고 있다고 보고되어있으며(Schnepf 등, 1998), 몇몇 *B. thuringiensis* strains, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, subsp. *entomocidus*, subsp. *galleriae* 그리고 subsp. *kenyae* 등에서 CryIC, CryID, CryIE 또는 CryIF 유전자가 독소 단백질을 생산하며, 이들은 단지 *Spodoptera*

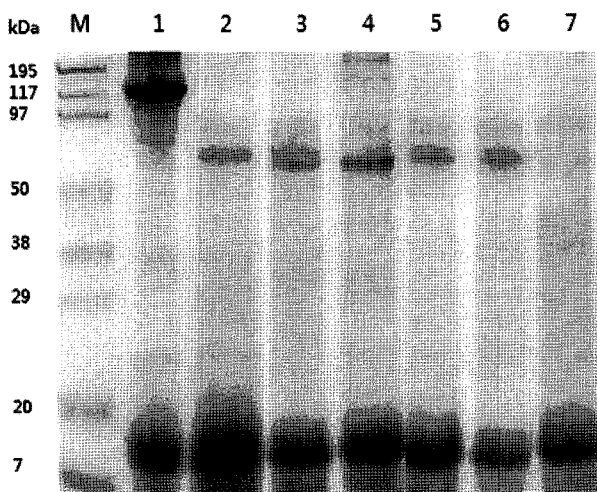


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of solubilized crystal proteins digested with *S. litura* gut extract of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099. Lane 1: undigested KB099 and Lane 2-7: digested KB099 (Lane 2: 15 min; Lane 3: 1h; Lane 4: 3h; Lane 5: 6h; Lane 6: 12h; Lane 7: 24h).

종에만 활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Sanchis 등, 1989; Visser 등, 1988, 1990). 나비목해충에 활성이 있는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*는 CryIAa, CryIAb, CryIC 그리고 CryID 등 4개의 유전자로 알려져 있으며 있다(Aronson 등, 1991; Crickmore 등, 1998; Höfte와 Whiteley, 1989), 반면 KB099 균주는 혈청학적으로 HD-1와 같은 *kurstaki*로 동정 되었으나 CryIAa, CryIAb, CryIAc, CryIC, CryID 그리고 CryII 등 6개의 독소 단백질을 가지고 있음이 확인 되었으며(Fig. 5B). 기준균주인 HD-1을 대조시험하여 5개의 Cry독소 단백질의 존재함을 확인 할 수 있었다(Fig. 5A). 그리고 그림 5A의 7번 lane에서 Cry2A 단백질이 KB099 균주에서 확인되지 않는 것은 cuboidal crystal의 존재와 관련이 있는 것을 암시한다.

또한, 담배거세미나방 유충에 대한 생물검정에서 HD-1보다 높은 활성을 나타내는 것에는 KB099 균주의 CryIC, CryID 내독소 단백질의 작용이 확실하게 나타나는 것을 알 수 있다. 특히 CryIC 내독소단백질에 대한 연구가 많이 보고되어 있으며, 담배거세미나방(Rajagopal 등, 2002)과 담배박각시나방 유충, 파밤나방, 담배나방(Luo 등, 1999) 등이 있다.

나비목의 유충은 CryIA 내독소 단백질에 저항성이 나타

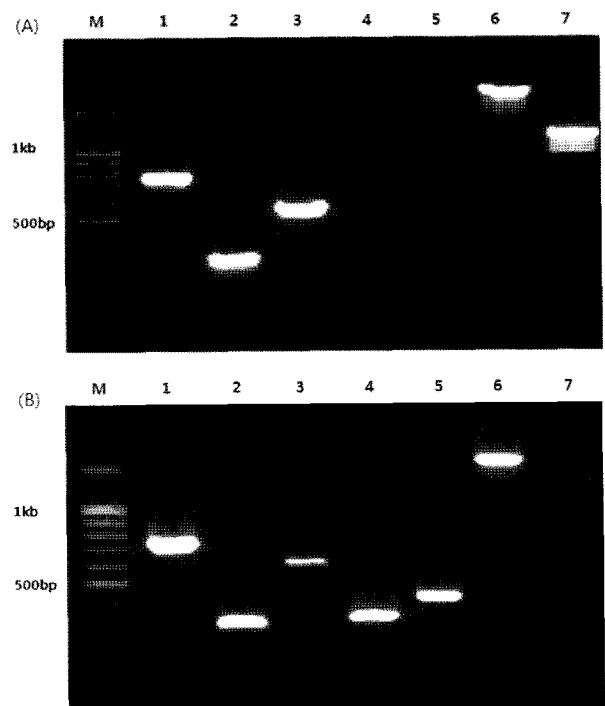


Fig. 5. Agarose gel (1.5%) electrophoresis of PCR products obtained with specific primers for the cry genes. (A) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and (B) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099, Lane: 1, cryIAa; 2, cryIAb; 3, cryIAc; 4, cryIC; 5, cryID; 6, cryII; 7, cry2.

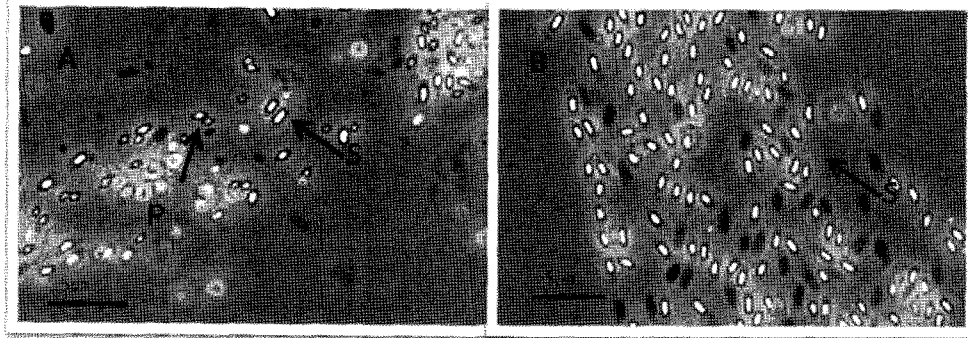


Fig. 6. Phase-contrast microscopies are used to detect the presence of parasporal inclusion (p) and spore (s) in Cry⁺ and Cry⁻ of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099.

나며, Cry1Ca에는 높은 감수성을 나타내었다. 이는 해충에 Cry1A에 대한 저항성이 발달하였으며, 잔존한 Cry1Ca는 감수성을 나타낸 것으로, 곤충 증장 세포막의 수용체의 차이점과 함께 이들 독소의 작용을 예상할 수 있다(Ferre 등, 1991; Tabshnik, 1994). 또, 3개의 Cry1A 단백질에 감수성을 보인 집시나방은 Cry1Aa와 Cry1Ac 단백질 존재 사이에서 상승효과를 보였으며, 반면 Cry1Aa와 Cry1Ab 작용에서는 상승효과가 나타나지 않았다. 이러한 현상은 내독소 단백질간의 감수성곤충의 증장내 성분의 용해성에 따른 차이로 본다. Aronson 등 (1991)의 보고에 의하면 Cry1C와 Cry1D만을 포함한 HD-133 균주의 독소 단백질은 높은 pH 조건하에 용해되었고, 이는 화랑곡나방과 다른 나비목 종에 살충성을 증가시킨다. 이 연구는 KB099의 내독소 단백질 중 Cry1C와 Cry1D의 존재와 증장 pH가 알칼리성의 담배거세미나방 유충에 높은 독성을 보이는 것에 대해 뒷받침한다.

일반적으로 대부분의 *B. thuringiensis* 균주의 경우 내독소 단백질을 만들어내는 plasmid DNA가 존재한다. 내독소 단백질을 생산해내는 Plasmid DNA의 크기(2-250kb)와 그 수는 균주마다 아주 다양하다(González와 Carlton, 1980; Lereclus 등, 1982; McDowell과 Mann, 1991). 이러한 plasmid DNA가 존재하는 내독소 단백질을 코딩하는 *Cry* 유전자와 관련된 정보를 얻을 수 있는 좋은 자료가 된다(Pedro 등, 2005). *B. thuringiensis*에서 대부분의 작은 plasmid DNA 크기는 15 kb 이하이며 이들의 기능이 잘 알려지지 않기 때문에 암호화되어 있다. 이러한 기능은 넓게 분산된 plasmid DNA가 복제되고 유동되었기 때문이다. 대부분의 작으나 다양하게 복제된 plasmid DNA는 Gram-양성 박테리아의 asymmetric rolling-circle 기작으로 생성된 한 가닥의 DNA 중간물에 의해 복제된다(Khan, 1997).

곤충병원성세균에 존재하는 plasmid DNA의 유전학적인

역할을 검토하기 위해 KB099 균주의 내독소 단백질을 생산하지 못하도록 plasmid DNA를 추출하여 cry-균주를 만들었다. 돌연변이균주가 내독소 단백질을 생산하는지 여부를 비교하기 위하여 위상차현미경으로 Cry와 Cry- 균주를 확인하였으나 Fig. 6의 B에서 볼 수 있듯이 내독소 단백질을 만들지 못하였다. 이러한 두 균주의 생물활성을 담배거세미나방을 통하여 확인 되었으며 Cry-균주에는 전혀 활성을 나타내지 못하였다(Table 2). 또한, Cry-균주가 나비목에 활성을

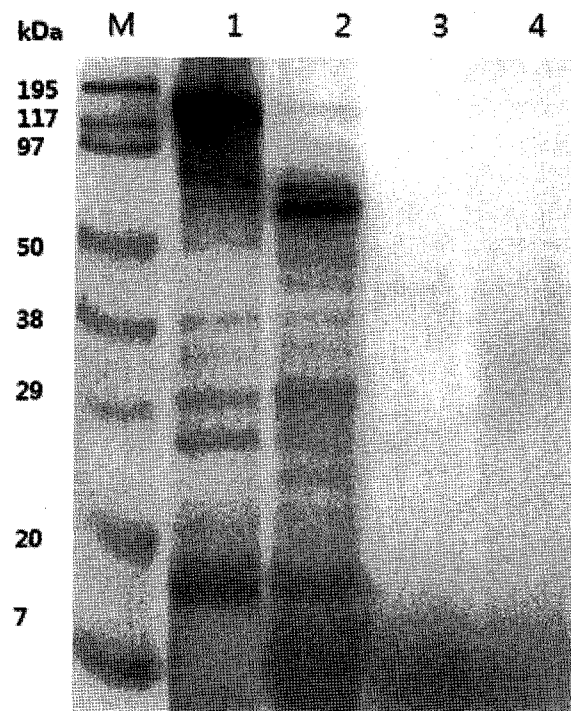


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of solubilized crystal proteins digested with *S. litura* gut extract of Cry⁺ and Cry⁻ strains of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099. Lane 1: undigested Cry⁺; Lane 2: digested Cry⁺; Lane 3: undigested Cry⁻; Lane 4: digested Cry⁻.

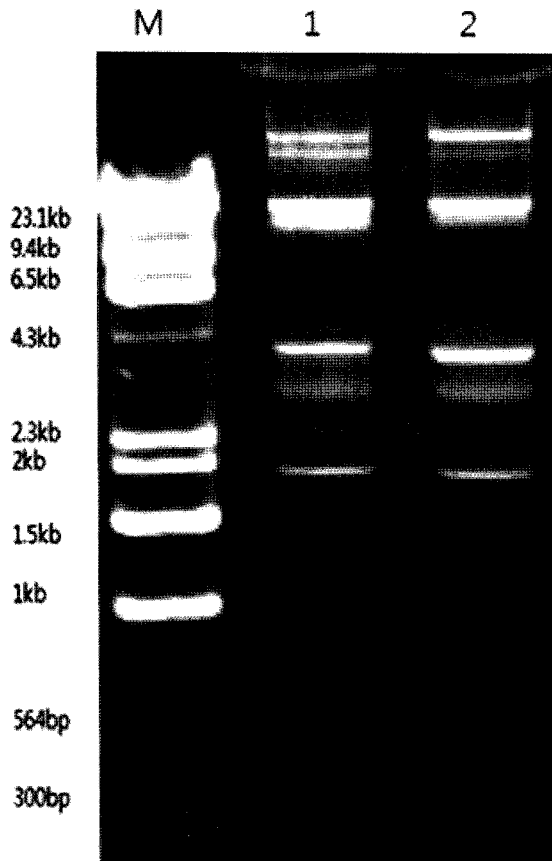


Fig. 8. Comparative plasmid DNAs pattern of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 as Cry+ and Cry-. Lane 1: Cry+ strain; Lane 2: Cry- strain; M: Lambda DNA HindIII plus marker.

나타내는 내독소 단백질을 생산하고 있는지의 여부를 확인하기 위해 SDS-PAGE 분석을 하였으나 전독소 단백질인 130 kDa이 존재하지 않았다(Fig. 7, lane 3). 또한 감수성 곤충인 담배거세미나방 증장 추출액에 반응시켜 독소 활성밴드인 60-65 kDa의 밴드가 없는 것을 확인하였다(Fig. 7, lane 4). 이와 같이 Cry-균주인 KB099의 plasmid DNA 패턴을 확인한 결과 화살표로 나타낸 것같이 두 개의 사이즈의 밴드가 돌연변이 균주에서는 없는 것을 확인 하였다(Fig. 8). 이러한 두 개의 Plasmid DNA가 독소 단백질을 생산여부에 관여하는 것을 암시하고 있다. 따라서 이 독소 단백질의 유전자 염기서열을 조사하여 담배나방에 높은 활성을 나타내는 내독소 단백질의 구조를 밝혀 특성을 조사하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립 농업과학원의 “해충방제용 미생물 살충제의 현장 활용 평가 기술 개발”과제에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Aronson, A. I., E.-S. Han, W. McGaughey and D. Johnson (1991) The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:981~986.

Ben-Dov, E., A. Zaritsky, E. Dahan, Z. Barak, R. Sinai, R. Manasherob, A. Khamraev, E. Troitskaya, A. Dubitsky, N. Berezina, and Y. Margalith (1997) Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4883~4890.

Brian, A., and C. Federici (1998) Transgenic Bt crops and resistance: Broadscale use of pest-killing plants to be true test. *California Agriculture* 52:14~20.

Burton, S. L., D. J. Ellar, J. Li, and D. J. Derbyshire (1999) N-Acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287:1011~1022.

Carozzi, N. B., V. C. Kramer, G. W. Warren, S. Evola, and M.G. Koziel (1991) Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3057~3061.

Choi, S. Y., M. S. Cho, T. H. Kim, and Y. M. Yu (2008) Bioactive characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 isolated from domestic soil. *Kor. J. Appl. Entomol.* 47:175~813.

Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D. H. Dean (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol.* 62:807~813.

Edyta, K., K. Adam Z. Jadwiga Z. Kazimierz and H. Paetzl (2007) Analysis of cry gene profiles in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Curr. Microbiol.* 55:217~222.

Ferre, J., M. D. Real, J. van Rie, S. Jansens and M. Perferoen (1991) Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88:5119~5123.

Glare, T. R. and M. O'Callaghan (2000) *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. Chichester: Wiley pp. 350

González, J. M. and B. C. Carlton (1980) Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 3:92~98.

Höfte, H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Mol. Biol.* 53:242~255.

http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/

- Hurley J. M., L. A. Bulla, and R. E. Andrews (1987) Purification of the mosquitocidal and cytolytic proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1316~1321.
- Jalali, S. K., K. S. Mohan, S. P. Singh, T. M. Manjunath and Y. Lalitha (2004) Baseline-susceptibility of the old-world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from India to *Bacillus thuringiensis* CryIAc insecticidal protein. *Crop Protect.* 23:53~59.
- Jensen, S., L. Cavarec, M. P. Gassama, and T. Heidmann (1995) Defective I elements introduced into *Drosophila* as transgenes can regulate reactivity and prevent I-R hybrid dysgenesis. *Europ. Dros. Res. Conf.* 14:198.
- Karamanlidou, G., A. Lambropoulos, S. Koliais, T. Manousis, D. Ellar and C. Kastritsis (1991) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2277~2282.
- Khan, S. A. (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:442~455.
- Kim, T. H., D. A. Kim, K. S. Kim, M. J. Seo, Y. N. Youn, and Y. M. Yu (2009) Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB109 isolate with bioactivities to *Spodoptera litura* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 48(4):509~517.
- Kim, D. A., J. S. Kim, M. R. Kil, Y. N. Youn, D. S. Park, and Y. M. Yu (2006) Isolation and activity of insect pathogenic *Bacillus thuringiensis* strain from soil. *Korean J. Appl. Entomol.* 45(3):1~6
- Kim, H. S., D. W. Lee, S. D. Woo, Y. M. Yu, and S. K. Kang (1998) Biological, immunological, and genetic analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from grassy in Korea. *Curr. Microbiol.* 37:52~57.
- Kim, D. A., J. S. Kim, M. R. Kil, S. K. Paek, S. Y. Choi, D. Y. Jin, Y. N. Youn, I. C. Hwang, and Y. M. Yu (2008) Characterization of new *Bacillus thuringiensis* isolated with bioactivities to tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), *Korean J. Appl. Entomol.* 47:87~93.
- Krieg, A., A. Huger, G. Langenbruch and W. Schnetter (1983) *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*; A new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *J. Appl. Entomol.* 96:500~508.
- Kumar N. S., and G. Venkateswerlu (1998) Endogenous protease-activated 66-kDa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* active against *Spodoptera littoralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 159:113~120.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680~685.
- Lereclus, D., M. M. Lecadet, J. Ribier, and R. Dedonder (1982) Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: Conserved sequences through 11 crystalliferous strains. *Mol. Gen. Genet.* 186:391~398.
- Luo, K., D. Banks, and M. J. Adang (1999) Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* CryI delta -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:457~464.
- Martin, P. A. W. and R. S. Travers (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2437~2442.
- McDowell, D. G. and N. H. Mann (1991) Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1-DIPEL, Plasmid 25:113~120.
- Minamikawa, H. (1937) Survey on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius Taiwan Central Res. Ins. Agr. Report 70:1~66.
- Mochida, O. and T. Okada (1974) A bibliography of *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Misc. Bull. Kyushu Nat. Agr. Expt. Sta.* 49:1~110.
- Neema, A., M. Pawan and Raj K. Bhatnagar (2002) Interaction of gene - cloned and insect cell- expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4583~4592.
- Ohba, M. and K. Aizawa (1978) Physiology of spore forming bacteria associated with insects minimal nutritional requirements for growth sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 28:124~128.
- Ohgushi, A., H. Satioh, W. Naoya., A. Uemori. and M. Ohba (2005) Cloning and characterization of two novel genes, cry24B and slorf2, from a mosquitocidal strain of *Bacillus thuringiensis* serovar sotto. *Curr. Microbiol.* 51:131~136.
- Pedro, D., L. Loeza, B. Graciela, C. Jorge, O. Z. Alejandra, M. Victor, A. Baizabal, J. Juan, A. Valdez and J. E. López-Mezaa (2005) The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. *Plasmid.* 25:229~240.
- Peyronnet, O., V. Vachon, J. L. Schwartz, and R. Laprade (2001) Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* 184:45~54.
- Porcar, M., J. Iriarte, V. Cosmao Dumanoir, M. D. Ferrandis, M. -M. Lecadet, J. Ferré, and P. Caballero (1999) Identification and characterization of the new *Bacillus thuringiensis* serovars *pirenaica* (serotype H57) and *iberica* (serotype H59). *J. Appl. Micro.* 87:640~648.
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, A. Neema, M. Pawan, I. Raj, and K. Bhatnagar (2002) Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.* 277:46849~46851.
- Raymond, M. (1985) Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORSTOM, Ser. Ent. Med. et Parasitol.* 22:117~121.

- Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, S. Guo, and M. M. Lecadet (1989) Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera*-active δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis aizawai*. *Mol. Microbiol.* 3:229~238.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. R. Baum and J. Feitelson (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol.* 62.
- Schnepf, H. E. (1995) *Bacillus thuringiensis* toxins; regulation, activities and structural diversity. *Curr. Opin. Biotech.* 6:305~312.
- Smith, R. A. and G. A. Couche (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:311~315.
- Tabshnik, B. E. (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.* 39:47~79.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji and L. A. Bulla Jr (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*, *J. Biol. Chem.* 270:5490~5494.
- Visser, B., E. Munsterman, A. Stocker and W. G. Dirkse (1990) A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *J. Bacteriol.* 172:6783~6788.
- Visser, B., T. van der Salm, W. van den Brink and G. Folkers (1988) Genes from *Bacillus thuringiensis entomocidus* coding for insect-specific toxins. *Mol. Gen. Genet.* 212:219~224.
- Zeigler, D. R. (1999) *Bacillus* genetic stock center catalog of strains. Part 2: *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*, 7th ed. *Bacillus* Genetic Stock Center, Columbus, Ohio.
- Zhong, C., D. J. Ellar, A. Bishop, C. Johnson, S. Lin and E. R. Hart (2000) Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.* 76:131~139.
- Zouari, N. and J. Samir (1997) Purification and immunological characterization of particular delta-endotoxins from three strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 19(8):825~829.

담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에 높은 살충활성을 나타내는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주의 내독소 단백질 특성

정선영 · 서미자¹ · 윤영남¹ · 유용만^{1*}

농촌진흥청 국립농업과학원 농자재평가과, ¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

요 약 주요 농업해충인 담배거세미나방에 대하여 높은 생물활성을 보이는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주의 내독소단백질의 특성이 검토되었다. 이 균주의 내독소단백질은 효소 처리 없는 SDS-PAGE 결과 HD-1 균주에서는 일부 용해되어 130 kDa와 60 kDa의 두 개의 단백질밴드가 나타났으나 KB099균주에서는 용해되지 않고 130kDa의 밴드만이 관찰되었다. KB099균주의 내독소단백질에 감수성 해충인 담배거세미나방의 증장액으로 소화하였을 때에는 약 60 kDa 단백질밴드가 형성됨을 확인하였다. 또한 두 균주의 각각의 내독소단백질에 감수성해충의 소화액으로 반응시켰을 때 생물활성이 약했던 HD-1균주는 약6시간 만에 주요 밴드가 사라지는데 비해 활성이 강한 KB099균주는 12시간이상 까지도 활성밴드가 유지되다가 24시간 정도에서 밴드가 사라졌다. KB099균주가 생산하는 내독소단백질 유전자의 탐색을 위한 PCR실험에서 Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C, Cry1D 그리고 Cry1I 등 6개의 유전자가 존재함을 확인하였다.

색인어 담배거세미나방, *Bacillus thuringiensis*, 생물활성, PCR, Plasmid DNA
