

CG222

곤충병원 미생물로부터 유래된 살충성 유전자  
조작에 의한 형질전환체 작물개발  
(Development of crop transformant by manipulation of insecticide gene  
derived from entomopathogenic microorganisms)

*Bacillus* 살충성 유전자를 이용한 해충저항성 작물 개발 연구  
(Development of insect resistant crop using insecticidal gene from  
*Bacillus* sp.)

미생물로부터 딱정벌레목 살충성 유전자 개발  
(Improvement of microbial insecticide gene for Coleopteran )

곤충병원 미생물로부터 작물형질전환  
용 살충성 유전자 탐색  
(Search of insecticidal genes from entomopathogenic  
microorganisms to transform crops for insect resistance)

농업생명공학연구원  
한림대학교  
서울대학교

과 학 기 술 부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 과학기술부 특정연구개발사업 21세기 프론티어연구개발사업 중 과학기술부와 농촌진흥청이 지원하는 작물류전체기능연구사업단 “곤충병원 미생물로부터 유래된 살충성 유전자 조작에 의한 형질전환체 작물개발에 관한 연구” 과제 (과제번호 CG222) 의 단계보고서로 제출합니다.

2004 . 8 .31.

주관연구기관명 : 농업생명공학연구원

주관연구책임자 : 서석철

연 구 원 : 박범석

” : 박형만

” : 이연희

” : 노경희

” : 신공식

” : 김광호

협동연구기관명 : 한림대

협동연구책임자 : 임성렬

협동연구기관명 : 서울대

협동연구책임자 : 제연호

보고서 초록

과제관리번호	CG222	해당단계 연구기간	2001 .9 .1- 2004 .6 .30(2 년10 월)	단계 구분	(1단계) / (3단계)
연구사업명	중 사업명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	작물유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명	곤충병원 미생물로부터 유래된 살충성 유전자 조작에 의한 형질전환체 작물개발			
	세부(단위)과제명	<i>Bacillus</i> 살충성 유전자를 이용한 해충저항성 작물 개발 연구			
		미생물로부터 딱정벌레목 살충성 유전자 개발			
연구책임자	농업생명공학연구원 : 서 석 철	해당단계 참여연구원수	총 : 76 명 내부 : 51 명 외부 : 25 명	해당단계 연구비	정부: 700,000 천원 기업: 천원 계: 700,000 천원
		농업생명공학연구원 유전자발현팀	참여기업명		
연구기관명 및 소속부서명	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
국제공동연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p><b>변형된 <i>cry1Ac</i> 유전자를 지닌 형질전환체 벼생산:</b> <i>Bt</i> 본래의 내독소 단백질 유전자 <i>cry1Ac</i> (이하 "<i>wt-cry1Ac</i>"로 약함)는 3,537 bp로 아미노산 1,178 개를 코드하고 있다. 이 <i>wt-cry1Ac</i> 유전자 중 앞부분 1,854 bp가 곤충 독성에 직접관련있다. 따라서 이 부분을 수정 합성함으로써 아미노산 배열은 변화시키지 않고 DNA 염기배열만 변형된 합성 곤충 독소 유전자를 만들었다.</p> <p>분자생물학적인 방법으로 형질전환체(T1,T2)의 세대진전을 통한 안정적인 유전자 발현을 분석한후 생물검정을 실시하였다. 검정결과로는 먹노린재와 이화명나방에서 효과적이었고 특히 포장시험에서 흑명나방에대하여 현저한 방제효과를 보였다.</p> <p><b>흡즙곤충에 대한 재조합 유전자작성 및 기작구명 :</b> 흡즙곤충에 살충력이 있는 재조합 단백질을 만들기 위해 <i>B.t.</i>결정체 생산 유전자와 감자염권바이러스(<i>PLRV</i>)의 피복단백질을 결합한 융합단백질을 생산하였다.</p> <p><b>효과적인 유전자발현을위한 조직특이 프로모터개발 :</b> 뿌리에서 선별적으로 발현하는 유전자들의 2kb upstream 부위를 binary vector에 클로닝하여 최종적으로 애기장대에서 프로모터의 활성여부에 따라 GFP나 GUS가 발현되도록 하였다.</p> <p><b>새로운 살충성유전자 개발 :</b> 본 과제의 1단계를 통하여 나비목 해충에 강독성인 <i>Bt</i> K-1 (대한민국 특허출원 제 2001-37445 호)과 <i>Bt</i> 2385-1 균주로부터 새로운 5종의 <i>cry1</i> type의 내독소단백질 유전자를 분리하여 Genbank에 등록하였다. 또한 이들 유전자를 baculovirus expression system을 이용하여 발현하고, 이들 발현 산물의 배추좀나방 및 파밤나방에 대한 독성을 확인한 결과, 기존에 작물형질전환에 가장 널리 사용되고 있는 <i>cry1Ac</i>와 <i>cry1C</i>과 대등하거나 더 높은 독성을 나타내는 것을 확인한 바 있다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	살충성, 형질전환체, 융합단백질, 연결부위, 분자육종			
	영 어	insecticide, transformant, fusion protein, ligand, molecular breeding			

# 요 약 문

I. 제 목 : 곤충병원 미생물로부터 유래된 살충성 유전자 조작에 의한 형질전환체 작물개발(Development of crop transformant by manipulation of insecticide gene derived from entomopathogenic microorganisms)

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

인구 증가 및 농약 사용 증가에 따른 식량 문제와 환경 오염 문제를 동시에 해결하기 위해 각 국가들이 생명 공학 기술을 바탕으로 농작물 형질 전환체 개발에 총력을 기울이고 있다. 따라서 본 과제에서 제시하는 첫 번째 연구로는 국내에서 분리한 곤충병원성 미생물들로부터 신규 살충성 유전자들을 탐색, 선별하여 작물형질전환용 유전자로서의 이용가능성을 확인하는 것을 목표로 하고 있다. 우선적으로 이 곤충병원성 미생물들에서 살충성 유전자군을 탐색하여 곤충병원 미생물 균주의 유전자 Database를 구축한다. 이중 신규가능성 있는 유전자를 대상으로 다수의 살충성 유전자를 선별하며, 이를 이용하여 유전자 융합과 shuffling 등의 방법을 통해 보다 다양한 적용범위를 가질 수 있는 새로운 재조합 유전자를 제작하고 이들의 염기서열을 분석하여 신규성을 확정하며 유전자의 분자생물학적인 특성을 규명하였다. 그리고 최종적으로 분리한 살충성 유전자에 대한 활성을 검정하기 위하여 이들 유전자들을 대량으로 발현시키고 그 발현산물로 해충들에 대하여 정량적, 정성적 생물검정을 수행하여 작물형질전환에 도입가능한 강력한 살충성 유전자를 확보하였다. 두 번째 연구로는 *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis* (B.t.t.) 및 *Bacillus popilliae*(Bp) 균주의 인체 무해 독소 단백질 유전자를 작물체에서 발현 할 수 있도록 형질 전환 벡터를 개발하여, 딱정벌레목에 저항성이 있는 작물을 개발하는데 사용하고자 한다. 본 연구의 목적을 달성하기 위해 작물의 잎 및 뿌리에서 특이적으로 유전자 발현을 조절하는 프로모터를 분리한 다음, 각각의 독소 유전자를 프로모터에 연결하고, *Agrobacterium*을 이용한 유전자 도입용 plasmid에 연결하여 형질 전환 벡터를 개발하였다. 세번째 연구로는 작물에 가해하는 나비목의 흡즙 해충을 방제하기위한 연구로 기주범위가 확장된 새로운 융합 살충단백질을 만들고 Btk 독소유전자를 변형하는 연구에 초점을 맞추었다. *Bacillus thuringiensis*(Bt) 독소 단백질은 곤충 소화관의 receptor를 인지 결합하는 C'-부분과 세포막에 구멍(pore)을 형성하는 N'-부분으로 이루어지는데, receptor를 인

지 결합하는 부분이 독소의 적용범위 (host range) 결정에 중요한 역할을 한다. 따라서 우리는 흡즙곤충의 소화관을 receptor mediated endocytosis 방법으로 통과하여 침샘으로 이동하는 식물바이러스의 외피단백질 ligand 부위로 Btk의 receptor 인지 결합 부분을 교체하여 흡즙해충으로 그 기주범위가 확장된 새로운 융합 살충단백질 유전자를 만들고, 이 유전자를 지닌 벼, 감자 및 토마토 형질전환체를 만들어 식물체 유관속(흡즙부위)에서 발현하므로써 이를 흡즙한 해충을 방제하는 것을 목적으로 하였다. 본 연구의 성공적인 결과로부터 우리는 다음과 같은 효과를 기대할 수 있다. 학술적 측면에서 1) *B.t. toxin gene*의 앞에서의 발현 벡터 개발과 cryBP toxin 유전자의 뿌리에서의 발현 벡터의 개발 및 복합적 살충성 유전자 발현 벡터 개발하게 될 것으로 기대되어 진다. 2) 식물, 곤충, 박테리아, 바이러스 등 다양한 분야를 총괄하는 연구 개발모델과, 3) 새로운 기능의 융합 단백질 창출이 예상된다. 또한 경제·산업적 측면에서는 1) 해충의 절반을 차지하며 방제가 어려운 흡즙해충 저항성 작물개발과, 2) 농약 사용 비용 절감 및 화학살충제에 의한 파생적 피해 경감, 3) 부수적인 식물 바이러스병 경감 효과, 4) 원천기술 개발로 다양한 주요 작물에 적용가능하며 새로운 신작물의 창출로 인하여 농민의 부가가치를 높일 수 있으며 국민의 복지 생활 증진에도 도움을 줄 것으로 예상된다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발내용 및 범위
Bacillus 살충성 유전자를 이용한 해충저항성 작물 개발 연구	o 흡즙곤충 살충성 융합 단백질 유전자 개발	o 융합독소 발현 식물체 개발 : - 식물발현 벡터제작 - 형질전환 : 감자, 담배
	o 살충성 전환 작물개발	o 살충성 유전자 형질전환 - 벼, 감자 및 토마토 o 형질전환체 도입유전자 분석 및 중간모본체 생성
	o 살충성 유전자 및 전환체 생물검정	o 벼물바구미 실내 누대 사육기술 개발 - 포트(토양, 수경) 사육 기술 o 공시충 사육 및 생물검정법 확립 - 공시충 : 목화진딧물( <i>A. gossypii</i> ), 벼물바구미( <i>L. oryzaephillus</i> )
미생물로부터 딱정벌레목 살충성 유전자 개발	o <i>B.t.t. toxin gene</i> 을 이용한 농작물 형질 전환 벡터 개발	o <i>B.t.t.</i> 독소 유전자의 작물기관부위별 발현 promoter 분리 o <i>B.t.t.</i> 독소 유전자의 감자 및 토마토의 저장 조직 부위 발현벡터 개발
	o 풍뎅이 살충성 유전자분리	o <i>B. popilliae</i> 균주로부터 풍뎅이 살충성 유전자 분리
	o <i>B. popilliae</i> 균주의 cryBP toxin-gene을이용한 농작물 형질전환 벡터개발	o cryBP toxin-gene의 특성 분석 o 독소 유전자 기관 부위별 발현promoter 분리 o cryBP toxin-gene의 기관 부위별 발현 벡터 개발 o cryBP toxin gene의 벼 뿌리발현 벡터 개발
	o 복합적 살충성 유전자를 이용한 벼 형질 전환용 벡터 개발	o 두 개 유전자 동시 발현을 위한 IRES 서열 분리 o 벼의 잎과 뿌리에서 <i>Btt-</i> 및 cryBP 유전자가 동시에 발현되는 벡터 개발 o 복합적 유전자의 기관 부위별발현 벡터 개발
곤충 병원성 미생물로부터 작물형질 전환용 유전자 탐색	o 곤충 병원성 미생물로부터 신규살충성 유전자 탐색	1. 신규곤충병원 미생물 선발 2. 살충성 유전자군으로부터 유전자형 분석 3. Database화를 통한 신규유전자 탐색
	o 살충성 유전자 구조분석과 유전자 개량	1. 신규 살충성 유전자 선발 2. 유전자 융합 및 유전자 조작을통한 재조합 유전자 제작 3. 분자생물학적인 특성 규명
	o 형질전환용 살충성 유전자로의 이용가능성 확인	1. 신규 및 재조합 살충성 유전자들의 대량발현 2. 정량적, 정성적 생물검정을 통한 강력한 살충성 유전자 확보

## IV. 연구개발결과

### A. *Bacillus* 살충성 유전자를 이용한 해충저항성 작물 개발 연구

#### 변형된 *cry1Ac* 유전자를 지닌 형질전환체 벼생산

*Bt* 본래의 내독소 단백질 유전자 *cry1Ac* (이하 “*wt-cry1Ac*”로 약함)는 3,537 bp로 아미노산 1,178 개를 코드하고 있다. 이 *wt-cry1Ac* 유전자 중 앞부분 1,854 bp가 곤충 독성에 직접 관련있다. 따라서 이 부분을 수정 합성함으로써 아미노산 배열은 변화시키지 않고 DNA 염기배열만 변형된 합성 곤충 독소 유전자를 만들었다. 수정 합성된 *cry1Ac* 유전자를 *rbcS* 프로모터와 transit peptide 염기서열에 연결하여 식물 발현 벡터를 제작하고 벼에 형질 전환하였다. 분자생물학적인 방법으로 형질전환체(T1,T2)의 세대진전을 통한 안정적인 유전자 발현을 분석한후 생물검정을 실시하였다. 검정결과로는 먹노린재와 이화명나방에서 효과적이었고 특히 포장시험에서 흑명나방에 대하여 현저한 방제효과를 보였다.

#### 흡즙곤충에 대한 재조합 유전자작성 및 기작구명

흡즙곤충에 살충력이 있는 재조합 단백질을 만들기 위해 *B.t.*결정체 생산 유전자와 감자염권바이러스(PLRV)의 피복단백질을 결합한 융합단백질을 생산하였다. 그결과 Cry1Ac-CP 와 Cry domain I-CP 융합단백질의 대한 복숭아진딧물에 살충력 효과는 50%농도(weight/weight)에서 각각 76% 와 82%의 살충력효과를 보였다.

#### 효과적인 유전자발현을위한 조직특이 프로모터개발

식물체에서의 유전자발현을 위해서는 주로 CaMV 35S, 벼의 actin 그리고 옥수수의 ubiquitin 프로모터들이 사용되었는데 이들은 모두 강력하면서도 항상 발현되는 것들이다. 그러나 형질전환식물에서의 유전자발현 조절을 위해서는 기관특이적인 프로모터가 절대적으로 요구된다. 이에 이미 밝혀진 애기장대의 전체 유전정보를 이용하여 그러한 특이프로모터를 발굴하는 연구를 시작하였다. 우선 뿌리에서 선별적으로 발현하는 유전자들의 2kb upstream 부위를 binary vector에 클로닝하여 최종적으로 애기장대에서 프로모터의 활성여부에 따라 GFP나 GUS가 발현되도록 하였다. T2세대의 형질전환체의 GFP/GUS 발현형태를 분석한 결과 2개의 프로모터 클론이 자엽단계에서 조직특이적으로 발현하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 중 하나는 GUS나 GFP가 동시에 발현하지 않았지만 어느 하나의 발현만으로도 이 프로모터의 활성을 예측하는 것은 가능하다. 앞으로 더욱 많은 특이 프로모터부위를 확보하기 위해 위의 방법을 이용한 발굴 및 분석이 계속 될 것이다.

#### 토마토 엽록체형질전환

엽록체형질전환 방법은 핵형질전환보다 많은수의 유전자를 복제할 수 있으므로 많은량의 살충성 단백질생산 형질전환체를 만들기위해 flanking sequence를 변경한 토마토 엽록체형질전환용 운반체를 제작하였다. 유전자총을 이용한 토마토 엽록체 형질전환조건은 9일 배양된 자엽을 사용하였고 유전자총의 입자크기는 직경 0.6 $\mu$ m gold particles 이며 1,100 psi의 Helium pressure와 , microcarrier와의 거리는 9 cm이고, 28" Hg vacuume 수준이 가장 적절하였다. 현재 토마토 형질전환체를 얻기위해서 살충성유전자 pKRT22A-cryIIIA

를 처리한후 25mg l<sup>-1</sup> spectinomycin이 함유된 재생배지상에서 형질전환체를 선발중에 있다.

### **Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis (B.t.f)**를 도입한 감자와 토마토 생산

식물체내에서 발현시킬 수 있는 chimeric 유전자를 구성하기 위해 딱정벌레목곤충에 특이적 독성을 나타내는 *B.t.f.*에서 얻어진  $\delta$ -endotoxin 유전자를 사용하였다. CaMV35S promoter, octopin synthase poly(A) sequence 및 neomycin phosphotransferase II (nptII) 유전자를 포함하고 있는 plasmid pBinAR 벡터를 이용하여 벡터의 *Bam* HI site에 살충성 유전자 단편을 삽입하여 식물발현 벡터를 구성 하였다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환법으로 감자와 토마토의 줄기 조직과 공동 배양하였다. kanamycin에 저항성을 나타낸 식물체에 대해  $\delta$ -endotoxin 유전자의 발현 양상을 분석하기 위해 total genomic DNA 분리하고 southern hybridization 분석을 실시하였다. 그 결과 몇몇 line에서 B.t.f 유전자에 blotting됨으로써 형질전환 식물체로 확인되었다. 또한 Northern blot 분석에 의해 RNA 발현을 확인할 수 있었다. Southern과 northern blot 분석을 통해  $\delta$ -endotoxin 유전자가 감자와 토마토 품종의 genomic DNA 상에 성공적으로 도입되었다는 것을 확인할 수 있었다.

### C. 곤충병원 미생물로부터 작물형질전환용 살충성 유전자 탐색

#### 곤충병원성 미생물로부터 신규 살충성 유전자 탐색

전국의 각 sample로부터 125종의 Bt 균주를 분리하여 Database를 제작하였고 이중에서 나비목에 독성을 보이는 56개의 Bt 균주를 분리하였다. 56개의 Bt 균주로부터 PCR-RFLP를 통하여 7종의 새로운 *cry1-type* 유전자를 탐색하였다.

#### Bt 살충성 유전자 클로닝과 구조분석

Bt K-1 균주와 Bt 2385-1 균주를 선발하고 이로부터 5종의 새로운 *cry1-type* 내독소 단백질 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였다.

#### 형질전환용 살충성 유전자로의 이용가능성 확인

독성검정을 통하여 5종의 새로운 *cry1-type* 내독소 단백질은 모두 배추좀나방에 높은 살충력을 보였으며 그 중 2종은 파밤나방에 대하여서도 높은 살충력을 보였다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

### 형질전환작물의 상용화

새로운 살충성 유전자 등의 유전자원을 확보하여 살충성 형질전환작물개발을 위한 유전자원을 제공하며 이의 상용화를 통하여 보다 환경친화적인 농업환경을 조성한다.

### 미생물살충제로의 개발 및 산업적 활용

현재 국내 여러 농약회사(한농, 경농, 미성, 동방, 전진, 동양 등)에서 이미 외국에서 상품화되어 있는 미생물 살충제를 수입하여 시판하고 있는 점을 고려할 때 해충에 대한 미생물 농약의 국내 개발이 시급하다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 특허와 기술을 민간 농약회사에 이전함으로써 국내 농약회사내에서의 미생물 살충제 연구를 활성화시키는



물론 농약산업체에 중요한 활용자료(Know-How)로 제공하는 것이 가능하며 제품화와 실용화로 국내농약회사를 육성하고 나아가서 국가경쟁력 강화에도 크게 기여할 것으로 예상된다.

### **제조합유전산물의 특이적 이용**

현재 개발되어 있는 미생물 살충제보다 한단계 발전된 강한 살충력과 속효성을 가지는 미생물 살충제 개발에 이용할 수 있을 것이며, 유전공학기술을 통한 유전자조작 등의 기술을 관련된 분야에 접목시킬 수 있다.

### **살충성 유전자의 미생물균주간의 이용**

서로 다른 미생물로부터 분리된 살충성 유전자는 그 작용기작 및 활용범위에 따라 다른 미생물 균주 및 유전자 등과 상호 조합 및 이용이 가능하게 되어 보다 유용하게 이용될 수 있다.

## S U M M A R Y

Development of insect resistant crop using insecticidal gene from *Bacillus* sp.

**Expression of a Synthetic *cry1Ac* Gene in Transgenic Rice Plants**

To make insect pest resistant rice plants, we neutrally modified the DNA sequence of *Bacillus thuringiensis* *cry1Ac1* gene for better expression in rice. We analysed twelve genes from rice to get the data about the codon usage in rice. The final modified gene was different at 393 residues, 21 % of 1845 bases of the wild-type gene and 56 % of 615 codons. And the G+C content was increased from 37% of wild type to 48% of modified *cry1Ac1* gene. We synthesized DNA fragments of the modified *cry1Ac1* gene by recursive PCR method using 54 primers. The modified *cry1Ac1* gene was expressed using an insect baculovirus vector system. The product was analysed by western blot and assayed against diamondback moth larvae. The toxicity of the modified *cry1Ac1* protein was equivalent to wild type protein. A synthetic *cry1Ac* gene, codon optimized for rice, was made and linked to the rice *rbcS* promoter and its transit peptide sequence (Tp) for chloroplast-targeted expression. The expression of *cry1Ac* protein in the transgenic rice plants was determined by immunoblot analysis. *cry1Ac* were clearly detectable in all lines of *rbcS-Tp::cry1Ac* plants; whereas no expression was detected in nontransgenic plant. Stem cuttings from *rbcS::Tp-cry1Ac*-transformed lines were infested with the neonate larvae of Japanese black rice bug (*Scotinophra lurida*) and striped stem borer (*Chilo suppressalis*). Also we got the resistance of a *cry1Ac* - transformed rice T2 plants against natural infestations of the rice leaffolders under field condition. In fact, most of the larvae, particularly those of yellow stem borer and rice leaffolder, were found dead in the sheath tissue before they were able to penetrate into the stem. We expect fertile transgenic rice plants expressing the *rbcS-Tp::cry1Ac* in chloroplasts at high levels. The use of *rbcS-Tp::cry1Ac* transgenic plants to express an insecticidal protein in chloroplast of transgenic rice plants would be especially useful for conferring resistance to sap-sucking insects, rice leaffolder.

**Development of the recombinant proteins which have the aphidicidal activity**

The destination of CP fusion protein in the gut of aphid was investigated with fusion proteins of GFP and CP. Two different fusion protein, GFP-CP and CP-GFP were expressed using baculovirus expression vector system (BEVS). When expressed in Sf9 insect cells, fusion proteins showed a molecular weight of about 53 kDa, and CP-GFP existed as the large granular form compared to GFP-CP. To study the binding activity of GFP-CP and CP-GFP in

the aphid gut, each fusion protein was mixed with aphid artificial diet and fed to adult *Myzus persicae*. However, none of fusion proteins were detected in the aphid when the Western hybridization was carried out with GFP antibody against total protein of aphid fed to GFP-CP or CP-GFP fusion proteins. To determine the toxicity of Bt crystal protein against aphid and to screen crystal proteins having higher toxicity against aphids, Bt crystal proteins were fed to *M. persicae* in the form of non-solubilized intact form or solubilized form. The results revealed that *B.t.* subsp. *kurstaki* had relatively higher aphidicidal activity in both form used in bioassay.

### **Construct of tissue-specific promoters to regulate gene expression**

For artificial gene expression in plants, just a few of promoters have been frequently used. Those are 35S (CaMV), actin (rice), and ubiquitin (maize) promoters that are strongly and constitutively expressed. However, some organ specific promoters also are required for regulation of the gene expression in transgenic plants. By using Arabidopsis genome information an effort to find such specific promoters has begun. Cloning of the 2kb upstream region of the root-specific genes into binary vector generated the promoter-GFP-GUS fusion system in transformed Arabidopsis. From GFP/GUS expression pattern observed a couple of clones showed tissue-specific expression at cotyledon stage (T2 generation). Although the expression pattern does always not match between GUS and GFP either expression clearly indicates the activity by a promoter. Further search and analysis by this approach will be done to obtain more specific promoter-candidates

Search of insecticidal genes from entomopathogenic microorganisms to transform crops for insect resistance

Development of transgenic crops against pest insects is a very important mean in integrated pest management programs which are a mandate in pest control strategy these days. But research in this field, including isolation of new insecticidal genes, is not satisfactory yet in Korea. Therefore, my research project is targeting on selection of new insecticidal genes from entomopathogenic microorganisms isolated from Korea and on the possibility of their application to development of insect resistant crops and cultivars by crop transformation.

We have been working on isolation and characterization of new insecticidal genes from the Bt strains. To identify new *cry1*-type crystal protein genes, 56 Bt isolates were selected on the basis of their toxicity against *Bombyx mori* larvae. The restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of the PCR-amplified fragments revealed 7 distinct patterns, and 7 standard isolates were selected from each RFLP group.

Through cloning to pGemT-easy vector and sequence analysis of the PCR-amplified fragments showing unique RFLP pattern, 7 novel *cry1*-type genes were identified from 5 standard isolates. Among these strains, Bt K-1 had 3 novel genes and Bt 2385-1 strain also had 2 novel genes and two strains had high toxicities to lepidopteran larvae. For cloning and characterization of the toxic domains of the novel *cry1* type genes, Bt k-1 and Bt 2385-1 strains were selected and the 2.4 kb toxic fragment of the 5 novel genes were cloned from them. To verify the activity against lepidopteran larvae, the novel genes were expressed using baculovirus expression vector system (BEVS) and the bioassay was performed to *Plutella xylostella* (Px) and *Spodoptera exigua* (Se). All novel *cry1*-type genes had high toxicities against Px larvae and, *cry1-44* and *cry1-5* had the highest toxicity against Px and Se larvae, respectively. Also, *cry1-1* and *cry1-5* had dual toxicities against Px and Se larvae. Finally, each novel gene must be a very useful resource for development of microbial insecticide and insect resistant plants.

## C O N T E N T S

Chapter 1 Outline of the research . . . . . 14  
    Clause 1 Purpose of the research  
    Clause 2 Necessity of the research

Chapter 2 The present position of the inside and outside of the country . . . . . 20  
    Clause 1 The example of the inside and outside of the country . . . . . 20

Chapter 3 The achieved substance and results . . . . . 24  
    Clause 1 Development of insect resistant crop using insecticidal gene from  
        *Bacillus* sp. . . . . 24  
    Clause 2 Improvement of microbial insecticide gene for Coleopteran . . . 87  
    Clause 3 Search of insecticidal genes from entomopathogenic  
        microorganisms to transform crops for insect resistance . . . . 105

Chapter 4 Attainment grade of the object and contribution grade in the  
    related field . . . . . 148

Chapter 5 Application plan of the research . . . . . 148

Chapter 6 The information of abroad science technique . . . . . 150

Chapter 7 Literature cited . . . . . 150

# 목 차

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

- 기술적 측면
  - 우리나라는 지속적인 쌀 증산정책으로 재래육종 방법에 의한 새로운 신품종이 개발되고 있지만 경지면적의 감소, 곡물시장의 불안정, 수요의 증가문제로 식량의 안정적인 공급이 미흡한 실정이고,
  - 농업 생산여건이 자원 위주에서 기술위주의 농업으로 바뀌어 감에 따라 농업의 노동 생산성 향상과 기술개발의 방향이 최소 비용으로 최대의 효과를 이룰 수 있는 적정기술개발이 이루어져야 한다.
  - 한편, 식물 유전공학에 있어서 획기적인 형질전환 기법의 확립과 함께 현재 유전공학 기술로 1997년까지 전세계적으로 생산된 3,800여종의 신품질 전환작물이 포장 시험중에 있으며 50여종이 이미 상품화되었고 나머지 대부분이 10년내에 실용화 될 것으로 전망된다(James, 1997).
  - 우리나라 벼 육종기술은 세계적 수준이며 벼에 대한 많은 유전자원을 보유하고 있으나 농업적으로 주요한 유전특성(재해저항성등)의 유전자 분리개발 및 품종 육성은 미흡한 실정이다.
  - 따라서 쌀을 주식으로 하는 우리나라의 경제 및 대외 경쟁력을 고려할 때 기존의 우량품 종에 살충성에 관련된 유전자를 도입한 벼 품종 개발로 안정적인 환경친화적 농업개발의 공급이 요구된다.
  - 이를 극복하기 위한 적극적인 방법으로는 자연재해에 관련된 새로운 유전자의 개발 및 유용 유전자를 지닌 새로운 작물의 출현이 시급한 실정임.
  - Bt의 포자형성기에 생성되는 내독소단백질은 목적해충이 섭식할 경우 해충 충체내의 중장에 들어가 중장상피세포에 존재하는 수용기와 결합한 후 중장막을 파괴하여 수시간 내에 섭식을 중지하게 하고 24시간이내에 치사에 이르게 하는 강력한 살충단백질로 알려져 있다 (Schnepf *et al.*, 1998). 이러한 내독소단백질은 척추동물에 무해하고 잔류독성이 없는 것으로 보고되어 있어

생물농약으로서 각광받고 있으며 현재 Bt 미생물살충제제는 전세계적으로 185종이 등록되어 광범위하게 사용되고 있다 (EPA, 2000). 현재까지 알려져 있는 Bt 내독소단백질 유전자의 수는 전체 유전자 (full gene)를 기준으로 86개에 이르며 그 외 독성을 가지는 N-terminal 부분 혹은 일부만 알려진 것도 124개 이상 보고되어 있다 (Crickmore *et al.*, 1998). 이렇게 다양한 내독소단백질 유전자는 각각 독성범위에 따라 나비목 독성, 파리목 독성, 딱정벌레목 독성 등 다양한 해충목에 대하여 독성범위가 나누어지며 그 숙주해충에 대한 특이성 또한 높은 것으로 알려져 있음 (Hofte and Whiteley, 1986).

- Bt 내독소단백질을 이용한 Bt 형질전환작물은 IPM (종합적 해충방제)의 한 방제수단으로 이용되고 있으며 현재까지 외국에서 개발된 Bt 형질전환작물로는 나비목 해충을 방제하기 위해 나비목에 강독성을 보이는 *cry1* type에 속하는 유전자를 형질전환함으로써 Bt cotton (Perlak *et al.*, 1990), Bt rice (Fujimoto *et al.*, 1993), Bt corn (Kozziel *et al.*, 1993), Bt tobacco (Strizhov *et al.*, 1997), Bt tomato (Perlak *et al.*, 1991), Bt cabbage, Bt soybean, Bt alfalfa 등 다양한 작물에서 이루어지고 있다. 또한 딱정벌레목 해충의 방제를 위해 *cry3* type의 유전자를 형질전환한 Bt potato (Adang *et al.*, 1993)가 있으며, 목본류인 *Populus spp.* 들의 해충인 매미나방 (*Lymantria dispar*)을 방제하기 위하여 Bt trees가 개발되는 등 그 이용범위가 점차 확산되고 있다. 이러한 광범위한 이용은 Bt 내독소단백질의 강력한 살충효과에 기인한 것으로 현재 다른 살충성 유전자보다 그 효용가치면에서 월등하며 식물체에서의 발현에 적합하도록 codon usage를 바꾸어 줄 경우 작물내에서 다량의 Bt 내독소단백질을 발현할 수 있어 충분한 살충효과를 얻을 수 있을 것임 (Perlak *et al.*, 1991).

#### 작물 형질전환, 도입유전자의 안정적 발현, 프로모터

- 작물 형질전환에 사용되는 기술은 현재 유전자총(Particle Gun) 이용법이 널리 사용되고 있으며 최근에 *Agrobacterium*을 이용하는 방법이 개발되고 있어서 형질전환 기술의 국내 정착이 비교적 용이함.
- 벼 형질전환 기술이 보급되면서 현재까지 환경내성에 관련된 Bt toxin 유전자 (Fujimoto *et al.*, 1993) 혹은 proteinase inhibitor 유전자 (Ray Wu *et al.*, 1994)를 이용한 내충성벼, chitinase 유전자 도입에 의한 내병성 벼 (Lin *et al.*, 1995) Rip 유전자 도입 및 제초제 저항성 벼(Kim *et al.*, 1998)등이 있음

- 그러나 벼 형질전환 기술이 1989년에 최초로 개발된 (Shimamoto, 1989) 이후 10여년이 흐른 지금에 이르기까지 형질전환식물체가 전세계적으로 아직 한건도 상업화되지 않았는데 이것은 농업적으로 유용한 벼 형질전환용 유전자의 부족과 또한 쌍자엽식물에서와 같은 효율적인 형질전환 체계의 부족에 기인한다고 볼 수 있다
- 작물의 형질전환기술이 널리 보급되면서 최근에 식물유전공학의 당면과제로 등장하는 것들을 보면 4가지로 요약할 수 있다. 첫째, 도입유전자의 copy number와 발현수준이 연관성이 없고 오히려 multicopy 형질전환체의 경우 발현수준이 떨어진다. 둘째, 유전자의 염색체내 삽입부위에 따라서 도입유전자의 발현수준이 크게 달라진다(position effect). 셋째, 두 개이상의 도입유전자가 존재할 경우에 도입유전자의 발현이 정지되는 경우가 많다(transgene silencing). 마지막으로 도입유전자의 발현수준이 원하는 표현형을 나타낼 만큼 충분히 높지 못하다. 이러한 문제점들은 현재 프로모터의 선정, intron sequence의 사용, 형질전환 후 single copy를 갖는 형질전환체의 선발 등의 방법으로 부분적으로 해결하고 있으나 매우 소극적이고 수동적인 방법이기 때문에 이러한 현상들에 대한 원인구명 및 적극적인 해결방안이 성공적인 형질전환체 개발에 필수적이다.

#### 생명공학및 전통육종과의 접목

- 지금까지의 벼 육종을 유전변이를 확대 재조합하는 수단으로 인공교배를 이용하였으며 이들의 후대를 분리시켜 유용형질인 내재해성 및 수량성 등을 향상 시켰다. 재배환경 변화등 대처하기 위한 품종 육성을 위하여는 새로운 유용 유전형질의 개발이 필수적임.
- 수시로 변하는 재배환경등에 대처하기 위한 품종 육성을 위하여는 새로운 유용 유전형질 개발이 필수적임.
- 지금까지 세계적으로 분자육종된 신품종 작물은 가장 보편적인 경우가 제초제 저항성으로서 전체의 약 58%를 차지하며 바이러스 저항성, 해충 저항성, 제품의 질적인 향상, 옹성불임의 응용, 진균병 저항성 그리고 재해 저항성 등의 순서로 이루어졌음.
- 살충성등 주요 농업형질 유전자들은 양적유전을 하고 환경의 영향을 받기 때문



에 선발의 효율이 낮아, 유용한 저항성 유전자들을 집적인 품종의 육성에는 많은 시간과 노력을 요 함. 그러나 재조합저항성 형질전환체를 활용하므로서 목표 형질과 인접한 형질전환체를 활용한 교배집단을 만들고 후대에 효율적인 선발로 저항성 품종 육성기간을 단축시킬 수 있을 것임

기존의 노동집약적이고 장시간의 연구가 요구되는 육종연구와 상호보완적인 새로운 육종기술의 개발이 가능하여 전통적인 육종연구의 시간과 노력의 절감에 따라서 신품종의 개발에 의한 농업생산성의 향상

#### ○ 경제·산업적 측면

현재 전세계 농약시장규모는 약 250억 달러에 이르고 있으며 연평균 성장률은 약 2%로써 매우 저조한 편이다. 이는 환경오염 및 생태계 파괴등을 염려하여 각국에서 규제가 심해지고 있기 때문이다. 이는 최근에 이르러 전 세계적으로 일고 있는 자연 환경 보호측면에서의 국민적 요구에 의한 것이 매우 크게 작용하고 있기 때문이라 여겨 진다. 특히, 그린라운드의 협정에 의하면 앞으로는 잠정적이거나 전체 농약 사용량을 규제 할 것을 규정화 하려고 하고 있는 실정이어서, 이를 대체 할 분야의 개발 및 상품화는 정치적 경제적으로 많은 관심을 끌고 있는 것이 사실이다. 이런 가운데 미생물 살충성 유전자를 이용한 생물 농약 및 형질 전환 농작물의 개발은 경제적 측면에서 매우 흥미 있는 분야로 지목되고 있다. 미국에서는 미생물 살충성 유전자에 의하여 형질 전환된 농작물의 시장 규모를 2000년대에 대략 30억 달러 이상으로 예상하고, 집중적인 연구를 하고 있는 중임 (Entwistle et al.,1993).

Bt 살충성 형질전환작물의 이용현황을 미국의 예를 들어보면 Bt cotton의 경우 1997년 전체 재배면적의 25%로 이미 상용화되어 있으며 1998년에는 45%로 증가되었고 이후 꾸준한 증 가추세를 보이고 있으며 대표적인 품종으로는 bollgard cotton (Monsanto Co., USA)이 있다. Bt corn의 경우는 1998년 전체 재배면적의 25%를 차지하며 해마다 15%정도의 증가세를 보이고 있고 KnockOut과 NatureGard (Novartis Co., USA) 등의 이름으로 상품화되어 재배되고 있다. 한편, 살충성 Bt 형질전환작물의 단점으로 지적되는 해충의 저항성 문제를 해결하기 위한 방안도 다각도로 이루어지고 있는데, 특히 EPA (Environment Protection Agency)를 중심으로 Bt 살충성 형질전환작물의 사용방법에 있어서의 guide-line을 수립, 이를 보편화함으로써 저항성해충의 대발생을 억제하는 방법이 효과를

보고있고, 다른 한편으로 Bt 살충성 유전자의 기능을 증진 또는 보완하기 위해 Bt 내독소 단백질 유전자간의 융합에 의한 고기능 유전자 도입 및 다른 방제 수단과 결합되는 다양한 저항성 지연 연구 등이 활발히 진행되고 있음

Bt 내독소 단백질 유전자 및 기타 곤충병원 미생물의 살충성 유전자를 작물에 형질전환하여 살충력을 부여하는 방법은 국내작물보호를 위한 중요한 수단일 뿐 만 아니라 국내 작물의 국제화를 위해서도 반드시 필요하다. 이를 위해 국내자원으로부터 고기능, 고효율의 신규 살충성 유전자군 확보 및 특허화는 가장 우선적으로 고려되어야 함.

쌀은 우리의 주식 작물일 뿐 만 아니라, 농가 수입의 50%를 생산하는 경제작물로서 벼농사는 농촌경제의 중심 소득원이고 국가 경제에도 지대한 영향을 미침.

재분화 기술 형질전환 System 그리고 gene cloning 기술을 벼에 적용할 수 있는 방안이 확립된다면 현재까지 육종적 방법에 의해 불가능한 작물의 신종 창성이 용이해지며 단시간내에 이루어 지므로 경제적 기대효과가 상당히 높을 것으로 사료됨.

우리나라는 자력 신상품의 개발이 없고 농업자원의 개발, 육종 및 생산화가 현저히 낮다. 따라서 특정 농업상품 개발을 위하여 체계적으로 장기적인 연구계획을 세워야함.

특히 우리나라에서 육성된 벼품종중에서 살충성을 갖는 기능벼를 개발한다면 그 경제적인 파급효과는 크다. 특히 21C에 있어서 예상되는 “종자 전쟁”, “생물산업의 특허분쟁 등에 있어서도 당당하게 우리의 고유한 권리를 주장할 수 있으며, 국민 건강을 크게 개선시키기 때문에 그 영향은 경제적 효과가 큼. 세계 각국은 기능성 작물을 생산하는 품종개발사업이 작물품종개발사업에 중심적 역할을 하고 있으며 특히 자연 생태계 변화에 따른 환경내성에 관련되는 유전자 전환체 작물의 창출이 중심적인 과제로 부상되고 있음.

저비용, 고품질 벼의 안정적 생산 시스템을 갖춘 품종개발을 통해 농민의 소득을 보장하고, 소비자의 기호에 부응하는 무공해 안전벼 공급과 환경보전형 품종 개발을 위하여 환경의 과수꾼으로 벼를 재정립 시키기 위해서는 살충성을 증가시킨 벼의 개발이 필수적임.

선진국형 첨단 농업구조 형성 및 고용기회 확대가 가능하며 신품종 개발로 농가소득이 증대 하며 종묘 수입 대체 효과가 있다.

따라서 본 연구과제는 자연재해에 관련이 있는 것으로 알려진 살충성 유전자를 분리하여 그 구조및 발현 양상을 분자 생물학적 기술을 이용하여 구체적이고 체계적으로 밝히며 궁극적으로, 분리된유용유전자를 작물에 도입시켜 유전자의

발현 양상이 변화된 형질 작물을 개발하며 중간모본 품종을 육성하여 육종에 기초자료를 제공함으로써 대외경쟁력을 향상시키고 농가의 획기적인 소득향상 및 환경친화적인 신품종 작물을 생산함을 목적으로함

○ 사회·문화적 측면

벼, 감자 및 토마토의 재배는 우리나라에서 기후적, 토양적 조건에 의해 잘 자랄 수 있고 이러한 점에서 자연 환경 보호에 적합한 품종이 유충 저항성 감자, 벼품종 및 진딧물 저항성 토마토개발은 유기 합성 농약에 의한 피해를 줄일 수 있는 것으로 국가적으로도 매우 중요한 의미를 지니고 있음.

이는 또한 세계적으로 일반화되어 유발 되고 있는 인구 및 산업체 증가에 따른 자연 환경 파괴와 인간 생명에 관련된 문제이며 자연 환경보호에 대한 사회적 욕구는 소득의 향상과 의식 수준이 높아감에 따라 더욱 강하여 저서, 그동안 사용해 왔던 유기 합성 농약의 사용을 기피하는 것은 당연한 일이라 여겨짐.

그대신 농약 사용을 줄일 수 있는 농약 개발이나, 더 나아가 유전 공학적 방법에 의한 내병 충성 차세대 농작물 개발등이 필수적으로 수행 되어져야 하는 것임.

이는 농약 사용의 당사자이며, 피해자인 농민들에게서도 확실히 볼 수 있는 면인데, 한 예로 미국 Sandoz Agro사에 의해서 위임된 국립 깰립여론 조사팀은 미국의 농민들이 5년전 보다도 더 농촌의 환경문제에 관심을 가지고 있다고 밝혔다. 이는 미국 뿐 만 아니라 우리나라 에서도 같은 현상을 나타내고 있는 부분임.

더욱이나, 농작물등에 남아 있는 유기 합성 농약의 잔여 성분이 인체에 치명적인 해를 주고 있어, 농약 사용 농산물의 구매 기피 현상으로 농민들의 소득이 줄어 들고 있음.

이와 함께 국내 농산물 시장 개방에 따라 농민들은 이중으로 고통을 받고 있어, 시급하게 고소득을 올릴 수 있는 방법을 다각적으로 모색하여야 할 때인 것임

유기합성농약에 의존하지 않고 작물의 생산성을 향상시키려는 연구는 현재 범세계적인 추세 이며, 이는 작물보호 뿐만 아니라, 환경보호 측면에 있어서도 매우 중요한 수단으로 인식되고 있다. 이중 작물에 외래 유전자를 형질전환 하여 작물의 생산성 및 특성을 향상시키는 기술은 주로 체초제 내성유전자, 병해에 대한 내성유전자, 해충저항성 유전자를 이용하고 있다. 이중 곤충병원성

미생물인 *Bacillus thuringiensis* (Bt)의 내독소단백질 (crystal protein;  $\delta$ -endotoxin)은 현재까지 보고된 살충성 단백질 중 가장 강력하고 빠른 살충력을 보이는 반면 인축에는 안전하고 환경에 해가 없어, 이들 유전자의 형질전환에 의해 해충으로부터 작물을 보호하는 기술이 현재까지 가장 보편적이면서, 가장 효율적인 방법으로 인정되고 있다 (Gould, 1998).

- 이러한 상황에서, 해충에 저항성을 지니는 벼, 감자 및 토마토의 개발은 우리나라의 환경 보호에 대한 특수한 여건에 비추어 볼 때 매우 중요한 의미를 지니고 있는 것임
- 이러한 곳에서 유기합성 농약 사용에 의해 야기될 수 있는 여러가지 환경 문제들에 대한 사회적 불안, 즉 지하수 오염, 농약 오염된 농작물 생산, 건강에 대한 불안등 여러가지 문제등과 이에 따른 농민들의 소득의 증대에 가장 큰 몫을 담당하여온 관광 산업의 불안등임

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 연구사례

#### 1. 외국의 경우

현재까지 알려져 있는 Bt 내독소단백질 유전자의 수는 전체 유전자 (full gene)를 기준으로 86개에 이르며 그 외 독성을 가지는 N-terminal 부분 혹은 일부만 알려진 것도 124개 이상 보고되어 있다 (Crickmore *et al.*, 1998). 이러한 Bt 내독소단백질을 이용하여 Bt 형질전환작물을 만드는 것은 IPM (종합적 해충방제)의 한 방제수단으로 이용되고 있으며 현재까지 외국에서 개발된 Bt 형질전환작물로는 나비목 해충을 방제하기 위해 나비목에 강독성을 보이는 *cry1* type에 속하는 유전자를 형질전환함으로써 Bt cotton (Perlak *et al.*, 1990), Bt rice (Fujimoto *et al.*, 1993), Bt corn (Koziel *et al.*, 1993), Bt tobacco (Strizhov *et al.*, 1997), Bt tomato (Perlak *et al.*, 1991), Bt cabbage, Bt soybean, Bt alfalfa 등 다양한 작물에서 이루어지고 있다. 또한 딱정벌레목 해충의 방제를 위해 *cry3* type의 유전자를 형질전환한 Bt potato (Adang *et al.*, 1993)가 있으며 목본류인 *Populus* spp. 들의 해충인 매미나방 (*Lymantria dispar*)을 방제하기 위하여 Bt trees가 개발되는 등 그 이용범위가 점차 확산되고 있다. Bt 살충성 형질전환작물의 이용현황을 미국의 예를 들어보면 Bt cotton의 경우 1997년 전체 재배면적의 25%로 이미 상용화되어 있으며 1998년에는 45%로 증가되었고 이후 꾸준한 증가추세를 보이고 있으며 대표적인 품종으로는 bollgard cotton (Monsanto Co., USA) 이 있다. Bt corn의 경우는 1998년 전체 재배면적의 25%를 차지하며 해마다 15%정도의 증가세를 보이고 있고 KnockOut 과 NatureGard (Norvatis Co., USA) 등의 이

름으로 상품화되어 재배되고 있다. 곤충바이러스는 높은 숙주 특이성과 지속성 때문에 Bt와 더불어 상업적으로 사용되고 있는 미생물살충제중의 하나이다 (Bonning and Hammock, 1996). 곤충 바이러스로부터 살충성에 관련된 유전자를 분리하여 작물에 형질전환한 예로는 Hukuhara 등 (1999)이 핵다각체병 바이러스 (Nucleopolyhedrovirus, NPV)의 살충력을 증가시키기 위해 멸강나방 (*Pseudaletia separata*)의 entomopoxvirus로부터 분리한 virus enhancing factor (EF)를 벼에 형질전환하여 발현시킴으로써 곤충바이러스에 대한 감수성을 증가시키는 연구를 수행하였다. 그 결과 멸강나방 유충이 형질전환된 벼를 섭식하였을 경우에 NPV에 대한 감수성을 증가되었으며, 이는 작물에 적용하는 바이러스 양을 잠재적으로 감소시켜 상대적으로 높은 바이러스 생산비를 절감하는 효과를 나타냈다. 최근에는 또 다른 baculovirus의 병원성-관련 단백질인 enhancin을 담배에 형질전환하여 양배추은무늬밤나방 (*Trichoplusia ni*) granulovirus의 enhancin 유전자를 가진 재조합 담배를 제작하였으며 이를 통하여 AcNPV의 감염력이 증가되는 것을 확인하였다 (Hayakawa *et al.*, 2000). 매미나방 핵다각체병바이러스 (LdNPV)는 기존에 보고된 핵다각체병 바이러스의 계놈에서 보고되지 않은 enhancin 유전자를 갖는 것으로 알려져 있으며 (Bischoff and Slavicek, 1997), 이 유전자 단백질 역시 NPV의 병원성을 증가시킬 수 있을 것으로 기대되고 있다.

## 2. 국내의 경우

### 가. Bt

본 곤충병리학 연구실에서는 무공해 미생물 살충제의 개발연구를 통하여 토양, 저곡창고, 산림자원등 국내 자연환경으로부터 유효한 Bt 균주를 600여종 분리 확보하고 있고, 이중 약 300여종에 대해서는 독성범위 및 독성정도, 내독소단백질의 성상 등에 대한 Database를 구축하고 있으며 이는 지속적으로 축적되고 있다 (Kim *et al.*, 1998a; Kim *et al.*, 1998b). 특히, Bt 균주의 내독소 단백질 유전자형 분석을 위한 특이 Primer set와 신규 유전자 탐색을 위한 Degenerate primer set를 제작하여 새로운 Bt 균주 및 유전자 탐색을 위한 기반을 구축하고 있다. 그중 살충효과가 뛰어나고 특성이 기존의 균주와는 다른 새로운 특성의 Bt 균주를 다수 분리하였는데 대표적인 Bt 균주로는 Bt NT0423 균주 (대한민국 특허 제 0280380호)가 있으며 이 균주는 나비목과 파리목에 이중독성을 갖는 효과적인 균주로 현재 산업체((주) 동부한농화학)에 기술이전하여 미생물농약 등록이 진행 중에 있다. 또한 이 균주로부터 새로운 나비목 독성 내독소단백질 유전자인 *cryIAf1*의 염기서열을 분석하여 등록하였다 (Genbank Accession No. U82003). 이외에도 국내의 주요 문제해충인 파밤나방에 강한 살충력을 보이는 Bt STB series를 분리하여 그 특성을 보고하였으며 (Chang *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999), Bt의 독성기작을 알아보기 위한 연구로 무독성 Bt 균주에 대한 연구도 수행하였다 (Roh *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1998). 현재는 파밤나방 및 담배거세미나방에 살충효과가 뛰어난 균주인 Bt K-1 균주 (대한민국 특허출원 번호 제 2001-37445호)로부터 새로운 *cry1* type의 내독소단백질을 분리하여 특성검정 중에 있다.

#### 나. NPV 및 기타 곤충병원성 미생물

곤충병원 미생물중 Bt 이외에 미생물살충제로 개발되어 사용되고 있는 핵다각체병바이러스 및 곤충병원성 곰팡이에 대한 분리 및 특성규명에 관한 연구도 수행하였다. 바이러스의 분리 연구로 다수의 국내산 핵다각체병 바이러스 (NPV)를 확보하였으며, 이 중 누에NPV (*Bombyx mori* NPV), 과밤나방NPV (*Spodoptera exigua* NPV), 담배거세미나방NPV (*Spodoptera litura* NPV), 흰불나방NPV (*Hyphantira cunea* NPV), 매미나방NPV (*L. dispar* NPV) 등의 NPV를 수종 분리하여 그 병원성에 관하여 연구를 수행하였으며 병원성을 높이는 유전자로서 현재는 매미나방NPV의 enhancin 유전자에 대하여 클로닝 및 특성분석을 시도하고 있다. 이외에 바이러스의 병원성에 대한 분자생물학적 연구를 통하여 미생물 살충제 응용을 위한 기술연구를 수행하고 있다. 곤충병원성 곰팡이는 *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces fumosoroceus*, *Metharizium anisopliae* 등 대표적인 곤충병원성 곰팡이 종류를 국내자원으로부터 40여 종 분리하여 보유하고 있으며, 이 중 *P. fumosoroceus*와 *M. anisopliae*로부터 병원성에 중요한 요소로 작용하는 protease 유전자인 PR-1 유전자를 분리하여 그 특성을 규명하고 있다. 그밖에도 방선균인 *Streptomyces*로부터 살충성 효소인 cholesterol oxidase 유전자의 분리도 기초연구로 수행하고 있다.

#### 다. *Bacillus* 균으로부터 흡즙곤충방제를 위한 유전자분리연구

Bt 독소 단백질은 곤충 소화관의 receptor를 인지 결합하는 C'-부분과 세포막에 구멍(pore)을 형성하는 N'-부분으로 이루어지는데, receptor를 인지 결합하는 부분이 독소의 적용범위 (host range) 결정에 중요한 역할을 한다. 따라서 우리는 매개충(흡즙해충)의 소화관을 receptor mediated endocytosis 방법으로 통과하여 침입으로 이동하는 식물바이러스의 외피단백질 ligand 부위로 Bt의 receptor 인지 결합 부분을 교체하여 흡즙해충으로 그 기주범위가 확장된 새로운 융합 살충단백질 유전자를 만들고, 이 유전자를 형질전환 벼식물체의 유관속(흡즙부위)에서 발현시켜 이를 흡즙한 해충이 죽게 만드는 것이다.

#### 라. *Bacillus thuringiensis*(Bt) 독소 유전자 변형 및 해충 저항성 작물 개발

본 연구팀은 우리나라의 Bt 연구 초기부터 Bt 균주 분리, 살충성 독소 정제·분석·동정, 독소 플라스미드·유전자 분리 및 형질전환 등을 통하여 Bt와 그 살충성 독소에 관한 경험과 지식을 축적해왔다. 최근 1999년에는 약 1년 반의 농촌진흥청 및 학술진흥재단 과제를 통하여 Bt 세균의 cryIAc1 유전자를 배추 유전자처럼 DNA 배열을 변형하여 새로 만들고 배추에 형질전환하여 배추의 심각한 해충인 배추좀나방 (diamondback moth)에 완벽하게 저항성인 배추를 개발하였다. 생물검정시 수시간 내에 섭식을 중단하였고 2일 이내에 100% 살충력을 보였다. 유전자 변형은 배추 유전자들에서 자주 사용되는 codon 자료를 토대로 cryIAc1 유전자의 아미노산 배열에는

변화없이 DNA 배열을 변환하였다(neutral modification).이 때 진핵세포의 유전자 발현에 관여하는 요소들, 예를들어 TATA box, CAAT box, intron consensus sequence, poly(A) signal 등을 배제하였다. 그리고 합성 후 연결을 위하여 적당한 간격으로 제한효소 자리를 인위적으로 배치하였다. 이렇게 디자인된 cryIAc1 유전자 1854bp를 50여개의 oligomer로 나누어 인접 sequence 끼리 중복되도록 합성하고 PCR하여 클로닝하고 염기서열을 확인하여 올바른 클론을 선발하였다. 전체 1854bp를 커버하는 7개의 클론(PCR산물)을 계획된 제한효소 자리를 이용하여 연결하여 유전자를 완성하였다. 이 유전자를 우선은 곤충 Baculovirus system에서 발현시켜 생물검정은 통하여 유전자 성능을 확인한 후 배추에 형질전환하여 해충저항성 배추를 완성하였다. 이 결과는 현재 특허 출원 중이다(특허출원번호00-46327).

#### 1) 프로모터 연구

본 연구팀은 약의 용단조직, 화분 및 유관속 특이 프로모터를 분리하고 그들의 조직 특이 적 발현 분석 연구를 해왔다. 현재 용단조직 프로모터 1종, 화분 특이 프로모터 3종 및 유관속 조직특이 프로모터 1종을 특허출원 중이다(특허출원번호 01-12040). 특히 유관속 특이 프로모터는 본 계획에 직접 응용 가능한 프로모터이다.

#### 2) 식물 바이러스 연구

식물 바이러스 연구는 바이러스의 외피단백질을 이용한 바이러스 저항성 작물 개발을 목표로 수행하여 cucumber mosaic virus에 저항성인 담배 및 토마토를 성공적으로 개발한 바 있으며 현재도 일부 진행 중이다. 현재까지 본 연구팀이 확보하고 있는 바이러스의 외피단백질 유전자는 cucumber mosaic virus(CMV), turnip mosaic virus(TuMV), ribgrass mosaic virus(RMV), lily symptomless virus(LSV), pepper mild mottle virus(PMMV)들로부터 분리되었다.

#### 마. 작물 유전자 전환체연구

농림특정 기술개발사업으로 필수아미노산이 강화된벼 및 내병성유전자를 강화한벼개발을 통해 다수의 벼 형질전환체를 개발하였다. 지난 16년간 농진청에 연구사업인 유전공학 기법을 이용한 작물 형질전환체 개발사업의 일환으로 제초제저항성, 내병성, 내건성, 내충성, 영양분이 강화된 형질전환 작물 개발사업을 주도하였으며 다수의 형질전환체작물을 개발하여 산업체 및 육종기관에 중간모본체를 제공하였음

#### 바. 살충성 유전자 및 벼 생물검정

일반적으로 알려진 농업해충에 대해서 지난 20년간, 각 해충들의 분류사업과 곤충생리 사육기술을 축적하였으며, 특히 *B.t.kurstaki*(B.t.k)를 중심으로한 균주가 생산하는 toxin으로써 Lepidoptera (나방목)에 살충성을 나타내는 CryI과 Lepidoptera와 Diptera에 살충성을 나타내는 CryII, *B.t. subsp.tenebrionis* (B.t.t.)균주가 생산하는 toxin으로써 Coleoptera(딱정 벌레목)에 살충성을 나타 내는 CryIII, 그리고, *B.t.subsp.isralensis*(B.t.i.) 균주가 생성하며 Diptera(파리목)에 살충성을 나타 내는 CryIV, 그리고, B.t.i. 균주가 생성하며, 선택적 특이성이 없는 toxin인 Cryt A등으로 해충의 생물학적 방제 사업업무를 수행하여 왔음.

### 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

#### 제1절) 제1세부과제: *Bacillus* 살충성 유전자를 이용한 해충저항성 작물 개발 연구(주관연구기관)

본 실험은 우리 나라에서는 물론 중국, 일본 등 동북아시아에서 널리 재배되는 벼의 중요해충 피해로부터 보호하기 위하여 살충력을 보이는 *Bacillus thuringiensis* (이하 “Bt” 로 약함)의 내독소 단백질 유전자 *cryIAC*를 벼에서 잘 발현되도록 유전자를 변형 합성하였다.

Bt 본래의 내독소 단백질 유전자 *cryIAC* (이하 “wt-*cryIAC*” 로 약함)는 3,537 bp로 아미노산 1,178 개를 코드하고 있다. 이 wt-*cryIAC* 유전자 중 앞부분 1,854 bp가 곤충 독성에 직접 관련있다. 따라서 이 부분을 수정 합성함으로써 아미노산 배열은 변화시키지 않고 DNA 염기배열만 변형된 합성 곤충 독소 유전자를 만들었다.

우선 wt-*cryIAC* 유전자의 코돈을 바꾸되 아미노산 배열은 wt-*cryIAC* 유전자와 같도록 하였다. 이 때 진핵세포에서 유전자의 발현 조절에 관여하는 DNA 염기서열과 유사한 부분, 예를 들어 TATA box나 CAAT box와 polyadenylation signal (AATAAA를 위시한 연속된 6개 이상의 AT 염기배열), 및 인트론(intron)이 될 가능성이 있는 부분 (AGGT, 인트론의 3' 가능 부분)을 코돈을 바꾸며 제거하였다. 한편 mRNA 안정성과 관련이 있을 것으로 보고된 ATTTA 염기배열을 전부 제거하였다. *cryIAC* 유전자의 DNA 염기 구성은 wt의 adenine 577 개, thymine 585 개, guanine 377 개, cytosine 315 개에서 합성 수정된 유전자의 경우 adenine 479 개, thymine 481 개, guanine 397 개, cytosine 497 개로 변환되었으며, 전체 G+C 함량은 37 %에서 48 %로 증가시켰다. 결과적으로 전체 1,854 bp 중 21.2 %에 해당하는 393 개 염기가 변환되었으며, 전체 코돈 618 개 중 56.5 %에 해당하는 349 개 코돈이 변환되었다.

*cryIAC* 유전자의 수정 합성은 recursive PCR 방법을 사용하였는데, *cryIAC* 수정 계획에 따라 합성된 프라이머(primer) 50-mer 47 개, 49-mer 3 개, 48-mer 2 개, 47-mer 1 개, 44-mer 1 개, 39-mer 1 개, 32-mer 1 개를 이용하였다. 프라이머는 순서대로 14-18 염기씩 중첩되도록 하였는데 중첩부분의



annealing 온도가 45 °C 이상되도록 하였다. PCR은 목적하는 DNA 단편의 양쪽 끝 프라이머는 20 pmol, 중간 프라이머는 0.2 pmol 농도가 되도록 첨가하고, 95 °C 2분, 45-55 °C 2분, 72 °C 1분으로 30 회 하였다. 이 때 polymerase는 proofreading하며 blunt-end를 만드는 PWO polymerase (Boehringer Mannheim) 또는 Pyrobest(TAKARA)를 사용하였다. 예상되는 크기의 PCR 단편을 분리하여 pBluescript SK(+)에 클로닝한 후 DNA 염기배열을 확인하여 *cryIAC* 유전자 수정 계획과 일치하는 클론을 선발하였다. 선발된 PCR 단편은 총 7 개였는데 미리 준비되었던 제한효소 자리를 이용하여 각 단편들을 연결하여 1,854 bp의 수정 합성된 *cryIAC*를 완성하였다. 수정 합성된 *cryIAC*를 baculovirus (BmNPV) 발현 벡터와 누에 세포를 이용하여 발현시킨 후 배추좀나방 등에 살충력 검정을 하여 발현 단백질 *cryIAC*의 살충성을 검정하였다. 수정 합성된 *cryIAC* 유전자를 *rbcS* 프로모터와 transit peptide 염기서열에 연결하여 식물 발현 벡터를 제작하고 벼에 형질 전환하였다.

### 실험 방법 1

특별히 언급되지 않은 DNA 실험들은 Sambrook 등의 “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition, 1989” 을 참조하였다.

**Ligations:** PCR 결과물 또는 제한효소 처리된 단편들을 0.8 % 아가로스 겔에 TAE 버퍼에서 전기영동한 후 목적하는 DNA 단편을 포함하는 아가로스 겔을 잘라내어 QIAEX gel extraction kit를 이용하여 공급자가 제공하는 방법에 의하여 DNA 단편을 정제하였다. 정제된 DNA 단편은 다시 아가로스 겔에서 전기영동하여 농도를 확인한 후 목적하는 단편과 벡터를 1:1로 혼합하고 T4 DNA ligase를 사용하여 15 °C에서 밤새 ligation시킨 후, *E. coli*에 형질전환하고 앰피실린 (100 ug/ml) 등 적당한 항생제 배지를 이용하여 클론을 선발하였다.

***E. coli* Transformations:** *E. coli*는 DH5 *a*를 사용하였다. Sambrook 등에 따라 CaCl<sub>2</sub> 방법으로 만든 competent cell 200 ul에 밤새 ligation한 DNA 시료를 혼합한 후 얼음에 30 분, 42 °C 90 초, 얼음 10 분 처리하고 액체 LB 배지 800ul를 첨가하여 150 rpm으로 흔들어주며 1시간 배양하고, 앰피실린 (100 ug/ml) 등 적당한 항생제 배지 (LB 배지)에 도말하고 37 °C에서 밤새 배양하였다. 필요에 따라서는 0.008% X-gal과 80 mM IPTG를 사용하여 벡터의 beta-galactosidase 유전자 발현여부를 보고 목적 DNA 단편의 삽입여부를 확인하였다.

**플라스미드 분리 및 삽입 단편 확인:** 선택된 형질전환 *E. coli*를 앰피실린 등 적당한 항생제를 포함하는 액체 배지 5 ml에 접종하고 37 °C, 250 rpm에서 밤새 배

양한 후, Sambrook 등에 따라 알칼리 방법으로 플라스미드를 분리하였다. 분리된 플라스미드는 적당한 제한효소 처리 후 전기영동하여 확인하였다. 또는 QIAGEN miniprep kit를 이용하여 플라스미드를 분리한 후 DNA 염기서열을 확인하였다.

### 실험 2. 유전자의 염기서열 수정

wt-*cryIac* 유전자의 염기배열을 수정했는데, 위에서 언급된 진핵세포 유전자들의 발현 조절 요소로서 가능한 염기서열은 모두 제거하면서 G+C 함량도 48 %로 높였다. 이 때 아미노산 서열은 변화시키지 않고 wt-*cryIac*와 동일하게 하였다. 또한 PCR한 후 각 DNA 단편을 연결하기 위하여 필요한 제한효소 자리를 만들고 불필요한 제한효소 자리는 제거하였다(그림 2).

표 1. Bt 본래 유전자(wt)와 변형 유전자(mod)의 codon 사용 빈도 비교

CODON	wt	mod	CODON	wt	mod	CODON	wt	mod	CODON	wt	mod
TTT-Phe	30	6	TCT-Ser	11	17	TAT-Tyr	24	5	TGT-Cys	1	0
TTC-Phe	6	30	TCC-Ser	7	18	TAC-Tyr	4	23	TGC-Cys	1	2
TTA-Leu	22	0	TCA-Ser	12	3	TAA-***	0	1	TGA-***	0	0
TTG-Leu	5	19	TCG-Ser	7	0	TAG-***	0	0	TGG-Trp	10	10
CTT-Leu	10	17	CCT-Pro	10	10	CAT-His	7	0	CGT-Arg	7	11
CTC-Leu	2	9	CCC-Pro	2	3	CAC-His	2	9	CGC-Arg	1	2
CTA-Leu	8	2	CCA-Pro	15	19	CAA-Gln	22	15	CGA-Arg	4	1
CTG-Leu	3	3	CCG-Pro	6	1	CAG-Gln	5	12	CGG-Arg	1	0
ATT-Ile	23	11	ACT-Thr	12	15	AAT-Asn	35	11	AGT-Ser	21	4
ATC-Ile	6	35	ACC-Thr	6	15	AAC-Asn	14	38	AGC-Ser	3	19
ATA-Ile	18	1	ACA-Thr	13	6	AAA-Lys	1	0	AGA-Arg	23	20
ATG-Met	8	8	ACG-Thr	5	0	AAG-Lys	1	2	AGG-Arg	7	9
GTT-Val	18	21	GCT-Ala	20	15	GAT-Asp	20	11	GGT-Gly	13	13
GTC-Val	0	3	GCC-Ala	4	13	GAC-Asp	5	14	GGC-Gly	5	6
GTA-Val	18	1	GCA-Ala	11	8	GAA-Glu	26	15	GGA-Gly	19	24
GTG-Val	6	17	GCG-Ala	1	0	GAG-Glu	3	14	GGG-Gly	8	2

표2. wt-*cryIAc*와 수정 합성된 *cryIAc*의 주요 차이점

	Wild-type gene	Modified gene
Bases different from wild-type	-	393/1854(21.2%)
Codons different from wild-type	-	349/618(56.5%)
Base composition	577 A; 315 C; 377 G; 585 T	479 A; 497 C; 397 G; 481 T
G + C content	37.32 %	48.22 %
Potential poly(A) sites	11	0
A + T rich regions, >6 consecutive A and/or T	36	0
ATTTA sequences	9	0
CCAAT	6	1
TATA	19	0
AGGT(intron 3' end)	6	0

### 실험 3. 유전자 합성을 위한 프라이머(primer) 제작

프라이머는 (주)BMS(서울 서초구 서초동 1717-55)에 제작을 주문하여 사용하였다. 프라이머는 모두 3 세트로 56개를 합성하였는데, 50-mer 47 개, 49-mer 3 개, 48-mer 2 개, 47-mer 1 개, 44-mer 1 개, 39-mer 1 개, 32-mer 1 개였다. 각 프라이머는 순서대로 인접한 프라이머와 5' 및 3' 각각 14 - 18 염기씩 중첩되도록 하되 중첩부분의 annealing 온도가 45 °C 이상되도록 하였다.

**프라이머 세트 1번.** *cryIAc* 유전자의 1,344 염기부터 1,854 염기까지의 PCR을 위한 프라이머. 프라이머 1-16은 1,854 염기에 번역종료 코돈 TAA 및 제한효소 KpnI (GGTACC)을 포함하고 있다(그림 1).

- Primer 1-01 (50-mer) :  
5'-CAGAGCTCCTATGTTCTCTTGGATTACCGTTCTGCCGAGTTCAACAACA-3'
- Primer 1-02 (50-mer) :  
5'-CAGGGATTTGAGTAATACTATCAGATGCGATGATGTTGTTGAACTCGGCA-3'
- Primer 1-03 (50-mer) :  
5'-AGTATTACTCAAATCCCTGCCGTGAAGGAAACTTCCTTTTCAATGGAAG-3'
- Primer 1-04 (48-mer) :  
5'-CCGCCAGTGAATCCTGGTCCGCTGATAACGCTTCCATTGAAAAGGAAG-3'
- Primer 1-05 (50-mer) :  
5'-CAGGATTCCTGGCGGAGATCTTGTGAGACTTAACAGCTCTGGCAACAAC-3'
- Primer 1-06 (49-mer) :  
5'-ATAGGAACTTCGATGTAGCCTCTATTCTGAATGTTGTTGCCAGAGCTGT-3'
- Primer 1-07 (50-mer) :  
5'-CTACATCGAAGTTCCTATCCACTTCCCATCCACATCTACTAGATACAGAG-3'
- Primer 1-08 (50-mer) :  
5'-GATTGGGGTCACAGAGGCGTATCTAACCCTAACTCTGTATCTAGTAGATG-3'
- Primer 1-09 (47-mer) :  
5'-CTCTGTGACCCCAATCCACCTTAACGTGAACTGGGGCAATTCATCTA-3'
- Primer 1-10 (49-mer) :

5'-GGTAGCAGTAGCTGGAACGGTGTGGAGAAGATAGATGAATTGCCCCAG-3'  
 Primer 1-11 (48-mer) :

5'-TCCAGCTACTGCTACCTCACTTGATAATCTTCAATCCAGCGATTTTGG-3'  
 Primer 1-12 (50-mer) :

5'-GAAGAAGTGAATGCGTTGGCACTTTCGAAGTAACCAAAATCGCTGGATTG-3'  
 Primer 1-13 (50-mer) :

5'-CAACGCATTCACTTCTTCATTGGGCAACATCGTGGGTGTTAGGAATTTCA-3'  
 Primer 1-14 (50-mer) :

5'-GAATCTGTCAATGATCACTCCTGCAGTACCGCTGAAATTCCTAACACCCA-3'  
 Primer 1-15 (49-mer) :

5'-GTGATCATTGACAGATTTCGAGTTCATTCTGTTACTGCCACTCTTGAGG-3'  
 Primer 1-16 (39-mer) :

5'-GGTACCTTAAAGATTGTACTCAGCCTCAAGAGTGGCAGT-3'

프라이머 세트 2번. *cryIac* 유전자의 864 염기부터 1,351 염기까지의 PCR을 위한 프라이머(그림 2).

Primer 2-1 (50-mer) :

5'-AAGATCCATCAGGAGCCCACACTTGATGGACATCTTGAACAGCATAACTA-3'  
 Primer 2-2 (50-mer) :

5'-GTAATAGTATCCTCTGTGAGCATCGGTGTAGATAGTTATGCTGTTCAAGA-3'  
 Primer 2-3 (50-mer) :

5'-CACAGAGGATACTATTACTGGTCTGGACACCAGATCATGGCCTCTCCAGT-3'  
 Primer 2-4 (50-mer) :

5'-AGAGAGGAAAGGTAAACTCAGGTCCGGAGAATCCAACCTGGAGAGGCCATG-3'  
 Primer 2-5 (50-mer) :

5'-GTTTACCTTTCCTCTCTATGGAACATATGGGAAACGCCGCTCCACAACAAC-3'  
 Primer 2-6 (50-mer) :

5'-TCTGTAGACACCCTGTCCTAGTTGAGCAACGATACGTTGTTGTGGAGCGG-3'  
 Primer 2-7 (50-mer) :

5'-ACAGGGTGTCTACAGAACCTTGTCTTCCACCTTGTACAGAAGACCCTTCA-3'  
 Primer 2-8 (50-mer) :

5'-GAACGGAAAGTTGCTGGTTGTTGATACCGATATTGAAGGGTCTTCTGTAC-3'  
 Primer 2-9 (50-mer) :

5'-CAGCAACTTTCGGTTCCTGACGGAACAGAGTTCGCCTATGGAACCTCTTC-3'  
 Primer 2-10 (50-mer) :

5'-TCCGCTCTTTCTGTAAACAGCGGATGGCAAGTTAGAAGAGGTTCCATAGG-3'  
 Primer 2-11 (50-mer) :

5'-TTTACAGAAAGAGCGGAACCGTTGATTCCTTGGACGAAATCCCACCACAG-3'  
 Primer 2-12 (50-mer) :

5'-GGGAGAATCCTTGCCTGGGTGGCACATTGTTGTTCTGTGGTGGGATTTTCG-3'  
 Primer 2-13 (50-mer) :

5'-GGCAAGGATTCTCCACAGGCTTAGCCACGTGTCCATGTTCCGTTCCGGA-3'  
 Primer 2-14 (50-mer) :

5'-GAGCTCTGATGATGCTCACGGAACCTGTTGCTGAATCCGGAACGGAACATG-3'

프라이머 세트 3번. *cryIac* 시작 코돈 앞에 CC를 첨부하고 900 염기까지의 PCR을 위한 프라이머(그림 3).

Primer 3-1 (50-mer) :

5'-CCATGGACAACAACCAACATCAACGAATGCATTCCATACAACCTGCTTG-3'

Primer 3-2 (50-mer) :  
5'-CGTTCTCCACCAAGTACTTCAACTTCTGGGTTACTCAAGCAGTTGTATGG-  
3'

Primer 3-3 (50-mer) :  
5'-CTTGGTGGAGAACGCATTGAAACCGGTTACACTCCCATCGACATCTCCTT-  
3'

Primer 3-4 (50-mer) :  
5'-GCACGAACTCGCTGAGCAGAACTGTGTCAAGGACAAGGAGATGTCGATG-  
3'

Primer 3-5 (50-mer) :  
5'-CAGCGAGTTCGTGCCAGGAGCTGGGTTTCGTTCTCGGACTAGTTGACATCA-  
3'

Primer 3-6 (50-mer) :  
5'-GCATCCCATTGAGATGGACCAAAGATACCCAGATGATGTCAACTAGTCC-  
3'

Primer 3-7 (50-mer) :  
5'-ATCTCAATGGGATGCATTCCTGGTGCAAATTGAGCAGTTGATCAACCAGA-  
3'

Primer 3-8 (50-mer) :  
5'-GAGATGGCCTGGTTCCTGGCGAACTCTTCGATCCTCTGGTTGATCAACTG-  
3'

Primer 3-9 (50-mer) :  
5'-AACCAGGCCATCTCTCGTTTGAAGGATTGAGCAATCTCTACCAAATCTA-  
3'

Primer 3-10 (50-mer) :  
5'-GGATCGGCTTCCCCTCTCTGAAGCTCTCTGCATAGATTTGGTAGAGATT-  
3'

Primer 3-11 (50-mer) :  
5'-GGGAAGCCGATCCTACTAACCCAGCTCTCCGCGAGGAAATGCGTATTCAA-  
3'

Primer 3-12 (50-mer) :  
5'-TAGCTGTGGTCAAGGCGCTGTTTCATGTCGTTGAATTGAATACGCATTTCC-  
3'

Primer 3-13 (50-mer) :  
5'-CCTTGACCACAGCTATCCCATTGTTTCGCAGTCCAGAACTACCAAGTTCCT-  
3'

Primer 3-14 (50-mer) :  
5'-GAAGATTAGCTGCTTGAACGTACACGGACAAGAGAGGAACTTGGTAGTTC  
-3'

Primer 3-15 (50-mer) :  
5'-CAAGCAGCTAATCTTCACCTCAGCGTGCTTCGAGACGTTAGCGTGTTTGG-  
3'

Primer 3-16 (50-mer) :  
5'-TATTGATGGTTGCAGCATCGAATCCCCATCTTTGCCCAAACACGCTAACG-  
3'

Primer 3-17 (50-mer) :  
5'-GCTGCAACCATCAATAGCCGTTACAACGACCTTACTAGGCTGATTGGAAA-  
3'

Primer 3-18 (50-mer) :  
5'-AGTGTTGTACCAACGAACAGCGTAGTCGGTGTAGTTTCCAATCAGCCTAG-  
3'

Primer 3-19 (50-mer) :  
5'-CGTTGGTACAACACTGGCTTGGAGCGTGTCTGGGGTCCTGATTCTAGAGA-3'

Primer 3-20 (50-mer) :  
5'-CAATTCTCTCCTGAACTGGTTGTATCTCATCCAATCTCTAGAATCAGGAC-3'

Primer 3-21 (50-mer) :  
5'-GTTTCAGGAGAGAATTGACCCTCACAGTTTTGGACATTGTGGCTCTCTTCC-3'

Primer 3-22 (50-mer) :  
5'-CTGTACGGATAGGGTAACGTCTGGAGTCATAGTTCGGGAAGAGAGCCACA-3'

Primer 3-23 (50-mer) :  
5'-CCCTATCCGTACAGTGTCCCAACTTACCAGAGAAATCTACACTAACCCAG-3'

Primer 3-24 (50-mer) :  
5'-AGAACCACGGAAGCTACCGTCAAGTTCTCAAGAACTGGGTAGTGTAGA-3'

Primer 3-25 (44-mer) :  
5'-GCTTCCGTGGTTCTGCCAGGGTATCGAAAGATCCATCAGGAGC-3'

Primer 3-26 (32-mer) :  
5'-GTTCTACAGGTAGTTCACACCCGAGGACTACCTAGAA-3'

#### 실험 4. Recursive PCR, PCR한 DNA 단편의 염기서열 확인 및 연결

Recursive PCR은 Prodromou와 Pearl의 방법(Protein engineering, 1992, 827-829)을 응용하였다. PCR은 목적하는 DNA 단편의 양쪽 끝 프라이머는 20 pmol, 중간 프라이머는 0.2 pmol 농도가 되도록 첨가하고, 95 °C 2분, 45-55 °C 2분, 72 °C 1분으로 30 회 하였다. 이 때 polymerase는 proofreading하며 blunt-end를 만드는 PWO polymerase (Boehringer Mannheim) 또는 Pyrobest(TAKARA)를 사용하였다. 예상되는 크기의 PCR 단편을 분리하여 pBluescript SK(+)의 EcoRV 또는 SmaI 자리에 삽입하여 *E. coli*에 형질전환하고 단편이 삽입된 백색 콜로니를 선발하였다. 선발된 백색 콜로니 10개를 QIAGEN miniprep kit를 이용하여 플라스미드를 분리하고 DNA Sequencing kit (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction)를 사용하여 양방향에서 염기서열을 분석하여 계획된 염기서열과 일치하는 클론을 선택하였다. 수정된 *cryIac* 전체에 해당하는 1,865 bp를 포함하게 되었을 때 PCR 단편 클론은 7개였다. 각 PCR 단편의 제작을 상술하면 다음과 같다(그림 6 참조).

- 1) p1-3 : primer 3-1부터 primer 3-12까지 12개 primer의 PCR 단편 약 420 bp. 수정 *cryIac* 유전자의 처음부터 CfoI(그림 2의 419 염기)까지를 포함하였다. pBluescript SK(+)의 EcoRV 자리에 클로닝하였다. p2-4의 CfoI 자리와 연결하였다.
- 2) p2-4 : primer 3-11부터 primer 3-22까지 12개 primer의 PCR 단편 약 450 bp. 수정 *cryIac* 유전자의 AccI(381 염기)부터 XbaI(668 염기)까지를 포함한다. pBluescript SK(+)의 EcoRV 자리에 클로닝하였다. p1-3의 CfoI 자리 및

p5-4의 DraII 자리와 연결하였다.

3) p5-4 : primer 3-19부터 primer 3-24까지 6개 primer의 PCR 단편 약 190 bp. 수정 *cryIAC* 유전자의 DraII(659 염기)부터 DsaI(841 염기)까지를 포함한다. pBluescript SK(+)의 EcoRV 자리에 클로닝하였다. p2-4의 DraII 자리 및 p7-3의 DsaI 자리와 연결하였다.

4) p7-3 : primer 3-25, 3-26, 2-1, 2-1까지 4개 primer의 PCR 단편 약 170 bp. 수정 *cryIAC* 유전자의 DsaI(841 염기)부터 MroI(968 염기)까지를 포함한다. pBluescript SK(+)의 EcoRV 자리에 클로닝하였다. p5-4의 DsaI 자리 및 pBS10의 MroI 자리와 연결하였다.

5) pBS10 : primer 2-1부터 primer 2-8까지 8개 primer의 PCR 단편 약 240 bp. 수정 *cryIAC* 유전자의 MroI(968 염기)부터 AccI(1074 염기)까지를 포함한다. pBluescript SK(+)의 SmaI 자리에 클로닝하였다. p7-3의 MroI 자리 및 pP6의 AccI 자리와 연결하였다.

6) pP6 : primer 2-7부터 primer 2-14까지 8개 primer의 PCR 단편 약 380 bp. 수정 *cryIAC* 유전자의 AccI(1074 염기)부터 SacI(1351 염기)까지를 포함한다. pBluescript SK(+)의 SmaI 자리에 클로닝하였다. p1-3의 CfoI 자리 및 p5-4의 DraII 자리와 연결하였다.

7) p17 : primer 1-1부터 primer 1-16까지 16개 primer의 PCR 단편 약 520 bp. 수정 *cryIAC* 유전자의 SacI(1351 염기)부터 1854 염기와 번역 종료 코돈 다음에 첨부된 KpnI(1865 염기)까지를 포함한다. pBluescript SK(+)의 EcoRV 자리에 클로닝하였다. pP6의 SacI 자리와 연결하였다.

각 PCR 단편의 연결을 상술하면 다음과 같다(그림 7 참조).

1) p1-3를 SmaI과 CfoI, p2-4를 CfoI과 EcoRI, pBluescript SK(+)를 HincII와 EcoRI으로 절단하고 각각 분리한 후 연결하여(three-way ligation) p13-24를 제작하였다.

2) pP6를 ClaI과 SacI, p17을 SacI과 XbaI, pBluescript SK(+)를 ClaI과 XbaI으로 절단하고 각각 분리한 후 연결하여(three-way ligation) p6-17을 제작하였다.

3) pBS10을 BamHI과 MroI, p7-3을 BamHI과 MroI으로 절단하고 각각 분리한 후 연결하여 pBS10-73을 제작하였다.

4) p5-4를 DsaI과 EcoRI, pBS10-73을 EcoRI과 DsaI으로 절단하고 각각 분리한 후 연결하여 p54를 제작하였다.

5) p54를 ApaI과 DraII, p13-24를 ApaI과 DraII로 절단하고 각각 분리한 후 연결하여 p54-13을 제작하였다.

6) p54-13을 AccI과 BamHI, p6-17을 AccI과 BamHI으로 절단하고 각각 분리한 후 연결하여 pBt9을 제작하였다.

## 실험 5. 합성 *cryIAC* 유전자의 in vitro 발현 및 살충성 검정

### 곤충세포배양

곤충세포주는 Sf-9(*Spodoptera frugiperda*)을 이용하였고, 10% FBS (fetal bovine serum; Gibco-BRL, USA)가 함유된 곤충세포주 배양용 TC-100 (Gibco-BRL, USA) 배양액으로 Summers와 Smith의 방법 (1987)에 따라 27°C 항온기에서 초기분주농도를 플라스크 (25cm<sup>2</sup>)당 2×10<sup>6</sup> 세포로하여 4-5일마다 계대배양하였다.

#### 재조합 바이러스 제작 및 선발

Sf-9 세포주에 재조합 전이벡터 pBac8-Bt9 500 ng과 *Bsu36I*으로 절단된 BacPAK6 (Clontech, USA) viral DNA 5μl를 혼합하고 lipofectin (11 mg/ml) 15μl를 첨가하여 27°C에서 5시간 동안 cotransfection 하였다. 이 후 새 배양액으로 교체하고, 접종 5일 후 바이러스 병징을 관찰하여 감염유무를 확인 하였다. 바이러스 순화를 위한 한계희석(end-point dilution)은 바이러스 접종액을 10<sup>-2</sup>-10<sup>-8</sup>배까지 희석하고, 96-well plate에 well당 세포 1×10<sup>4</sup>개의 농도로 분주된 배양세포에 각 희석액을 접종하고 27°C에서 배양하였다. 접종 후 4일부터 바이러스 감염유무를 도립현미경으로 관찰하여 바이러스를 선발하고, 동일한 방법으로 3회 이상의 순화과정을 거쳐 순수한 재조합 바이러스 vBac8-Bt9을 선발하였다(그림 8).

#### 외래유전자 발현 확인

Sf-9 세포주를 35-mm diameter dish에 1×10<sup>6</sup>세포로 분주하고 wt-AcNPV와 재조합 바이러스 vBac8-Bt9 감염액을 세포당 5 PFU 농도로 접종한 후 감염 3일째 각각 수거하여 단백질 전기 영동과 생물검정으로 외래유전자 발현을 확인 하였다.

#### 단백질 전기영동

바이러스 감염세포의 단백질에 대한 전기영동은 바이러스가 감염된 세포를 거두어 PBS 완충액 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)으로 2회 세척하고 2배 농도의 단백질 시료 용액 (0.0625M Tris-HCl, pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 같은 양으로 혼합하고, 100°C에서 10분간 처리하여 전기영동시료를 준비하였다. 전기영동은 Lamlli 방법 (1970)에 따라 SDS-polyacrylamide 겔에서 수행하고 Commassie brilliant blue로 염색하여 관찰하였다.

#### Western blot 분석

단백질 시료를 전기영동한 후 PVDF-membrane에 전이시켰다. PVDF-membrane을 5% skim-milk 용액으로 blocking시키고 *cryIAC* 항체 (Adgia 제품 : PSB05200)를 100:1로 5% skim-milk 용액에 희석하여 반응시켰다. TBST 용액으로 3회 및 TBS 용액으로 1회 세척하고, BP-A와 BP-B 1:1 혼합액(Adgia 제품)으로 발색시킨 후 다시 TBS 용액으로 세척하였다(그림 9).

#### 생물검정

배추좀나방에대한 바이러스의 생물검정은 Evans (1981)의 표면 오염법 (Surface contamination assay)에 따라, 배추 잎을 2cm<sup>2</sup> 크기로 잘라 그 위에 감염세포 현탁액을 더한 뒤 6시간 이상 굵긴 3령 또는 4령 유충 20마리씩으로 3반복 수행하였



다. 벼에대한 stem borer test는 4엽기에 해당되는 벼유묘에 주당 5마리씩 접종하여 생육상태를 관찰하였다.

#### 실험6. 합성 *cryIAC* 유전자의 식물 발현 및 살충성 검증

##### 식물 발현 벡터 제작 및 *Agrobacterium* 형질 전환

pBt9의 합성 *cryIAC*(1.86 kb)를 EcoRI으로 잘라내어 pBluescript SK(+)의 EcoRI 자리에 삽입하였다. 그 결과 합성 *cryIAC*의 삽입 방향에 따라 pBt91과 pBt92를 얻었다(그림 10). pBt91을 HindIII와 NcoI으로 절단하고, pCAMBIA3301을 HindIII와 NcoI으로 자르고 0.8 kb CaMV35S 프로모터를 분리하여 연결하여 p35SBt를 제작하였다. p35SBt를 HindIII와 BamHI으로 절단하여 2.65 kb(CaMV35S 프로모터/합성 *cryIAC*)를 분리한 후 pCAMBIA1390를 HindIII와 BamHI으로 절단하고 삽입하여 식물 발현 벡터 pBt20을 제작하였다.

pBt20의 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 형질 전환은 An 등의 freeze-thaw 방법(G. An, P.R. Ebert, A. Mitra, and S.M. Ha, "Binary vectors" in Plant molecular biology manual. A3: 1-19. Kluwer Academic Publishers)을 사용하였다. Kanamycin이 50 ug/ml 포함된 YEP배지에서 선발된 *Agrobacterium*을 배양하고 플라스미드를 분리하고 제한효소 패턴을 분석함으로써 *Agrobacterium*의 형질전환을 재확인한 후 벼 형질 전환에 사용하였다.

#### 실험7. 살충성 벼 형질전환체 생성

##### 1) 식물재료 및 캘러스 유도

본 실험에 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)는 낙동 품종의 완숙 종자를 이용하였다. 벼의 종피를 제거하고 70% 에탄올에서 1분간 교반한 후 2% sodium hypochloride 용액에 20분간 교반하면서 표면 살균하였다. 살균된 종자를 멸균수에 3-4회 이상 세척하고 2,4-D 2 mg/L 포함된 N6(Chu 등, 1975) 캘러스 유도배지에 종자를 치상하였다. 25°C, 암조건에서 4-5주간 배양하여 callus를 유도하였으며, embryogenic callus를 취하여 형질전환에 사용하였다.

##### 2) 형질전환 vector

사용된 형질전환 *rbcS::Tp-cryIA(c)*에 대한 vector map을 figure 11에 나타냈으며, 합성 *cryIA(c)*에 대한 염기서열은 GenBank에 등록되어있다. plasmid pKS-cry1A(c)를 제한효소 NcoI과 NotI으로 처리하여 *cryIA(c)*를 절단하고, Tp (transit peptide)가 연결된 *rbcS* promoter를 포함하는 pSK-RTG에 ligation하였다. *rbcS::Tp-cryIA(c)*는 BamHI과 NotI으로 절단하여 potato protease inhibitor II (Pin II)/ 35S promoter/ *bar*/ nopaline synthase terminator 및 양쪽에 matrix

attachment region (MAR)를 포함한 pSB11 border에 제한효소 *Bam*HI과 *Not*I으로 ligation하였다.

### 3) *Agrobacterium*을 이용한 벼 형질전환

*Cry1A(c)* 유전자로 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101은 YEP 액체배지에서 28°C, 24시간 배양하여 균체를 취하였다. 균체는 100 mM acetosyringone을 함유한 AA액체배지에  $10^7$  cell/mL가 되도록 현탁한 후 embryogenic callus와 15분간 전배양하고, 3일간 암상태에서 2,4-D 2 mg/L 및 acetosyringone을 포함하는 N6배지에서 공동배양하였다. 공동배양 후 callus는 cefotaxime을 사용하여 균을 완전히 제거하고, 2,4-D 2 mg/L, 250 mg/L cefotaxime 및 6 mg/L phosphinothricin (PPT)을 포함하는 N6배지에서 4주간 같은 배지에 일정 간격으로 2번 계대 배양하고 생생하게 증식하는 callus를 선발하였다. 선발된 callus는 재분화배지(MS medium, 0.5 mg/L NAA, 2 mg/L kinetin, 250 mg/L cefotaxime, 6 mg/L PPT)에서 26°C, 2500 lux 명상태로 하여 배양하고 발생하는 형질전환 식물체를 선발하였다.

### 4) Genomic DNA의 추출 및 Southern blot analysis

벼의 genomic DNA는 싱싱한 잎 1g을 채취하여 CTAB (cethyltrimethyl ammonium bromide) buffer를 이용한 DNA 분리방법(Dellaporta 등, 1983)으로 추출하였다. 추출한 DNA 5  $\mu$ g을 제한효소 *Pst*I 또는 *Eco*RI으로 절단하여 1% agarose gel에 전기영동 한 다음 denaturation 과정을 거친 후 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham)으로 전이하였다. 전이된 DNA 단편들을 고정시키기 위하여 UV-crosslink ( $1200 \times \mu$ J/cm<sup>2</sup>)를 실시한 후 membrane은 hybridization buffer (0.5M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.2, 1% BAA, 7% SDS, 1 mM EDTA, 10 mg/mL salmon sperm testicle DNA)를 사용하여 1시간 동안 pre-hybridization하였다. 이후 random primer DNA labeling kit (Takara Bio Inc.)를 이용하여 <sup>32</sup>P를 1.3-kb *cry1A(c)* fragment DNA 와 <sup>32</sup>P를 0.6-kb MAR fragment에 labeling하여 65°C에서 16-18시간 동안 hybridization 시켰다. membrane은 washing solution (1st solution, 2X SSC, 0.1% SDS; 2ed solution, 1X SSC, 0.1% SDS; 3rd solution, 0.2% SSC, 0.1% SDS)으로 처리하고 X-ray 필름(Super RX, Fuji)에 감광하였다.

### 5) RNA 추출 및 Northern blot analysis

형질전환체 벼의 잎 0.3 g 정도를 채취한 다음 Triazol (BioRad)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 정제된 RNA 20  $\mu$ g을 formaldehyde가 포함된 1% agarose gel에 전기영동하였다. RNA가 전개된 gel은 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham)에 blotting한 후 1.3-kb *cry1A(c)* fragment DNA를 probe로 하여 hybridization과 washing 등의 과정을 southern blot과 같은 방법으로 수행하였다.

#### 6) protein 추출 및 Western blot analysis

단백질을 추출하기 위해 1 g의 싱싱한 잎을 액체질소 하에서 분쇄하고, 단백질 추출 buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% SDS)를 첨가하였다. 이후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질을 추출하였으며, Bradford solution (Biorad)를 이용하여 단백질 농도를 결정하였다. 동량의 조단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하고 단편화된 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore)에 electroblotting하여 Western blot analysis를 실시하였다. Western blot은 anti-*cry1A(c)* polyclonal antibody를 1:1000으로 희석하여 사용하였으며, BioRad사의 manufacturer's instruction에 따라 alkaline phosphatase color 반응을 수행하였다.

#### 7) Insect bioassay

japanese black rice bug (*Scotinophra lurida*)와 striped stem borer (*Chilo suppressalis*)를 이용하여 T0 및 T1 식물체에 대한 저항성을 조사하였다. Petri dish에 습윤 상태의 filter paper를 깔은 다음 young-fresh stem을 넣어 주고 5일 후 각 plate에서 japanese black rice bug와 striped stem borer에 대한 식물체의 피해정도 및 해충의 사멸 정도를 조사하였다. T2 line에 대한 생물검정으로 야외 포장에서 rice leaf folder (*Cnaphalocrocis medinalis*)에 의한 형질전환 식물체 및 비형질전환체의 피해 조사가 2003년 9월 23일(수잉기)에 실시되었으며, 또한 beet armyworm에 대한 형질전환 벼의 피해정도를 R0 및 R1에서와 같이 infestation하고 6일 후 식물체의 피해정도 및 해충의 사멸 정도를 조사하였다.

#### 8) 형질전환 식물체의 후대검정

T1과 T2세대에서 외형적으로 정상이고 종자의 채종이 가능한 line의 형질전환 식물체로부터 phosphinothricin (PPT)을 살포 또는 배지에 첨가하여 *bar* 유전자 저항

성 검증을 실시하였다.

ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCTTATAATTGTTTAAGTAAC  
CCTGAAGTAT  
AAGTATTAGGTGGAGA 80  
AAGAATAGAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTGTGCGCTAACGCAATTTCT  
TTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTG 160  
CTGGATTTGTGTTAGGACTAGTTGATATAATATGGGGAATTTTTGGTCCCTCTCAAT  
GGGACGCATTTCTTGTACAAATT 240  
GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGA  
TTAGAAGGACTAAGCAATCTTTA 320  
TCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGATCCTACTAATCCAGCATT  
AAGAGAAGAGATGCGTATTCAAT 400  
TCAATGACATGAACAGTGCCCTTACAACCGCTATTCCTCTTTTTGCAGTTCAAATTT  
ATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA 480  
TATGTTCAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTTTGAGAGATGTTTCAGTGTTTGA  
CAAAGGTGGGGATTTGATGCCGC 560  
GACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTATTGGCAACTATACAGATTA  
TGCTGTACGCTGGTACAATACGG 640  
GATTAGAACGTGTATGGGGACCGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTA  
GAAGAGAATTAACACTAACTGTA 720  
TTAGATATCGTTGCTCTGTTCCCGAATTATGATAGTAGAAGATATCCAATTCGAACA  
GTTTCCCAATTAACAAGAGAAAT 800  
TTATACAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTTTCGAGGCTCGGCTCAGGG  
CATAGAAAGAAGTATTAGGAGTC 880  
CACATTTGATGGATATACTTAACAGTATAACCATCTATACGGATGCTCATAGGGGTT  
ATTATTATTGGTCAGGGCATCAA 960  
ATAATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTTCGGGGCCAGAATTCACTTTTCCGCTATATGGA  
ACTATGGGAAATGCAGCTCCACA 1040  
ACAACGTATTGTTGCTCAACTAGGTCAGGGCGTGTATAGAACATTATCGTCCACTTT  
ATATAGAAGACCTTTTAATATAG 1120  
GGATAAATAATCAACAACCTATCTGTTCTTGACGGGACAGAATTTGCTTATGGAACCT  
CCTCAAATTTGCCATCCGCTGTA 1200  
TACAGAAAAAGCGGAACGGTAGATTCGCTGGATGAAATACCGCCACAGAATAACAAC  
GTGCCACCTAGGCAAGGATTTAG 1280  
TCATCGATTAAGCCATGTTTCAATGTTTCGTTTCAGGCTTTAGTAATAGTAGTGTAAG  
TATAATAAGAGCTCCTATGTTCT 1360  
CTTGGATACATCGTAGTGCTGAATTTAATAATATAATTGCATCGGATAGTATTACTC  
AAATCCCTGCAGTGAAGGGAAAC 1440  
TTTCTTTTTAATGGTTCTGTAATTTTCAGGACCAGGATTTACTGGTGGGGACTTAGTT  
AGATTAAATAGTAGTGGAATAA 1520  
CATTGAGAATAGAGGGFATATTGAAGTTCCAATTCACTTCCCATCGACATCTACCAG  
ATATCGAGTTCGTGTACGGTATG 1600  
CTTCTGTAACCCCGATTACCTCAACGTTAATTGGGGTAATTCATCCATTTTTTCCAA  
TACAGTACCAGCTACAGCTACG 1680

TCATTAGATAATCTACAATCAAGTGATTTTGGTTATTTTGAAAGTGCCAATGCTTTT  
ACATCTTCATTAGGTAATATAGT 1760  
AGGTGTTAGAAATTTTAGTGGGACTGCAGGAGTGATAATAGACAGATTTGAATTTAT  
TCCAGTTACTGCAACACTCGAGG 1840  
CTGAATATAATCTG 1854

그림1. wt-*cryIAc* (M11068) 유전자 전체길이 3,537 bp 중 살충성 관련 부분인  
아미노터미널 쪽 1,854 bp만의 DNA 염기서열.

CCATGGACAACAACCCAAACATCAACGAATGCATTCCATACAACCTGCTTGAGTAACCC  
AGAAGTTGAAGTACTTGGTGGG 80  
GAACGCATTGAAACCGGTTACTCTCCATCGACATCTCCTTGTCCTTGACACAGTTTC  
TGCTCAGCGAGTTCGTGCCAGG 160  
AGCTGGGTTTCGTTCTCGGACTAGTTGACATCATCTGGGGTATCTTTGGTCCATCTCAA  
TGGGATGCATTCCTGGTGCAA 240  
TTGAGCAGTTGATCAACCAGAGGATCGAAGAGTTCGCCAGGAACCAGGCCATCTCTCG  
TTTGGAAGGATTGAGCAATCTC 320  
TACCAAATCTATGCAGAGAGCTTCAGAGAGTGGGAAGCCGATCCTACTAACCAGCTC  
TCCGCGAGGAAATGCGTATTCA 400  
ATTC AACGACATGAACAGCGCCTTGACCACAGCTATCCCATTGTTTCGCAGTCCAGAAC  
TACCAAGTTCCTCTCTTGTCGG 480  
TGTACGTTCAAGCAGCTAATCTTCACCTCAGCGTGCTTCGAGACGTTAGCGTGTTTGG  
GCAAAGATGGGGATTTCGATGCT 560  
GCAACCATCAATAGCCGTTACAACGACCTTACTAGGCTGATTGGAAACTACACCGACT  
ACGCTGTTTCGTTGGTACAACAC 640  
TGGCTTGGAGCGTGTCTGGGGTCTGATTCTAGAGATTGGGTGAGATACAACCAGTTC  
AGGAGAGAATTGACCCTCACAG 720  
TTTTGGACATTGTGGCTCTCTTCCCGAACTATGACTCCAGACGTTACCCTATCCGTAC  
AGTGTTCCCAACTTACCAGAGAA 800  
ATCTACTAACCAGTTCTTGAGAACTTCGACGGTAGCTTCCGTGGTTCTGCCAGG  
GTATCGAAAGATCCATCAGGAG 880  
CCCACACTTGATGGACATCTTGAACAGCATAACTATCTACACCGATGCTCACAGAGGA  
TACTATTACTGGTCTGGACACC 960  
AGATCATGGCCTCTCCAGTTGGATTCTCCGGACCTGAGTTTACCTTTCCTCTCTATGG  
AACTATGGGAAACGCCGCTCCA 1040  
CAACAACGTATCGTTGCTCAACTAGGACAGGGTGTCTACAGAACCTTGTCTTCCACCT  
TGTACAGAAGACCCTTCAATAT 1120  
CGGTATCAACAACCAGCAACTTCCGTTCTTGACGGAACAGAGTTCGCCTATGGAACC  
TCTTCTAACTTGCCATCCGCTG 1200  
TTTACAGAAAGAGCGGAACCGTTGATTCTTGGACGAAATCCCACCACAGAACAA  
TGTGCCACCCAGGCAAGGATTC 1280  
TCCCACAGGCTTAGCCACGTGCCATGTTCCGTTCCGGATTCAGCAACAGTTCCGTGA  
GCATCATCAGAGCTCCTATGTT 1360  
CTCTTGGATTACCGTTCTGCCGAGTTCAACAACATCATCGCATCTGATAGTATTA  
CAAATCCCTGCCGTGAAGGGAA 1440  
ACTTCCTTTTCAATGGAAGCGTAATCAGCGGACCAGGATTCAGTGGCGGAGATCTTGT  
GAGACTTAACAGCTCTGGCAAC 1520  
AACATTCAGAATAGAGGCTACATCGAAGTTCCTATCCACTTCCCATCCACATCTACTA  
GATACAGAGTTAGGGTTAGATA 1600  
CGCCTCTGTGACCCCAATCCACCTTAACTGAACTGGGGCAATTCATCTATCTTCTCC  
AACACCGTTCAGCTACTGCTA 1680  
CCTCACTCGATAATCTTCAATCCAGCGATTTTGGTTACTTCGAAAGTGCCAACGCATT

CACTTCTTCATTGGGCAACATC 1760  
 GTGGGTGTTAGGAATTTTCAGCGGTACTGCAGGAGTGATCATTGACAGATTCGAGTTC  
 ATTCTGTACTGCCACTCTTGA 1840  
 GGCTGAGTACAATCTTTAAGGTACC 1865

그림 2. 수정된 *cryIac*의 DNA 염기서열. 처음 부분에 번역 시작 코돈을 포함하여 제한효소 NcoI (CCATGG) 자리를 만들고 끝 부분에 번역 종료 코돈 TAA와 제한효소 KpnI (GGTACC) 자리를 추가하였다.

SacI(1351)  
 CAGAGCTCCTATGTTCTCTTGGATTCACCGTTCTGCCGAGTTCAACAACA-----  
 -----AGTATTACTCAAATCCCTGCCGTGA  
 GACGGCTCAAGTTGTTGTAGTAGCGTAGACTATCATAATGAGTTTAGGGA  
 BglII(1489)  
 AGGGAAACTTCCTTTTCAATGGAAG-----CAGGATTCACTGGCGGAGA  
 TCTTGTGAGACTTAACAGCTCTGGCAACAAC  
 GAAGGAAAAGTTACCTTCGCAATAGTCGCCTGGTCCTAAGTGACCGCCTC  
 TTGTCGAGACCGTTGTTG  
 -----CTACATCGAAGTTCCTATCCACTTCCCATCCACATCTACTAGAT  
 ACAGAG-----GCCTCTGT  
 T A A G T C T T A T C T C C G A T G T A G C T T C A A G G A T A  
 GTAGATGATCTATGTCTCAATCCCAATCTATGCGGAGACA

GACCCCAATCCACCTTAACGTGAACTGGGGCAATTCATCTAT-----TT  
 CCAGCTACTGCTACCTCACTTGATAATCTTC  
 C T G G G G G T T A G  
 GACCCCGTTAAGTAGATAGAAGAGGTTGTGGCAAGGTCGATGACGATGGA  
 G  
 BstBI(1719) PstI  
 AATCCAGCGATTTTGGT-----CAACGCATTCACTTCTTCATTGGGCAA  
 CATCGTGGGTGTTAGGAATTTCA-----  
 TTAGGTTCGCTAAAACCAATGAAGCTTTCACGGTTGCGTAAGTGAAGAAG  
 ACCACAATCCTTAAAGTCGCCATGA  
 (1789) BclI(1794) KpnI(1862)  
 -----GTGATCATTGACAGATTCGAGTTCATTTCCTGTTACTGCCACTCTTGAGGC

C G T C C T C A C T A G T A A C T G T C T A A G  
 ATGACGGTGAGAACTCCGACTCATGTTAGAAATTCATGG

그림 3. 합성 *cryIac* 유전자의 1344 염기부터 1854 염기까지에 번역 종료 코돈 TA 합성 및 제한효소 KpnI (GGTACC)를 첨부한 PCR을 위한 프라이머의 배열 및 제한 효소 자리.

XhoII(866)  
 AAGATCCATCAGGAGCCCACACTTGATGGACATCTTGAACAGCATAACTA-----  
 -----CACAGAGGATACTATTACTGGTCT  
 AGAACTTGTCGTATTGATAGATGTGGCTACGAGTGTCTCCTATGATAATG  
 MroI(986)  
 GGACACCAGATCATGGCCTCTCCAGT-----GTTTACCTTTCTCCTC  
 TCTATGGAACATATGGGAAACGCCGCTCCAC  
 GTACCGGAGAGGTCAACCTAAGAGGCCTGGACTCAAATGGAAAGGAGAGA  
 GGCGAGGTG

AccI(1074)

AACAAC-----ACAGGGTGTCTACAGAACCTTGTCTTCCACCT  
 TGTACAGAAGACCCTTCA-----  
 T T G T T G C A T A G C A A C G A G T T G A T C C T G T C C C A C A G A T G T C T  
 CATGTCTTCTGGGAAGTTATAGCCATAGTT  
  
 ----CAGCAACTTTCGGTTCTTGACGGAACAGAGTTCGCCTATGGAACCTCTTC----  
 -----TTTACAGAAAGAGCGGA  
 G T T G G T C G T T G A A A G G C A A G  
 GGATACCTTGGAGAAGATTGAACGGTAGCGACAAATGTCTTTCTCGCCT  
BglI(1267)  
 ACCGTTGATTCCTTGGACGAAATCCCACCACAG-----GGCAAG  
 GATTCTCCACAGGCTTAGCCACGTGTCCA  
  
 GCTTTAGGGTGGTGTCTTGTGTTACACGGTGGGTCCGTTCCCTAAGAGGG  
 GT

MroI(1296) SacI(1351)

TGTTCCGTTCCGGA-----  
 ACAAGGCAAGGCCTAAGTCGTTGTCAAGGCACTCGTAGTAGTCTCGAG  
 그림 4. 합성 *cryIac* 유전자의 864 염기부터 1351 염기까지의 PCR을 위한 프라이머의  
 배열 및 제한효소 자리.

NcoI(1) NsiI(32) ScaI(69)  
 CCATGGACAACAACCCAAACATCAACGAATGCATTCCATACAACCTGCTTG-----  
 -----CTTGGTGGAGAACG

GGTATGTTGACGAACTCATTGGGTCTTCAACTTCATGAACCACCTCTTGC  
  
 CATTGAAACCGGTTACACTCCCATCGACATCTCCTT-----  
 ---CAGCGAGTTCGTGCCAGGAGCTGGGTTC

GTAGCTGTAGAGGAACAGGAACTGTGTCAAAGACGAGTCGCTCAAGCAG  
SpeI(178)HincII(184) BstXI(216) NsiI(226)  
BclI(249)  
 GTTCTCGGACTAGTTGACATCA-----ATCTCAATGGGA  
 TGCATTCCTGGTGCAAATTGAGCAGTTGATCA  
CCTGATCAACTGTAGTAGACCCCATAGAAACCAGGTAGAGTTACCCTACG  
GTCAACTAGT

ACCAGA-----AACCAGGCCATCTCTCGTTTGGAAAGGA  
 TTGAGCAATCTCTACCAAATCTA-----  
 T G G T C T C C T A G C T T C T C A A G C G G T C C T T G G T C C G G T A G A G  
 TTAGAGATGGTTTAGATACGTCTCTC  
A c c I I ( 3 8 1 )

CfoI(419)  
 -----GGGAAGCCGATCCTACTAACCAGCTCTCCGCGAGGAAATGCGT  
 ATTCAA-----CCTTG  
 G A A G T C T C T C A C C C T T C G G C T A G G  
 CCTTTACGCATAAGTTAAGTTGCTGTAAGTTGTCGCGGAAC

ACCACAGCTATCCCATTTGTTTCGCAGTCCAGAACTACCAAGTTCCT-----  
 -----CAAGCAGCTAATCTTCACCTCAGCG  
 T G G T G T C G A T  
 CTTGATGGTTCAAGGAGAGAACAGGCACATGCAAGTTCGTCGATTAGAAG

TGCTTCGAGACGTTAGCGTGTTTGG-----GCTGCAACC  
 ATCAATAGCCGTTACAACGACCTTACTAGGCT

GCAATCGCACAAACCCGTTTCTACCCCTAAGCTACGACGTTGGTAGTTAT  
 GATCCGA

DraII(659) XbaI(668)

GATTGGAAA-----CGTTGGTACAACACTGGCTTGGAGC  
 GTGTCTGGGGTCCTGATTCTAGAGA-----  
 C T A A C C T T T G A T G T G G C T G A T G C G A C A A G C A A C C A T G T T G T G A  
 CAGGACTAAGATCTCTAACCTAC

-----G TTCAGGAGAGAATTGACCCTCACAGTTTTGGACATTGTGGCT  
 CTCTTCC-----CC  
 T C T A T G T T G G T C A A G T C C T C T C T T A A C  
 ACACCGAGAGAAGGGATTGATACTGAGGTCTGCAATGG

DsaI(841)

CTATCCGTACAGTGTCCCAACTTACCAGAGAAATCTACACTAACCCAG-----  
 -----GCTTCCGTGGTTCTGC  
 G A T A G G C A T G T C  
 AGATGTGATTGGGTCAAGA ACTCTTGAAGCTGCCATCGAAGGCACCAAGA

XhoII(866)

CCAGGGTATCGAAAGATCCATCAGGAGC  
 TTCTAGGTAGTCCTCGGGTGTGAACTACCTGTAGAAC

그림 5. 합성 *cryIac* 시작 코돈 앞에 CC를 첨부하고 900 염기까지의 PCR을 위한 프라이머의 배열 및 제한효소 자리.

p1-3 : 420 bp  
 SI.BX.SII.N.Xb.Sp.Bm.Sm.P.RI. (RV) (RV).H3.Cl.Acc.Xh.Ap.K

NcoI AccII CfoI

p2-4 : 450 bp  
 K.Ap.Xh.Acc.Cl.H3. (RV) (RV).RI.P.Sm.Bm.Sp.Xb.N.SII.BX.SI

AccII CfoI DraII XbaI

p5-4 : 190 bp  
 K.Ap.Xh.Acc.Cl.H3. (RV) (RV).RI.P.Sm.Bm.Sp.Xb.N.SII.BX.SI

DraII XbaI DsaI

p7-3 : 170 bp  
 SI.BX.SII.N.Xb.Sp.Bm.Sm.P.RI. (RV) (RV).H3.Cl.Acc.Xh.Ap.K

DsaI XhoII MroI

pBS10 :240 bp  
 SI.BX.SII.N.Xb.Sp.Bm. (Sm) (Sm).P.RI.RV.H3.Cl.Acc.Xh.Ap.K

MroI AccI

pP6 : 380  
 K.Ap.Xh.Acc.Cl.H3.RV.RI.P. (Sm) (Sm).Bm.Sp.Xb.N.SII.BX.SI

AccI SacI

p17 : 520 bp  
 (RV).RI.P.Sm.Bm.Sp.Xb.N.SII.BX.SI K.Ap.Xh.Acc.Cl.H3. (RV)

SacI KpnI

그림 6. 수정된 *cryIac* 전체에 해당하는 1865 bp를 포함하는 PCR 단편 클론은 7개.





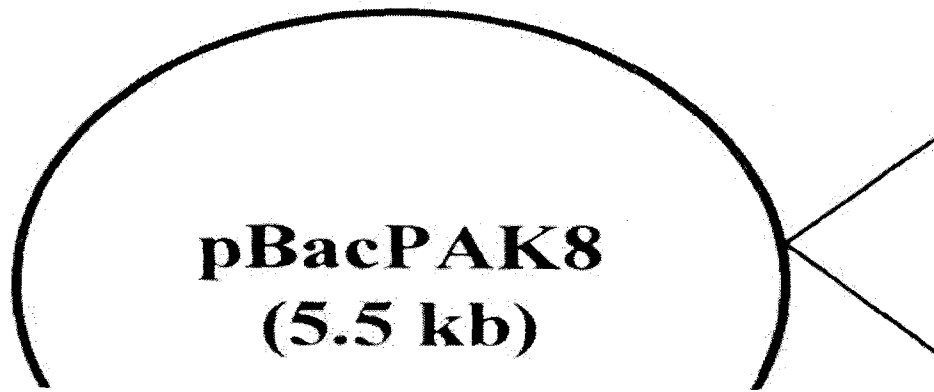


그림 8. 합성 *cryIAc* 유전자의 in vitro 발현을 위한 pBac8-Bt9 벡터 제작. 합성 *cryIAc* 유전자를 전이벡터(transfer vector) pBacPAK8에 삽입하고 곤충세포 Sf9에 BacPAK6 viral DNA와 동시감염(cotransfection)시킨 후 재조합 바이러스 vBac-Bt9을 선발하였다.

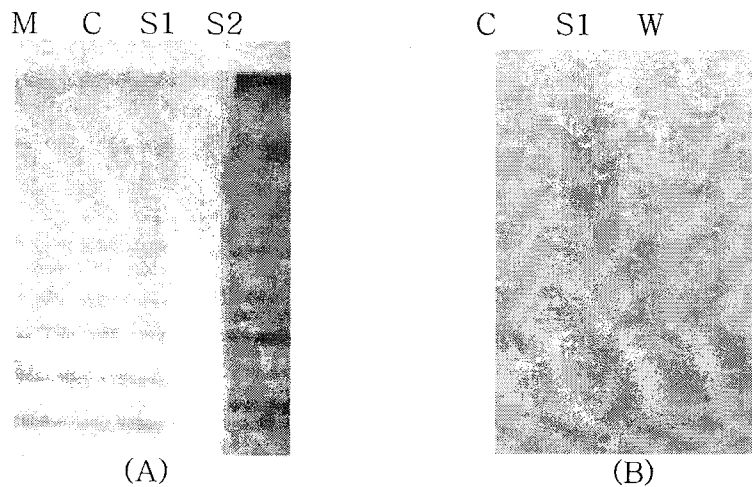


그림 9. 합성 *cryIAc* 유전자 발현 단백질 SDS-PAGE 및 western blot 분석. (A) 재조합 바이러스 vBac-Bt9에 의한 합성 *cryIAc* 독소 단백질 약 67 kd(화살촉). (B) *cryIAc* 항체를 사용한 western blot 분석. M, size marker; C, wt-AcNPV 접종; S1, vBac-Bt9-S1; S2, vBac-Bt9-S2; W, wt-Bt의 *cryIAc* 단백질.

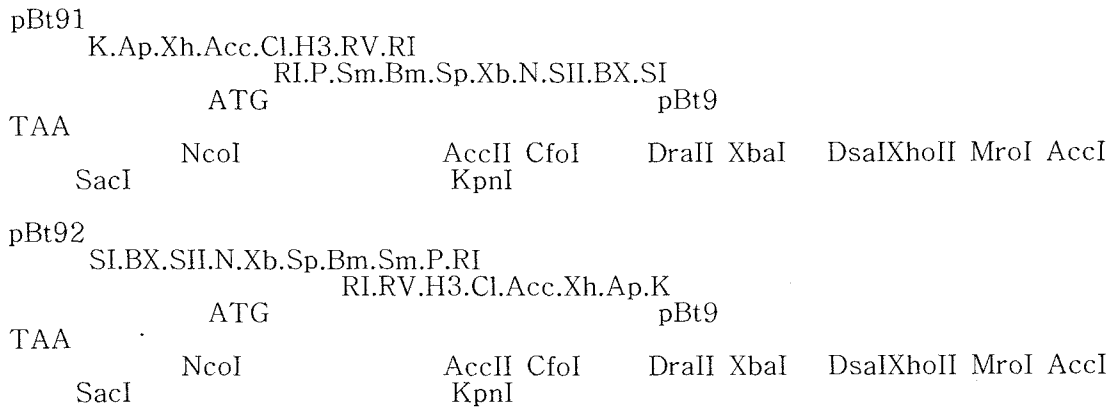


그림 10. 합성 *cryIAC* 유전자 포함 플라스미드. 그림 7의 pBt9을 *EcoRI*으로 절단하여 pBluescript SK(+)의 *EcoRI* 자리에 삽입하여 합성 *cryIAC* 유전자의 삽입 방향에 따라 pBt91과 pBt92 선발. 제한효소 약어는 그림 6과 동일함.

## 결과 및 고찰

### 1) *cryIA(c)* 벼 형질전환체 선발

벼에 적합하도록 변형시켜 합성한 *cryIA(c)* gene을 *rbcS* promoter와 chloroplast-targeted expression을 위해 transit peptide sequence (*Tp*)에 결합시켰다. 여기서 *rbcS-Tp*는 특이적으로 chloroplast에 위치하면서 형질전환 식물체의 단백질 축적을 강하게 한다고 알려져 있다. Chimeric *rbcS-Tp::cryIA(c)* gene은 35S promoter와 phosphinothricin acetyl transferase gene (*bar*)을 포함하는 식물 발현 vector에 삽입하여 형질전환에 이용하였다. 본 실험에서 낙동벼의 embryogenic callus는 *cryIA(c)* gene을 포함하고 있는 *Agrobacterium*과 공동배양하여 총 32개 line의 형질전환체를 생산하였다. 형질전환 식물체는 phosphinothricin (PPT)으로 선발하였으며, 온실에서 선발된 식물체를 성장시켜 잎에 시판중인 Basta를 스프레이를 이용하여 살포하여 본 결과, 선발된 모든 식물체 line에서 *bar* 저항성을 나타냈다. 또한 이들 선발 식물체는 특별한 장애 없이 성장하였다.

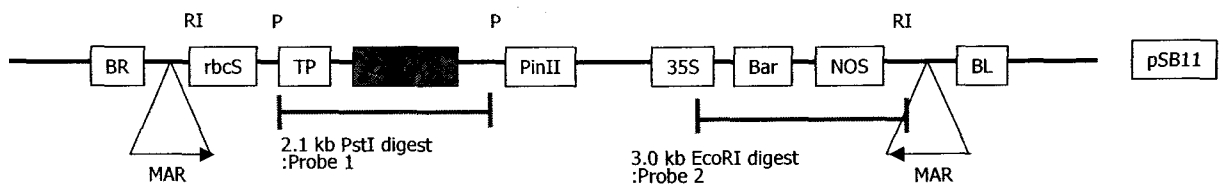


Figure11. Expression vector used for rice transformation. *rbcS::Tp-cryIA(c)*

consists of the rice *rbcS* promoter and its transit peptide (*Tp*) sequence translationally fused to *cryIA(c)* coding region and 3' region of the potato protease inhibitor II (*pinII*) gene plus the bar gene expression cassette that contains 35S promoter/*bar* coding region/3' region of the nopaline synthase gene (*NOS*). The hybridization probe (probe) used for DNA-blot analyses and the restriction sites (*PstI*, and *EcoRI*) followed by the expected fragments are shown below the map. BR, right border; BL, left border; P, *PstI*; RI, *EcoRI*

2) *rbcS-Tp::cryIA(c)*에 의한 벼 형질전환 식물체의 genomic DNA 분석

Genomic DNA의 Southern blot 분석을 수행한 결과 32 line 중에서 16개가 *rbcS-Tp::cryIA(c)*의 형질전환체로 나타났다(figure12A, B). 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하고 제한효소 *PstI*으로 full-length *cryIA(c)*를 절단하여 southern blot hybridization을 수행하였다. 그 결과 *PstI*에 의한 2.1-kb 단편과 같은 사이즈의 밴드가 나타났으며, 이의 결과는 *cryIA(c)* 유전자가 벼 genomic DNA 상에 성공적으로 형질전환 되었다는 것을 확인 시켜 주었다. 또한 *EcoRI*으로 절단한 0.6-kb MAR probe를 사용하여 분석한 경우에도 모두 line이 Mar 유전자 밴드를 나타내어 형질전환 되었음이 확인되었다. Copy 수는 각 line 별로 single에서 multi copy 수까지 다양하게 나타내었다.

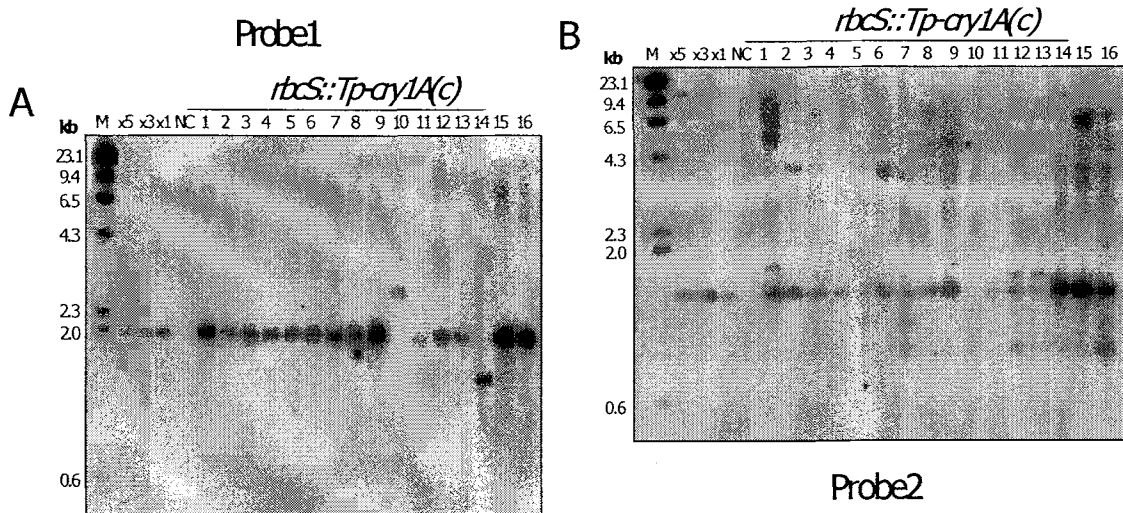


Figure12. Genomic DNA blot analyses of *rbcS::Tp-cryIA(c)*-transformed rice plants. A. Genomic DNA blot analysis of *rbcS::Tp-cryIA(c)*-transformed rice plants. Genomic DNA from the leaf tissues of *rbcS::Tp-cryIA(c)* -transformed

plants (1-16) were digested with *Pst*I (*P*) and hybridized with a 1.0-kb gene specific probe (probe 1) containing 3' region of *cry1A(c)* cDNA. PC contained *Pst*I-digested *rbcS::Tp-cry1A(c)*. B. The same genomic DNA used in A were digested with *Eco*RI (*R*I) and hybridized with a 0.7-kb DNA fragment (probe 2) containing 5' region of MAR sequence. PC contained *Eco*RI-digested *rbcS::Tp-cry1A(c)*. NC, genomic DNA from an untransformed control plant; 1, 3, and 5 in PC represent 1, 3, and 5 genome equivalents of *rbcS::Tp-cry1A(c)* relative to 5 ug of rice genomic DNA, respectively. The DNA molecular size markers (M) are indicated.

이어서 이들 16개 line에 대한 T1과 T2 세대에 대한 Southern 분석을 실시하였으며 모두 line에서 T0에서와 같은 결과의 DNA 밴드를 확인할 수 있었다(figure15,16). 여러 line 중에서 밴드의 양상이 가장 뚜렷하고, positive와 같은 위치의 밴드 양상을 나타내며 외형적인 생육상태에서 비형질전환 식물체와 생장의 차이를 보이지 않은 7-1 line을 선발하였고 그의 sub-line을 Southern 분석한 결과 모든 sub-line에서 안정적으로 positive 밴드와 같은 위치에서 뚜렷한 유전자 밴드를 보였다. 7-1 line의 결과는 후대에서도 식물체에 삽입된 *cry1A(c)* 유전자가 안정적으로 유지되었음을 의미한다.

### 3) 벼 형질전환체로부터 *cry1A(c)* 발현

벼 형질전환 식물체로부터 *cry1A(c)*의 발현 수준을 조사하기 위해 생생한 잎 조직에서 total RNA를 추출하고 동량의 RNA로 전개하여 Northern blot 분석을 수행하였다. DNA 분석에서와 같은 *cry1A(c)* probe를 사용하여 선발된 5개 대표 line의 RNA를 분석한 결과 *rbcS::Tp-cry1A(c)* 형질전환 식물체 모든 line에서 높은 발현 양상을 나타냈다. 반면 대조구로 사용한 비 형질전환 식물체는 어떤 RNA 발현 양상도 보이지 않았다(figure13). 또한 T1과 T2 세대에서도 선발된 line의 rRNA

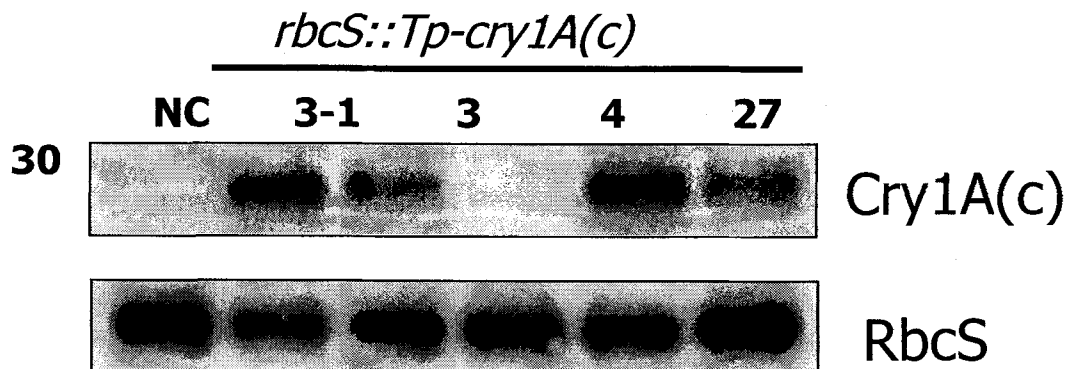


Figure13 . Expressed levels of *cry1A(c)* transcripts in *rbcS::Tp-cry1A(c)*-transformed rice plants. Northern analysis of *rbcS::Tp-cry1A(c)* transgenic

rice plants. 10 ug of total RNAs isolated from transgenic plants and wild type plants were transferred to a membrane and hybridized with a 1.0kb gene specific probe (see probe 1 in Figure 1) Hybridization with the *rbcS* gene of rice was used as a control for equal RNA loading.

상에서 *cry1A(c)* 발현을 확인할 수 있었으며, 이 중 Southern 분석에서 안정적으로 판명된 7-1 line이 가장 높은 발현량을 나타냈다. 따라서 선발된 7-1의 sub-line을 Northern 분석했으며, 그 결과 7-1의 모든 sub-line에서 같은 수준의 높은 RNA 발현양상을 확인할 수 있었다(figure18).

한편, Southern 및 Northern blot 등의 분석에 의한 *cry1A(c)*에 대해 높은 발현양상은 transit peptide (TP)의 영향인 것으로 생각된다. 담배 식물체에서 *Arabidopsis thaliana rbcS* at 1A 프로모트에 transit peptide (TP)를 포함한 것과 비 포함한 것에 대한 *cry1A(c)*의 발현을 비교한 결과 TP를 포함한 경우 *cry1A(c)*의 mRNA와 단백질이 10-20배 증가하는 것으로 보고 되었다(Wong 등 1992). 본 실험에 사용한 *rbcS-TP* sequence도 벼 형질전환 식물체에서 도입 유전자의 강력한 생산을 유도하는 것으로 확인된 바 있다(Jang 등, 1999).

형질전환 식물체의 단백질 상에서 *cry1A(c)* 단백질의 발현을 확인하고자 immunoblot 분석을 실시하였다. 4개의 *rbcS::Tp-cry1A(c)* 형질전환 식물체를 선발하여 각 단백질을 polyclonal antibody를 이용하여 분석하였으며, 그 결과 전개된 모든 line에서 뚜렷한 반응 밴드를 확인할 수 있었다(figure14). 반면, 비 형질전환 식물체에서는 어떠한 반응 밴드도 확인할 수 없어 위의 밴드가 살충성 *cry1A(c)* 단백질의 발현 밴드임을 확인시켜 주었다.

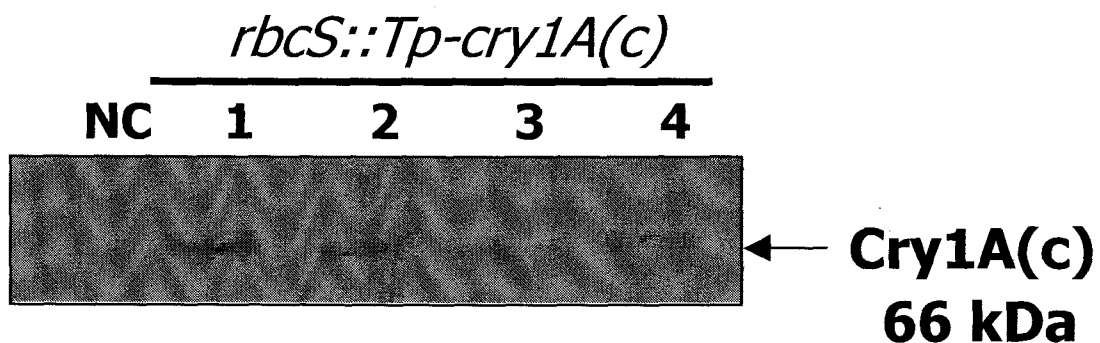


Figure14. Western blot analysis of *rbcS::Tp-cry1A(c)*. *RbcS::Tp-cry1A(c)*-transformed rice plants protein extracts were separated on SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane, and *cry1A(c)* was detected with antibodies against *cry1A(c)*. The amounts of protein extracts loaded 40ug per lane. Lane 1, 2, 3 and 4 are the purified *rbcS::Tp-cry1A(c)*. NC, protein extracts from an untransformed control plant.

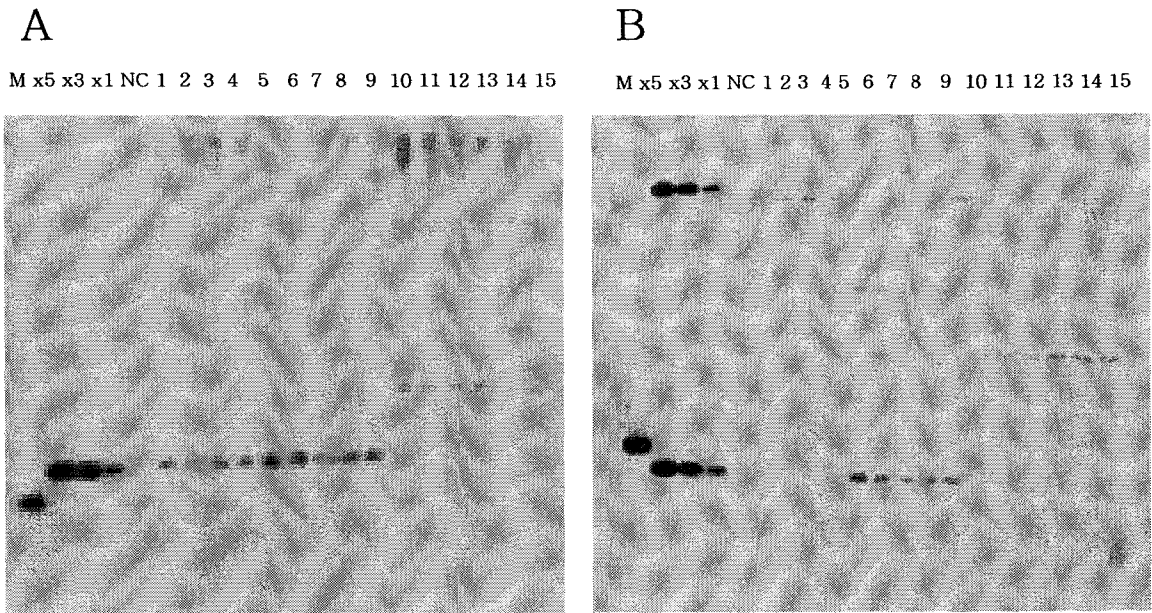


Figure15 . Southern blot analysis of T<sub>1</sub> rice plants (Lane 1–15) and control plant (NC). Genomic DNA from transformed rice were digested with *Pst* I, and hybridized with a 2.1kb gene specific probe (A, *Cry1Ac*) and with 1.3kb DNA fragment (B, *MAR* sequence) M, DNA molecular size markers; x5, x3 and x1, positive control.

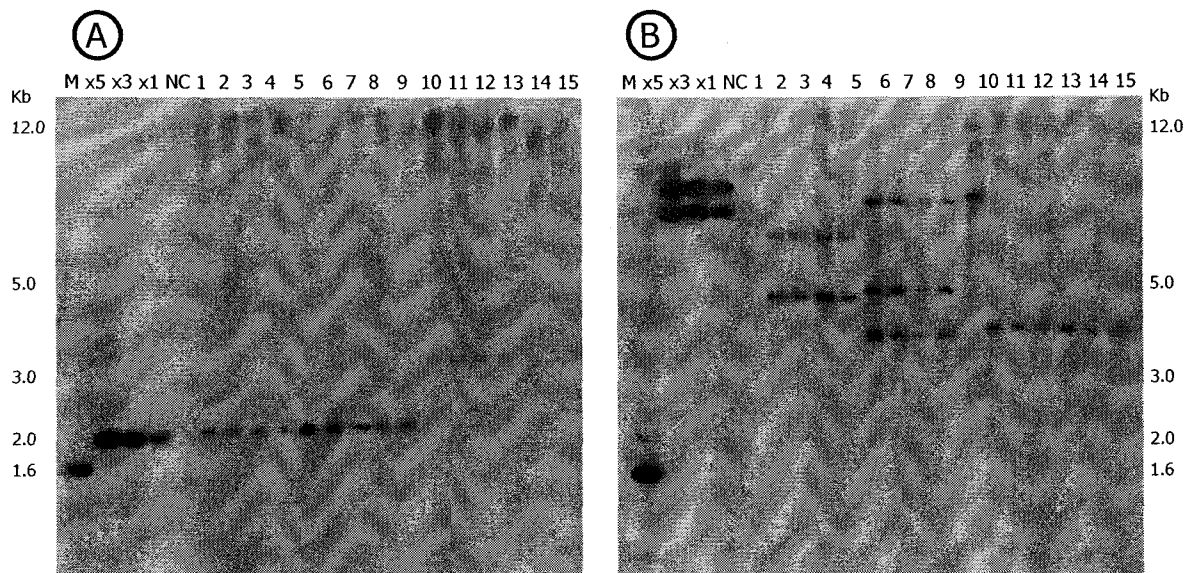


Figure16 . Southern blot analysis of T<sub>2</sub> rice plants (Lane 1–15) and control plant (NC). Genomic DNA from transformed rice were digested with *Pst* I, and hybridized with a 2.1kb gene specific probe (A, *Cry1Ac*) and with 1.3kb DNA fragment (B, *MAR* sequence). M, DNA molecular size markers; x5, x3 and x1, positive control.

#### 4) Insect bioassay

*rbcS::Tp-cryIA(c)* 형질전환 식물체의 줄기를 japanese black rice bug와 striped stem borer의 유충에 섭식시키고 5일 후 식물 조직 내의 toxin peptide에 의한 살충력을 조사한 결과, 비 형질전환 식물체를 먹인 나방의 유충은 실험 조작 상의 사상 이외에 모두 어떤 이상 없이 잘 자랐으나, 형질전환 식물체를 섭식한 나방 유충의 경우에는 높은 유독 효과를 나타냈다(figure17). 형질전환 식물체에 infestation하고 5일 후 치사율을 조사한 결과 japanese black rice bug의 경우 95-100%의 치사율을 보인 반면 비 형질전환 식물체에서의 치사율을 유효 수준 이하를 나타냈다. 한편 striped stem borer의 경우에는 형질전환 식물체에서 50-80%의 치사율을 나타냈다. 결론적으로 형질전환 식물체를 섭식한 나방의 유충들은 거의 대부분 생존하지 못했으며, 형질전환체로부터 생산된  $\delta$ -endotoxin의 결정단백질에 의해 유충의 중장 내에서 독작용으로 섭식 후 바로 죽는 현상을 나타냈다. 이로써 *cryIA(c)* 벼 형질전환 식물체로부터 살충성 toxine 단백질이 성공적으로 생산되고 있음을 확인할 수 있었다.

한편, 본 실험에서 얻어진 형질전환 식물체 중 10%는 총단백질 중 3% 정도의 높은 toxin 수준을 나타냈으며, 기존에 보고된 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)*의 함량보다 10에서 100 배의 이상 높게 나타났다. 이의 수준은 형질전환 작물체로써 통합적인 병충해 방제에 효과적인 수준으로 제안되어져 왔다. 또한 이들 형질전환 식물체의 전체적인 toxin 수준은 feeding time에 총 단백질 중에서 0.23-0.31%에 달하는 것으로 추정되었다. Wuhn 등(1996)은 단백질 중 0.009%의 *cryIA(b)* 함량이지만 striped stem borer와 yellow stem borer에 대하여 100%의 치사율을 나타냈다고 보고한 바 있으며, 이보다 높은 *cryIA(b)* (단백질 중 0.05%)와 *cryIA(c)*의 함량(단백질 중 0.024%)으로 각각 striped stem borer에 대해 10-50%의 치사율(Fujimoto 등, 1993)과 yellow stem borer에 대해 76-92%의 치사율(Nayak 등, 1997)을 나타낸 결과가 있다.

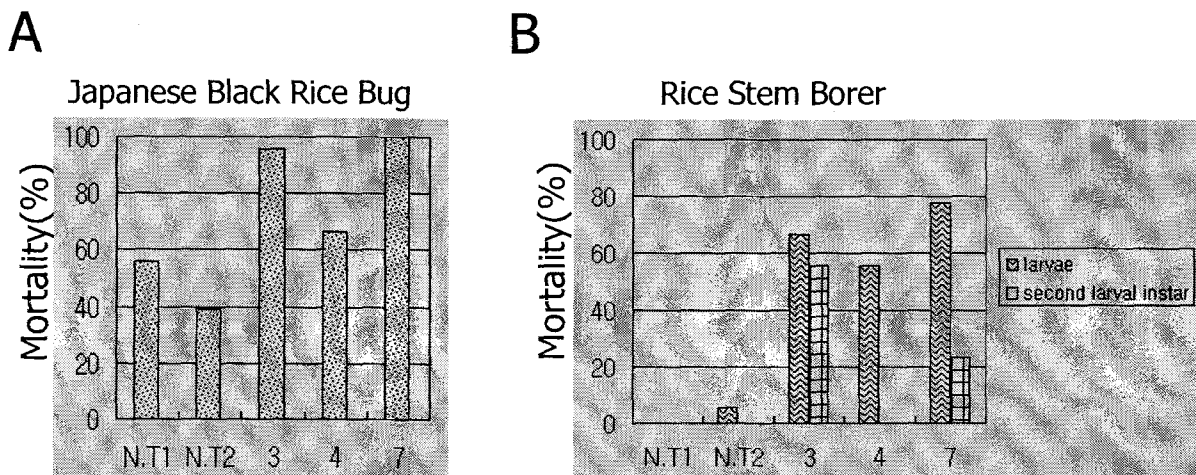


Figure17. Insecticidal activity of *rbcS::Tp-cryIA(c)*-transformed rice plants. Tissue damage caused by black rice bug and stem borer feeding. The stem cuttings of untransformed and *rbcS::Tp-cryIA(c)*-transformed rice plants



were infested with neonate Japanese black rice bug or rice stem borer larvae. The larvae were allowed to feed on stem cutting of untransformed and *rbcS::Tp-cryIA(c)*-transformed rice plants. Mortality was calculated 5 days after infestation.

2003년 4월, T<sub>1</sub>세대 식물체부터 얻어진 종자(T<sub>2</sub> 세대)를 받아시켜 야외 포장에 이양하였다. 당해 년도에 우기가 많고 일조량이 적은 기상조건의 불량으로 자연적 병충해의 발생이 빈번하였으며, 특히 벼에 있어서 rice leaffolder (RLF, 흑명나방)의 발생이 심각하였다. 한편 포장에 생육중인 *cryIA(c)* 유전자 형질전환 벼도 예외는 아니었으며, 이에 따라 9월 벼이삭의 유숙기에 흑명나방 유충에 의한 피해 정도를 조사하였다. 그 결과 7-1의 모든 sub-line (12개 line) 중 일부 몇 line(3개 line)에서 약간의 섭식 흔적이 있었으나 흑명나방 유충은 거의 발견되지 않았다(Table 1). 대조 식물체의 섭식 흔적과 비교하여 형질전환 식물체의 매우 적은 섭식 흔적으로 보아 살충성 결정단백질의 발현에 의한 독성으로 흑명나방 유충들의 기피 현상이 있었음이 확인 되었다. 또한 발견된 유충의 성장 상태를 비교한 결과 7-1의 sub-line에서 발견된 유충(12개 sub-line 중에서 단 3마리의 유충 발견)과 비 형질전환 식물체에서 발견된 유충의 길이와 무게에 있어서 7-1에서 발견된 유충이 비 형질전환체의 것보다 절반 수준에 미치지 않는 것으로 나타나 살충성 toxin에 의한 섭식 장애를 확인 할 수 있었다.

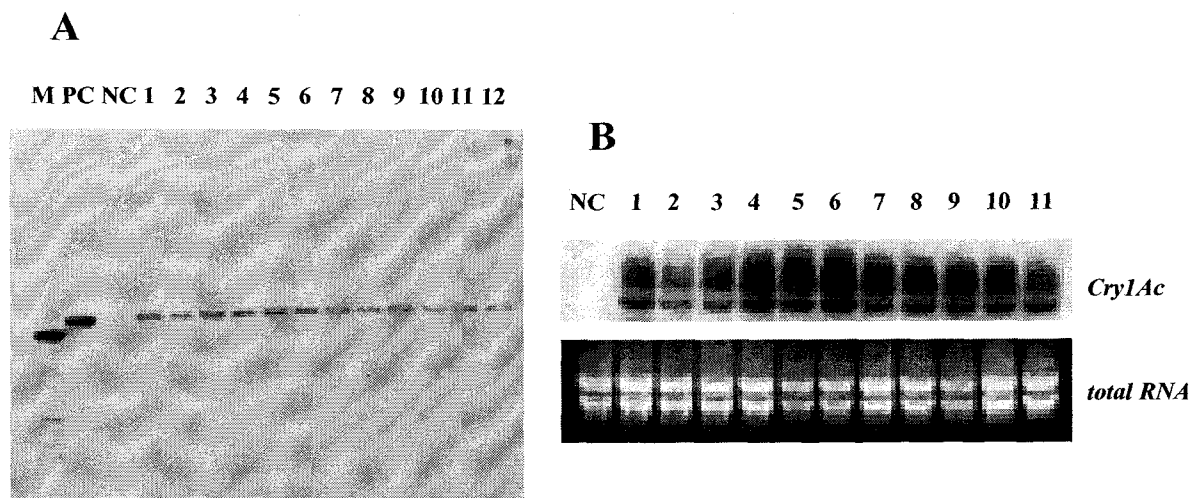


Figure18. Southern (A) and northern (B) blot analysis of 7-1 T<sub>2</sub> rice plants (Lane 1-12) and control plant (NC). Genomic DNA was digested with *Pst* I, and hybridized with a 2.1kb gene specific probe (*CryIAc*). Total RNA (20g) was run on a 1% agarose gel containing formaldehyde, and then hybridized with the same probe. M, marker DNA; PC, positive control.

T<sub>2</sub>세대 7-1의 31개 sub-line에 대한 beet armyworm의 치사율을 조사하였으며, 그 결과 25개 sub-line이 50-100%의 치사율을 보였으며, 반면 대조구는 80%의 생존율을 나타냈다. 위의 결과로부터 *rbcS::Tp-cryIA(c)* 형질전환 식물체가 여러 나방의 유충에 대하여 뚜렷한 살충력을 갖는 것으로 나타났으며, *cryIA(c)*의 toxine peptid가 안

정적으로 발현, 생산되는 것이 확인 되었다.

Table. Resistance of a *Cry1Ac*-transformed rice line against natural infestations of the rice leaffolder (RLF) under field conditions.

	Sub-line											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RTB103-1	+++	++	-	++	+	++++	-		-			
7-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-1	++++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
6-5	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
6-6	++	++++	+++	+++	+++	++	++	+	++	++	+++	+++
6-7	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++				
6-8	++++	+++				++	+++				+++	
4-1	++++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++	++	++++
4-3	+++	++++	++++	+++	+++	+++	++	++++				

- No damage symptoms or slightly scrape some leaves  
 + The leaf damage grades showed with severity

(Date: 2003. 9. 23)

### 5) 형질전환 식물체의 후대검정

형질전환 식물체 T2세대에 대하여 상업적으로 시판되고 있는 Basta를 유효농도로 처리하여 본 결과 저항성과 감수성의 비율이 멘델의 이론적 분리비에 적합한 3:1, 또는 그 이상의 분리비를 총 7개 계통에서 확인 되었다. 이중 3:1 이상의 분리비를 보이고 여러 분자학적 분석에서 좋은 결과를 나타낸 7-1 line의 종자를 T2세대까지 유지하였으며, 이들 7-1 line의 T2 종자를 6 mg/L phosphinothricin (PPT)가 첨가된 MS 배지에 치상하여 *bar* gene 저항성을 조사하였다. 그 결과 PPT를 포함한 배지에서 형질전환된 7-1의 모든 sub-line은 98% 이상 발아하여 정상적으로 생육하였으며, PPT를 포함되지 않은 MS 배지에서 발아한 비 형질전환 식물체와 같은 생장 상태를 나타냈다. 반면 PPT가 첨가된 MS 배지에 치상한 비 형질전환 대조구는 모든 종자가 발아하지 못하고 0%의 생존률을 나타냈다. 이로부터 이들 형질전환 식물체는 후대에도 지속적으로 도입 유전자의 발현이 안정적으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면, *Agrobacterium*를 이용한 형질전환 방법으로 modified *cry1A(c)* 합성 유전자를 낙동벼에 삽입시켜 여러 형질전환 식물체 line을 얻었다. 형질전환된 식물체는 Southern과 Northern blot 등의 분자생물학적 분석을 통해 벼의 genomic DNA로 *cry1A(c)* 유전자의 도입과 RNA의 발현이 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 또한 형질전환 식물체로부터 polyclonal antibody를 이용하여 *cry1A(c)*에 대한 immunoblot 분석에서 높은 수준의 살충성 toxin 단백질의 생산을 확인할 수 있었으며, japanese black rice bug, striped stem borer, rice leaffolder 및 beet armyworm

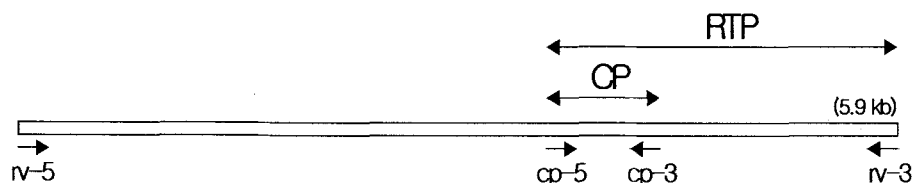
등 여러 나방의 유충에 대한 생물검증에서도 *rbcS::Tp-cry1A(c)* 형질전환 벼 식물체가 강력하고 뚜렷한 살충 작용을 갖는 것으로 나타났다. 따라서 위의 실험에서 확인된 우수 계통을 먼저 선발하고 도입된 유전자가 후대에 안정적으로 유전되는 가를 지속적으로 확인한 다음 homo계통으로 고정화 시켜 새로운 내충성 품종으로 개발하고자 한다. 형질전환에 의한 내충성 벼 품종의 개발은 먼저 해충방제에 큰 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대되며, 농약의 사용량이 감소함으로써 생산원가에 대한 실제 작물 생산량의 증가, 이에 따른 식량난의 해소 효과를 얻을 수 있을 것으로 본다. 또한 소비자들의 기호에 맞게 저농약 사용으로 고부가가치성 작물의 생산 및 화학 농약의 사용 절감에 따른 인축의 피해와 환경 보호에 일익을 담당할 것으로 사료된다.

### E. 흡즙곤충 방제를 위한 새로운 독소 단백질 개발

감자엽권바이러스(potato leaf roll virus; PLRV)는 Luteovirus에 속하는데, 형태는 정이십면체이고, 유전체는 linear positive-sense single stranded RNA로 그 크기는 5882-5987 bp 이며 6개의 유전자가 존재한다. 식물체의 체관부에 국한하여 감염되지만 감자가 어린 시기에 PLRV에 감염되면 거의 수확을 할 수 없을 정도의 피해를 입는다. 이 바이러스는 흡즙곤충인 진딧물류에 매개되어 전파된다. 따라서 PLRV의 방제는 진딧물을 방제하는 것이 중요하다. 감염 식물체에서 진딧물의 구침을 통하여 수액과 함께 진딧물의 소화관으로 유입된 바이러스는 후장 부위에서 혈체강으로 투과되어 들어간 후 침샘으로 이동하고 진딧물이 새로운 식물체에서 흡즙할 때 진딧물의 침과 함께 진딧물의 구침을 통하여 바이러스가 감염된다. 소화관에서 혈체강으로의 바이러스 이동은 receptor-mediated endocytosis 기작이 이용되는데, 이때 곤충 소화관의 receptor에 대하여 ligand 역할을 하는 것은 PLRV의 외피단백질(coat protein; CP)일 것으로 추정된다. 따라서 본 실험은 PLRV의 외피단백질과 *Bacillus thuringiensis*의 곤충독소단백질을 융합시켜 진딧물에 살충성을 갖는 새로운 단백질을 개발하고자 한다.

#### 1. 감자엽권 바이러스의 외피단백질 클로닝

고령지시험장 감자 육종포에서 PLRV에 감염된 감자를 수집하였다. PLRV 감염된 감자괴경의 도관이 많이 분포된 외피 아래부분 조직에서 total RNA를 분리하였다. 기 보고된 PLRV genome sequence들을 이용하여 PLRV genome 전체를 얻기 위하여 4종의 primer를 합성하였다(그림 1). RT-PCR을 수행한 결과 primer-2 와 -3을 사용한 coat protein 만 product가 나왔다. 이를 TA cloning vector에 삽입하고 염기서열을 분석한 후(그림 2), 기 보고된 coat protein들의 염기서열 및 아미노산 서열과 비교하였다. 국내 분리된 coat protein 유전자의 염기서열은 기존의 것들과 유사성이 매우 높았다. PLRV Canadian isolate의 CP 유전자[J. Gen. Virol. 71 (Pt 3), 719-724,(1990); Genbank accession No. D13954]는 한국 분리주와 단지 1 base 만의 차이를 보이며 일치했다(그림 3). 또한 CP 유전자들의 아미노산 서열에서도 매우 높은 유사성을 보였다(그림 4).



cp-5 : 5'-atg agt acg gtc gtg gtt aa-3'

cp-3 : 5'-cta ttt ggg gtt ttg caa ag-3'

rv-5 : 5'-aca aaa gaa tac cag gag aaa tt-3'

rv-3 : 5'-act aca caa ccc tgt aag agg atc-3'

그림 1. PLRV genome의 외피단백질 유전자의 위치 및 RT-PCR을 위한 프라이머.  
CP, coat protein ; RTP, readthrough protein

(A)

ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAGGAAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGAAGGCG  
A

AGAAGGCAATCCCTTCGCAGGCGCGCTAACAGAGTTCAGCCAGTGGTTATGGTCACGGC  
C

CCTGGGCAACCCAGGCGCCGAAGACGCAGAAGAGGAGGCAATCGCCGCTCAAGAAGA  
ACT  
GGAGTTCCCCGAGGACGAGGCTCAAGCGAGACATTCGTGTTTACAAAGGACAACCTCGT  
G

GGCAACTCCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCCGAGTCTATCAGACTGTCCGGCATTCAA  
G

GATGGAATACTCAAGGCCTACCATGAGTATAAGATCACAAGCATCTTACTTCAGTTCGT  
C

AGCGAGGCCTCTTCCACCTCCTCCGGTTCATCGCTTATGAGTTGGACCCCCATTGCAAA

GTATCATCCCTCCAGTCCTACGTCAACAAGTTCCAAATTACGAAGGGCGGCGCCAAAAC  
T

TATCAAGCGCGGATGATAAACGGGGTAGAATGGCACGATTCTTCTGAGGATCAGTGCCG  
G

ATACTGTGGAAGGGAAATGGAAAATCTTCAGATACCGCAGGATCCTTCAGAGTCACCAT  
C

AGGGTGGCTTTGCAAAAACCCCAAATAG (627)

(B)

MSTVVVKGNVNGGVQQPRRRRRQSLRRRANRVQPVVMVTAPGQPRRRRRRRGGNRRSRRT

GVPRGRGSSETFVFTKDNLVGNSQGSFTFGPSLSDCPAFKDGILKAYHEYKITSILLQFV

SEASSTSSGSIAYELDPHCKVSSLQSYVNKFQITKGGAKTYQARMINGVEWHDSSEDQCR  
ILWKGNGKSSDTAGSFRVTIRVALQNP (208)

그림 2. 대관령에서 분리한 감자엽권바이러스(PLRV) 외피단백질(CP) 유전자의 DNA 염기서열 (A) 및 아미노산 서열 (B).

1)ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAGGAAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGAAGG  
CGAAGAAGGCAATCCCTTCGCAG  
2)ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAGGAAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGAATG  
CGAAGAAGGCAATCCCTTCGCAG  
3)ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAGGAAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGAAGG  
CGAAGAAGGCAATCCCTTCGCAG  
4)ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAGGAAATGTCAATGGTGGTGCACAACAACCAAGAAGG  
CGAAGAAGGCAATCCCTTCGCAG  
5)ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAGGAAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGAAGG  
CGAAGAAGGCAATCCCTTCGCAG  
6)ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAGGAAATGTCAATGGCGGTGTACAACAACCAAGAAGG  
CGAAGAAGGCAATCCCTTCGCAG

GCGCGCTAACAGAGTTCAGCCAGTGGTTATGGTCACGGCCCCTGGGCAACCCAGGCGCCG  
AAGACGCAGAAGAGGAGGCA  
GCGCGCTAACAGAGTTCAGCCAGTGGTTATGGTCACGGCCCCTGGGCAACCCAGGCGCCG  
AAGACGCAGAAGAGGAGGCA  
GCGCGCTAACAGAGTTCAGCCAGTGGTTATGGTCACGGCCCCTGGGCAACCCAGGCGCCG  
AAGACGCAGAAGAGGAGGCA  
GCGCGCTAACAGAGTACAGCCAGTGGTTATGGTCACGGCCCCTGGGCAACCCAGGCGCCG  
AAGACGTAGAAGAGGAGGCA  
GCGCGCTAACAGAGTTCAGCCGGTGGTTATGGTCACGGCCCCTGGGCAACCCAGGCGTGG  
AAGACGCAGAAGAGGAGGCA  
GCGCGCTAACAGAGTTCAGCCAGTGGTTATGGTCACGGCCCCTGGGCAACCCAGGCGCCG  
AAGACGCAGAAGAGGAGGCA

ATCGCCGCTCAAGAAGAAGTGGAGTTCACCGAGGACGAGGCTCAAGCGAGACATTCGTG  
TTTACAAAGGACAACCTCGTG  
ATCGCCGCTCAAGAAGAAGTGGAGTTCACCGAGGACGAGGCTCAAGCGAGACATTCGTG  
TTTACAAAGGACAACCTCGTG  
ATCGCCGCTCAAGAAGAAGTGGAGTTCACCGAGGACGAGGCTCAAGCGAGACATTCGTG  
TTTACAAAGGACAACCTCGTG  
ACCGCCGCTCAAGAAGAAGTGGAGTTCACCGAGGACGAGGCTCAAGCGAGACATTCGTG  
TTTACAAAGGACAACCTCGTG  
ATCGCCGCTCAAGAAGAAGTGGAGTTCACCGAGGACGAGGCTCAAGCGAGACATTCGTG  
TTTACAAAGGACAACCTCATG  
ATCGCCGCTCAAGAAGAAGTGGAGTTCACCGAGGACGAGGCTCAAGCGAGACATTCGTG  
TTTACAAAGGACAACCTCATG

GGCAACTCCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCCGAGTCTATCAGACTGTCCGGCATTCAA  
GGATGGAATACTCAAGGCCTA  
GGCAACACCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCCGAGTCTATCAGACTGTCCGGCATTCAA  
GGATGGAATACTCAAGGCCTA  
GGCAACTCCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCCGAGTCTATCAGACTGTCCGGCATTCAA  
GGATGGAATACTCAAGGCCTA  
GGCAACTCCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCCGAGTCTATCAGACTGTCCGGCATTCAA  
GGATGGAATACTCAAGGCCTA  
GGCAACTCCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCCGAGTCTATCAGACTGTCCGGCATTCAA  
GGATGGAATACTCAAGGCCTA  
GGCAACTCCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCCGAGTCTATCAGACTGTCCGGCATTCAA  
GGATGGAATACTCAAGGCCTA

CCATGAGTATAAGATCACAAGCATCTTACTTCAGTTCGTTCAGCGAGGCCTCTTCCACCT

CCTCCGGTTCCATCGCTTATG  
CCATGAGTATAAGATCACAAAGCATCTTACTTCAGTTCGTCAGCGAGGCCTCTTCCACCT  
CCTCCGGTTCCATCGCTTATG  
CCATGAGTATAAGATCACAAAGCATCTTACTTCAGTTCGTCAGCGAGGCCTCTTCCACCT  
CCTCCGGTTCCATCGCTTATG  
CCATGAGTATAAGATCACAAAGTATCTTACTTCAGTTCGTCAGCGAGGCCTCTTCCACCT  
CCGCCGGTCCATCGCTTATG  
CCATGAGTATAAGATCACAAAGCATCTTACTTCAGTTCGTCAGCGAGGCCTCTTCCACCT  
CCTCCGGTTCCATCGCTTATG  
CCATGAGTATAAGATCACAAAGCATCTTACTTCAGTTCGTCAGCGAGGCCTCTTCCACCT  
CCTCCGGTTCCATCGCTTATG

AGTTGGACCCCCATTGCAAAGTATCATCCCTCCAGTCCTACGTCAACAAGTTCCAAATT  
ACGAAGGGCGGGCGCCAAAACCT  
AGTTGGACCCCCATTGCAAAGTATCATCCCTCCAGTCCTACGTCAACAAGTTCCAAATT  
ACGAAGGGCGGGCGCCAAAACCT  
AGTTGGACCCCCATTGCAAAGTATCATCCCTCCAGTCCTACGTCAACAAGTTCCAAATT  
ACGAAGGGCGGGCGCCAAAACCT  
AGTTGGACCCCCATTGCAAAGTATCATCCCTCCAGTCCTACGTCAACAAGTTCCAAATT  
ACGAAGGGCGGGCGCCAAAACCT  
AGTTGGACCCCCATTGCAAAGTATCATCCCTCCAGTCCTACGTCAACAAGTTCCAAATT  
ACGAAGGGCGGGCGCCAAAACCT  
AGTTGGACCCCCATTGCAAAGTATCATCCCTCCAGTCCTACGTCAACCAGTTCCAAATT  
CCTCAGGGCGGGCGCCAAAACCT

TATCAAGCGCGGATGATAAACGGGGTAGAATGGCACGATTCTTCTGAGGATCAGTGCCG  
GATACTGTGGAAGGGAAATGG  
TATCAAGCGCGGATGATAAACGGGGTAGAATGGCACGATTCTTCTGAGGATCAGTGCCG  
GATACTGTGGAAGGGAAATGG  
TATCAAGCGCGGATGATAAACGGGGTAGAATGGCACGATTCTTCTGAGGATCAGTGCCG  
GATACTGTGGAAGGGAAATGG  
TATCAAGCGCGGATGATAAACGGGGTAGAATGGCACGATTCTTCTGAGGATCAGTGCCG  
GATACTGTGGAAGGGAAATGG  
TATCAAGCGCGGATGATAAACGGGGTAGAATGGCACGATTCTTCTGAGGATCAGTGCCG  
GATACTGTGGAAGGGAAATGG  
TATCAAGCGCGGATGATAAACGGGGTAGAATGGCACGATTCTTCTGAGGATCAGTGCCG  
GATACTGTGGAAGGGAAATGG

AAAATCTTCAGATACCGCAGGATCCTTCAGAGTCACCATCAGGGTGGCTTTGCAAACC  
CCAAATAG  
AAAATCTTCAGATCCCGCAGGATCCTTCAGAGTCACCATCAAGGTAGCTTTGCAAACC  
CCAAATAG  
AAAATCTTCAGATCCCGCAGGATCCTTCAGAGTCACCATCAGGGTGGCTTTGCAAACC  
CCAAATAG  
AAAATCTTCAGATCCCGCAGGATCCTTTAGAGTCACTATCAGAGTGGCTTTGCAAACC  
CCAAATAG  
AAAATCTTCAGATACCGCAGGATCCTTCAGAGTCACCATCAGGGTGGCTTTGCAAACC  
CCAAATAG  
AAAATCTTCAGATACCGCAGGATCCTTCAGAGTCACCATCAGGGTGGCTTTGCAAACC  
CCAAATAG

그림 3. 감자엽권바이러스(PLRV)의 외피단백질 DNA 염기서열 비교. 1) Korean isolate, 2) NC\_001747, 3) D13954, 4) D13953, 5) X74789, 6) Y07496. 한국 분 리주는 D13954(Canadian isolate)와 염기서열이 거의 일치하여 단 한 염기만 차이를 보인다.

1)MSTVVVKGNVNGGVQQPRRRRRQSLRRRANRVQPVVMVTAPGQPRRRRRRRGGNRRSRR  
TGVPRGRGSSETF  
2)MSTVVVKGNVNGGVQQPRRRRRQSLRRRANRVQPVVMVTAPGQPRRRRRRRGGNRRSRR  
TGVPRGRGSSETF  
3)MSTVVVKGNVNGGVQQPRMRRRQSLRRRANRVQPVVMVTAPGQPRRRRRRRGGNRRSRR  
TGVPRGRGSSETF  
4)MSTVVVKGNVNGGVQQPRRRRRQSLRRRANRVQPVVMVTAPGQPRRRRRRRGGNRRSRR  
TGVPRGRGSSETF

5)MSTVVVKGNVNGGVQQPRRRRRQSLRRRANRVQPVVMVTAPGQPRRRRRRRGGNRRSRR  
TGVPRGRGSSETF

VFTKDNLVGNSQGSFTFGPSLSDCPAFKDGILKAYHEYKITSILLQFVSEASSTSSGSIAYELD  
PHCKVSSLQS  
VFTKDNLVGNSQGSFTFGPSLSDCPAFKDGILKAYHEYKITSILLQFVSEASSTSSGSIAYELD  
PHCKVSSLQS  
VFTKDNLVGNTQGSFTFGPSLSDCPAFKDGILKAYHEYKITSILLQFVSEASSTSSGSIAYELD  
PHCKVSSLQS  
VFTKDNLMGNSQGSFTFGPSLSDCPAFKDGILKAYHEYKITSILLQFVSEASSTSSGSIAYELD  
PHCKVSSLQS  
VFTKDNLMGNSQGSFTFGPSLSDCPAFKDGILKAYHEYKITSILLQFVSEASSTSSGSIAYELD  
PHCKVSSLQS

YVNKFQITKGGAKTYQARMINGVEWHDSSDQCRILWKGNGKSSDTAGSFRVTIRVALQNP  
YVNKFQITKGGAKTYQARMINGVEWHDSSDQCRILWKGNGKSSDPAGSFRVTIRVALQNP  
YVNKFQITKGGAKTYQARMINGVEWHDSSDQCRILWKGNGKSSDSAGSFRVTIKVALQNP  
YVNKFQITKGGAKTYQARMINGVEWHDSSDQCRILWKGNGKSSDTAGSFRVTIRVALQNP  
YVNQFQIPQGGAKTYQARMINGVEWHDSSDQCRILWKGNGKSSDTAGSFRVTIRVALQNP

그림 4. 감자엽권바이러스(PLRV)의 외피단백질 아미노산 서열 비교. 1) Korean isolate, 2) D13954, 3) NC\_001747, 4) X74789, 5) Y07496. 한국 분리주는 D13954 및 X74789와 각각 하나의 아미노산에서만 차이를 보였다.

## 2. 융합단백질 합성 및 분석

진딧물 소화관에서 CP의 리간드 역할과 안정성을 조사하기 위하여 CP와 리포터(GFP, Clontech Co.) 및 *Bacillus thuringiensis* 곤충독소 단백질이 융합된 단백질을 만들었다. 융합은 두 유전자 혹은 유전자 단편을 in frame으로 연결하였다. 이 때 제한효소를 이용할 수 있도록 프라이머들을 고안하고 PCR하였다. 각각의 PCR 산물을 적당한 제한효소 자리를 이용하여 연결한 후, 곤충 Baculovirus를 이용한 단백질 발현 시스템으로 융합단백질을 발현 시켰다. 발현된 융합단백질은 전기영동분석 등으로 확인하였다. 차후 이들 단백질을 진딧물에 섭식시킨 후, 진딧물 소화관에서의 영향과 변화를 분석하고자 한다.

### 1) GFP와 CP 유전자 융합 및 발현 분석

진딧물 소화관에서 CP의 안정성과 리간드 역할을 조사하기 위하여 CP와 GFP가 융합된 단백질을 만들었다. CP와 GFP 및 GFP와 CP를 pBacPAK8 (5.5 Kb) 벡터내에 in-frame으로 연결하여(그림 5) pBac8-CPGFP 및 pBac8-GFPCP를 만들고(그림 6), 이것을 각각 Baculovirus bApGOZA genomic DNA와 homologous recombination을 시켜서 ApCPGFP 및 ApGFPCP를 선발하였다(그림 7). 선발된 클론들을 각각 곤충세포 Sf9에 감염 발현시키고 형광현미경으로 관찰하고(그림 8) SDS-PAGE로 분석하였다(그림 9). 곤충세포에서 GFP만을 발현시켰을 때는 세포 전체에서 녹색형광이 관찰되었으나, CP+GFP 또는 GFP+CP의 형태로 발현시켰을 때는 녹색형광이 핵에 국한됨이 관찰되었다. 따라서 PLRV의 CP는 곤충세포의 핵으로 축적되는 특성을 갖는 것으로 추측된다.

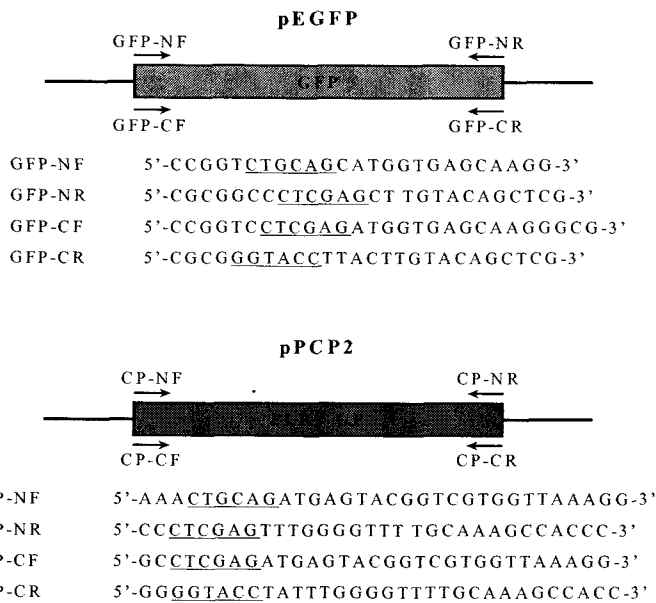


Fig 5. The synthetic oligonucleotides used for amplification of green fluorescent protein (GFP) and coat protein (CP) gene of potato leaf roll virus (PLRV).

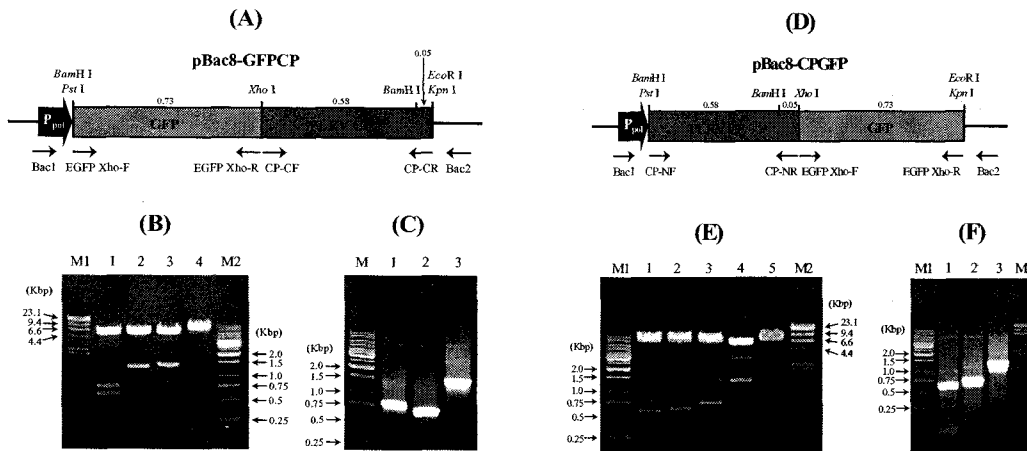


Fig 6. Construction analysis of the transfer vector pBac8-GFPCP and pBac8-CPGFP.

The fusion genes were introduced under the control of the polyhedrin gene promoter in pBac8-GFPCP. The constructs were analyzed by restriction enzymes and PCR. (A, D) Solid arrows indicate the positions of primers for PCR and the figures on the bar indicate the size of each fragment. (B) Lane : M1, Lambda DNA digested with *Hind* III; 1, *Bam*H I and *Xho* I; 2, *Bam*H I; 3, *Eco*R I and *Pst* I; 4, *Kpn* I; M2, 1 Kb DNA Ladder. (C) Lane : M, Lambda DNA digested with *Hind* III; 1, primer Bac1 and EGFP Xho-R; 2, primer CP-CF and Bac2; 3, primer Bac1 and Bac2. (E) Lane : M1, Lambda DNA digested with



*Hind* III; 1, *Bam*H I; 2, *Pst* I and *Xho* I; 3, *Eco*R I and *Xho* I; 4, *Eco*R I and *Pst* I; 5, *Kpn* I; M2, 1 Kb DNA Ladder. (F) Lane : M1, 1 Kb DNA Ladder; 1, primer Bac1 and CP-NR; 2, primer EGFP Xho-F and Bac2; 3, primer Bac1 and Bac2; M2, Lambda DNA digested with *Hind* III

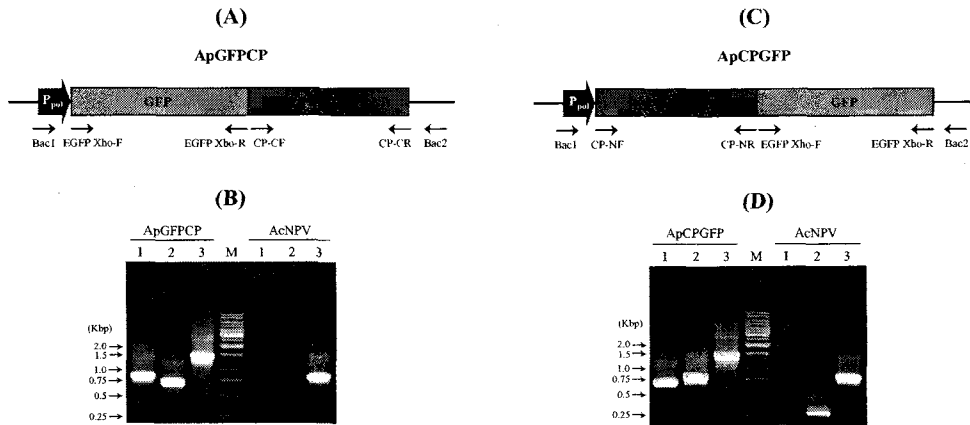


Fig 7. PCR analysis of the recombinant virus ApGFPCP and ApCPGF. Introduction of the fusion gene under the control of the polyhedrin gene promoter in ApGFPCP (A, C) was analyzed by PCR (B, D). (A, C) Solid arrows indicate primer positions used in PCR. (B) Lane : M, 1 Kb DNA Ladder; 1, primer Bac1 and EGFP Xho-R; 2, primer CP-CF and Bac2; 3, primer Bac1 and Bac2. (D) Lane : M, 1 Kb DNA Ladder; 1, primer Bac1 and CP-NR; 2, primer EGFP Xho-F and Bac2; 3, primer Bac1 and Bac2.

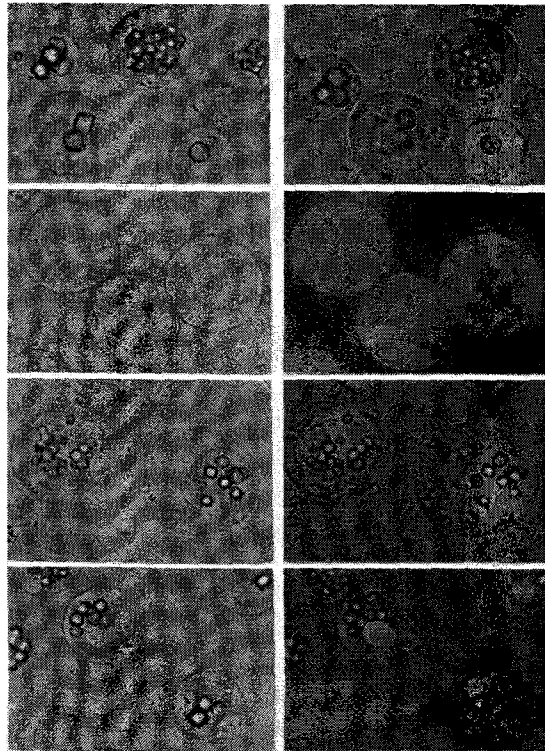


Fig 8. Microscopy of Sf9 cells infected with recombinant virus ApGFPCP and ApCPGFP. Sf9 cells infected with wild-type AcNPV, AcGFP, ApGFPCP and ApCPGFP (from the top to the bottom) were observed by light (Left panels) or light/fluorescent (Right panels) microscope (X 1,000).

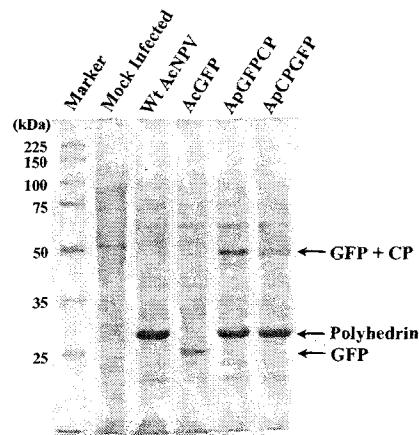


Fig 9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the fusion protein from recombinant virus ApGFPCP and ApCPGFP. Sf9 cells were mock infected or infected with wild-type AcNPV, AcGFP, ApGFPCP and ApCPGFP at MOI of 5 PFU per cell. Cells were collected at 3 days p.i. Total cellular lysates were subjected to 12% SDS-PAGE. Fusion protein, polyhedrin and GFP bands are indicated on the right of panel. Molecular weight standards were used as size marker.



*Hind* III. (F) PCR analysis. Lane : M, 1 Kb DNA Ladder; 1, primer Bac1 and K3un3; 2, primer CP-CF and Bac2; 3, primer Bac1 and Bac2.

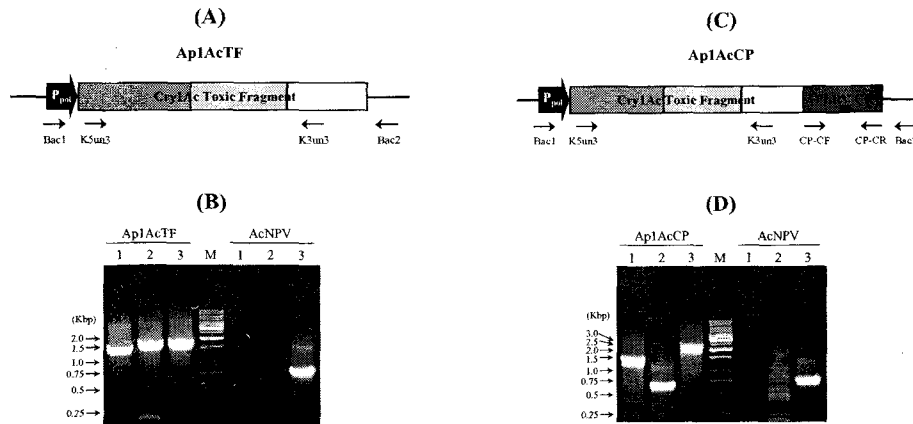


Fig 12. Constructs of the recombinant virus Ap1AcTF and Ap1AcCP. By recombination between the transfer vectors (pBac8-1Ac and pBac8-1AcCP) and bApGOZA genomic DNA, Ap1AcTF and Ap1AcCP were constructed. These recombinant viruses were analysed by PCR. (A, C) Solid arrows indicate the positions of primers used in PCR. (B) PCR products of Ap1AcTF. Lane : M, 1 Kb DNA Ladder; 1, primer Bac1 and K3un3; 2, primer K5un3 and Bac2; 3, primer Bac1 and Bac2. (B) PCR products of Ap1AcCP. Lane : M, 1 Kb DNA Ladder; 1, primer Bac1 and K3un3; 2, primer CP-CF and Bac2; 3, primer Bac1 and Bac2.

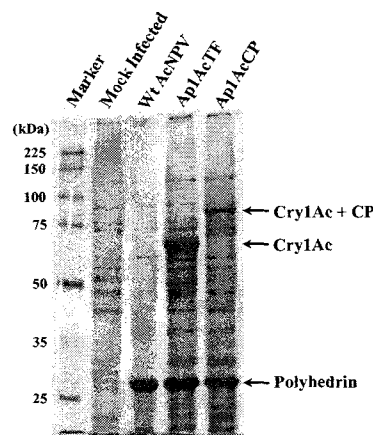


Fig 13. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the proteins from recombinant virus Ap1AcTF and Ap1AcCP. Hi5 cells were mock infected or infected with wild-type AcNPV, Ac1AcTF and Ap1AcCP at MOI of 5 PFU per cell. Cells were collected at 3 days p.i. Total

cellular lysates were subjected to 12% SDS-PAGE. Fusion protein, Cry1Ac toxic fragment and polyhedrin bands are indicated on the right of panel. Molecular weight standards were used as size marker.

### 3) Cry1Ac의 domain I과 PLRV CP 융합단백질 발현 및 분석

*Bacillus thuringiensis*의 *cry1Ac* 단백질에서 대상세포의 막에 구멍(pore)을 형성하는 domain I을 PLRV CP와 융합시킨 단백질의 진딧물 독성 여부를 검토하고자 하였다. 그림 14와 같이 domain I을 PCR 한 후, PLRV CP와 연결하여 transfer vector pBac8-1AcD1CP를 제작하고 확인하였다(그림 15). 이것을 baculovirus와 재조합 시키고 Ap1AcD1CP를 선발하고 확인한 후(그림 16) Hi5 세포에서 발현시키고 SDS-PAGE로 분석하였다(그림 17). 융합단백질은 예상되는 분자량을 보이며 다량 발현되었다. 이 때 *cry1Ac*의 domain I 만을 동일한 방법으로 발현시켜서 대조로 삼았다.

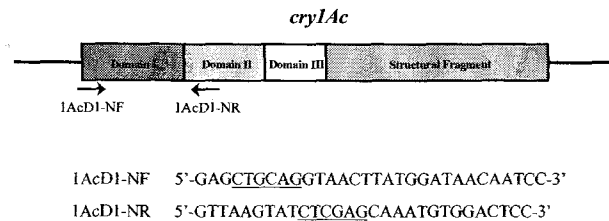


Fig 14. The synthetic oligonucleotides used for amplification of domain I fragment of *cry1Ac* *Bacillus thuringiensis* toxin protein gene.

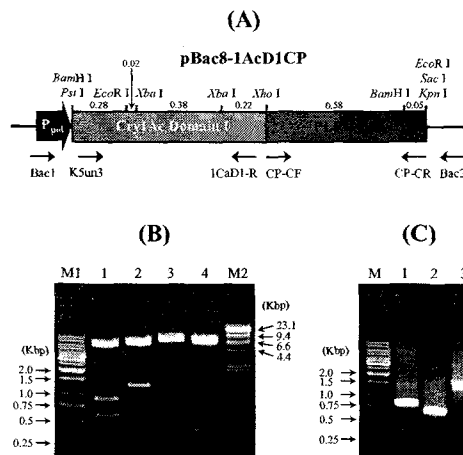


Fig 15. Construction analysis of the transfer vector pBac8-1AcD1CP.

Introduction of the fusion gene under the control of the polyhedrin gene promoter in pBac8-1AcD1CP (A) was analyzed by restriction endonuclease digestion pattern (B) and PCR (C). (A) Solid arrows indicate primer positions of PCR and the figures on the bar indicate the size of each fragment. (B) Lane : M1, 1 Kb DNA Ladder; 1, *Bam*H I and *Xho* I; 2, *Eco*R I; 3, *Kpn* I; 4, *Pst* I and *Xba* I; M2, Lambda DNA digested with *Hind* III. (C) Lane : M, 1 Kb DNA

Ladder; 1, primer Bac1 and 1CaD1-R; 2, primer CP-CF and Bac2; 3, primer Bac1 and Bac2.

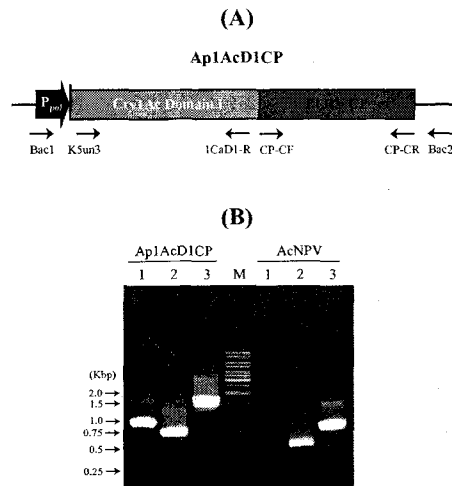


Fig 16. PCR analysis of the recombinant virus Ap1AcD1CP. Introduction of the fusion gene under the control of the polyhedrin gene promoter in Ap1AcD1CP (A) was analyzed by PCR (B). (A) Solid arrows indicate primer positions used in PCR. (B) Lane : M, 1 Kb DNA Ladder; 1, primer Bac1 and 1CaD1-R; 2, primer CP-CF and Bac2; 3, primer Bac1 and Bac2.

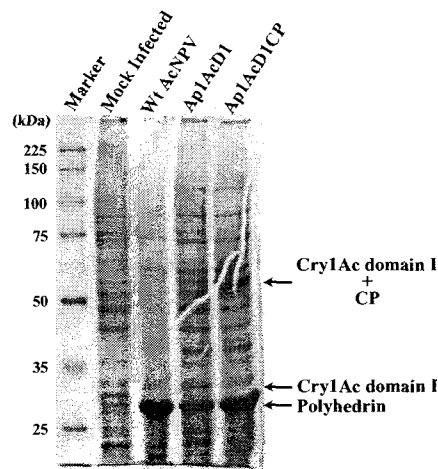


Fig 17. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the fusion protein from recombinant virus Ap1AcD1 and Ap1AcD1CP.

Hi5 cells were mock infected or infected with wild-type AcNPV, Ac1AcD1 and Ap1AcD1CP at MOI of 5 PFU per cell. Cells were collected at 3 days p.i. Total cellular lysates were subjected to 12% SDS-PAGE. Fusion protein, Cry1Ac domain I and polyhedrin bands are indicated on the right of panel. Molecular weight standards were used as size marker

## 엽록체 형질전환방법에 의한 살충성작물개발

### A. 벼 엽록체 형질전환 기술 개발

#### 1) 벼 엽록체 DNA로부터 엽록체 형질전환 운반체 제작

낙동벼로부터 total DNA를 분리 정제하여, 올리고 합성에 의해 제작된 primer OS16S(GGCGAACTCCAGGC TAATAATCT)와 OStrnI(AGCTCTCCCC-TTTTTCCGCCCGACTCT)을 이용하여 PCR을 실시하였다. 실시한 결과, 전기 영동상의 예상된 위치에 엽록체 border sequence DNA 절편이 나타났다(그림 1). 나타난 밴드의 DNA 절편을 정제한후 pCR2.1-TOPO 벡터에 PCR cloning을 하였다. cloning 된 엽록체 border 염기서열을 HincII와 PvuII를 처리한 2.5 kb단편을 pUC18 벡터의 PvuII 자리에 subcloning하였다.

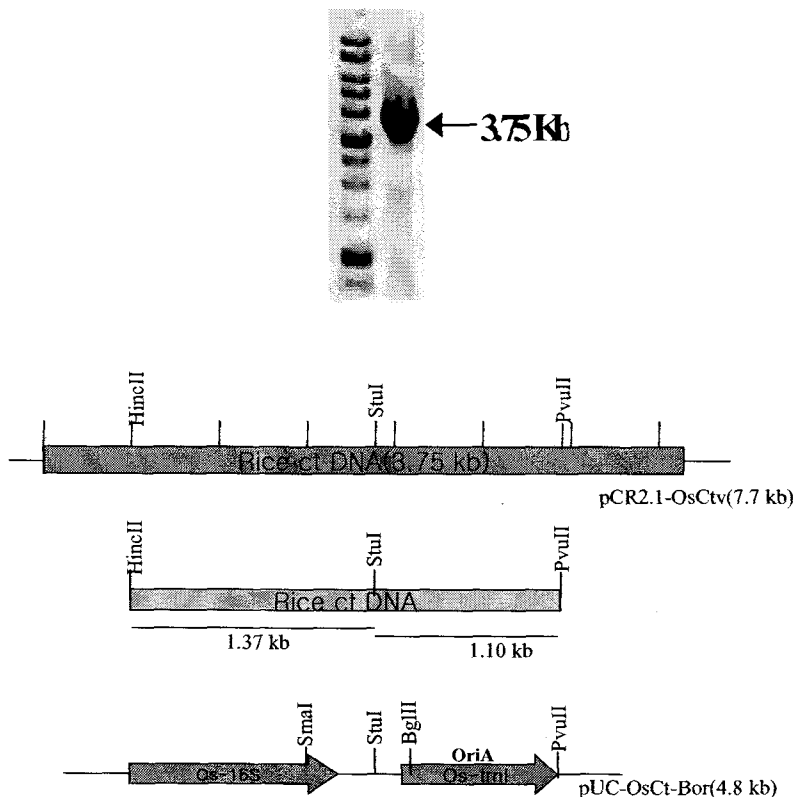


그림 1. PCR에 의해 벼 엽록체 border 염기서열 분리 및 cloning  
 lane 1: 1Kb ladder DNA(marker)  
 lane 2: PCR fragment

#### 2) 벼 엽록체 벡터작성을 위한 선발마커 카세트 제조합

가) Spectinomycin 선발마커 카세트(*Prrn-aadA-TpsbA*) 제조합

앞에서 subcloning한 pUC-OSct-Bor에 선발 마커 카세트를 재조합 하기 위해서 pUC-OSct-Bor를 StuI(Blunt end)으로 처리한후 탈 인산화 하여 gel elution 으로 그 벡터를 분리 정제 했다. 엽록체 발현용 선발마커 카세트인 Prn-aadA-TpsbA를 pPCR script-Cst에서 SmaI(Blunt end)으로 처리하여 Gel elution 하였으며 pUC-OSct-Bor와 ligation 하여 벼 엽록체 운반체인 pOS-CtV를 작성하였다.

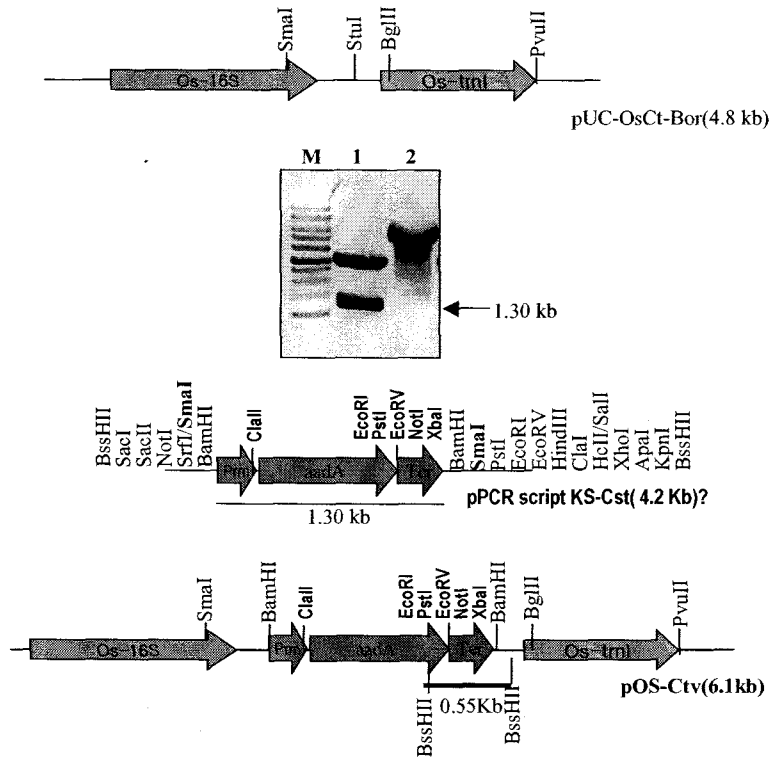


그림2. Spectinomycin 선발마커 카세트(*Prn-aadA-TpsbA*) 재조합

- M: 1 Kb ladder
- 1.pPCR script-Cst/SmaI
- 2.pUC-OSct-Bor/StuI

나) Hygromycin 선발마커 카세트(*Prn-hph-TpsbA*) 재조합  
 pOS-CtV운반체에 제한효소 ClaI 과 NotI으로 처리하여 이중 절단된 운반체에 pNeCtV역시 ClaI 과 NotI으로 처리해서 hph 유전자 단편을 gel elution으로 분리 정제하였으며 pOS-CtV 운반체와 hph 단편을 ligation 하여 pOS-CtVH를 작성하였다.



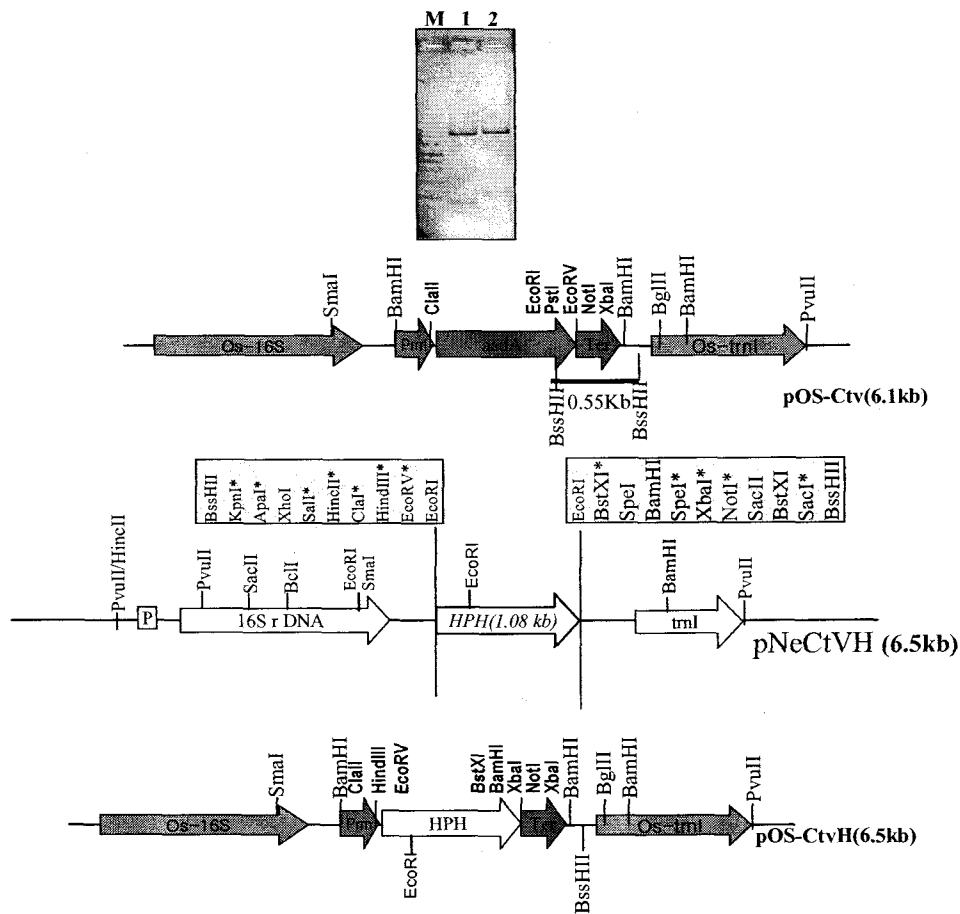


그림 3: Hygromycin 선발마커 카세트(*Prrn-hph-TpsbA*) 재조합.

M: 1 Kb ladder

1.pUC-OSct-Bor/ClaI/NotI

2.pNeCtVH/ClaI/NotI

### 3) 내냉성 관련 유전자 CSPA를 벼 엽록체 벡터에 재조합

pOS-CtVH 벡터에 내냉성 관련 유전자로 알려진 CSP(Cold shock protein)를 재조합 하였다. pOS-CtVH를 HindIII를 처리하고 탈 인산화하여 벡터를 준비하고 pKK223-3-CSP1을 HindIII처리하여 psbA 5'Utr 부분이 부착된 CSP를 준비된 pOS-CtVH 벡터와 ligation 하여 대장균 XL1-Blue MRF' Tc에 형질전환하여 얻은 형질전환 대장균으로부터 재조합된 pOS-CtVH-CSPA를 분리 정제하여 벼 엽록체에 사용 하였다.

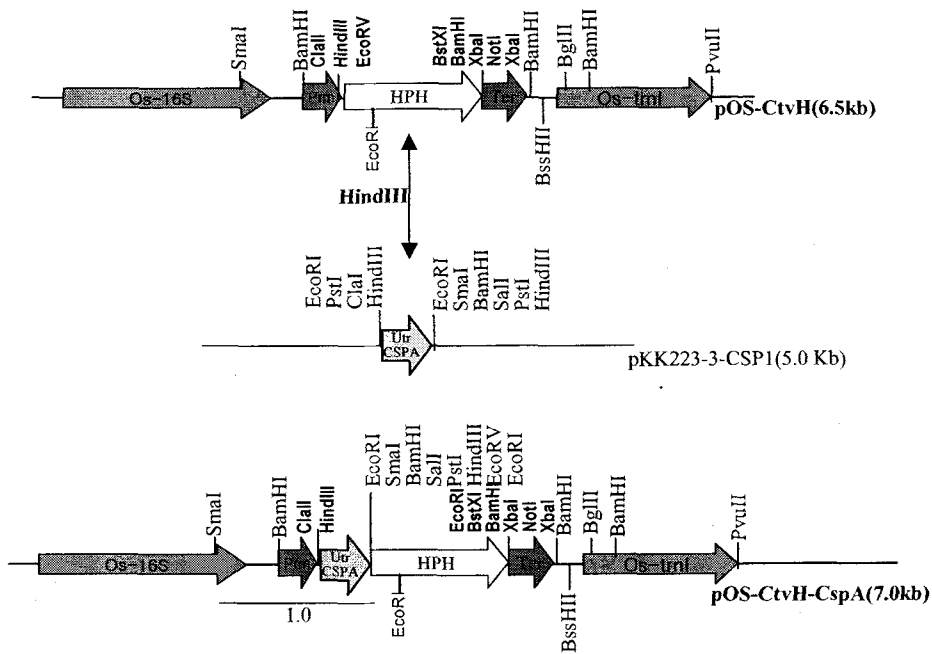


그림 4: CSPA 유전자의 pOS-CtVH 운반체내 재조합

4) 살충 독소 유전자 CryIIAI 유전자의 벼 엽록체 벡터에 재조합 pOS-CtVH-CspA의 XbaI 자리에 CryIIAI XbaI 단편을 삽입하여 pOS-CtVH-CspA-CryIIA를 재조합 하였다. 재조합된 운반체를 BglII를 처리하여 1.3 kb 단편의 생성으로 삽입 방향의 정방향을 확인했고 XbaI을 처리하여 2.2kb의 cryIIAI 유전자 삽입을 확인하였다.

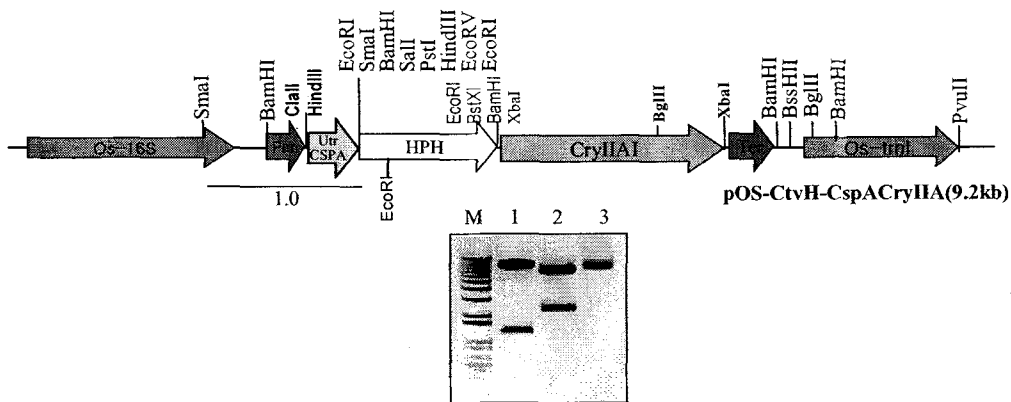


그림 5: CryIIAI 유전자의 pOS-CtVH-CspA 운반체내 재조합

- M: 1 Kb ladder
- 1.pOS-CtVH-CspACryIIA/BglII
- 2.pOS-CtVH-CspACryIIA/XbaI
- 3.pOS-CtVH-CspACryIIA/uncut

5) 낙동벼 callus의 항생제 내성 테스트

벼 callus를 형질전환 후 선발마커에 의한 전환 callus를 구별하기 위해 항생제 spectinomycin 과 streptomycin 두 종류를 벼 재분화 배지 2N6 배지에 농도별로 첨가하여 치사 농도를 측정해 보았다. 저항성유전자로 사용한 *aadA* 유전자는 spectinomycin 과 streptomycin 에 저항성을 나타내는 유전자이다. 시험결과 spectinomycin은 100 $\mu$ g/ml 농도에서도 어느정도 callus의 분열을 억제하는 것으로 나타났고 담배 작물에 널리 사용하고 있는 spectinomycin에서는 callus 분열을 억제하지 못해 벼 callus 에서는 streptomycin 이 선발배지에 첨가하는 것이 적합한 것으로 나타났다.

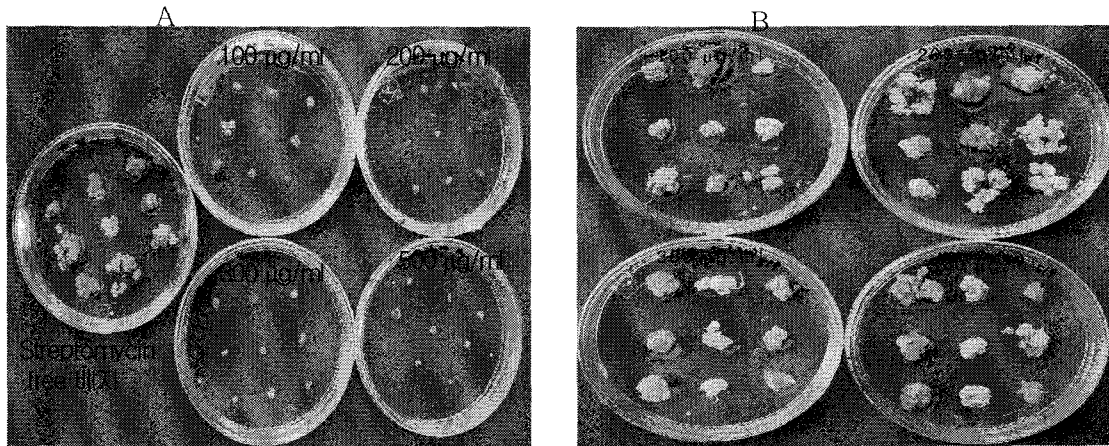


그림 6: 낙동벼 callus 항생제 내성 검정

A: streptomycin 농도별 처리한 2N6 배지에서 벼 callus 분열 양상  
 B: spectinomycin 농도별 처리한 2N6 배지에서 벼 callus 분열 양상

6) 유전자 총(Bioliistic)을 이용한 벼 엽록체형질전환

낙동벼 callus로부터 육안으로 embryogenic callus를 수집하여 그림7의 A처럼 2N6배지에 치상하여 암조건에서 2일 배양한후 Gold Particle 0.6 micron 에 코팅된 pOS-CtVH-CSP를 형질전환하였다. 전환 후 3주 간격으로 선발배지 2N6(+Hyg 30 $\mu$ g/ml)에서 계대 하면서 배양했다. 6주 후 callus 분열이 왕성한 callus들을 그림7의 B처럼 발견 할 수 있었다.

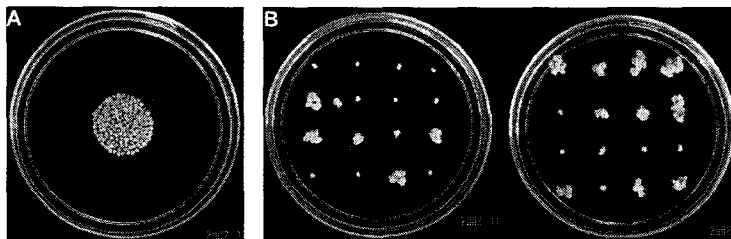


그림 7: 형질전환 낙동벼 callus의 선발배지 상에서의 배양

A: 유전자총 발사 전 embryogenic callus의 수집  
 B: 유전자총 발사 후 선발 배지에서 callus 분열양상(6주)

### 7) 벼 엽록체 형질전환 세포의 도입 유전자 확인

항생제 hygromycin에 저항성을 나타내는 벼 callus로부터 total DNA를 분리하여 hph 유전자내에 있는 primer를 이용하여 선발마커 유전자로 사용한 hph(hygromycin 저항성) 유전자의 유무를 확인하였다. 5번 callus에서 positive 밴드가 나타났다.

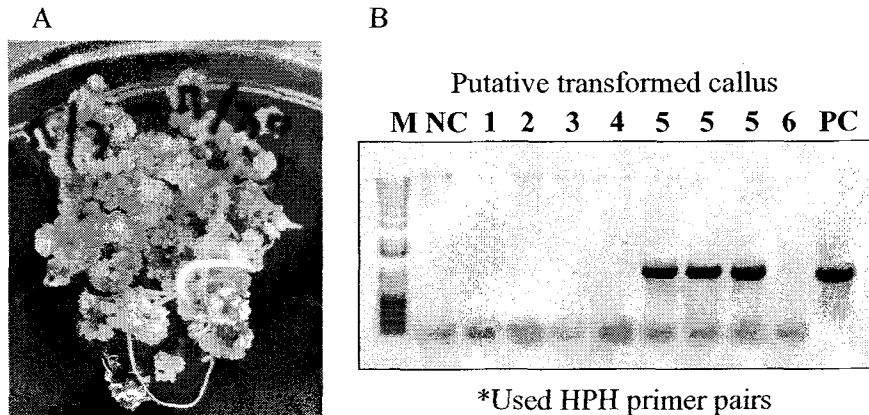


그림 8: 저항성 벼 callus로부터 도입유전자 hph 확인

A: 저항성 벼 callus로부터 재분화 개체 발생중

B: PCR에 의한 hph 유전자 삽입 밴드의 agarose 전기영동 사진

### B 토마토 엽록체 형질전환

#### 재료 및 방법

#### 식물재료 및 살균

토마토 모모타로(다끼종묘) 종자를 70% 에탄올로 1분간 침지한 후 1.2% NaOCl로 15분간 표면살균한 후 멸균수로 3회 수세하였다. 멸균된 토마토 종자를 30 g/L sucrose 와 3 g/L phytigel (Sigma) 가 첨가된 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지에 치상하였다.

#### 식물체 재분화

파종 10~11일 후 발아한 유식물체의 자엽 양쪽 끝을 잘라서 0~1.0 mg/L BAP와 0~1.0 mg/L IAA가 혼용처리된 MS배지에 치상하여 8주간 배양한 다음 줄기 형성율을 조사하였다. 줄기 형성율은 전체 치상된 절편 중 줄기가 유도된 절편 수를 백분율로 계산하였다. 배지는 MS 기본배지에 30 g/L sucrose와 3 g/L phytigel를 첨가한 후 pH 5.8로 조정하였으며, 배양은 온도 23 ± 2°C, 16h 광주기하의 배양실에서 실시하였다.

## 토마토 엽록체 형질전환 벡터 제작

토마토 엽록체 형질전환용 벡터 pKRT22-A는 토마토 엽록체 게놈의 *rrn16~trnA* (103,993 n.t.~106,182 n.t., Z00044, EMBL Nucleotide Sequence Database) 부위를 PCR 반응을 통하여 증폭한 후 pCR2.1-topo cloning kit (Invitrogen)을 이용하여 pCR2.1-topo vector로 도입되었다 (Wakasugi, 1998). Daniell 등 (1998)의 방법을 이용하여 pUC18에 삽입한 후, 16S rRNA promoter와 *psbA* 3' terminator 사이에 *aadA* (aminoglycoside 3"- adenylyltransferase) 유전자가 들어있는 cassette를 *Sma* I으로 절단한 후 토마토 엽록체 flanking region내 존재하는 *Pvu* II (105,331 n.t.) 를 이용하여 벡터를 구축하였다. PCR primer는 forward primer (5'-AAA ACC CGT CCT CAG TTC GGA TTG CC-3') 와 reverse primer (5'-CAC GAG TTG GAG ATA AGC GG-3')를 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 반응 후, 94°C 30초, 58.5°C 30초, 72°C 1분 30초간 30회 반복 실시하였다. 얻어진 PCR 산물은 0.5X TAE agarose gel을 이용하여 전기영동하였다. pKRT22-A의 토마토 엽록체내 발현여부를 조사하기 위해 wild type pEGFP vector(clontech)를 *Xba* I으로 *gfp* 유전자를 분리한 후 토마토 엽록체 형질전환 벡터 pKRT22-A에 cloning 하여 pKRT22-AG를 작성하였다 (Figure 1). Bt 유전자 함유 엽록체 형질전환 벡터를 작성하기 위해 pKRT22-A의 *Cla* I 과 *Not* I 을 이용하여 *cryIII A* 유전자를 삽입하여 pKRT22A-CryIII A 벡터를 작성하였다 (Figure 1).

## 토마토 엽록체 flanking region 염기서열 분석

토마토 엽록체 flanking region이 삽입된 pCR2.1-topo vector를 정제한 후, dideoxynucleotide chain termination 방법 (ABI prism dye terminator) 으로 PCR 반응을 실시하였다. PCR primer는 M13 forward primer와 M13 reverse primer를 사용하였다. 염기서열은 automatic DNA sequencer (ABI9700) 를 이용하였다. 결정된 염기서열은 DNASTar 소프트웨어 프로그램을 이용하여 담배 (*Nicotiana tabacum*) 엽록체 게놈과 비교분석하였다.

## 유전자총을 이용한 엽록체 형질전환

GFP가 들어있는 토마토 엽록체 형질전환 벡터인 pKRT22-AG를 1 $\mu$ g/bombardment 가 되도록 농도를 조절한 후 0.6 $\mu$ m gold particle로 코팅하였다. Biolistic device PDS1000/He (bio-rad) 를 사용하였으며, target distance를 9cm가 되도록 조정 한 후 1,100psi에서 bombardment를 하였다. CLSM(Confocal laser scanning microscopy)을 이용한 토마토 엽록체내 GFP 발현 관찰 Bombardment를 실시한 후 자엽을 재분화배지에 치상하여 암상태에서 배양한 후 16시간, 40시간, 64시간후에 엽록체 내에서 GFP 발현을 관찰하였다. 엽록체 관찰방법으로는 핀셋으로 잎의 뒷면을 얇게 벗

겨서 기공세포내 엽록체를 관찰하였다. 공초점현미경(CLSM)은 Olympus에서 구입하였고, GFP 발현을 관찰하고자 blue light(488nm)을 이용하였으며, dye(filter)는 GFP와 Rodamin을 사용하였다. GFP 발현을 관찰하고자 CLSM의 green channel에서 대조구(비형질전환체)의 자가형광이 zero가 되도록 PMT(Photomultiplier tube)를 680이 되도록 조정한 후 형질전환체의 GFP 발현을 관찰하였다.

## 핵 형질전환

핵 형질전환을 위하여 pBINAR-btt(한림대 분양)를 freeze-thaw 방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404와 EHA105에 도입하였다 (Figure ). *Agrobacterium* 은 kanamycin 100 mg/L가 첨가된 YEP 액체배지에 접종하여 28°C에서 250rpm 으로 진탕배양하면서 O.D.<sub>600</sub> 1.2가 되도록 배양한 후 MS액체배지로  $5 \times 10^8$  ml/cell이 되도록 조절하였다. 자엽과 하배축을 절단하여 24시간 암상태에서 전처리 한 후, 준비된 배양액에 10분간 접종한 다음, 멸균된 여과지에서 여분의 *Agrobacterium*을 제거한 후 재분화배지(MS 기본배지 + IAA 0.1 mg/L + BAP 0.5 mg/L)로 이식하였다. 재분화배지로 이식된 절편체를 25°C에서 2일간 암배양 한 다음, 멸균수로 세척한 후 cefotaxime 250 mg/L와 carbenicillin 500 mg/L 와 kanamycin 150 mg/L 가 첨가된 배지로 이식하여 3주간격으로 계대배양을 하며 선발배지에서 재분화한 개체를 선발하여 MS 배지에 이식하여 발근시킨 후 온실로 이식하였다.

## Southern blot 분석

어린 잎 1g에서 genomic DNA를 추출하였다. Southern blot 분석을 위하여 20  $\mu$ g의 genomic DNA를 제한효소 *BamH* I 100unit를 사용하여 절단한 후 0.8% agarose gel에 전기영동하였다. Gel을 0.25 N HCl에 10분간 처리하여 denature를 시킨 후 0.4 N NaOH 용액에 의한 upward capillary 방식을 이용하여 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham)에 DNA를 전이시켰다. 전이가 완료된 후 UV-cross linker를 이용하여 1200 mJ/cm<sup>2</sup>의 UV를 조사하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. Membrane을 1시간 pre-hybridization 시킨 후 표지된 탐침 DNA와 18~20시간 동안 65°C에서 혼성화 반응을 수행하였다. 탐침 DNA는 *EcoR* I을 사용하여 650bp의 btt(*cryIIIA*) 유전자 일부를 사용하였으며 Ready-to-go labelling system (Amersham)을 이용하여 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP로 표지하였다. 혼성화 반응 후 membrane을 65°C에서 2×SSC, 0.1% SDS용액으로 10분, 1×SSC, 0.1% SDS용액으로 10분, 0.2×SSC, 0.1% SDS용액으로 20분 세척한 후 -70°C에서 4~7일간 X-ray film에 노출시켜 확인하였다.

## 결과 및 고찰

## IAA, BAP 조성에 따른 식물체 재분화

토마토 자엽으로부터 녹색을 띄는 캘러스 형성은 1~2주에 이루어져서 일반적으로 3~4주정도에 캘러스로부터 혹은 자엽 절편체에서 직접적으로 줄기가 형성되어 신장되는 것을 관찰할 수 있었다. 토마토 자엽으로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 생장조절제인 IAA와 BAP의 적정 농도를 조사한 결과 BAP가 첨가되지 않은 배지에서는 줄기형성이 관찰되지 않았으며, BAP 0.5 mg/L 처리구에서 비교적 양호한 줄기형성이 이루어졌고, 특히 BAP 0.5 mg/L와 IAA 0.1 mg/L 혼용처리구에서 줄기형성율이 99%로 가장 양호하였다(Table 1).

## 토마토 엽록체 게놈 flanking sequence

Homologous recombination에 의한 엽록체 형질전환 메카니즘 (Figure 2)에 의해 토마토 엽록체 형질전환 벡터 구축시 필요한 토마토 엽록체 게놈 flanking region을 분리하여 염기서열을 결정하고 해당부위의 담배 엽록체 DNA sequence와 비교 분석하였다 (Staub and Maliga 1992; Maliga 1993; Maliga et al. 1994; Wakasugi, 1998; Kavanagh et al. 1999) (Figure 3). 표 2를 살펴보면 16S rRNA와 tRNA(*trnI* and *trnA*) 유전자 sequence는 토마토와 담배 모두 동일하였으며 단, *trnI* 유전자 내에 존재하는 intron의 크기가 토마토에서는 723bp, 담배에서는 707bp였으며, *trnA* 유전자 내에 존재하는 intron의 크기는 토마토가 809bp, 담배에서는 709bp로 토마토 엽록체 DNA의 intron의 크기가 담배보다 큼을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 Palmer 등(1987, 1988)이 보고한 바와 같이 엽록체 DNA sequence 간의 homology가 높았으며, 특히 structural gene의 homology가 매우 높다는 것을 알 수 있었다.

Table 1. Effect of IAA and BAP on shoot induction from cotyledon of tomato (*Lycopersicon esculentum*)

BAP (mg/L)	IAA (mg/L)			
	0	0.1	0.5	1.0
0	0	0	0	0
0.5	94	99	88	88
1.0	74	30	62	33

\* Basal medium: MS + 30g/L Sucrose + 3g/L Phytigel

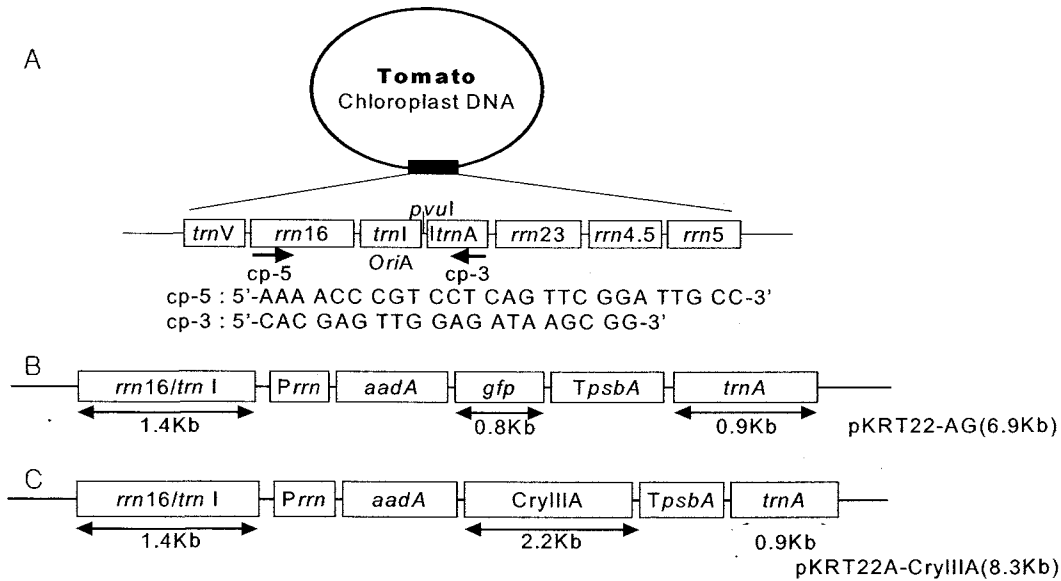


Figure 1. Construction of tomato chloroplast expression vector. (A) Chloroplast border region for homologous recombination and primers for chloroplast border region of *Lycopersicon esculentum*. The targeting region is inserted into *pvul* site of chloroplast border sequences. (B) The pKRT22-AG transformation vector. The spectinomycin resistance (*aadA*) and *gfp* gene and chloroplast genes *rrn16*, *trnI* and *trnA* are shown. (C) Diagram of the insertion cassette of the transformation construct, pKRT22A-CryIIIA.

### GFP를 이용한 엽록체 형질전환 transient assay

엽록체 형질전환 벡터 pKRT22-AG를 토마토 자엽에 bombardment 한 후 16시간, 40시간, 64시간 배양 후 관찰 한 결과 16시간과 40시간배양 후

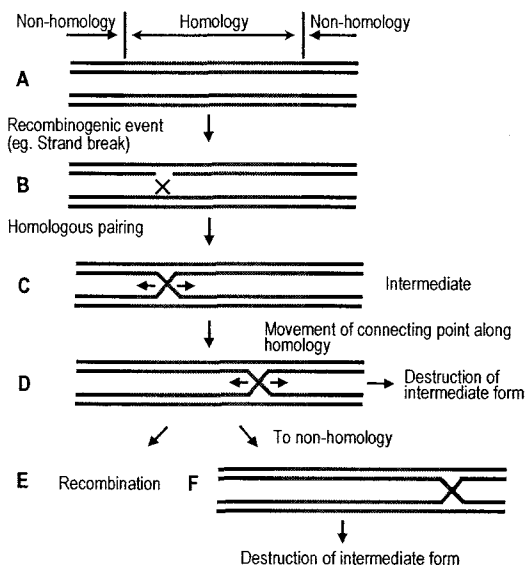


Figure 2. Likely steps of homologous recombination (Fujitani et. al. 1999) (A) A region of homology between two DNA duplexes. (B) A recombination event in one of them causes their homologous pairing. (C) The homologous regions are connected at a point. A Holliday junction is one example of the connecting point, but the molecular details need not be specified. (D) The connecting point of the reaction intermediate moves along the homology. During this movement, it may be somehow destroyed, or (E) it may be resolved to a recombinant. (F) When the connecting point encounters the non-homology, the intermediate is somehow destroyed.



Tomato	AAAACCCGTCCTCAGTTCGGATTGCGAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAATCGCCGGTCAGCCAT	80
Tobacco	AAAACCCGTCCTCAGTTCGGATTGCGAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAATCGCCGGTCAGCCAT	80
Tomato	ACGGCGGTGAATTTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACTATGGGAGCTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACCT	160
Tobacco	ACGGCGGTGAATTTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACTATGGGAGCTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACCT	160
Tomato	TAACCCGAAGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTAGTGACTGGAGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGACTGGAAGGTGC	240
Tobacco	TAACCCGAAGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTAGTGACTGGAGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGACTGGAAGGTGC	240
Tomato	GGCTGGATCACCTCCTTTTCAGGGAGAGCTAATGCTTGTGGGTATTTTGGTTTGACACTGCTTTCACACCCCCAAAAAAA	320
Tobacco	GGCTGGATCACCTCCTTTTCAGGGAGAGCTAATGCTTGTGGGTATTTTGGTTTGACACTGCTTTCACACCCCCAAAAAAA	320
Tomato	AGAAGGGAGCTACGCTGAGTTAAACTTGGAGATGGAAGTCTTCTTCTTCTCGACGGTGAAGTAAAGACCAAGCTCAT	400
Tobacco	AGAAGGGAGCTACGCTGAGTTAAACTTGGAGATGGAAGTCTTCTTCTTCTCGACGGTGAAGTAAAGACCAAGCTCAT	400
Tomato	GAGCTTATTATCCTAGGTCCGAAACAAGTTGATAGGACCCCTTTTTTACGTCCTATGTTCCCCCGTGGCGACATGG	480
Tobacco	GAGCTTATTATCCTAGGTCCGAAACAAGTTGATAGGACCCCTTTTTTACGTCCTATGTTCCCCCGTGGCGACATGG	480
Tomato	GGGCGAAAAAGGAAAGAGAGGGATGGGGTTTCTCTCGCTTTTGGCATAGCGGGCCCCAGTGGGAGGCTCGCACGACGG	560
Tobacco	GGGCGAAAAAGGAAAGAGAGGGATGGGGTTTCTCTCGCTTTTGGCATAGCGGGCCCCAGTGGGAGGCTCGCACGACGG	560
Tomato	GCTATTAGCTCAGTGGTAGAGCGGCCCTGATAATTGCGTCGTTGTGCCTGGGCTGTGAGGGCTCTCAGCCACATGGGA	640
Tobacco	GCTATTAGCTCAGTGGTAGAGCGGCCCTGATAATTGCGTCGTTGTGCCTGGGCTGTGAGGGCTCTCAGCCACATGGGA	639
Tomato	TAGTTCAATGTGCTCATCGGCGCCTGACCCTGAGATGTTGGATCATCCAAGGCACATTAGCATGGCGTACTCCTCCTGTT	720
Tobacco	TAGTTCAATGTGCTCATCGGCGCCTGACCCTGAGATGTTGGATCATCCAAGGCACATTAGCATGGCGTACTCCTCCTGTT	719
Tomato	GAACCGGGGTTTGAACCAAACTCCTCCTCAGGAGGATAGATGGGGCGATTCCGGTGAAGTCCAATGTAGATCCAACCTT	800
Tobacco	GAACCGGGGTTTGAACCAAACTCCTCCTCAGGAGGATAGATGGGGCGATTCCGGTGAAGTCCAATGTAGATCCAACCTT	799
Tomato	CGATTCACCTCGTGGGATCCGGGCGGTCCGGGGGGGACCACCAGGCTCCTCTCTTCTCGAGAATCCATACATCCCTTATC	880
Tobacco	CGATTCACCTCGTGGGATCCGGGCGGTCCGGGGGGGACCACCAGGCTCCTCTCTTCTCGAGAATCCATACATCCCTTATC	879
Tomato	AGTGTATGGACAGCTATCTCTCGAGCACAGGTTTAGTTAGTTCGGCCCTCAATGGGAAAAATAAATGGAGCACCTAACACGCA	960
Tobacco	AGTGTATGGACAGCTATCTCTCGAGCACAGGTTTAG-----CAATGGGAAAAATAAATGGAGCACCTAACACGCA	950
Tomato	TCTTCACAGACCAAGAAGTACGAGATCACCCCTTTCATTCTGGGGTGACGGAGGGATCGTACCATTGAGCCGTTTTTTT	1040
Tobacco	TCTTCACAGACCAAGAAGTACGAGATCACCCCTTTCATTCTGGGGTGACGGAGGGATCGTACCATTGAGCCGTTTTTTT	1030
Tomato	CTTGACTCGAAATCGAAATGGGAGCAGTTTGA AAAAGGATCTTAGAGTGTCTAGGGTTGGGCCAGGAGGGTCTCTTAAAC	1120
Tobacco	CTTGACTCGAAAT-----GGGAGCAGTTTGA AAAAGGATCTTAGAGTGTCTAGGGTTGGGCCAGGAGGGTCTCTTAAAC	1104
Tomato	GCCTTCCTTTTTCTTCTCATCGGAGTTATTCACAAAGACTTCCAGGGTAAGGAAGAAAGGGGGGAACAAGCACACTTG	1200
Tobacco	GCCTTCCTTTTTCTTCTCATCGGAGTTATTCACAAAGACTTCCAGGGTAAGGAAGAAAGGGGGG--AACAAAGCACACTTG	1183
Tomato	GAGAGCGCAGTACAACCGAGAGTTGTATGCTGCGTTCGGGAAGGATGAATCGCTCCCGAAAGGGAATCTATTGATTCTCT	1280
Tobacco	GAGAGCGCAGTACAACCGAGAGTTGTATGCTGCGTTCGGGAAGGATGAATCGCTCCCGAAAGGGAATCTATTGATTCTCT	1263
Tomato	CCCAATTGGTTGGACCGTAGGTGCGATGATTTACTTACGGGGCAGGTTCTCTGGTTCAAGTCCAGGATGGCCAGCTGCG	1360
Tobacco	CCCAATTGGTTGGACCGTAGGTGCGATGATTTACTTACGGGGCAGGTTCTCTGGTTCAAGTCCAGGATGGCCAGCTGCG	1343
Tomato	CCAGGGAAAGAATAGAAAGACATCTGACTACTTTCATGCATGCTCCACTTGGCTCGGGGGGATATAGCTCAGTTGGTAG	1440
Tobacco	CCAGGGAAAGAATAGAAAGACATCTGACTACTTTCATGCATGCTCCACTTGGCTCGGGGGGATATAGCTCAGTTGGTAG	1423
Tomato	AGCTCCGCTCTTGAATTTGGGTCGTTGCGATTACGGGTTGGATGCTAATTGTCCAGGCGGTAATGATAGTATCTTGTAC	1520
Tobacco	AGCTCCGCTCTTGAATTTGGGTCGTTGCGATTACGGGTTGGATGCTAATTGTCCAGGCGGTAATGATAGTATCTTGTAC	1503
Tomato	CTGAACCGGTGGCTCACTTTTTCTAAGTAATGGGGAAGAGGACCGAAACGTGCCACTGAAAGACTCTACTGAGACAAAGA	1600
Tobacco	CTGAACCGGTGGCTCACTTTTTCTAAGTAATGGGGAAGAGGACCGAAACGTGCCACTGAAAGACTCTACTGAGACAAAGA	1583
Tomato	TGGGCTGTCAAGAACGTAGAGGAGGTAGGATGGGCGATTGGTCAGATCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTTGGAG	1680
Tobacco	TGGGCTGTCAAGAACGTAGAGGAGGTAGGATGGGCGATTGGTCAGATCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTTGGAG	1663
Tomato	TCGGGGCTCTCCAGGGTTCCCTCATCTGAGATCTCTGGGGAAGAGGATCAAGTTGGCCCTTGCGAACAGCTTGTATGCA	1760
Tobacco	TCGGGGCTCTCCAGGGTTCCCTCATCTGAGATCTCTGGGGAAGAGGATCAAGTTGGCCCTTGCGAACAGCTTGTATGCA	1743
Tomato	CTATCTCCCTTCAACCTTTGAGCGAAATGCGGCAAAAGAAAAGGAAGAAAATCCATGGACCGACCCCATCATCTCCAC	1840
Tobacco	CTATCTCCCTTCAACCTTTGAGCGAAATGCGGCAAAAGAAAAGGAAGAAAATCCATGGACCGACCCCATCATCTCCAC	1823
Tomato	CCCGTAGGAACTACGAGATCACCCCAAGGACGCCCTTCGGCATCCAGGGGTACGGACCGACCATAGAACCCTGTTCAATA	1920
Tobacco	CCCGTAGGAACTACGAGATCACCCCAAGGACGCCCTTCGGCATCCAGGGGTACGGACCGACCATAGAACCCTGTTCAATA	1903
Tomato	AGTGGAAACGCATTAGCTGTCCGCTCTCAGGTTGGGACGTAGGGTCCGGAGAGGGCAATGACTATTCTTAAACCAGCG	2000
Tobacco	AGTGGAAACGCATTAGCTGTCCGCTCTCAGGTTGGGACGTAGGGTCCGGAGAGGGCAATGACTATTCTT-----	1973
Tomato	TTCTTAAGACCAAAGAGTCGGGCGGAAGGGGGGAAAGCCCTCCGTTCTCTGTAGTTGGATCCTCCGGAACC	2080
Tobacco	TTCTTAAGACCAAAGAGTCGGGCGGAAGGGGGGAAAGCCCTCCGTTCTCTGTAGTTGGATCCTCCGGAACC	
Tomato	ACAAGAATCCTTAGTTAGAATGGGATTCCAACCTCAGCACCTTTTGGTGGATTTTGGAGAAGGTTGCTCTTTGGAGAGC	2160
Tobacco	ACAAGAATCCTTAGTTAGAATGGGATTCCAACCTCAGCACCTTTTGGTGGATTTTGGAGAAGGTTGCTCTTTGGAGAGC	2041
Tomato	ACAGTACGATGAAAGTTGTAAGCTGTGTTCCGGGGGGGAGTTATTGCTATCGTTGGCCTCTATGGTAGAATCAGTCGGGG	2240
Tobacco	ACAGTACGATGAAAGTTGTAAGCTGTGTTCCGGGGGGGAGTTATTGCTATCGTTGGCCTCTATGGTAGAATCAGTCGGGG	2121
Tomato	GACCTGAGAGGGCGGTGGTTTACCCTGCGGGGATGTACGCGGTTTCGAGTCCGCTTATCTCCAACCTCGTG	2310
Tobacco	GACCTGAGAGGGCGGTGGTTTACCCTGCGGGGATGTACGCGGTTTCGAGTCCGCTTATCTCCAACCTCGTG	2190

Figure 3. Alignment of nucleotide sequences of flanking region used for plastid transformation vector from the plastid DNAs of *L. esculentum* and *N. tabaccum*. A bold indicates that a nucleotide is only present in *L. esculentum*. A dash indicates a nucleotide that is absent from a sequence. The *N. tabaccum* plastid DNA sequences reported in this figure have been deposited in the EMBL nucleotide sequence databases with the accession number Z00044.

Table 2. The analysis of comparison tomato (*L. esculentum*) with tobacco (*N. tabaccum*) plastid DNA. Portions of *N. tabaccum* nucleotide sequence are shown from 103,993 to 106,182.

Gene	Product/Comment	Size(bp)	
		<i>L. esculentum</i>	<i>N. tabaccum</i>
<i>rrn16</i>	3'-16S rRNA	258	258
<i>trnI</i>	tRNA-Ile(GAU) 5'exon	77	77
	Intron	723	707
	3'exon	35	35
<i>OriA</i>	Replication origin region	82	82
<i>trnA</i>	tRNA-Ala(UGC)5'exon	38	38
	Intron	809	709
	3'exon	35	35

기공세포의 엽록체내에 GFP 발현을 관찰할 수 있었으며, 64시간 배양 후 GFP 발현 관찰은 다소 어려웠다(Figure 4). 양파에서의 GFP transient assay는 핵 형질전환 후 16-18시간이 지나면 발현관찰이 가장 용이하고 이후에는 GFP 발현이 약해지는 것을 관찰할 수 있었으며, 벼에서의 핵 형질전환시 GFP transient assay는 48시간 후에 관찰이 가능하다고 보고된 바 있다(Schenk et. al. 1998). 따라서 본 실험결과를 통하여 pKRT22-AG가 토마토 엽록체내에서 정상적으로 작동함을 알 수 있었으며, 금후 토마토 엽록체 형질전환 기본벡터로 pKRT22-A의 유용성을 알 수 있었다.

#### 핵 형질전환

아그로박테리움 균주에 따른 핵 형질전환에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pBINAR-btt 함유 *Agrobacterium* LBA4404와 EHA105를 토마토 자엽에 감염시켜 형질전환을 실시하였다(Figure 5). 전체 치상수 750개체 중 52개의 항생제 저항성 개체를 선발할 수 있었다(Table 3).

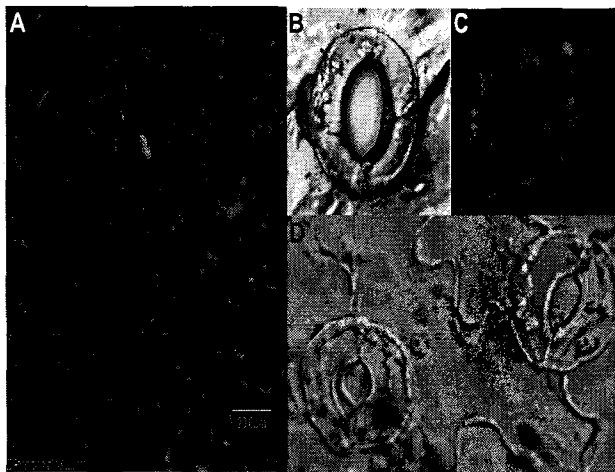


Figure 4. CLSM images of chloroplast expressing GFP of pKRT22-AG on epidermis cell in tomato. (A) Three-dimensional distribution shown is composed of 91 images taken at 0.2 μm intervals along the optical z-axis. Magnification is 40X, zoom size is 2.5 and PMT voltage ch1 (green channel) is 680. (B) Guard cells of leaf (0.2 μm/62 images). Merged images of green and DIC channels. Magnification is 40X, zoom size is 3 and PMT voltage ch1 is 675. (C) GFP fluorescence of chloroplast of guard cell at green channel. PMT voltage ch1 is 675. (D) Red chlorophyll autofluorescence (red channel) was shown.

Table 3. Summary of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation experiments in *Lycopersicon esculentum*

<i>Agrobacterium</i> Strain	Number of explants plated	Number of plants regenerated	Number of plants transformed	Ratio of transformation (%)
EHA105	576	44	1	0.2
LBA4404	174	8	6	3.4
Total	750	52	7	0.9

획득한 항생제 저항성 52개체를 southern 분석한 결과 6개체만이 형질전환체로 확인되었다(Figure 6). 아그로박테리움 균주에 따른 형질전환 효율면에 있어 LBA4404 이용시 형질전환효율이 3.4%였고, EHA105 이용시 0.2%로, LBA4404 균주가 EHA105균주보다 형질전환효율이 높은 경향을 나타냈다.

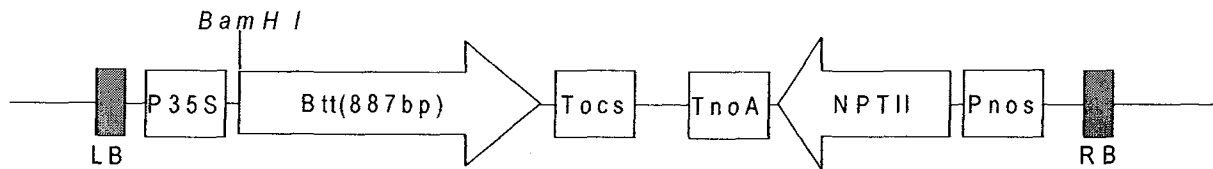


Figure 5. Plant transformation vector pBINAR-btt containing the chimeric B.t.t. toxin gene. The arrows indicate the direction of transcription. NPTII, neomycin phosphotransferase II; P35S, CaMV 35S promoter; LB, left border; RB, right border of T-DNA; Pnos, nopaline synthase gene promoter; Tocs, terminator of octopine synthase gene.

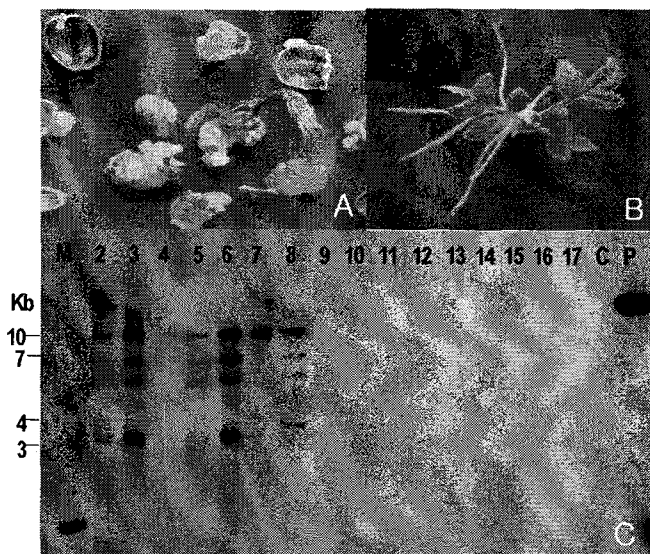


Figure 6. Production of transgenic tomato plants. (A) Shoots regenerating from cotyledonary segments on selection medium following treatment with *Agrobacterium*. (B) Plantlets regenerating roots. (C) Southern blot analysis of the transgenic plantlets. Lane M, marker; C, negative control using nont-transformed tomato DNA; P, positive control (pBINAR Btt); 1-17, independent transgenic individuals. The blot was probed with a

## 감자 살충성 작물개발

### 재료 및 방법

#### 1) 식물재료 및 균주

본 연구에 사용된 감자(*Solanum tuberosum* L.)는 Dejima 품종으로 기내에서 2~3주간 MS (Mjurashige and Skoog, 1962) 기본배지에서 생육시켜 줄기를 0.5cm 크기로 잘라 형질전환에 사용하였다. 균주는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*로부터 유래한 *B.t.t.* 유전자를 plasmid pBinAR에 클로닝한 후 (figure 1) 식물체로의 형질전환을 위해 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켜 사용하였다. *B.t.t.* 유전자가 형질전환된 *A.tumefaciens* LBA4404의 배양은 단일 콜로니를 취하여 kanamycin 50 mg/L 첨가된 LB배지(bacto tryptone 10 g/L+bacto-yeast extract 5 g/L+NaCl 10 g/L)에 접종하고, 28 °C shaking incubator에서 배양하여 식물체의 형질전환에 사용하였다.

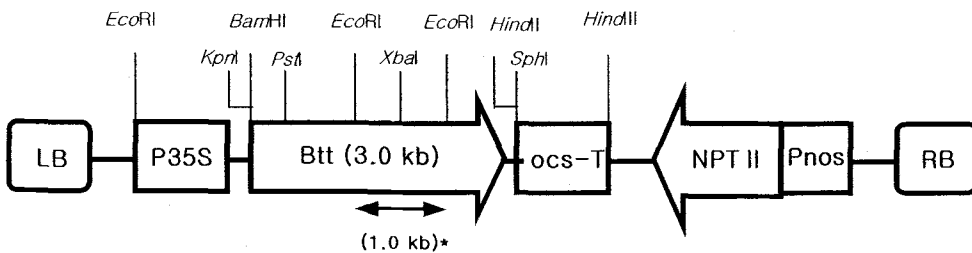


Figure 1. The T-DNA region of the binary vector pBinAR-Btt containing the chimeric *B.t.t.* toxin gene. NPTII, neomycin phosphotransferase II; P35S promoter; LB, left border; RB, right border of T-DNA; Pnos, nopaline synthase gene; ocs-T, terminator of octopine synthase gene. \* The *EcoRI* restriction fragment was used as hybridization probe.

#### 2) 식물체의 형질전환 및 선발

형질전환을 위하여 0.5 cm로 자른 줄기를 OD<sub>600</sub>=1.0으로 배양시킨 *A.tumefaciens* LBA4404 균주액에 10분간 접종한 후 멸균된 여과지에서 건조시켰다. 건조된 절편은 2,4-D가 첨가된 배지 (MS+2,4D 2mg/L+acetocyringone 100  $\mu$ M)에서 24°C, 암상태로 3일간 공동 배양한 후 kanamycin과 carbenicillin이 함유되어 있는 재분화 선발 배지 (MS+kanamycin 100 mg/L+carbenicillin 500 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA3 0.1 mg/L+zeatin 2 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 0.7 g/L)에서 4~8주간 배양하여 shoot

를 형성시켰다. 생성된 shoot는 kanamycin 50 mg/L를 함유한 MS 기본배지에서 소식 물체로 발달시켜 포장에 이식하였다. 이후 포장에서 정상적으로 성장한 신선한 잎을 채취하여 형질전환체 검정을 위한 분석 시료로 이용하였다.

### 3) Genomic DNA의 추출 및 Southern blot analysis

감자의 genomic DNA는 싱싱한 잎 1g을 채취해 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) buffer를 이용한 DNA 분리방법(Dellaporta 등, 1983)으로 추출하였다. 추출한 genomic DNA 5  $\mu$ g을 제한효소 *Bam*HI으로 절단하여 1% agarose gel에 전기영동 한 다음 denaturation 과정을 거친 후 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham)으로 전이하였다. 전이된 DNA 단편들을 고정시키기 위하여 UV-crosslink ( $1200 \times \mu\text{J}/\text{cm}^2$ )를 실시한 후 membrane은 hybridization buffer (0.5M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  pH 7.2, 1% BAA, 7% SDS, 1 mM EDTA, 10 mg/mL salmon sperm testicle DNA)를 사용하여 1시간 동안 pre-hybridization하였다. 이후 random primer DNA labeling kit (Takara Bio Inc.)를 이용하여  $^{32}\text{P}$ 를 1.0-kb *B.t.t.* fragment DNA에 labeling하고 65°C에서 16-18시간 동안 hybridization 시켰다. membrane은 washing solution (1st solution, 2X SSC, 0.1% SDS; 2ed solution, 1X SSC, 0.1% SDS; 3rd solution, 0.2% SSC, 0.1% SDS)으로 처리한 후 X-ray 필름(Super RX, Fuji)에 감광하였다.

### 4) RNA 추출 및 Northern blot analysis

형질전환체 감자의 잎 0.3 g 정도를 채취한 다음 Triazol (BioRad)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 정제된 RNA 20  $\mu$ g을 formaldehyde가 포함된 1% agarose gel에 전기영동하였다. RNA가 전개된 gel은 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham)에 blotting한 후 *B.t.t.* fragment DNA를 probe로 하여 southern blot과 같은 방법으로 hybridization하였다.

### 5) protein 추출 및 Western blot analysis

감자의 단백질을 추출하기 위해 1 g의 잎을 액체질소를 이용하여 분쇄하고, 단백질 추출 buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 2% polyvinylpyrrolidone)를 첨가하였다. 이후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질을 추출하였으며, Bradford solution (Biorad)를 이용하여 단백질 농도를 결정하였다. 동량의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영

동하고 단편화된 단백질을 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham)에 electroblotting하여 Western blot analysis를 실시하였다. Western blot은 chemiluminescent western blot immunodetection kit (WesternBreeze, Invitrogen)를 사용하여 kit manual의 절차에 따라 실시하였으며, 1차 항체는 monospecific *B.t.t.* toxin antibody (Rhim 등, 1995)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1) *B.t.t.* 유전자에 의한 감자조직의 형질전환 및 선발

감자의 기내 배양 식물체로부터 측지의 성장점이 포함되지 않은 줄기 부위를 채취하여 *B.t.t.* 유전자로 형질전환 시킨 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404와 공동배양하여 형질전환하였다. 그 결과 100 mg/L의 kanamycin이 첨가된 배지에서 절단면으로부터 캘러스가 형성된 후 약 4주 정도에 shoot가 발생하기 시작하였다(figure 2A). Shoot는 일정크기(1 cm)의 유식물체로 발달되었을 때 kanamycin 50 mg/L를 함유한 배지로 옮겨 정상 식물체로 발달시켰다(figure 2B). 일차 shoot 유기 시 형질전환 개체의 경우 녹색 shoot를 형성하고 지속적으로 발달하는 반면, 비형질전환 개체는 엽록소를 형성하지 못하고 백색의 shoot를 형성하였으며, 지속적인 성장을 나타내지 못했다. 따라서 선발된 유식물은 기내 배지 상에서 뿌리를 형성시키고 건강한 소식물체로 성장시켜 인공토양으로 채워진 포트에 이식하여 생육시켰다(figure 2C). 이들 식물체들은 외부유전자의 도입 여부를 확인하기 위해 사용되었다. 식물세포의 형질전환 연구에 있어서 큰 문제가 되고 있는 점은 형질전환체의 선발을 위해서 사용하고 있는 항생제, 식물의 종류와 품종, 사용 부위 및 *Agrobacterium* spp.의 종류 등이 형질전환을 및 재분화율을 감소시킨다고 한다(Choi 등, 1996). 이런 관점에서 Oome 등(1987)의 경우 감자의 형질전환 시 8-19주 후 형질전환 개체를 얻었다고 보고한바 있다. 그러나 본 실험에서 사용한 대지 품종의 경우 약 3-4주 생육시킨 신선한 줄기를 사용한 결과 4주 정도 경과 후 쉽게 shoot가 형성되었으며, 이에 따라 재분화 체계를 확립할 수 있었다.

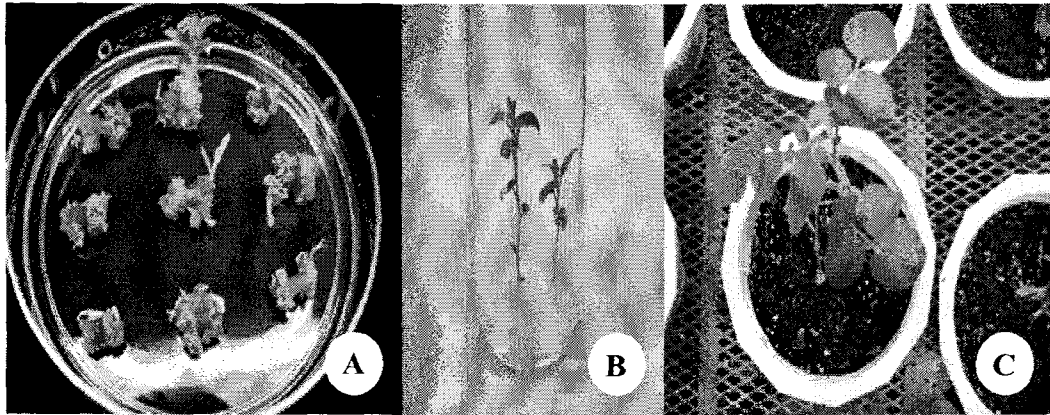
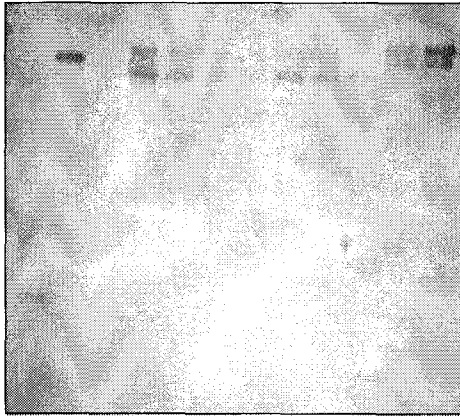


Figure 2. formation of resistant shoots on selection medium containing 100 mg/L of kanamycin from potato cv. Dejima (A), plants on growth medium containing 50 mg/L of kanamycin (B) and transgenic plants in greenhouse after two weeks (C).

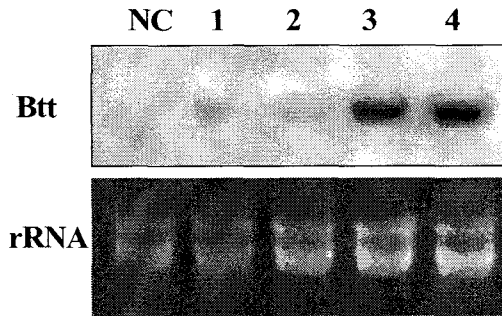
## 2) 형질전환된 식물체로부터 *B.t.t.* 유전자의 발현

kanamycin 배지에서 선발된 식물체와 비형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 Southern blot 분석을 수행하였다. genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI으로 24시간 처리한 후  $^{32}$ P로 포지된 1kb-*B.t.t.* probe를 이용하여 분석한 결과 (figure 3A), *B.t.t.* probe에 특이적으로 반응하는 단편들을 확인할 수 있었다. 그러나 대조구로 사용한 비형질전환 식물체에서는 전혀 단편의 밴드가 발견되지 않았다. 형질전환체는 모든 개체에서 밴드수가 2개로 나타났으며, 두가지 형태의 양상을 보였다. Southern 분석에 의한 DNA 밴드의 확인 결과는 선발된 감자 염색체내에 외래 유전자인 *B.t.t.* 유전자가 성공적으로 삽입되어 형질전환 되었음을 나타내고 있다. Southern 분석결과 식물체의 게놈에 안정하게 삽입된 *B.t.t.* 유전자가 정상적으로 발현되는지 확인하기 위하여 밴드 양상이 서로 다른 식물개체로부터 total RNA를 분리하고  $^{32}$ P로 포지된 probe로 Northern blot 분석을 한 결과 (figure 3B), *B.t.t.* 유전자의 transcript가 합성되었음을 확인할 수 있었다. 발현양은 개체간에 차이를 보였으며, 그의 RNA 발현 밴드를 비교해 보면, southern 분석의 두 가지 밴드 양상에 따라 구별되는 것으로 나타났다. 발현양의 차이는 핵내로 외부유전자를 도입한 형질전환 식물체는 RNA분해가 쉬워 불안정하며, double-stranded RNA가 gene silencing이 일어나 그 정도에 따라서 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Marjori 등, 2001). Southern, Northern 분석을 실시한 결과 감자 식물체에 안정적인 외부유전자의 도입과 발현이 확인되었다. 또한 외부유전자 *B.t.t.*의 도입에 따른 형질전환체와 비형질전환체의 생육과 성장에 있어서의 외형적인 차이를 나타내지 않았다.

MPC NC 1 2 3 4 5 6 7 8 9



(A)



(B)

Figure 3. southern (A) and northern blot (B) from transgenic potato leaves hybridized with the *B.t.t.* DNA fragment. Total 5  $\mu$ g of DNA was digested with *Bam*HI. Total RNA was fractionated on an 1% agarose gel containing formaldehyde. M, marker; NC, negative control; Pc, positive control; lane 1-9, transgenic potato plants.

### 3) Western blot 분석

선발된 감자 형질전환체로부터 *B.t.t.* toxin 유전자의 단백질 발현양상을 분석하기 위해 싱싱한 잎조직 1 g에서 단백질을 추출하여 8% SDS-polyacrylamide gel로 전개한 후 western blot을 실시하였다. monoclonal *B.t.t.* toxin antibody를 이용하여 분석한 결과 74 kDa에서 단지 한개의 단백질 발현밴드를 나타냈다(figure 4). 이는 형질전환된 감자 식물체에서 안정적으로 살충성 toxin 단백질을 생산한다는 것을 나타낸다. 본 실험과 같은 유전자를 이용해 Rhim 등(1995)은 토마토에서, Arpaia 등(1997)은 가지의 형질전환체로부터 74 kDa의 위치에서 단백질 발현밴드를 확인한 바 있다. 결론적으로 감자 식물체에서도 *B.t.t.* 유전자의 형질전환에 의해 살충성 toxin 단백질의 생산을 확인할 수 있었다.



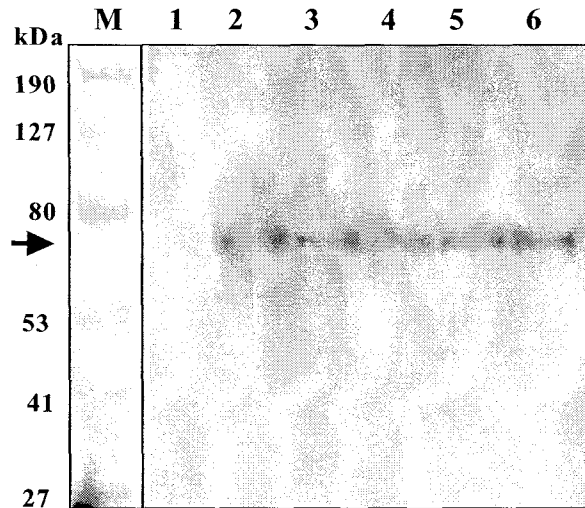


Figure 4. western blot analysis of transgenic potato plants. Total protein was extracted from the leaf of the transgenic potato plants. The extract was separated on a 8% SDS-polyacrylamide gel and blotted onto nitrocellulose paper for the hybridization with antiserum against the *B.t.t.* toxin. M, protein marker; lane 1, normal potato plant; lane 2-6, transgenic potato plants. Arrow indicates the bands of *B.t.t.* toxin.

## 결론

위 실험에서 본 바와 같이 *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*로부터 유래한 살충성 *B.t.t.* 유전자를 감자 '대지' 품종에 형질전환 시킬 수 있었으며, Southern과 Northern blot 등의 분자생물학적 분석을 통해 감자 genomic DNA에서 *B.t.t.* 유전자 도입 여부와 RNA의 발현을 확인할 수 있었다. 또한 감자 형질전환 식물체로부터 살충성 결정단백질의 발현을 확인하기 위해 monoclonal antibody를 이용하여 immunoblotting 한 결과 74 kDa에서 toxin 단백질 밴드를 나타내어 성공적으로 단백질을 생산하고 있음을 확인할 수 있었다. 본 실험에서 형질전환된 감자 개체들은 포장에서 비형질전환체와 외형적인 차이를 나타내지 않았으며, 정상적으로 생육하였다. 일반적으로 외부유전자가 도입된 식물체는 그 단백질의 발현이 불안정하고 발현양이 적다는 단점이 있다. 그럼에도 불구하고 전통적인 해충 방제는 농약의 사용에 있어서 농약비용, 인건비, 장비 등에 의해 작물의 생산비가 상승하게 되고, 또한 유해 농약에 의해 인축과 환경에 악영향을 미칠 수 있기 때문에 이의 문제를 극복할 수 있는 형질전환 내충성 작물에 대한 기대가 크다. 따라서 본 실험에서 개발된 내충성 식물체는 해충 저항성에 기인하여 농작물의 생산원가를 낮춤으로써 생산량이 증가하고, 소비자들의 기호에 맞는 저농약 사용에 따른 고부가가치성 작물을 생산할 수 있으며, 농약 사용 절감에 따른 인축의 피해와 환경 보호에 일익을 담당할 것으로 여겨진다.

## 벼물바구미 실내사육기술 개발

### 1. 연구목표

○ 형질전환 작물체의 실내 스크리닝을 위한 딱정벌레목 해충의 실내 대량사육 기술 개발을 통한 연중 공급체계 수립

### 2. 재료 및 방법

#### (1) 벼물바구미의 생물학적 특성조사

① 시험곤충 : 벼물바구미 (월동성충)

② 조사내용

○ 휴면타파기간 : 야외에서 채집한 월동성충을 토양가열법에 의해 채취 한후 추청벼 유묘 (7일묘)가 들어있는 사육상에 1마리씩 접종하여 섭식전기간을 조사, 섭식과 동시에 휴면이 타파된 것으로 인정

○ 산란전기간 : 휴면이 타파된 월동충을 대상으로 위와 동일한 사육상 에 개체사육하면서 첫 산란이 이루어지기까지의 산란 전기간을 조사

○ 일일 산란수 : 첫 산란 후 성충이 사망할때까지 30℃에서 매일 산란수 조사 (그림 1)

③ 시험조건

○ 30℃, 70~80% RH, 16L : 8D

#### (2) 벼물바구미의 실내사육 조건 수립

① 온도가 벼물바구미 발육에 미치는 영향

○ 갓 부화한 벼물바구미 유충을 사육상에 일정마리수로 넣고 25, 28, 30℃로 유지되는 항온기에 넣고 우화 성충으로부터 발육기간 조사

② 벼물바구미 사육에 적합한 물(水) 조건 구명

○ 갓 부화한 벼물바구미 유충을 사육상에 일정마리수로 넣고 수돗물, 정수기 물, 증류수, 지하수를 공급하면서 항온기에 넣고, 수종별 산란선호도 및 우화하는 성충의 우화율 조사 (그림 2)

### 3. 시험결과

(1) 공시충 채집 : 벼물바구미의 월동성충을 채집하기 위하여 토양을 채취하는 장소로는 논둑이나 주변에 논이 많이 있는 산기슭이 적당하였으며, 월동 벼물바구미 성충의 채집시기와 채집법 및 채집장소는 표 1에 나타내었다.

(2) 휴면타파기간 : 벼물바구미 월동성충의 휴면타파기간은 채집시기별로 볼 때 25℃ 기준, 1월 채집충이 3.2일, 3월 채집충이 2.7일로 3월, 2월, 1월 순으로 짧게

나타났다. 온도조건에 따라서는 3월충을 기준으로 25℃에서 2.7일, 30℃에서 1.2일로 온도가 높아질수록 빠르게 휴면이 타파되는 것으로 나타났다(표 2).

- (3) 산란전기간 : 벼물바구미 월동성충의 산란전기간은 채집시기별로 25℃를 기준으로 할때, 1월 채집충이 20.8일, 3월 채집충이 19.6일로 채집시기별로는 큰 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 온도조건에 따라서는 1월충을 기준으로 25℃에서 20.8일, 30℃에서 14.0일로 온도가 높아질수록 빠르게 산란이 이루어 지는 것으로 나타났다 (표 3).
- (4) 일일 산란수 : 1월 채집충과 2월 채집충을 30℃ 조건에서 1마리씩 개체사육하면서 일일 산란수를 조사한 결과 일일평균 산란수는 2.4개였으나 첫 산란 후 15일에서 30일 사이에 가장 많이산란하는 것으로 일일최고 산란수는 15개로 나타나 실내누대사육의 가능성을 제시하였다 (그림 3).
- (5) 온도가 벼물바구미 발육에 미치는 영향 : 연구 진행 중
- (6) 벼물바구미 사육에 적합한 물(水) 조건 구명 : 3월 채집충을 대상으로 물 종류별로 산란선호성 조사를 실시한 결과 증류수, 정수, 지하수,수돗물 순으로 선호도가 높게 나타났으며 (그림 3), 성충 한 마리 당 10일 산란수가 32.8, 31.4, 26.8, 23.8으로 나타났다.물 종류별로 우화하는 성충수를 최종적으로 조사할 필요가 있으나 현재 진행 중이며, 일단 source 별로 산란수에서 차이를 보여 누대사육에 적합한 조건을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

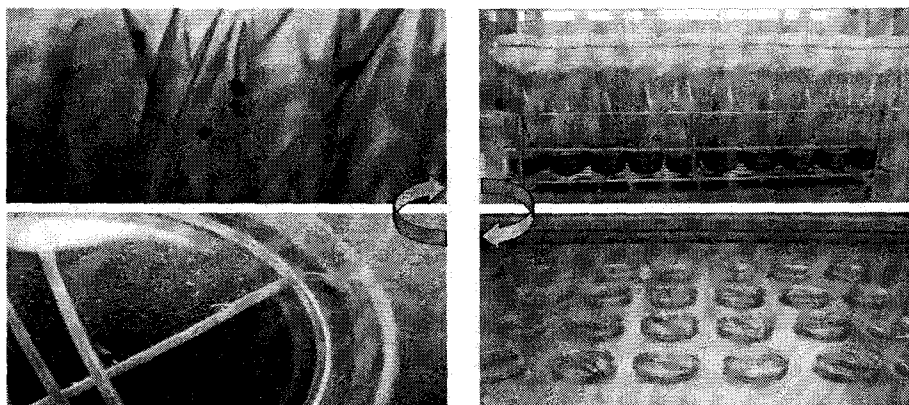


그림 1. 일일 산란수 조사 모습.

표 1. 벼물바구미 월동충의 채집시기, 방법 및 채집장소

채 집 시기	채 집 방법	채 집 장소
2002년 1월 16일	토양 채취	사강/광명/시흥 (논둑 및 산기슭)
2002년 2월 21일	토양 채취	사강/광명 (논둑 및 산기슭)
2002년 3월 15일	토양 채취	사강/광명 (논둑)
2002년 4월 13일	유묘 트랩	사강 (산기슭)



그림 2. 수종 및 온도별 발육기간 조사 모습.

표 2. 채집시기 및 온도별 섭식전기간 조사

Temperature	Days from Collecting to the First Feeding <sup>a</sup>		
	Jan.	Feb.	Mar.
25°C	3.2 ± 0.5	2.9 ± 0.3	2.7 ± 0.4
28°C	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.7
30°C	1.9 ± 0.4	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.2

<sup>a</sup> Mean ± Standard deviation of 10 replications.

표 3. 채집시기 및 온도별 산란전기간 조사

Temperature	Preoviposition period (days) <sup>a</sup>		
	Jan.	Feb.	Mar.
25°C	20.8 ± 1.9	20.3 ± 1.9	19.6 ± 1.9
28°C	14.2 ± 1.4	13.6 ± 1.3	13.3 ± 1.8
30°C	14.0 ± 1.8	13.2 ± 0.9	12.9 ± 1.0

<sup>a</sup> Mean ± Standard deviation of 10 replications.

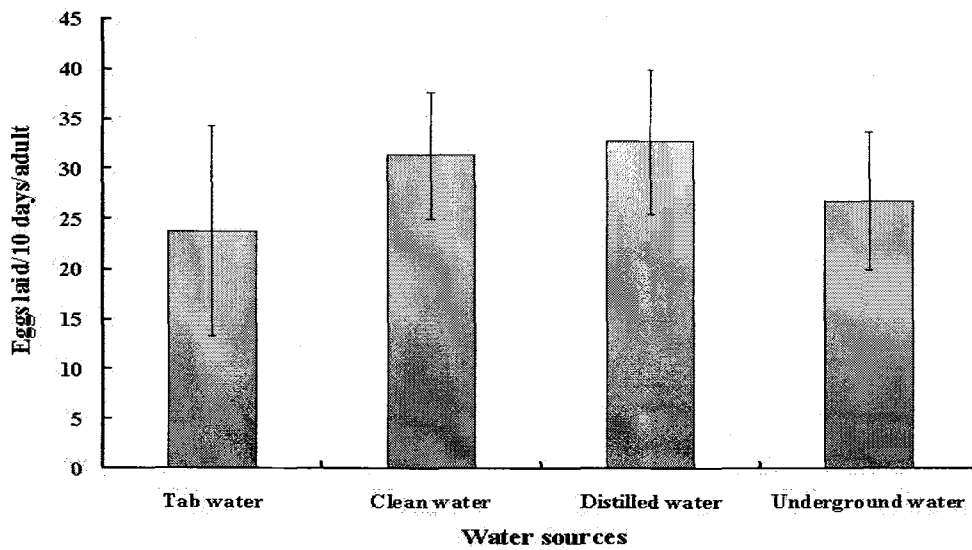


그림 3. 수종별 산란 선호성 조사 (3월 채집종)

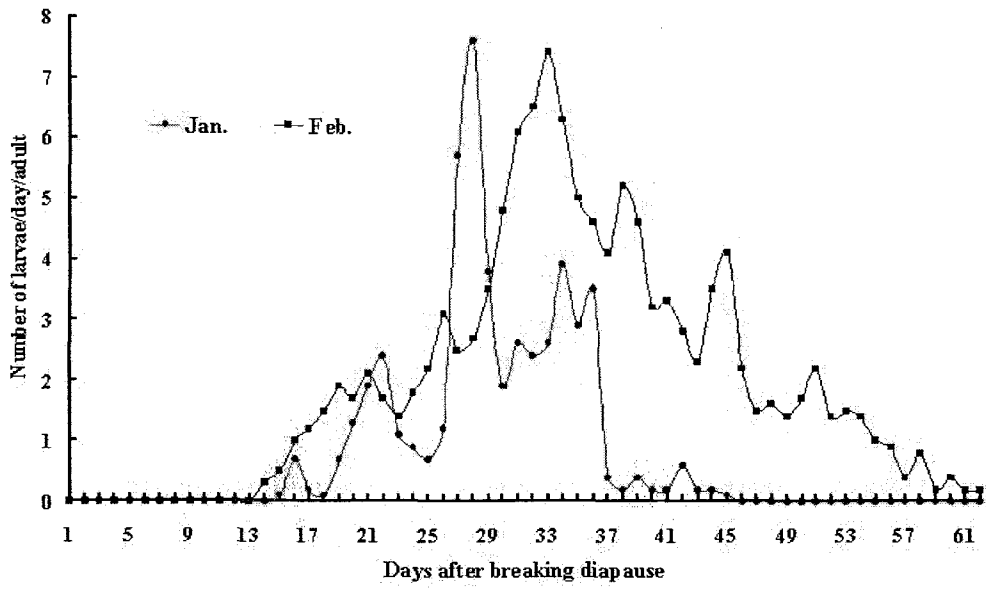


그림 4. 채집기시별 일일 산란수 조사

## 제2절) 제2세부과제: 미생물로부터 딱정벌레목 살충성 유전자 개발 (한림대)

### 1 서론

화학 공업의 발달과 함께 고속 성장을 해온 것이 바로 유기합성 농약이다. 이 유기합성 농약은 금세기 초부터 엄청난 인구 증가로 감당하기 어려웠던 식량자원의 생산량을 늘이는데 큰 공헌을 해왔다. 그러나 유기합성 농약의 과다한 사용의 폐해는 이미 알려진 바와 같이 자연계에서의 난분해성 성분의 잔류와 잔류성분에 포함된 중금속에 의한 농산물 및 지하수의 오염으로 인간의 생존권에 대한 위협뿐만 아니라 생물들을 무분별하게 치사하게 함으로써 생태계 파괴하고 있다. 지속적이고 환경 친화적인 농업에 대한 수요가 늘어나면서 특정 해충의 유충에 대한 특이적 살충성이 있고 환경친화적이며, 인체에 무해한 미생물 살충성 독소 단백질에 관심을 가져 왔으며, 이러한 유전자를 이용한 형질 전환 작물의 개발에 관심이 이루어져왔다. 미생물 독소 유전자들 중에서 가장 많이 사용되어 지고 있는 것이 *Bt*로 알려져 있는 *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) 균주들과 *BP*로 알려져 있는 *Bacillus popilliae* (*BP*) 균주들의 독소 유전자이다. *B. popilliae* 균들은 독소 단백질을 *B. thuringiensis* 균주에서와 같이 포자 형성기에 생성하는데, 아직 *B. popilliae* 균의 병리 작용에 있어서 독소의 역할에 대해서는 확실하게 알려져 있지 않고 있다. 그러나 *B. popilliae* 균으로 감염된 cockchafer 유충의 병리 현상을 보면, 유충의 장으로 들어간 포자는 그곳에서 발아되어 생체 내의 여러 방어 작용에도 상관없이 발아된 상태로 표피층 및 기본 larmina 조직을 통과하여 hemolymph에 도달하여 이를 파괴는 것으로 추측되고 있다. 이러한 *B. popilliae* 균의 병리 기작은 다른 유충들에서도 비슷하리라고 여겨지고 있다 (Splittstoesser *et al.*, 1978; Splittstoesser and Tashiro, 1981). *B. thuringiensis* (*B.t.*) 균주는 농작물, 인체, 가축에 해를 주지 않으며 선택적 살충성으로 자연의 생태계 보존에 용이하고 해충이 저항성을 매우 늦게 갖게 되어 오래전부터 해충 저항성 작물의 개발을 위한 미생물 농약으로 많이 사용되고 있다. 이러한 균주들에서 생성되는 *B.t.* 단백질은 해충이 먹을 경우 알칼리성인 해충의 위속에서 효소에 의해 가수분해 됨으로써 해충 장세포막의 특이한 수용체와 결합하고 채널을 형성하여 살충 효과를 나타낸다 (Schnepf *et al.*, 1998). 이러한 독소들은 많은 다양성과 유전자 조작에 의한 좋은 발전성으로 더욱 효과적이고 환경에 적응이 잘되는 새로운 *B.t.* 살충제 개발에 관심의 초점이 되고 있다. 또한, 이들이 생산하는 독소 단백질의 유전자를 이식 발현시키는 방법으로 이미 콩, 옥수수, 면화, 감자 등의 형질 전환 작물이 개발 재배되고 있는 실정이다. 선진국에서는 정부 및 기업체에서 주도적으로 형질 전환 작물의 개발에 관한 연구를 적극적으로 진행하여 일부 작물에 대해서는 실용화 단계를 거쳐 제품화가 이루어져 있는 반면, 국내에서는 연구실 수준의 형질 전환 작물 개발 사례가 다수 보고 되고 있지만 선진국처럼 실용화되어 제품화가 이루어진 경우가 아직까지 보고된 바가 없다. 따라서 이러한 점을 극복하기 위해서는 외국의 경우처럼 개발된 형질 전환 작물의 실용화가

정부의 주도로 이루질 필요가 있다고 사료된다. 아울러 다양한 작물체에서 발현 할 수 있도록 식물체 형질 전환 벡터의 개발도 함께 이루어 져야 할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 박테리아 독소 살충제로 잘 알려진 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (*B.t.t.*)-toxin gene과 *B. popilliae*의 cryBP gene을 분리 및 특성을 규명하고 벼 작물체에서 발현할 수 있도록 형질전환벡터를 개발하는데 목표를 두어, *B.t.t.*-toxin 유전자를 이용한 식물체 형질전환 벡터 제작과 *B. popilliae* 균주로부터 클로닝 된 cryBP 유전자에 HIV-1 Tat basic domain을 coding하는 올리고머를 fusion하여 해충이 섭취하였을 때, 해충 세포에 독소 단백질의 침투 효과 상승 시킬 수 있도록 다양한 식물체 형질 전환 벡터를 제작하였다. 또한 특성 규명이 되지 않은 *B.t.* 균주의 동정을 형태학적, 생리학적, 분자생물학적 측면에서 실시하였다.

## 2 재료 및 방법

### 가. Strains and plasmids

형질전환과 plasmid 유지를 위하여 *E. coli* DH5 $\alpha$  strain을 사용하였으며, *Bacillus thuringiensis* SR660, SR803 그리고 *Bacillus popilliae* 균주는 Heidelberg University로부터 제공받았다. 식물체 형질전환용 균주로는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105를 사용하였다. Subcloning을 위해서는 pBluescript KS+를 사용하였다.

### 나. 배지

*B. thuringiensis*, *B. popilliae*, *A. tumefaciens* LBA4404 균주와 *E. coli*의 보관 및 생육 배지로 LB (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 배지 및 1.5% agar plate를 사용하였으며, 각각 30 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C, 28 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 재조합 plasmid를 지닌 *E. coli* 및 *Agrobacterium* 형질 전환주를 선별하기 위해 Km (50  $\mu$ g/ml)을 첨가하였다.

### 다. DNA 조작

*E. coli* 형질전환, plasmid DNA 분리, 제한효소 사용, cloning 방법 등은 Sambrook *et al.*의 방법 (1989)에 따라 실행하였다. 식물체 형질전환용 균주인 *Agrobacterium*의 형질전환은 electroporation 방법을 이용하였으며, plasmid 분리는 An *et al.*의 방법 (1988)에 따라 실행하였다.



라. 각 균주로부터 chromosomal DNA의 분리

*B. thuringiensis* SR660, SR803 그리고 *B. popilliae*의 chromosomal DNA는 Dubnau & Abenson 방법(1971)을 변형하여 분리하였다. 전배양액 1%를 LB 배지에 접종하여 30°C에서 대수기까지 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수(5000 xg, 10분, 4°C)하였다. 회수한 균체를 SET buffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl[pH 8.0])로 세척한 8 ml의 SET로 현탁하고 30 ml corex tube로 옮겨 2 ml의 lysozyme 용액 (10 mg/ml in SET buffer)을 첨가한 후 얼음에서 30분간 정치하였다. 0.5 ml의 pronase 용액 (10 mg/ml in STE buffer)을 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 1.2 ml의 10% SDS를 첨가한 후 65°C에서 2시간 동안 방치하였다. 동량의 phenol용액 (phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1)을 처리한 후 3,000 xg에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하고 같은 조작을 1회 더 반복하여 상층액을 30 ml corex tube에 옮겼다. 이 상층액에 RNase 용액 (10 mg/ml in SET buffer)을 최종 농도가 20 µg/ml이 되도록 가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 최종농도가 0.1 M이 되도록 5 M NaCl을 가하고 2배의 absolute EtOH을 첨가하여 서서히 흔들어준 후 유리봉을 이용하여 chromosomal DNA를 분리하였다. 70% EtOH로 DNA를 세척한 후 건조시키고 TE(10/1) buffer에 녹여 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

마. PCR 기법을 이용한 cryBP 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

EMBL로부터 얻은 cryBP 유전자의 염기서열을 주형으로 primer를 설계하였다. 100 ng의 chromosomal DNA, 각각 100 pmol의 primer (BP-F, 5'-GCGAATTCA TGAACAATAATTTT-3'; BP-R, 5'-GGGAATTCCTAATAAAGAGGAGT-3') 그리고 1 unit의 *Pwo* DNA polymerase를 50 µl의 반응양으로 조합하였다. Amplification은 94°C에서 30초간 denaturation, annealing 50°C 45초, polymerization 72°C 2분으로 하여 30회 반복하였다. 합성된 DNA는 Ethidium bromide (EtBr)가 첨가된 0.8% agarose gel에 전기영동한 후 U.V.조사를 통해 DNA 절편을 확인하였다. PCR을 수행한 DNA를 BamHI과 EcoRI으로 절단하여 pBluescript KS+의 같은 제한효소 위치에 삽입하였다. 삽입된 cryBP 유전자의 염기서열은 ABI prism 377 자동염기서열 분석기로 dye terminator sequencing 방법을 이용하여 분석하였다.

바. Tat-cryBP, cryBP-Tat, Tat-cryBP-Tat 및 벡터 형질전환 벡터 제작

먼저 cryBP유전자의 앞, 뒤 또는 양쪽에 Tat basic domain이 위치하도록 pBlue-Tat vector를 제조하기 위해 HIV-1 Tat basic domain을 coding하고 있는 DNA oligomer (TAT1, 5' -CTTATGAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA GAGAT-3'; TAT2, 5'-ATCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCCTCATAAG-3'), (TAT3, 5'-ATCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGATAGG-3'; TAT4,

5'-AATTCCTATCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCCTGAT-3')들을 합성하였다. 각각 DNA oligomer들을 70°C에서 30분간 정치하여 double-strand로 annealing하였다. pBluescript KS+의 *EcoRV*, *HindIII*와 *EcoRI*, *EcoRV*의 제한효소들로 자른 후 open reading frame에 맞게 Tat basic domain을 삽입하여 pBlue-Tat vector를 제작하였다. Tat의 삽입은 ABI prism 377 염기서열분석기로 확인하였다. 위에서 제작된 vector에 cryBP1유전자를 삽입하였다. 제작된 Tat-fused cryBP유전자들을 베타 형질전환 벡터를 제작하는데 이용하였다.

#### 사. *Bacillus thuringiensis* SR660, SR803의 현미경 관찰

##### (1) 위상차 현미경 관찰

100 ml의 LB broth에 *B. thuringiensis* SR660, SR803 균주를 접종하고 위상차 현미경 (x400, x1000)을 이용하여 시간에 따라 각각 관찰하여 phase bright spore의 형성 및 결정 독성 단백질을 관찰하였다.

##### (2) 전자 현미경 관찰

투사 전자 현미경 (TEM) 관찰을 위해서 *B. thuringiensis* SR606, SR803 균주를 LB broth에 접종한 다음 30°C에서 충분히 배양한 후 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)를 사용한 1% glutaraldehyde-1% paraformaldehyde 고정액에 2-3시간 고정한 후 2% osmium tetroxide 용액에 후고정하였다. Ethanol과 acetone으로 탈수한 후 Epon812-araldite mixture에 포매하여 60°C에서 중합시켰다. Reichert-Jung Ultracut E로 100nm 두께의 절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 Zeiss EM109 전자 현미경으로 관찰하였다. 주사 전자 현미경 (SEM) 관찰을 위해서는 건조 시 critical point dryer로 임계건조 (HITACHI HCP-2)한 후 10<sup>n</sup> COATER로 금도금한 후 HITACHI S-2500 전자 현미경으로 관찰하였다.

#### 아. 단백질 분석 및 Western blot

##### (1) 단백질 분리 및 SDS-PAGE

*B. thuringiensis* SR660, SR803 균주, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주들을 100 ml의 LB broth에서 접종한 다음 30°C에서 충분히 배양한 후 5000 xg에서 원심분리하였다. Pellet을 1 M NaCl로 2회 씻어주고 다시 이차 증류수로 2회 씻어주었다. 현탁한 cell pellet을 sonication (2 x 5분)한 후 이를 원심분리 (12000 xg, 20분, 4°C)하였다. 분리한 단백질을 Bradford 방법 (1976)에 따라 단백질의 양을 정량한 다음 eppendorf tube에 분주한 후 다음 실험을 위해 -20°C에 보관하였

다. 각각 분리한 단백질에 5x loading buffer를 넣고 섞어준 후 100°C에서 10분간 끓여 단백질을 변성한 후 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 (Laemmli, 1970)한 후 Commassie brilliant blue R250으로 염색하였다.

## (2) Western blot

*B. thuringiensis* SR803 균주를 100 ml의 LB broth에 접종한 후 30°C에서 배양하여 시간별로 시료 중 1 ml을 취한 다음 위에서 기술한 대로 단백질을 분리 및 변성시킨 후 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하였다. Semi-dry 방법을 이용하여 Nitrocellulose transfer membrane (Schleicher & Schuel 사)에 옮긴 후, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주의 독성 단백질에 대한 항체 (Rhim *et al.*, 1995)를 이용하여 결정 단백질을 면역 탐지하였다.

## 자 *B. thuringiensis* 균주들의 PCR analysis

상기에서 기술한 대로 분리한 각각의 chromosomal DNA를 주형으로 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 독소 유전자의 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 각각 100 ng의 chromosomal DNA, 각각 primer (SR6, 5'-GGATCCATGAATCCGAACAA-3'; SR6-1, 5-AAGCTTTTAATTCCTGGA A-3'), 그리고 2.5 unit의 *Pwo* DNA polymerase를 50 ul의 반응양으로 조합하였다. Amplification은 94°C에서 30초간 denaturation, annealing 45°C 45초, 72°C에서 1분 30초간 polymerization이 일어나도록 하면서 매 회마다 2초간의 extension time을 주어 30회 반복하였다. 증폭된 DNA는 Ethidium bromide (EtBr)가 첨가된 0.8% agarose gel에 전기영동한 후 U.V.조사를 통해 DNA 절편을 확인하였다.

## 차. 살충성 테스트

100 ml의 LB broth에 순수 배양된 *B. thuringiensis* 균주들을 접종하고 30°C에서 결정 단백질이 생성될 때까지 충분히 배양한 후 단백질을 분리하였다. 약 100 ug의 포자-결정복합체를 10cm<sup>2</sup>의 감자 잎의 표면에 바른 후 8마리의 딱정벌레목 유충이 들어있는 petri dish에 넣고 2일 이후에 치사율을 테스트하였다.

## 3 결과 및 고찰

### 가. *Bacillus popilliae* 균주로부터 cryBP 유전자의 클로닝

*B. popilliae* 균주로부터 chromosomal DNA를 분리 정제하여 올리고 합성에 의해 제작된 primer (BP-F, 5'-GCGAATTCATGAACAATAATTTT-3'; BP-R, 5'-GGGAATTCCTAATAAAGAGGAGT-3')을 이용하여 PCR을 실시하였다. 0.8%

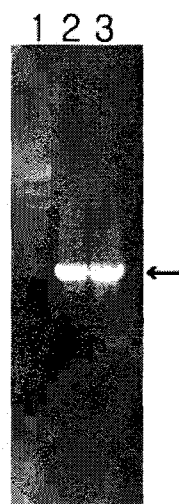
agarose gel상에서 전기영동을 수행한 결과 예상된 위치에서 toxin DNA 절편을 확인하였으며 (Fig. 1), 밴드의 DNA 절편을 추출하여 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 절단하여 pBluescript KS+ 벡터의 *Bam*HI과 *Eco*RI site에 subcloning하였다.

#### 나. 클로닝된 cryBP 유전자의 염기서열 분석

*Bam*HI과 *Eco*RI site에 subcloning된 cryBP 유전자의 DNA 절편을 지닌 pBluescript KS+ 벡터를 spin mini-column으로 정제한 후 T7/T3 primer와 BigDye-dideoxy nucleotide로 labelling된 nucleotide를 이용하여 각각 증폭하였다. 그리고 Applied Biosystem사의 ABI prism 377 염기서열분석장치를 이용하여 염기서열을 규명하였다 (Fig. 2). 분석한 결과 클로닝된 DNA 절편의 크기는 2121 bp이며, NCBI의 유전자 염기서열 비교 결과 *B. popilliae*의 cryBP 유전자의 염기서열과 100% 상동성이 있다는 것이 확인하였으며, 본 연구에서 얻어진 유전자가 cryBP 유전자임을 확인하였다.

#### 다. Tat-cryBP, cryBP-Tat, Tat-cryBP-Tat의 제작

클로닝된 cryBP 유전자의 해충 세포의 침투 효과 상승을 위해 HIV-1 Tat basic domain을 coding하는 oligomer를 cryBP유전자의 앞, 뒤 또는 양쪽에 Tat basic domain이 위치하도록 pBlue-Tat vector를 제조하였다. Tat의 삽입은 ABI prism 377 자동염기분석기로 확인한 결과 open reading frame에 맞게 Tat basic domain을 삽입된 것을 확인하였다. 제작된 Tat-fused cryBP유전자들을 벼 형질전환 벡터를 제작하는데 이용하였다.



**Figure 1.** Amplification of cryBP gene from chromosomal DNA of *Bacillus popilliae* by PCR. After PCR amplification, the products were separate on 0.8% agarose gel.

Lanes 1,  $\lambda$  DNA/*Hind*III marker; 2, 3, PCR fragments. The arrows indicates the 2.1 kb of cryBP gene.

ATGAACAATAATTTTAATGGTGGAAATAATACAGGAAATAACTTTACTGGAAATACTC  
TA 60  
M N N N F N G G N N T G N N F T G N T L  
AGCAACGGAATTTGTACGAAAAAAAAATATGAAAGGAACCCTAAGCAGAACTGCTATAT  
TT 120  
S N G I C T K K N M K G T L S R T A I F  
TCAGATGGGATTAGTGATGATTTAATTTGTTGTCTAGATCCTATATATAACAATAACG  
AT 180  
S D G I S D D L I C C L D P I Y N N N D  
AACATAACGATGCTATTTGTGATGAGTTAGGTTTAACTCCAATAGATAACAATACGA  
TA 240  
N N N D A I C D E L G L T P I D N N T I  
TGCAGTACTGATTTTACTCCATAAATGTAATGAGAACAGATCCTTTTTCGCAAGAAAT  
CA 300  
C S T D F T P I N V M R T D P F R K K S  
ACACAAGAACTCACAAGGGAATGGACAGAATGGAAAGAAAATAGTCCTTCTTTGTTTA  
CA 360  
T Q E L T R E W T E W K E N S P S L F T  
CCGGCAATTGTAGGTGTCGTTACCAGTTTTCTTCTTCAATCATTAAAAAACAAGCAAC  
T 420  
P A I V G V V T S F L L Q S L K K Q A T  
AGCTTTCTTTTAAAACTTTGACAGACCTATTATTTCCATAAACAGTTCGTTAACGA  
TG 480  
S F L L K T L T D L L F P N N S S L T M  
GAAGAGATTTTACGAGCCACGGAACAATATGTTTCAGGAACGGCTTGATACTGATACCGC  
G 540  
E E I L R A T E Q Y V Q E R L D T D T A  
AATCGTGTGTCACAGGAACTAGTAGGTTTGAAGAATAACCTAACACCTTTAACGATC  
AA 600  
N R V S Q E L V G L K N N L T T F N D Q  
GTCGAAGATTTTTTACAAAATAGAGTTGGGATTTCCACCACTTGCAATTATAGATTCGA  
TT 660  
V E D F L Q N R V G I S P L A I I D S I  
AATACCATGCAACAACCTTTTTGTTAATAGATTGCCACAGTTCCAAGTAAGTGGCTATC  
AA 720  
N T M Q Q L F V N R L P Q F Q V S G Y Q  
GTATTATTATTACCTTTATTTGCTCAAGCAGCCACGCTTCATTTAACTTTTTTACGAG  
AT 780  
V L L L P L F A Q A A T L H L T F L R D  
GTTATCATTAAATGCCGATGAATGGAATATACCGACAGCTCAATTGAACACGTATACGCG  
A 840  
V I I N A D E W N I P T A Q L N T Y T R  
TATTTTAAAGAATATATAGCGGAATATTTCCAATTATGCTTTATCCACCTATGATGATG  
GA 900  
Y F K E Y I A E Y S N Y A L S T Y D D G  
TTTAGAACAAGATTTTATCCAAGAAATACTTTAGAAGACATGTTACAATTCAAACAT  
TT 960  
F R T R F Y P R N T L E D M L Q F K T F  
ATGACATTAATGCACTAGATCTTGTTCATTTGGTTCGTTGCTAAAATATGTAAACC  
TA 1020  
M T L N A L D L V S I W S L L K Y V N L  
TATGTAAGCACTAGTGCAAATTTATATAATATAGGGGATAATAAGGTGAATGAGGGAG  
CA 1080  
Y V S T S A N L Y N I G D N K V N E G A  
TATCCAATCTCCTATGGCCCGTTCTTTAACTCCTATATTCAGACGAAATCGAATTATGT  
A 1140  
Y P I S Y G P F F N S Y I Q T K S N Y V  
TTATCCGGTGTATCAGGGATTGGCGCTCGCTTACTTATAGTACTGTCTTAGGACGATA  
C 1200  
L S G V S G I G A R F T Y S T V L G R Y

CTTTCATGATGACCTTAAAAATATTATCACCACCTTATGTAGGTGGGACTCAAGGACCAAA  
 C 1260  
 L H D D L K N I I T T Y V G G T Q G P N  
 ATGGCGTTCAGCTTTCTACAACCGAACTCGATGAACTAAAAAACAACAACAAGCTAC  
 T 1320  
 I G V Q L S T T E L D E L K K Q Q Q A T  
 AGAGATTATTAGTAGACTTTCAATTTTTCACATTGAATTGTATGCTACCAAATCCGA  
 TT 1380  
 R D S L V D F Q F F T L N C M L P N P I  
 ACTGCACCTTATTTTCGCTACCAGCTTATATGAATCTCGTTATTTCATCAATTGGTGGATA  
 C 1420  
 T A P Y F A T S L Y E S R Y S S I G G Y  
 CTTTCGTAAGGACGTCTTTAAAAGTGAAGATAGTACCTGCGGTCTTGGTAACCCGGGTGC  
 T 1480  
 L R K D V F K S E D S T C G L G N P G A  
 TGGACATCTTATCCAGATTATTATATTACGAATATTTCTGCAACTGTACAAATAAACG  
 GA 1540  
 W T S Y P D Y Y I T N I S A T V Q I N G  
 GAAAATACAGATACAACACCGTTATATTTCAAAGAAAACAGACCCATAACTTCTACTA  
 GG 1600  
 E N T D T T P L Y F K E N R P I T S T R  
 GGTGTAAATAAAGTTATCGCTGTTTATAATAGGAAAGCCAATATAGCAGGTACAAATC  
 AA 1660  
 G V N K V I A V Y N R K A N I A G T N Q  
 AATGGTACCATGATACATCAAGCACCTCCTGATGGTACCGGTTTTACTGTATCTCCATT  
 G 1720  
 N G T M I H Q A P P D G T G F T V S P L  
 CATCCGAGCGCTAATACAATTACTTCTTATATTAAGAGAATTATGGAAATAGTGGTG  
 AT 1780  
 H P S A N T I T S Y I K E N Y G N S G D  
 TCACTCCACCTGAAGGGTCAAGGCTATCTACATTACATGCTTTCAGGGAATGGGCAGGA  
 T 1840  
 S L H L K G Q G Y L H Y M L S G N G Q D  
 CGCTACAGATTAGTTTTGAGGTTATCTGGAGCTGCAAATCAGATAAAACTTCAGTCTCC  
 G 1920  
 R Y R L V L R L S G A A N Q I K L Q S P  
 ACTACTAGTATATACGCTTTCGATACATCTACTAATAACGAAGGAATTACAGACAATG  
 GT 1980  
 T T S I Y A F D T S T N N E G I T D N G  
 TCAAATTTAAAGATTTTCGCATTTTCAACCCCTTTTGTATACCTGAACAAAAAGAAA  
 TA 2040  
 S K F K D F A F S T P F V I P E Q K E I  
 GTTTTATATTTTCGAGGGTGTAGGATCCCTTGATCTAATGAATCTTATCTTTCTTCCAG  
 CA 2100  
 V L Y F E G V G S L D L M N L I F L P A  
 GATGACACTCCTCTTTATTAG  
 D D T P L Y

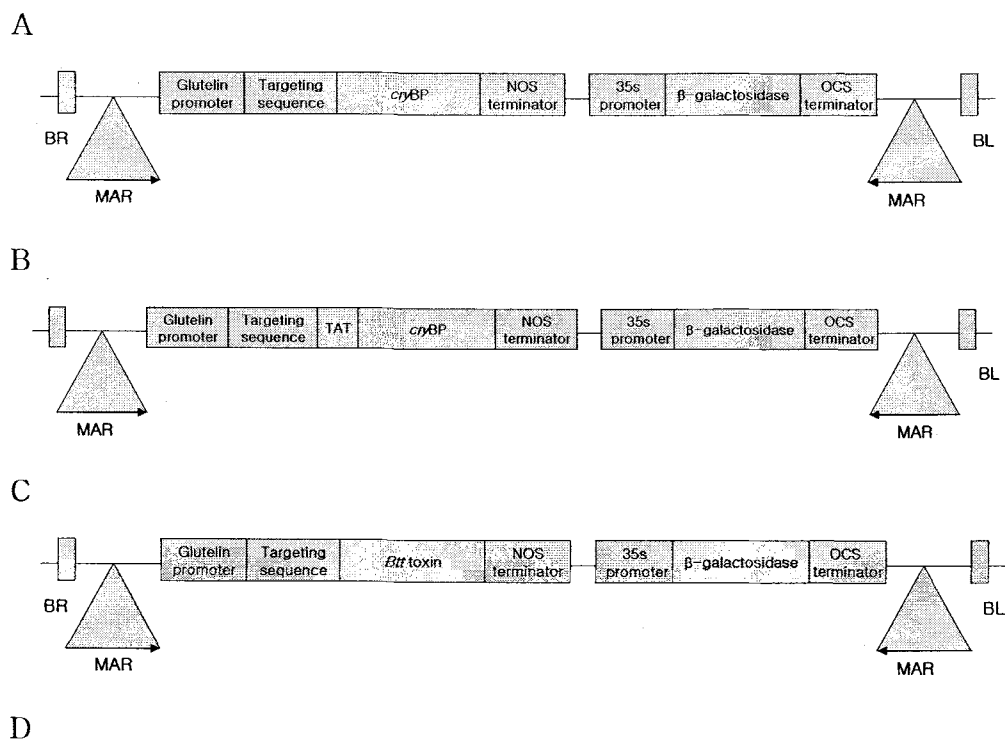
2121

**Figure 2.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of cryBP gene of *Bacillus popilliae*.

#### 라. 벼 형질 전환 벡터의 제작

cryBP 유전자를 벼에서 발현시키기 위해 *Agrobacterium*을 이용한 형질 전환 벡터를 제작하였다. Rice endosperm cell glutelin promoter에 storage vacuole targeting sequence를 연결한 다음, cryBP 유전자를 reading frame에 맞게 삽입하였다. 제작된 fusion gene 절편들을 MAR (matrix attachment region) sequence가 포함된 binary vector에 삽입하였다 (Fig. 3A). 또한 cryBP toxin이 유충에 섭취된 후 장내 세포에 좀더 효율적으로 흡수될 수 있도록 하기 위해 HIV-1 Tat basic domain sequence를 cryBP 유

전자의 앞에 open reading frame이 맞게 연결하여 glutelin promoter와 vacuole targeting sequence에 의해 유전자 발현 및 단백질 운반시 조절 받을 수 있도록 제작하였다 (Fig. 3B). 그리고 형질 전환체의 선발을 위하여 사용되어진 marker는 인체에 유익한 유산균으로부터 분리한  $\beta$ -galactosidase 유전자를 reporter gene으로 사용할 수 있도록 제작하였다. 이는 선발된 형질 전환체가 실용화 될 경우 소비자들의 거부반응을 억제할 수 있게 하기 위함이다. 위와 같은 방법으로 *B. thuringiensis subsp. tenebrionis*-toxin 유전자를 이용하여 벼 형질 전환 벉터를 제작하였다 (Fig. 3, C and D). 또한 벉 잎 발현 프로모터인 SP-LS와 벉 뿌리 세포에서 발현 시킬 수 있는 rsp (root specific promoter)를 유전자 발현 부위에 재조합하여 연결 시켰다. 그리고 최근에 벉에서 유전자 발현을 안정적으로 대량 생산시킬 수 있는 프로모터로 알려진 Ubiquitin promoter DNA 부위를 본 유전자 발현을 위해 사용할 수 있도록 조작하였다. 벉 형질 전환체 개발에 있어서 가장 문제점으로 알려진 것 중에 하나가 선발 마커이다. 이는 벉 형질 전환체 선발시 다른 항생제 마커로는 선발 효율이 낮아서 형질 전환체 선발 연구에 부적합하며, 주로 사용되어지고 있는 repoter gene들의 작용도 아직은 만족 할만한 수준이 아닌 것으로 판단되고 있기 때문이다. 이런 문제로 인해 본 연구에서는, 벉의 형질 전환체 선발을 위하여 여러 가지 문제가 있지만 현재로서는 다른 대안이 없는 관계로 제초제 저항성 유전자인 bar gene를 사용하였다 (Fig. 4).



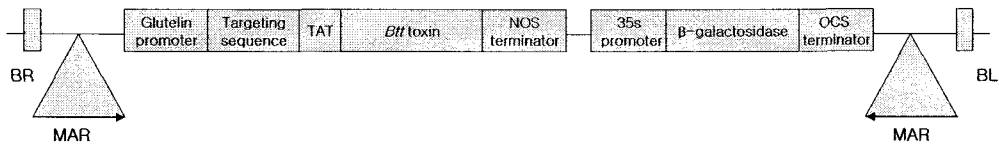
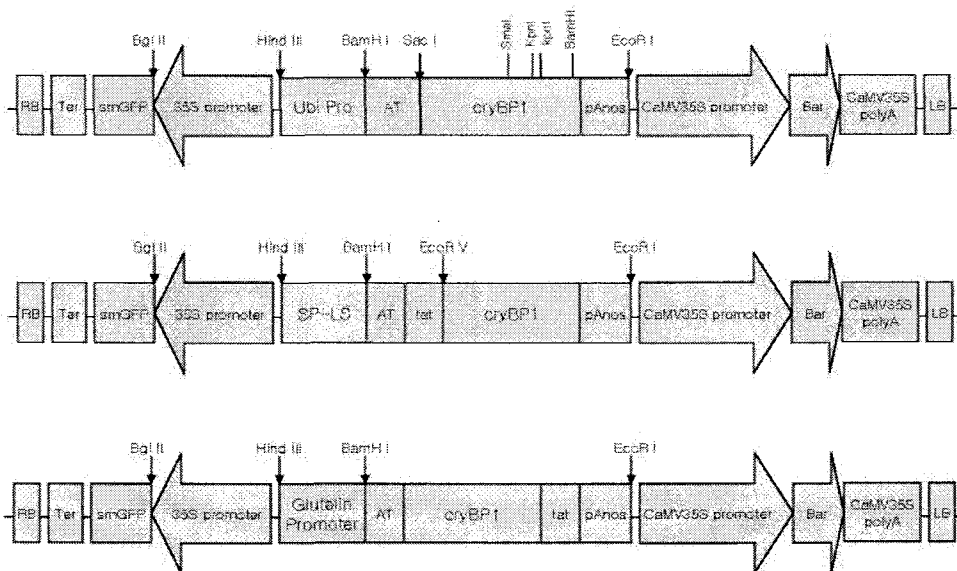
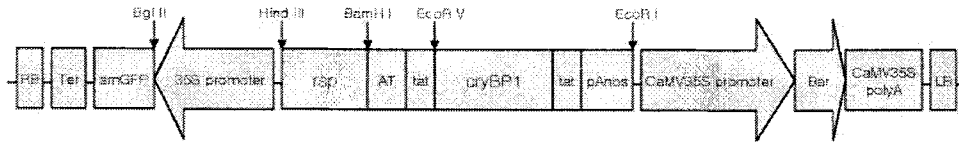


Figure 3. Schematic representation of rice transformation vectors containing cryBP or Btt toxin gene.







**Figure 4.** Schematic vector construction containing cryBP1 gene for ricetransformation. Ubi Pro, Ubiquitin promoter; SP-LS, Leaf specific promoter; Glutelin promoter, Rice glutelin gene promoter; rsp, Root specific promoter; AT, Targeting sequence; Tat, the HIV-1 protein transduction domain (PTD,RKKRRQRR); CaMV35S promoter, Cauliflower mosaic virus 35S promoter; CaMV35S polyA, nopaline synthase gene polyadenylation site; Bar, Basta-resistance (Agrevo herbicide) gene; LB, Left border; RB, Right border.

마. *Bacillus thuringiensis* SR660, SR803 균주의 포자형성 및 결정 단백질의 형태

(1). 위상차 현미경 관찰

*B. thuringiensis* SR660, SR803 균주를 LB broth에 배양하여 시간에 따라 위상차 현미경으로 관찰하였다. *B. thuringiensis* SR660, SR803 균주는 관상형 세포로 운동성이 있으며 배양한 지 48시간이 지나면서 서서히 포자를 형성하기 시작하며, 동시에 세포 내에 결정 단백질을 형성하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 5). 그러나 결정 단백질의 정확한 형태는 관찰할 수 없었다.

(2) 전자 현미경 관찰

LB broth에 48, 72 시간 배양한 *B. thuringiensis* SR660, SR803 균주를 투사 전자 현미경 (TEM)을 이용하여 각각 관찰한 결과 두 균주는 비슷하게 길이 4-6 um, 지름 1-1.5 um의 관상형 세포로서 포자를 형성하고 있었으며 동시에 세포 내에서 한개 이상의 결정 단백질을 형성하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 6). 96시간 배양한 *B. thuringiensis* SR660, SR803 균주를 투사 전자 현미경 (TEM)과 주사 전자 현미경 (SEM)으로 관찰한 결과 포자가 세포에서 분리되어 졌으며 특이하게 한 세포 내에서 길이 1.5-2.5 um, 폭 0.2-0.5 um의 rhomboid 형태의 큰 결정 단백질과 길이 0.3-0.5 um, 폭 0.2-0.5 um 정도의 몇몇의 작은 결정 단백질을 만들어 내는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7). 현미경 관찰을 통해, 96 시간 후에는 세포가 완전히 용해되어 포자와 결정 단백질만이 남은 것을 관찰할 수 있었다.

바. SDS-PAGE에 의한 결정 단백질의 분석

여러 종류의 *B. thuringiensis* 균주들을 결정 단백질이 생성되어 세포가 용해될 때까지 LB broth에서 충분히 배양한 후 sonication하여 세포를 파괴하고 원심분리하여 cell debris를 제거한 후 SDS-PAGE를 이용하여 *B. thuringiensis* SR803 균주의 단백질 조성을 알아보

았다. 다른 단백질들과 비교하였을 때, 단백질 중 약 70kDa의 위치에서 많은 양의 독소 단백질을 생성하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 8, lane 1). 또한 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주도 70kDa의 위치에서 독소 단백질을 생성하였다. 그러나 나머지 *B. thuringiensis* 균주들에서는 70kDa의 단백질을 생성하지 않았다 (Fig. 8, lane 2-5). *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*의 70kDa의 rhomboid 형태의 결정 단백질은 딱정벌레목에 살충성을 나타내며 그룹 CryIII에 속한다 (Whitely and Schnepf, 1986).

#### 사. Western blot analysis

*B. thuringiensis* SR803 균주가 만들어내는 70kDa의 단백질이 그룹 CryIII에 속하는 독성 결정 단백질인지 확인하기 위하여, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주의 독성 단백질에 대한 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다. 그 결과 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주의 독성 결정 단백질의 항체가 *B. thuringiensis* SR803 균주의 70kDa의 결정 단백질에 결합한 것으로 볼 때, 두 균주의 단백질들 사이에 면역학적인 유사성이 있음을 확인하였으며, 또한 시간에 따라 더욱더 많은 양의 결정 단백질을 생성하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 9).

#### 아. *B. thuringiensis* 균주들의 PCR analysis

CryIII 독소 유전자들이 *B. thuringiensis* SR660, SR803 균주들의 chromosomal DNA상에 위치해 있는 지를 알아보기 위하여, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 독소 유전자의 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 독소 유전자와 동일한 크기의 2.0 kb의 DNA 절편을 확인하였다 (Fig. 10). *B. thuringiensis* SR660, SR803 균주들의 독소 유전자는 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 독소 유전자와 동일하거나 유사하며, chromosomal DNA상에 있는 것으로 보여진다.

#### 자. 살충성 테스트

지금까지의 형태학적, 생리학적, 분자생물학적 데이터들을 종합하여 볼 때, *B. thuringiensis* SR660, SR803 균주들은 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주의 변이주로 추측된다. 그러므로 위 두 균주들이 생성하는 독소 단백질들이 딱정벌레목 유충에 대해 살충성을 나타내는 지를 시험하였다. *B. thuringiensis* 균주들을 30°C에서 96 시간 배양하여 결정 단백질을 생성하게 한 다음, 각각 100 ug의 단백질을 10cm<sup>2</sup> 크기의 감자 잎 표면에 바른 후 8마리 유충들을 이용하여 살충성을 시험하였다. 유충들이 *B. thuringiensis* SR660, SR803 균주들의 결정 단백질을 바른 잎은 거의 피해를 입히지 못하였으나, 결정 단백질을 처리하지 않은 잎에는 많은 피해를 입히는 것이 관찰되었다. *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주의 독성 단백질의 살충성과 비교하여 보았을 때, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주의 경우 약 3% 정도의 잎을 갇아 먹은 후, 죽은 유충은 8마리로 치사율은 100%인 반면, *B. thuringiensis* SR660 균주의 경우 30%의 피해에 3마리가 죽어 치사율은 38%이고, *B. thuringiensis* SR803 균주는 10%

의 피해에 4마리가 죽어 치사율이 50%에 이르렀다 (Table 1). 따라서 살충성 시험에서 보는 바와 같이 두 균주는 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주보다는 독성이 약하지만 딱정벌레목 유충에 독성을 나타내고 있음이 증명되었다.

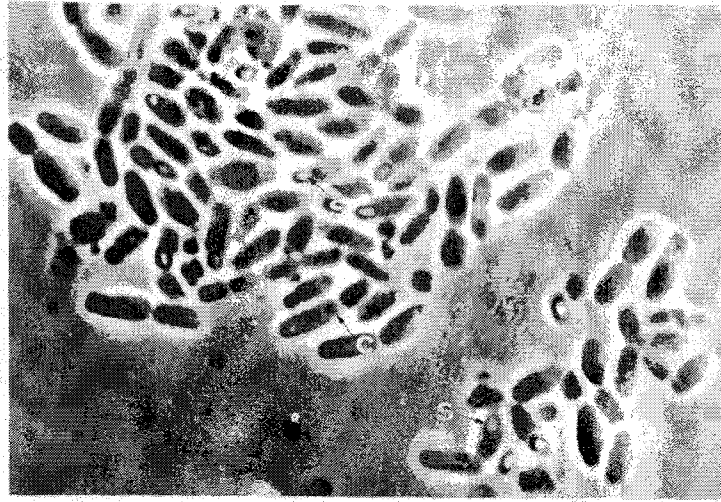


Figure 5. Phase-contrast micrographs showing formation of spores and crystal proteins of *B. thuringiensis* SR803. *B. thuringiensis* SR803 was grown for 72 h at 30°C. 'S', spore; 'C', crystal.

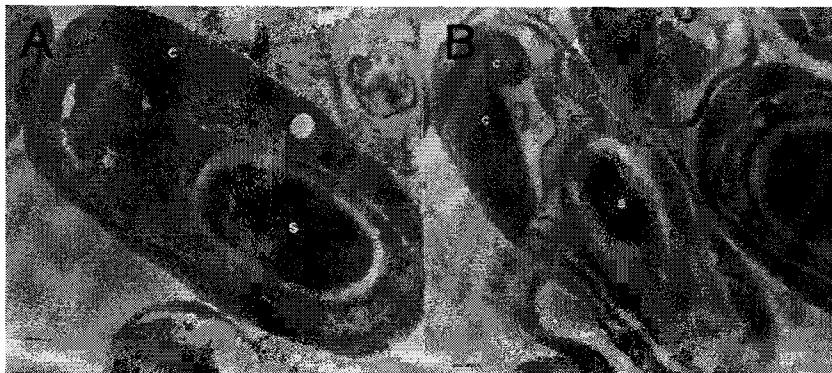


Figure 6. Transmission electron microscopes displaying the thin section of sporangia of *B. thuringiensis* SR803 and longitudinal section of the sporulating cell with the forespore and rhomboidal crystal protein in cross section. *B. thuringiensis* SR803 was grown for 48 h at 30°C (A), and 72 h at 30°C (B). [Bar: 0.23 μm]. 'S', Forespore; 'C', Rhomboidal crystal protein.

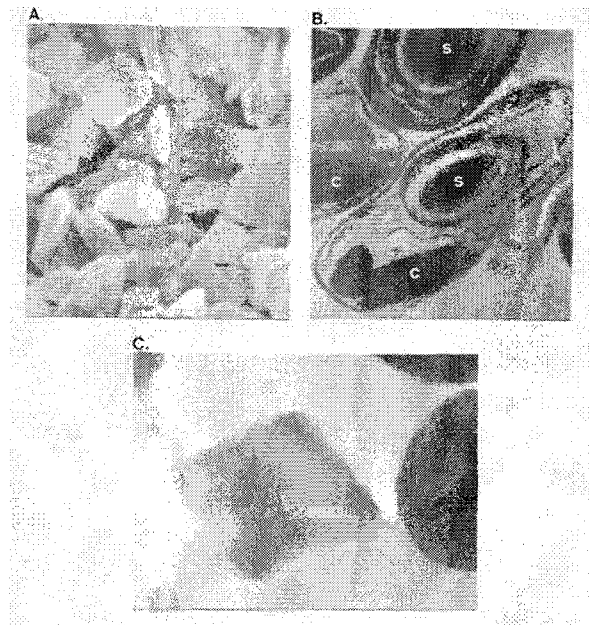


Figure 7. Rhomboidal crystals synthesized by *B. thuringiensis* SR803. Longitudinal section of the rhomboidal crystal protein cross section (A), plane section (B), and scanning electron microscopes (C). The crystals are approximately 0.5–2.5  $\mu\text{m}$  in length and 0.2–0.5  $\mu\text{m}$  in width. [Bar: 0.23  $\mu\text{m}$ ].

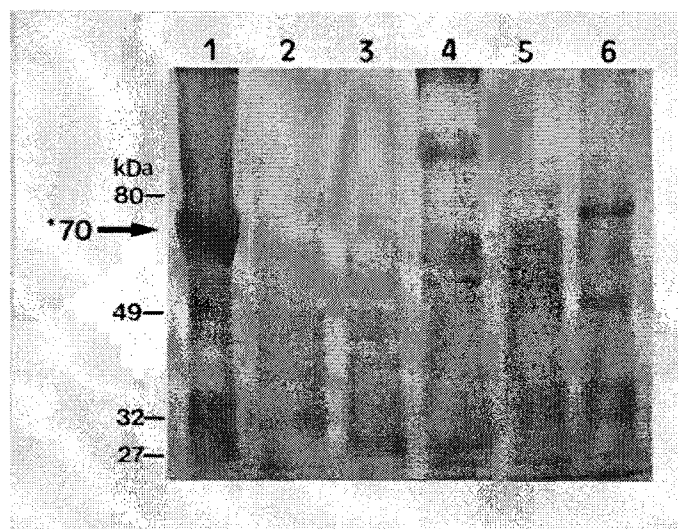


Figure 8. Analysis of proteins produced in various *B. thuringiensis* strains on

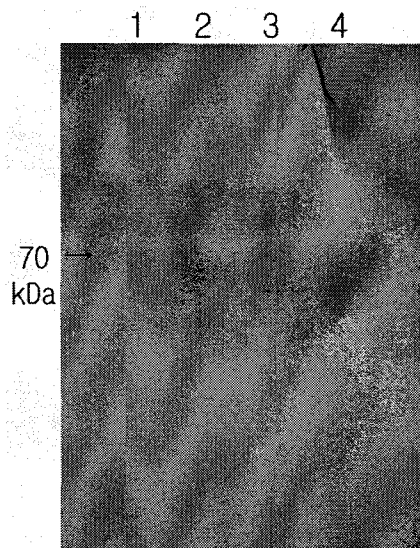
SDS-PAGE.

Lanes 1, *B. thuringiensis* SR803; 2, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*;

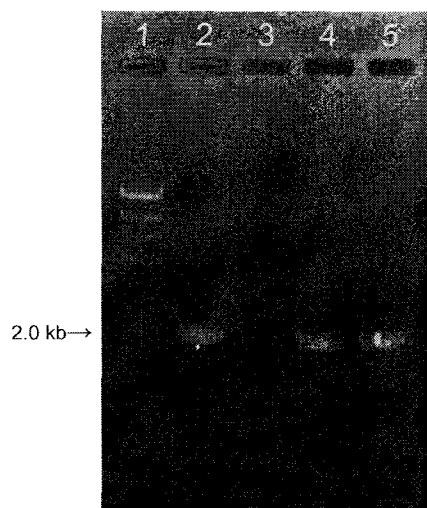
3, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*; 4, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*;

5, *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni*; 6, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*.

Protein sizes are indicated in kDa. The polyacrylamide concentration was 10%.



**Figure 9.** Western blot analysis of *B.t.*-toxins produced in *B. thuringiensis* SR803 as incubation time. Lanes 1, 24 h; 2, 48 h; 3, 72 h; 4, 96 h. Arrow indicates the *B.t.*-toxins of 70 kDa.



**Figure 10.** Detection of DNA fragments of *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*-toxin gene amplified by PCR on the agarose gel. Lanes 1,  $\lambda$ /DNA *Hind*III size marker; 2, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*-toxin gene (positive control); 3, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*; 4, *B. thuringiensis* SR803; 5, *B. thuringiensis* SR660. Arrow indicates amplified 2.0 kb fragments.

Table 1. Bioassay with the cell extracts of *B.t.* strains against eight potato beetle larvae, *L. decemlineata*. The size of leaf is 10 cm<sup>2</sup>.

<i>B. thuringiensis</i> strains	Mortality	Leaf damage
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>	8/8 (100%)	3%
<i>B. thuringiensis</i> SR660	3/8 (38%)	15%
<i>B. thuringiensis</i> SR803	4/8 (50%)	10%
Control	0/8 (0%)	60%

#### 4 종합 고찰

살충성 독소 단백질은 특정 해충의 유충에 대한 특이적 살충성이 있고 환경 친화적이며, 인체 무해한 무공해 미생물 살충 단백질이라는 점에서 많은 관심을 가지고 있다. 본 연구에서는 박테리아 독소 살충제로 잘 알려진 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*-toxin gene과 *B. popilliae*의 cryBP gene을 분리 및 특성을 규명하고 작물체에서 발현할 수 있도록 형질전환백터를 개발하는데 목표를 두었다. 이를 위해 우선 PCR 기법을 이용하여 *B. popilliae* 균주로부터 cryBP 유전자를 클로닝하였다. 클로닝된 DNA 절편의 크기는 2121 bp이며, NCBI의 유전자 염기서열 비교 결과 *B. popilliae*의 cryBP 유전자의 염기서열과 100% 상동성이 있다는 것이 확인하였다. 해충 세포에 독소 단백질의 침투 효과 상승을 위해 cryBP 유전자에 HIV-1 Tat basic domain을 coding 하는 올리고머를 앞, 뒤 그리고 양쪽에 위치하도록 하여 Tat-fused cryBP 유전자를 제작하여 벼 형질전환 백터를 제작하는데 이용하였다. cryBP 유전자를 벼의 기관 부위별로 발현시키기 위해서, *Agrobacterium*을 이용한 형질 전환 백터를 제작하였다. 벼 배유 세포에서 cryBP 유전자가 발현 되게 하기위해서 rice endosperm cell specific glutelin promoter에 storage vacuole targeting sequence를 연결한 다음, cryBP 유전자를 reading frame에 맞게 연결시켰다. 위와 같은 방법으로 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*-toxin 유전자를 이용하여 벼 형질 전환 백터를 제작하였다. 또한 벼 잎 발현 프로모터인 SP-LS와 벼 뿌리 세포에서 발현 시킬 수 있는 rsp (root specific promoter)를 유전자 발현 부위에 재조합하여 연결 시켰다. 그리고 벼에서 유전자 발현을 안정적으로 대량 생산시킬 수 있는 프로모터로 알려진 Ubiquitin promoter DNA 부위를 본 유전자 발현을 위해 사용 할 수 있도록 조작하였다. 형질 전환체의 선발을 위하여 사용되어진 marker는 인체에 유익한 유산균으로부터 분리한  $\beta$ -galactosidase 유전자와 제초제 저항성 유전자인 bar gene을 reporter gene으로 사용할 수 있도록 제작하였다.

특성 규명이 되지 않은 *B. thuringiensis* 균주의 동정을 형태학적, 생리학적, 분자생물학적

측면에서 실시하였다. 일반적으로 *B. thuringiensis* 균주는 포자 형성시기를 전후하여 결정형 독소 단백질을 생성하는 것으로 알려져 있으므로 배양된 균주를 현미경으로 관찰한 결과, 포자는 밝게 나타나는 반면 결정형 독소 단백질은 검은 형태의 세포내 inclusion body로 나타났으며, 마름모형에 얇고 납작한 모양이 확인되었다. SDS-PAGE 분석을 통해 *B. thuringiensis* 변이 균주가 생성하는 독소 단백질의 양 및 분자량 등을 분석한 결과 다른 균주들 보다 70kDa의 독소 생성에서 더욱더 많은 양의 독소 단백질이 생성되는 것이 확인되었다. 또한 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주의 독성 단백질에 대한 항체를 이용한 Western blot과 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 독소 유전자의 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주의 독성 결정 단백질의 항체가 *B. thuringiensis* 변이 균주의 70kDa의 결정 단백질에 결합한 것으로 볼 때, 두 균주의 단백질들 사이에 면역학적인 유사성이 있음을 확인하였으며, 또한 시간에 따라 더욱더 많은 양의 결정 단백질을 생성하는 것을 볼 수 있었고, 예상되었던 DNA 크기가 증폭되었음을 알 수 있었다. Western blot 분석과 PCR 분석을 통하여 볼 때, 이 *B. thuringiensis* 균주는 그룹 cryIII에 속하는 독소 단백질일 가능성이 높다고 사료된다. *B. thuringiensis* 균주들이 생성하는 독소 단백질들이 딱정벌레목 유충에 대해 살충성을 나타내는 지를 시험하였다. 유충들이 *B. thuringiensis* 균주들의 결정 단백질을 바른 잎은 거의 피해를 입히지 못하였으나, 결정 단백질을 처리하지 않은 잎에는 많은 피해를 입히는 것이 관찰되었다. 위에서 언급된 여러 연구결과들을 종합적으로 살펴 볼 때, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*-toxin 유전자와 cryBP 유전자를 이용한 벡터 개발은 형질 전환 농작물 개발 및 농약 사용 절감과 농가 피해 방지에 많은 도움이 될 수 있으리라 사료되며, *B. thuringiensis* 균주의 특성 규명은 무공해 미생물 농약 개발 및 식물체 형질 전환체 개발, 그리고 환경 보호 측면에서 많은 관심이 모아지고 있다. 그러므로 이 균주의 특성 규명 및 독성의 연구는 앞으로 유전자 클로닝 및 유전자 대량 발현 기작의 규명에 많은 기여 할 것이라 여겨진다. 또한, 다른 유전자와 재조합하여 살충범위를 넓히는데도 사용되어 질 수 있으리라 여겨진다.

## 5 적요

살충성 독소 단백질은 특정 해충의 유충에 대한 특이적 살충성이 있고 환경 친화적이며, 인체 무해한 무공해 미생물 살충 단백질이라는 점에서 많은 관심을 가지고 있다. 본 연구에서는 박테리아 독소 살충제로 잘 알려진 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*-toxin gene과 *B. popilliae*의 cryBP gene을 분리 및 특성을 규명하고 작물체에서 발현할 수 있도록 형질전환벡터를 개발하는데 목표를 두었다. 이를 위해 *B. popilliae* 균주로부터 cryBP 유전자를 클로닝하였으며, 해충 세포에 독소 단백질의 침투 효과 상승을 위해 cryBP 유전자에 HIV-1 Tat basic domain을 coding하는 올리고머를 앞, 뒤 그리고 양쪽에 위치하도록 하여 Tat-fused cryBP 유전자를 제작하여 벡터 형질전환 벡터를 제작하였다. 또한, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*-toxin 유전자를 이용하여 벡터 형질 전환 벡터를 제작하였다. 특성 규명이 되지 않은 *B. thuringiensis* 균주를 형태

학적, 생리학적, 분자생물학적 측면에서 연구를 실시한 결과, 포자는 밝게 나타나는 반면 결정형 독소 단백질은 검은 형태의 세포내 inclusion body로 나타났으며, 마름모형에 얇고 납작한 모양이 확인되었다. SDS-PAGE 분석을 통해 다른 균주들 보다 70kDa의 독소 생성에서 더욱더 많은 양의 독소 단백질이 생성되는 것이 확인되었다. Western blot, PCR 분석 및 살충성 테스트를 통해, *B. thuringiensis* 변이 균주의 70kDa의 결정 단백질이 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 균주의 독성 결정 단백질과 면역학적인 유사성이 있음을 확인하였으며, 그룹 cryIII에 속하는 독소 단백질일 가능성이 높다고 사료되었다. 본 연구에서 개발된 형질 전환 벡터들은 형질 전환 농작물 개발 및 농약 사용 절감과 농가 피해 방지에 많은 도움이 될 수 있으리라 사료되며, *B. thuringiensis* 균주의 특성 규명과 독성연구는 앞으로 유전자 클로닝 및 유전자 대량 발현 기작의 규명에 많은 기여 할 것이라 여겨진다. 또한, 다른 유전자와 재조합하여 살충범위를 넓히는데도 사용되어 질 수 있으리라 여겨진다.



### 제3절) 제3세부과제: 곤충병원 미생물로부터 작물형질전환용 살충성 유전자 탐색(서울대)

1:곤충병원성 Bt로부터 신규 살충성 유전자 탐색 및 분리

가. 재료 및 방법

(1) 실험재료

(가) *Bacillus thuringiensis*

*B. thuringiensis* (Bt) type strain은 일본 구주대학 생물적 방제 연구실의 Ohba 박사로부터 분양받아 사용하였다. 본 연구에 사용된 Bt 균주는 전국의 양잠농가 및 저곡창고 그리고 다양한 형태의 토양으로부터 분리되어 본 실험실에서 보관중이던 것을 사용하였다.

(나) 실험곤충 및 인공사육

누에유충(*Bombyx mori* larvae)는 농업과학기술원 잠사곤충부에서, 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 농업과학기술원 농업해충과에서 분양받아 동방유량(주) 제품 애누에 인공사료를 공급자의 방법에 따라 조제하여  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$  조건에서 사육하였다. 과밤나방(*Spodoptera exigua*)은 본 실험실에서 누대 사육하였고 과리목의 위생곤충인 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*) 유충은 서울대학교 생리활성천연물연구실에서 분양받아 사용하였다.

(다) PCR primers 합성

나비목 해충에 대해 독성을 갖는 내독소단백질 유전자를 확인하기 위하여 21 mer의 sense primer인 K5un2 (5'-AGGACCAGGATTTACAGGAGG-3')와 25 mer의 antisense primer인 K3un2 (5'-GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC-3'), Bt 균주의 새로운 유전자를 클로닝하기 위하여 primer set (ATG1-F와 N400-R)과 primer set (1BeATG1-F와 N400-R)사용하였다 (그림 13). 분리된 새로운 유전자를 발현하기 위하여 30 mer의 sense primer인 Bgl IIATG1-F (5'-GGAAGATCTATGCAATGCGTACCTTACAAT-3')와 29 mer의 antisense primer인 Not I 400-R (5'-TAAAGCGGCCCATCGATTCGGTTCACCGC-3')을 사용하였다. 각 primer들은 (주) COSMO genetech(한국)에 의뢰하여 합성하였다.

## (2) 실험방법

### (가) 생물검정

#### ① Bt 균주의 생물검정

분리한 Bt 균주를 GYS 배지로 30°C, 150 rpm에서 4~7일간 배양하고 내독소단백질이 생성됨을 현미경으로 확인하고 2령 누에유충 및 2령 빨간집모기유충을 사용하여 생물검정을 실시하였다. 누에유충은 Bt 배양액을  $1 \times 10^7$  cfu/cm<sup>2</sup>의 농도로 인공사료 (2×2×0.5 cm)에 도말하여 음건하고 48시간 동안의 치사율을 조사하였다. 빨간집모기 유충은 Bt 배양액을  $1 \times 10^7$  cfu/ml의 농도로 희석한 20ml의 접종원에 사육하면서 48시간 동안의 치사율을 조사하였다.

#### (나) 재조합 바이러스의 생물검정

##### ①. 재조합 바이러스의 다각체 정제

재조합 바이러스 세포를 세포 용해 완충액 (cell lysis buffer) (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.4% SDS, 10 mM EDTA, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol)에 처리한 다음 5,000 rpm 조건하에서 5분 원심분리한다. 상층액을 수거하여 0.1% Tween 20으로 두 번 씻어 정제한다.

##### ②. 다각체 정량

다각체의 정량은 다각체를 SDS-PAGE 한 다음 Kodak 1D gel analysis system (미국)을 이용하여 분석하였다. 다각체의 SDS-PAGE 전기영동 방법은 Laemmli의 방법 (Laemmli, Nature, 227, 680-685(1970))에 따라 다음과 같이 실시하였다. 준비된 바이러스 다각체 시료 일정량에 5배 시료 완충용액 (1M Tris-HCl(pH 6.8) 0.6 ml, 50% 글리세롤 5 ml, 10% SDS 2 ml, 2-머캅토에탄올 0.5 ml, 1% 브로모페놀 블루 1 ml, 증류수 0.9 ml)을 가하고 100°C 물에서 10분 간 가열한 후 상온에서 잠시 정치시키고 원심분리하여 상층액을 회수한 다음, 12% SDS 전기영동을 실시하였다.

##### ③. 생물검정

준비된 다각체를 2  $\mu$ g/ml 농도로 만든 다음 연속적으로 희석하여 사용하였다. 배추좀나방의 경우, 2령 유충을 각각 15마리씩 35 mm petridish에 넣은 다음 다각체가 도말된 배춧잎을 넣고 48시간 동안의 치사율을 조사하였다. 과밤나방의 경우, 1령 유충을 각각 15마리씩 35 mm petridish에 넣은 다음 다각체가 도말된 배춧잎을 넣고 72시간 동안의 치사율을 조사하였다. 실험은 모두 3반복으로 수행하였다.

(나). Plasmid DNA의 분리

Bt 균주의 plasmid는 QIAGEN<sup>□</sup> Plasmid Midi Kit (QIAGEN, 독일)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 기타 plasmid DNA는 AccuPrep<sup>TM</sup> Plasmid Extraction Kit (Bioneer, 한국)을 이용하여 분리한 후 실험에 사용하였다.

(다). Polymerase Chain Reaction (PCR)과 RFLP를 이용한 유전자형 분석

각 선발균주의 *cryI* type 유전자형을 분석하기 위하여 Bt 균주의 plasmid DNA를 분리하고 이를 주형으로 하여 합성한 primer들과 함께 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 AccuPower<sup>TM</sup> PCR PreMix (Bioneer, 한국)을 이용하여 수행하였다. 증폭반응은 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Corp., 미국)을 사용하여 94°C에 1분 (denaturation), 52°C에 2분 (annealing), 72°C에 1분 30초 (polymerization)의 조건으로 35 cycle 동안 수행하였다. 각 반응의 산물에 제한효소를 처리한 후 3% agarose gel에 전기영동하여 RFLP 패턴에 따라 유전자형을 확인하였다.

(라). PCR 산물의 cloning

PCR 산물을 cloning하기 위하여 각 산물을 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, 독일)을 이용하여 순수분리하였다. 순수분리된 PCR 산물은 pGemT-Easy PCR cloning vector (Promega, 미국)에 cloning 하였다.

(마). 편모항원 응집반응

편모항원 응집반응은 96-well plate를 이용하여 수행하였다. 50 rpm으로 회전하는 배양기에서 28°C에 8~10시간 동안 키운 Bt 배양액 100  $\mu$ l를 염용액으로 100배 희석한 동량의 편모항체와 잘 섞고 37°C에서 1시간 동안 정치하며 well의 밑부분에 침전이 생기는 응집반응을 관찰하였다. 침전물의 생성은 반응이 일어남을 의미한다.

(바). DNA 염기서열 결정

클로닝된 *cryI* type 유전자의 염기서열 결정은 (주) 마크로젠에 의뢰하여 수행하였다.

## 나. 실험 내용 및 결과

### (1) 나비목 곤충병원 Bt 균주의 선발

나비목에 강독성을 가지는 새로운 Bt 균주를 탐색하기 위하여, 국내에서 분리되어 본 실험실에서 보유하고 있는 Bt 균주 중 125개를 대상으로 실험하였다. 이들 125개의 Bt 균주는 내독소단백질을 생성하는 것으로 위상차현미경 하에서 관찰되었다. 1차로 선발된 125개의 균주에 대하여 나비목 곤충중 가장 감수성이 높은 것으로 알려져 있는 누에를 대상으로 생물검정을 실시한 결과 80% 이상의 치사율을 보인 56개 균주를 2차적으로 선발하였다(Table 1). 2차선발 균주 중 46개는 누에에 대하여 100%의 살충성을 보였으며, 9개는 90% 이상의 살충성을, 1개는 80% 이상의 살충성을 보였다. 또한, 이들 56개 균주 모두는 위상차현미경 관찰시 bipyramidal 형태의 crystal을 생성하는 것으로 확인되었는데, 이러한 bipyramidal 형태의 crystal은 나비목 해충에 대하여 독성을 갖는 *cry1* type 내독소단백질과 파리목 해충에 대하여 독성을 갖는 *cry4* type 내독소단백질에 의하여 생성되는 것으로 기존에 보고되어 있다(Whiteley 와 Ernest Schnepf, 1986). 그러나 본 실험에서 선발된 56개의 균주 대부분은 나비목 곤충에 비해 파리목 해충인 빨간집모기유충에 대하여 그다지 높은 살충성을 보이지 않은 것으로 보아(Table 1) 주로 *cry1* type의 내독소단백질을 생산하는 것으로 추정되었다.

Table 1. Database of Lepidoptera-specific Bt strains isolated from Korea

Serial No.	Isolate	Collection region <sup>1)</sup>	Sample type	Crystal shape <sup>2)</sup>	Bioassay (% mortality)	
					<i>Bombyx mori</i> (1 X 10 <sup>7</sup> CFU/cm <sup>3</sup> )	<i>Culex pipiens</i> (1 X 10 <sup>7</sup> CFU/ml)
1	1276-1	Poonggi, KW	mountain soil	BP / LM	100	40
2	1276-3	Poonggi, KW	mountain soil	BP / LM	100	55
3	1277-1	Poonggi, KW	mountain soil	BP / MS	100	55
4	1277-2	Poonggi, KW	mountain soil	BP / LM	100	60
5	1281-2	Poonggi, KW	sandy soil	BP / LS	100	40
6	1287-2	Poonggi, KW	grass leaf	BP / LMS	100	40
7	1288-2	Poonggi, KW	Acacia leaf	BP / LMS	100	75
8	1290-3	Poonggi, KW	tree leaf	BP / LMS	95	60
9	1291-1	Poonggi, KW	tree leaf	BP / L	100	50
10	1291-2	Poonggi, KW	tree leaf	BP / LM	100	80
11	1292-1	Poonggi, KW	grass leaf	BP / M	100	50
12	1293-1	Poonggi, KW	tree leaf	BP / LS	100	50
13	1294-1	Poonggi, KW	tree leaf	BP / LM	100	85
14	1296-2	Kimcheon KB	pine leaf	BP / LMS	100	30
15	1299-2	Kimcheon KB	tree leaf	BP / LMS	100	30
16	1300-1	Kimcheon KB	Ginkgo leaf	BP / LMS	100	50
17	1302-3	Jinan JB	sandy soil	BP / L	100	100
18	1308-2	Buan JB	mountain soil	BP / LMS	100	50
19	1315-1	Buan JB	mountain soil	BP / LMS	100	63.3
20	1318-1	Buan JB	upland soil	BP / LM	100	70
21	1334-1	Byunsan JB	sandy soil	BP / LMS	100	40
22	1342-1	Jinan JB	grass leaf	BP / LMS	100	50
23	1381-1	Mt. Jiri, JB	soil	BP / LMS	90	40
24	1382-2	Mt. Jiri, JB	soil	BP / LM	100	40
25	1397-1	Mt. Jiri, JB	soil	BP / LM	100	30
26	1414-1	Mt. Jiri, JB	tree leaf	BP / LMS	100	90
27	1422-2	Mt. Jiri, JB	moss	BP / LM	100	50
28	1425-1	Kimje, JB	fine sand	BP / LM	100	70
29	1430-2	Kimje, JB	soil	BP / LMS	100	70
30	1433-1	Kimje, JB	fine sand	BP / L	100	70

Table 1. Continued.

Serial No.	Isolate No.	Collection region	Sample type	Crystal shape	Bioassay (% Mortality)	
					<i>Bombyx mori</i> (1 X 10 <sup>7</sup> CFU/cm <sup>3</sup> )	<i>Culex pipiens</i> (1 X 10 <sup>7</sup> CFU/ml)
31	1434-2	Kimje, JB	mud	BP / LM	100	50
32	1435-2	Jungeup, JB	soil	BP / LM	100	40
33	1436-1	Jungeup, JB	soil	BP / LM	100	60
34	1439-2	Jungeup, JB	soil	BP / LM	100	70
35	1440-1	Jungeup, JB	loess	BP / LMS	100	60
36	1440-2	Kimje, JB	loess	BP / LM	100	35
37	2100-3	Boeun CB	soil	BP / LS	100	77.5
38	2112-2	Boeun CB	rice cake	BP / LMS	100	60
39	2112-3	Boeun CB	rice cake	BP / MS	100	75
40	2117-2	Boeun CB	rice bran	BP / LMS	100	37.5
41	2117-3	Boeun CB	rice bran	BP / LMS	100	55
42	2161-1	YoungDong, CB	dust	BP / LMS	97.5	57.5
43	2258-1	Hwabuk, JN	rice cake	BP / MS	100	60
44	2260-1	Hwasun, JN	rice cake	BP / M	90	56.5
45	2311-1	Buan JB	dust / rice	BP / LMS	100	53.5
46	2314-1	Buan JB	dust	BP / LS	97.5	42.5
47	2317-1	Buan JB	dust	BP / LMS	100	28.3
48	2317-2	Buan JB	dust	BP / LMS	97.5	65
49	2320-1	Buan JB	dust	BP / LM	100	51.7
50	2320-2	Buan JB	dust	BP / LM	100	62.5
51	2320-3	Buan JB	dust	BP / MS	100	22.5
52	2326-2	Buan JB	dust	BP / LMS	95	40
53	2327-1	Buan JB	dust	BP / LS	100	47.5
54	2343-1	Iksan, JB	loess	BP / M	95	47.5
55	2364-1	Iksan, JB	dust	BP / LS	85	60
56	2385-1	Namwon, JB	soil / rice bran	BP / LMS	95	37.5

<sup>1)</sup> CB: Chungcheongbuk-do; JB: Jollabuk-do; JN: Jollanam-do; KB: Kyungsangbuk-do; KW: Kangwon-do

<sup>2)</sup> BP: bipyramidal shape; LMS: crystal size, L (large), M (medium), S (small)

## (2) 나비목 병원성 내독소단백질 유전자 탐색

나비목 해충에 강독성을 가지는 새로운 내독소단백질 유전자를 탐색하기 위하여, 나비목에 높은 독성을 가지는 것으로 알려진 *cryI* type 유전자를 대상으로 PCR 증폭 및 RFLP를 수행하였다. 기존에 보고되어 있는 전체 *cryI* type 유전자들의 염기서열을 비교하여 높은 상동성을 보이는 부위를 탐색하고 이들 부위를 대상으로 sense primer인 K5un2와 antisense primer인 K3un2를 설계하였다(Table 2). 이들 primer들은 *cryI* type 유전자에 대해 대응되지 않는 염기서열수가 4개의 염기 이하로 상당히 높은 상동성을 보였으며, 그 PCR 산물의 예상되는 크기는 약 1.65 kb 정도였다. 또한, 기존에 보고된 *cryI* type 유전자의 PCR 산물에 대한 제한효소 처리시의 RFLP 패턴은 Table 3에 나타나 있다.

위에서 합성된 primer들과 함께 선발된 56개 Bt 균주의 plasmid DNA를 template로 하여 각각 PCR 반응을 수행한 결과, 예상한대로 약 1.65 kb 정도의 PCR 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이렇게 증폭된 PCR 산물을 순수분리하고 제한효소들을 처리하여 그 RFLP 패턴을 type strain인 *kurstaki* 및 *aizawai* 균주와 비교·분석하였다(Fig. 2). 대조구로 사용한 *kurstaki*와 *aizawai* 균주는 모두 대표적인 나비목 해충에 대한 강독성 균주로서 *kurstaki* 균주는 *cryI* type 유전자중 *cryIAa*, *cryIAb* 및 *cryIAc* 유전자를 가지고 있는 것으로 보고되어 있으며, *aizawai* 균주는 *cryIAa*, *cryIAb*, *cryICa* 및 *cryIDa* 유전자를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Herman 과 Whiteley, 1989). 56개 선발균주의 RFLP 패턴을 분석한 결과 이들은 총 8개의 group으로 분류할 수 있었고(Table 4), 그중 한 group은 type strain인 *aizawai* 균주와 동일한 RFLP 패턴을 보였으며, 나머지 7개의 group은 type strain들과는 다른 새로운 type임을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 *aizawai*와 동일한 패턴을 보인 group은 배제하고 새로운 패턴을 보인 7개의 group에 대해 각각 A, B, C, D, E, F, G group으로 명명하고, 각각의 group에서 standard 균주 1개씩 총 7균주를 선발하여 이후의 실험에 사용하였다.

또한 최종적으로 선발된 7개 균주에 대해 편모항원성 검정을 실시한 결과, 2112-3 균주, 2117-2 균주 및 2320-3의 3개 균주는 *kurstaki* subspecies에 속하는 종류로 확인되었으며, 2385-1 균주는 *kenyae* subspecies에 속하는 것으로 나타났다. 그러나 2311-1, 2181-2 및 1299-2 균주는 본 실험실에서 보유하고 있는 33종의 편모항원 중 어느것과도 반응을 보이지 않았다(Table 5).

Table 2. Nucleotide sequences of oligonucleotide primers and the corresponding regions of the distinct *cryI* type genes

Primer or gene	Sequence	Position <sup>a</sup>	Accession No.
K5un2	AGGACCAGGATTTACAGGAGG (21)		
<i>cryIAa1</i>	*****	1993-2013	M11250
<i>cryIAb1</i>	*****	1611-1631	M13898
<i>cryIAc1</i>	*****T**T**	1854-1874	M11068
<i>cryIAd1</i>	*****	1467-1487	M73250
<i>cryIAe1</i>	*****	1550-1570	M65252
<i>cryIBa1</i>	*****T**T**	1554-1574	X06711
<i>cryIBb1</i>	***G*****T**	1638-1658	L32020
<i>cryIBc1</i>	***G*****T**	1712-1732	Z46442
<i>cryIBd1</i>	*****T**T**	2410-2430	U70726
<i>cryICa1</i>	*****	1504-1524	X07518
<i>cryICb1</i>	***T*****	1753-1773	M97880
<i>cryIDa1</i>	***T**T*****T**	1700-1720	X54160
<i>cryIDb1</i>	***T**T*****C**	1677-1697	Z22511
<i>cryIEa1</i>	*****	1578-1598	X53985
<i>cryIEb1</i>	***C*****	1446-1466	M73253
<i>cryIFa1</i>	***G**C**G*****G****	1926-1946	M63897
<i>cryIFb1</i>	*****C**G*****T**	1931-1951	Z22512
<i>cryIGa1</i>	*****T*****T**	1491-1511	Z22510
<i>cryIGb1</i>	*****C*****T**	1965-1985	U70725
<i>cryIHa1</i>	***T**T*****T**	1981-2001	Z22513
<i>cryIHb1</i>	γ) ***T**T*****	2176-2196	U35780
<i>cryIKa1</i>	***G****G*****	2007-2027	U28801
K3un2	GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC (25)		
<i>cryIAa1</i>	*****	3603-3627	M11250
<i>cryIAb1</i>	*****	3143-3167	M13898
<i>cryIAc1</i>	*****	3470-3494	M11068
<i>cryIAd1</i>	*****	3077-3101	M73250
<i>cryIAe1</i>	*****	3160-3184	M65252
<i>cryIBa1</i>	*****	3215-3239	X06711
<i>cryIBb1</i>	*****	3296-3320	L32020
<i>cryIBc1</i>	*****	3370-3394	Z46442
<i>cryIBd1</i>	*****	4077-4101	U70726
<i>cryICa1</i>	*****	3150-3174	X07518
<i>cryICb1</i>	*****A*****	3360-3384	M97880
<i>cryIDa1</i>	*****A*****	3295-3319	X54160
<i>cryIDb1</i>	*****	3272-3296	Z22511
<i>cryIEa1</i>	*****A*****	3188-3212	X53985
<i>cryIEb1</i>	*****A*****	3053-3077	M73253
<i>cryIFa1</i>	*****	3536-3560	M63897
<i>cryIFb1</i>	*****A*****A****	3538-3562	Z22512
<i>cryIGa1</i>	*****A*****A****	3201-3125	Z22510
<i>cryIGb1</i>	*****A*****	3575-3599	U70725
<i>cryIHa1</i>	**C*****	3582-3606	Z22513
<i>cryIHb1</i>	*****A*****	3771-3795	U35780
<i>cryIKa1</i>	*****T**	3614-3638	U28801

<sup>a</sup> Position where the oligonucleotide primers probe the *cry*-type gene



Table 3. Predicted sizes of PCR products and the RFLP of various *cryI* type genes

<i>cry</i> -type gene	Predicted size (bp) of PCR product	Predicted size (bp) of PCR products digested with	
		<i>Pst</i> I and <i>Xba</i> I	<i>Eco</i> RI and <i>Cla</i> I
<i>cryIAa1</i>	1,635	1,117 / 518	820 / 707 / 108
<i>cryIAb1</i>	1,557	1,039 / 518	1,449 / 108
<i>cryIAc1</i>	1,641	801 / 518 / 322	750 / 707 / 184
<i>cryIAd1</i>	1,635	723 / 518 / 238 / 140 / 16	425 / 416 / 395 / 291 / 108
<i>cryIAe1</i>	1,635	961 / 518 / 140 / 16	820 / 416 / 291 / 108
<i>cryIBa1</i>	1,686	1,015 / 655 / 16	503 / 479 / 416 / 288
<i>cryIBb1</i>	1,683	655 / 624 / 238 / 150 / 16	630 / 416 / 349 / 288
<i>cryIBc1</i>	1,683	1,445 / 238	961 / 630 / 92
<i>cryIBd1</i>	1,692	871 / 655 / 150 / 16	704 / 639 / 349
<i>cryICa1</i>	1,671	758 / 423 / 239 / 140 / 95 / 16	964 / 707
<i>cryICb1</i>	1,632	958 / 518 / 140 / 16	1,632
<i>cryIDa1</i>	1,620	962 / 518 / 140	913 / 416 / 291
<i>cryIDb1</i>	1,620	946 / 518 / 140 / 16	1,620
<i>cryIEa1</i>	1,635	743 / 518 / 218 / 140 / 16	977 / 658
<i>cryIEb1</i>	1,632	974 / 658	1,232 / 400
<i>cryIFa1</i>	1,635	961 / 518 / 140 / 16	928 / 416 / 291
<i>cryIFb1</i>	1,632	736 / 423 / 238 / 140 / 95	817 / 707 / 108
<i>cryIGa1</i>	1,635	606 / 518 / 511	928 / 707
<i>cryIGb1</i>	1,635	1,117 / 518	928 / 707
<i>cryIHa1</i>	1,626	802 / 518 / 150 / 140 / 16	590 / 416 / 329 / 291
<i>cryIHb1</i>	1,620	946 / 658 / 16	683 / 425 / 323 / 165 / 24
<i>cryIKa1</i>	1,632	888 / 515 / 156 / 73	511 / 425 / 395 / 193 / 108

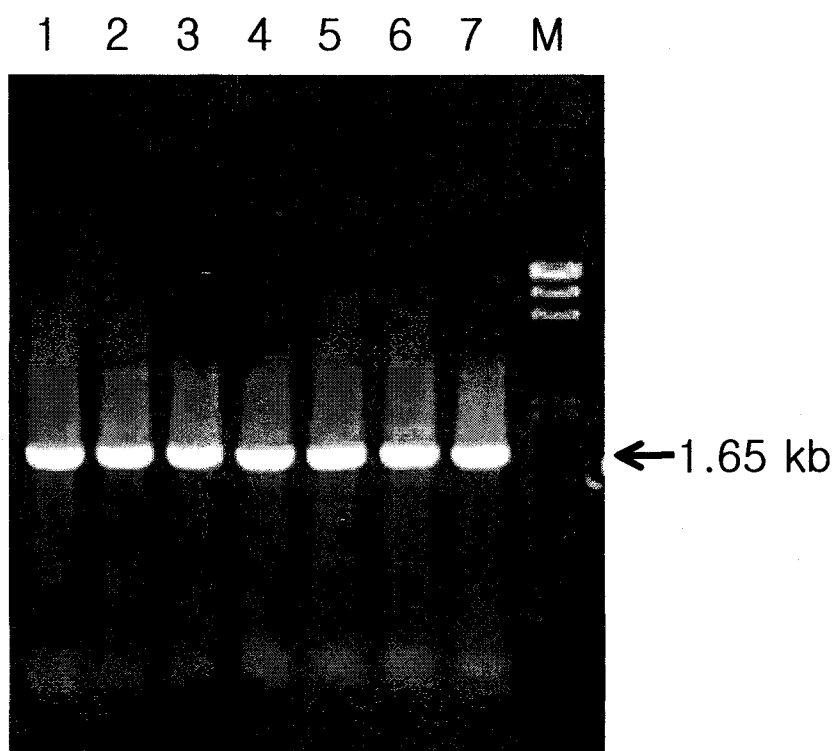


Fig. 1. PCR amplification with two oligonucleotide primers K5un2 and K3un2. PCR amplifications of the DNAs from various Bt isolates are shown. (Lanes 1: 2311-1; 2: 1281-2; 3: 1299-2; 4: 2385-1; 5: 2112-3; 6: 2117-2; 7: 2320-3; and M: Lambda DNA digested with *Hind*III)

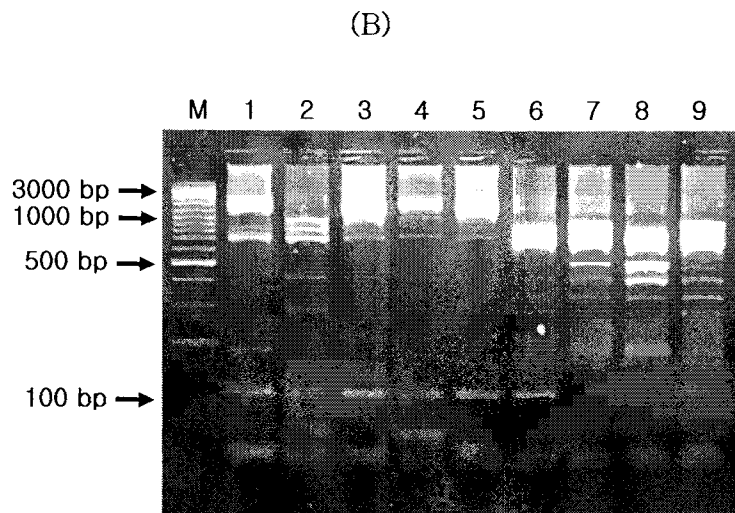
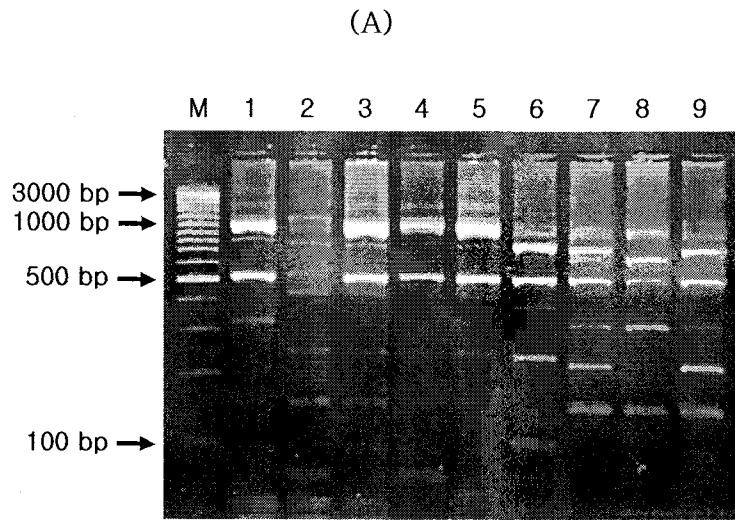


Fig. 2. RFLP patterns of the PCR-amplified *cryI* type genes from various Bt isolates. The PCR-amplified fragments were digested with *Pst*I/*Xba*I (A) and *Eco*R I/*Cla*I (B), and then electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes M: 100 bp DNA Ladder; 1: *kurstaki*; 2: *aizawai*; 3: 2311-1; 4: 1281-2; 5: 1299-2; 6: 2385-1; 7: 2112-3; 8: 2117-2; and 9: 2320-3)

Table 4. Groups of Bt isolates according to their RFLP pattern

RFLP group	No. Bt isolates	Standard isolate selected
A	1276-1 / 1276-3 / 1277-2 / 1287-2 / 1288-2 / 1290-3 1291-1 / 1291-2 / 1292-1 / 1293-1 / 1294-1 / 1296-2 1300-1 / 1302-3 / 1308-2 / 1315-1 / 1318-1 / 1334-1 1342-1 / 1381-1 / 1382-2 / 1397-1 / 1414-1 / 1422-2 1425-1 / 1433-1 / 1434-2 / 1435-2 / 1436-1 / 1439-2 1440-1 / 1440-2 / 2311-1 / 2314-1 / 2320-1	2311-1
B	1281-2	1281-2
C	1299-2	1299-2
D	2364-1 / 2385-1	2385-1
E	2100-3 / 2112-2 / 2112-3 / 2117-3 / 2161-1 / 2258-1 2260-1 / 2317-2 / 2320-2 / 2326-2 / 2327-1	2112-3
F	2117-2 / 2317-1 / 2343-1	2117-2
G	2320-3	2320-3

Table 5. H-agglutination test result of standard isolates selected

H-serotype	Serovar	1281-2	1299-2	2112-3	2117-2	2311-1	2320-3	2385-1
1	<i>thuringiensis</i>	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
2	<i>finitimus</i>	-	-	-	-	-	-	-
3a3c	<i>alesti</i>	-	-	-	-	-	-	-
3a3b3c	<i>kurstaki</i>	-	-	+ <sup>b</sup>	+	-	+	-
3a3d	<i>sumiyoshiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
3a3d3e	<i>fukuokaensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
4a4b	<i>sotto</i>	-	-	-	-	-	-	-
4a4c	<i>kenyae</i>	-	-	-	-	-	-	+
5a5b	<i>galleriae</i>	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>entomocidus</i>	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>aizawai</i>	-	-	-	-	-	-	-
8a8b	<i>morrisoni</i>	-	-	-	-	-	-	-
8a8c	<i>ostrinae</i>	-	-	-	-	-	-	-
8b8d	<i>nigeriensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>tolworthi</i>	-	-	-	-	-	-	-
10a10b	<i>darmstadiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
11a11b	<i>toumanoffi</i>	-	-	-	-	-	-	-
11a11c	<i>kushuensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>thompsoni</i>	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>pakistani</i>	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>israelensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>dakota</i>	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>indiana</i>	-	-	-	-	-	-	-
17	<i>tohokuensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
18a18b	<i>kumamotoensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>tochigiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
20a20b	<i>yunnanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
20a20c	<i>pondicheriensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
21	<i>colmeri</i>	-	-	-	-	-	-	-
22	<i>shangdongiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>japonensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
24a24b	<i>neoleonensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
25	<i>coreanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
26	<i>silo</i>	-	-	-	-	-	-	-
27	<i>mexicanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>-: no response; <sup>b</sup>+: agglutination

### (3) 새로운 나비목해충 병원성 내독소단백질 유전자 선발

최종선발된 7개 균주의 *cryI* type 유전자형을 분석하기 위하여 각각의 PCR 산물들을 pGemT-Easy vector에 cloning하여 균주의 개별 유전자를 분석한 결과, 이미 보고되어 있는 *cryI* type 유전자들과는 다른 10개 새로운 *cryI* type 유전자를 확인하였다 (Table 6). 7개의 선발균주중 2311-1 균주는 *cryIAb*, *cryICa*와 *cryIDa*를 가지고 있는 것으로 확인되었고, 2181-2 균주에는 *cryIAa*, *cryIAb*, *cryICa*와 *cryIDa*가 존재하는 것으로 나타났다. 이들 균주에서는 새로운 유전자가 탐색되지 않았으나 RFLP 패턴에서 차이를 보인 것으로 미루어보아 탐색된 것 외에도 다른 유전자가 존재할 가능성이 높은 것으로 추정되었다. 1299-2 균주에서는 기존에 보고된 *cryIAb*와 *cryIDa* 외에도 새로운 유전자 1개가 탐색되었고, 이를 *cryI-206*으로 명명하였다(Fig. 3). *cryI-206*의 염기서열을 분석한 결과 5' 말단은 *cryIAb1*과 96%의 상동성을, 3' 말단은 *cryIDa1*과 98%의 상동성을 보였다. 2385-1 균주의 경우 기존에 보고된 *cryI* type 유전자는 존재하지 않았고 3개의 새로운 유전자만을 가지고 있었으며, 각각 *cryI-208*(Fig. 4), *cryI-209*(Fig. 5) 및 *cryI-210*(Fig. 6)으로 명명하였다. 2112-3 균주에서는 *cryIEa* 외에 새로운 유전자 3개가 탐색되어 각각 *cryI-202*(Fig. 7), *cryI-203*(Fig. 8) 및 *cryI-205* (Fig. 9)으로 명명하였다.

2117-2 균주는 *cryIAa*와 *cryIAc* 외에 2개의 새로운 유전자를 보유하고 있었으며, 이들을 *cryI-201* (Fig. 10)과 *cryI-204* (Fig. 11)로 명명하였다. 이중 *cryI-201*은 5' 말단은 *cryIAc2*와 99%의 상동성을 보였으나 3' 말단은 *cryIEa1*과 91%의 상동성을 보였다. 2320-3 균주에는 *cryIEa* 외에 *cryI-207*로 명명된 1개의 새로운 유전자가 존재하는 것으로 확인되었다(Fig. 12). 이상에서의 결과와 같이 최종 7개의 선발균주로부터 모두 10개의 새로운 *cryI* type 내독소단백질 유전자를 탐색하였으나, 각 균주의 RFLP 패턴을 고려하였을 때 아직 탐색되지 않은 유전자가 더 존재할 것으로 기대되며, 이미 탐색된 유전자에 대해서도 염기서열분석 등을 통한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Table 6. Compiled results of *cry1* type gene combinations of selected Bt isolates

RFLP group	Standard isolate selected	<i>cry1</i> type genes previously reported	<i>cry1</i> type genes newly found
A	2311-1	<i>cry1Ab</i> <i>cry1Ca</i> <i>cry1Da</i>	-
B	1281-2	<i>cry1Aa</i> <i>cry1Ab</i> <i>cry1Ca</i> <i>cry1Da</i>	-
C	1299-2	<i>cry1Ab</i> <i>cry1Da</i>	<i>cry1-206</i>
D	2385-1	-	<i>cry1-208</i> <i>cry1-209</i> <i>cry1-210</i>
E	2112-3	<i>cry1Ea</i>	<i>cry1-202</i> <i>cry1-203</i> <i>cry1-205</i>
F	2117-2	<i>cry1Aa</i> <i>cry1Ac</i>	<i>cry1-201</i> <i>cry1-204</i>
G	2320-3	<i>cry1Ea</i>	<i>cry1-207</i>

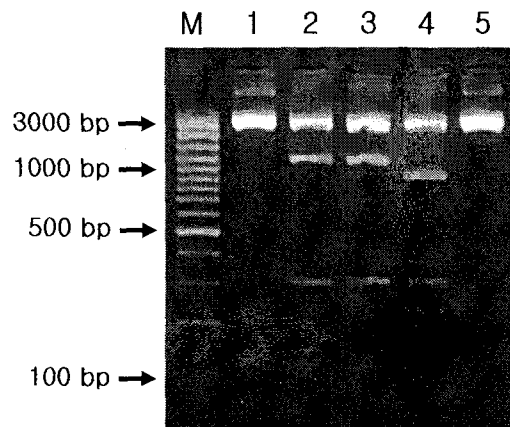


Fig. 3. Restriction endonuclease pattern of the *cryI-206* clone. The *cryI-206* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes M: 100 bp DNA Ladder; 1: *Pst* I; 2: *Eco*R I and *Pst* I

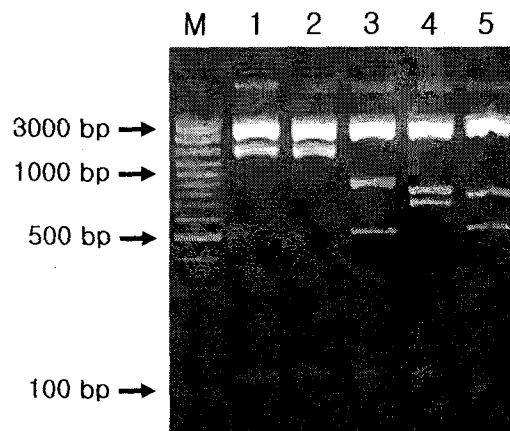


Fig. 4. Restriction endonuclease pattern of the *cryI-208* clone. The *cryI-208* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes M: 100 bp DNA Ladder; 1: *Eco*R I and *Hind*III; 2: *Eco*R I; 3: *Eco*R I and *Xba* I; 4: *Eco*R I and *Cla* I; and 5: *Pst* I and *Xba* I)



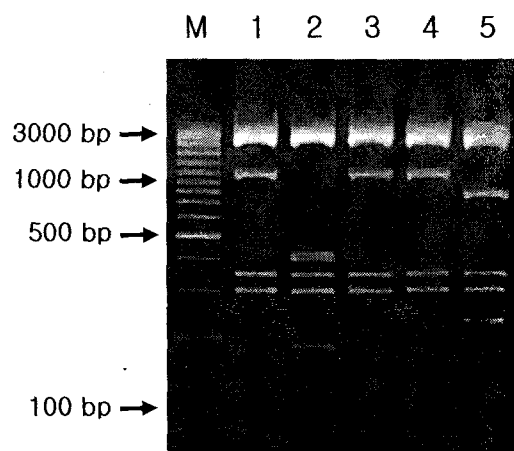


Fig. 5. Restriction endonuclease pattern of the *cry1-209* clone. The *cry1-209* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes M: 100 bp DNA Ladder; 1: *EcoR* I; 2: *EcoR* I and *Cla* I; 3: *EcoR* I and *Hind* III; 4: *EcoR* I and *Pst* I; and 5: *EcoR* I and *Xba* I

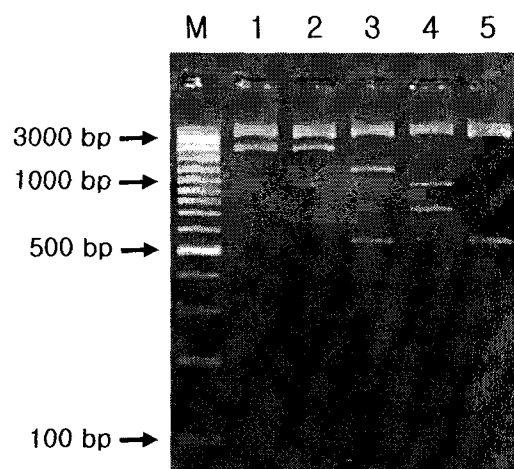


Fig. 6. Restriction endonuclease pattern of the *cry1-210* clone. The *cry1-210* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes M: 100 bp DNA Ladder; 1: *EcoR* I and *Hind* III; 2: *EcoR* I; 3: *EcoR* I and *Xba* I; 4: *EcoR* I and *Cla* I; and 5: *Pst* I and *Xba* I)

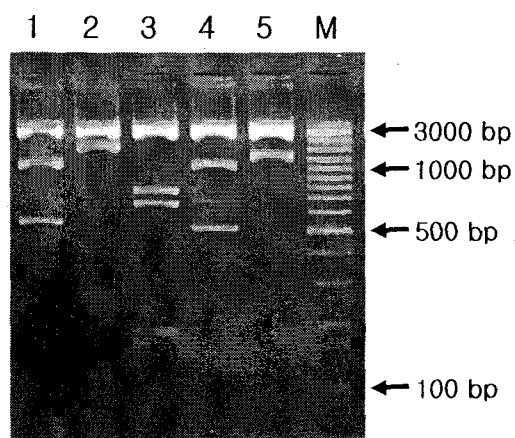


Fig. 7. Restriction endonuclease pattern of the *cryI-202* clone. The *cryI-202* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes 1: *EcoR* I and *Xba* I; 2: *EcoR* I; 3: *EcoR* I and *Cla* I; 4: *EcoR* I and *Hind*III; 5: *Pst* I; and M:100 bp DNA Ladder)

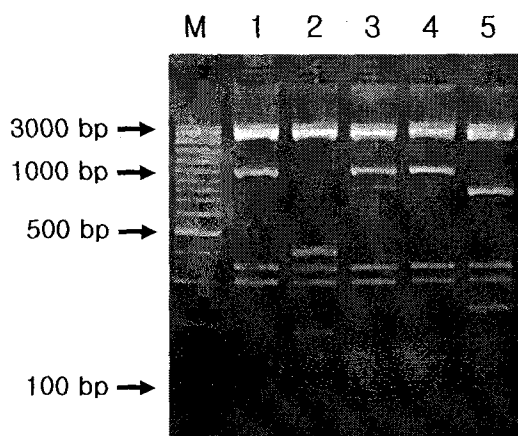


Fig. 8. Restriction endonuclease pattern of the *cryI-203* clone. The *cryI-203* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes M: 100 bp DNA Ladder; 1: *EcoR* I; 2: *EcoR* I and *Cla* I; 3: *EcoR* I and *Hind*III; 4: *EcoR* I and *Pst* I; and 5: *EcoR* I and *Xba* I)

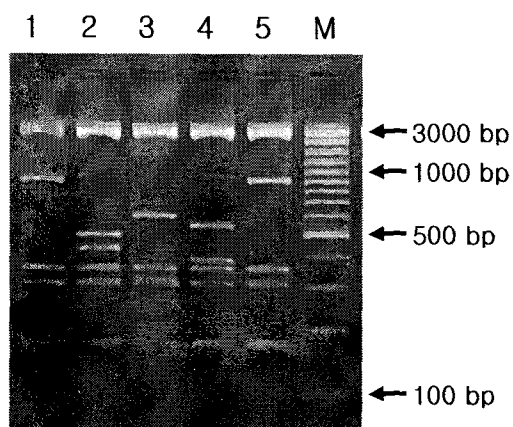


Fig. 9. Restriction endonuclease pattern of the *cryI-205* clone. The *cryI-205* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes 1: *EcoR*I; 2: *EcoR*I and *Cla*I; 3: *EcoR*I and *Hind*III; 4: *EcoR*I and *Pst*I; 5: *EcoR*I and *Xba*I; and M: 100 bp DNA Ladder)

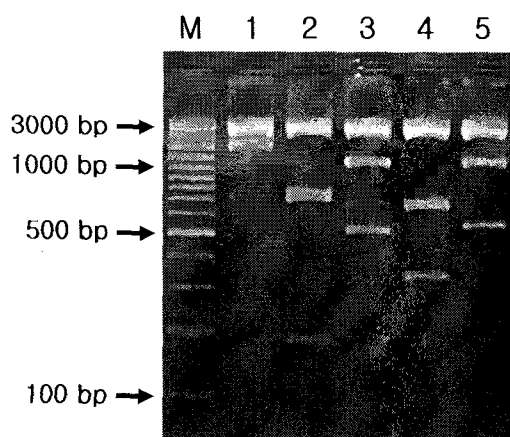


Fig. 10. Restriction endonuclease pattern of the *cryI-201* clone. The *cryI-201* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes M: 100 bp DNA Ladder; 1: *EcoR*I; 2: *EcoR*I and *Cla*I; 3: *EcoR*I and *Hind*III; 4: *EcoR*I and *Pst*I; and 5: *EcoR*I and *Xba*I)

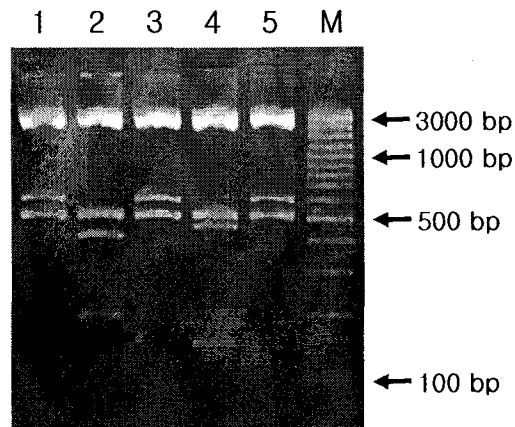


Fig. 11. Restriction endonuclease pattern of the *cryI-204* clone. The *cryI-204* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes 1: *EcoRI*; 2: *EcoRI* and *ClaI*; 3: *EcoRI* and *HindIII*; 4: *EcoRI* and *PstI*; 5: *EcoRI* and *XbaI*; and M: 100 bp DNA Ladder)

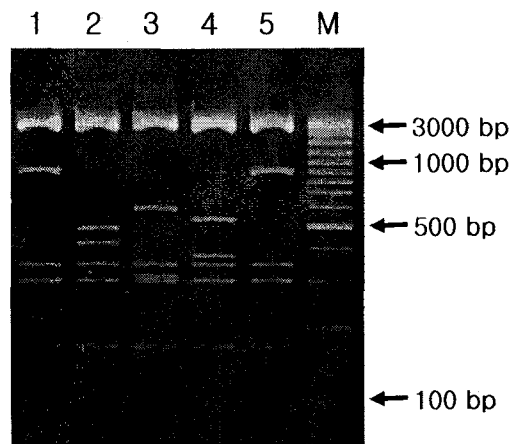
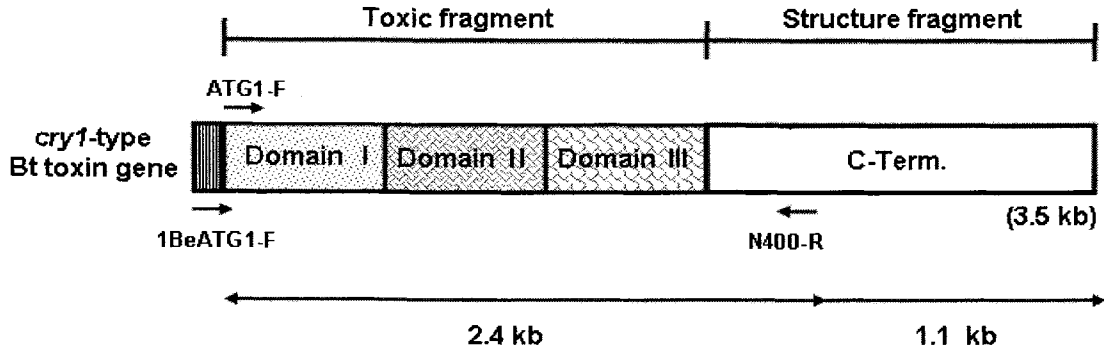


Fig. 12. Restriction endonuclease pattern of the *cryI-207* clone. The *cryI-207* was cloned into pGemT-Easy vector and digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 3% agarose gel. (Lanes 1: *EcoRI*; 2: *EcoRI* and *ClaI*; 3: *EcoRI* and *HindIII*; 4: *EcoRI* and *PstI*; 5: *EcoRI* and *XbaI*; and M: 100 bp DNA Ladder)

#### (4). 곤충병원성 Bt로부터 신규 살충성 유전자 구조 분석

강독성을 가지는 새로운 내독소단백질 유전자를 클로닝하기 위하여, 새로운 유전자를 다수 포함하고 있는 Bt K-1 균주와 1차년도 실험에서 Bt K-1과는 다른 새로운 내독소 단백질 유전자를 포함하고 있는 Bt 2385-1 균주를 선발하여 사용하였다. 작물형질 전환에 적합한 형태인 Bt toxic region 약 2.4 kb fragment를 클로닝하기 위하여 대부분의 Bt *cryI*-type의 toxic fragment를 detection할 수 있는 primer set (ATG1-F와 N400-R)과 1차년도에 Bt K-1 균주에서 *cryI*Be-like 유전자를 탐색한 결과에 근거하여 이 새로운 유전자를 클로닝 할 수 있는 primer set (1BeATG1-F와 N400-R)를 합성하였다 (Fig. 13). Bt K-1 균주와 Bt 2385-1 균주의 plasmid를 template로 하고 ATG1-F와 N400-R 및 1BeATG1-F와 N400-R primers를 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과, 예상한대로 약 2.4 kb 정도의 PCR 산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 14, Fig. 15). Bt 2385-1 균주에 대하여서도 ATG1-F와 N400-R primer set를 이용하여 약 2.4 kb 정도의 PCR 산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 16). 얻은 각각의 PCR 산물을 pGEM-T Easy PCR cloning vector에 cloning하고 얻은 colony들에 대하여 *EcoRI* enzyme을 처리한 결과 Bt K-1 균주에서는 *cryI*Be-like colony를 포함하여 모두 5 group의 서로 다른 패턴의 colony들을 확인할 수 있었고 (Fig. 17), Bt 2385-1 균주에서는 모두 3 group의 서로 다른 패턴을 확인할 수 있었다 (Fig. 18). 각 group별로 5개의 colony들을 선발하고 universal primer를 이용하여 염기서열을 분석한 결과, 각 group의 5개의 colony들은 모두 동일한 염기서열을 가지고 있었으므로 각 group에서 1개씩의 colony를 선발하여 남은 부분의 염기서열을 분석하였다. Bt K-1 균주의 5개의 유전자에 대하여 전체적인 염기서열 분석을 수행한 결과, *cryI*-2와 *cryI*-31 두 유전자가 기존에 이미 알려진 *cryIEa1* 및 *cryIAa1* 유전자와 100%의 상동성을 나타내었고 (Fig. 19, Fig. 20) 다른 3개의 유전자는 모두 기존의 유전자와 다른 새로운 내독소단백질 유전자임을 확인할 수 있었다. *cryI*-1 유전자는 *cryI*Hb1 유전자와 nucleotide 서열상에서는 73.3% (Fig. 21), amino acid 서열상에서는 78.0%의 상동성을 보였다 (Fig. 22). *cryI*-1 유전자의 1420 bp~2351 bp 부위는 1차년도에 탐색된 *cryI*-203 유전자와 일치함으로 이 두 유전자는 동일한 유전자일 것으로 추정되었다. *cryI*-7 유전자는 *cryI*Be1 유전자와 nucleotide 서열상에서는 4 bp (Fig. 23), amino acid 서열상에서는 2개의 차이를 보였다 (Fig. 24) 이 유전자의 1570 bp~2549 bp 부위는 1차년도에 탐색된 *cryI*-207과 100%의 상동성을 보였으므로 이 두 유전자는 동일한 유전자로 추정되었다. *cryI*-44 유전자는 *cryI*Ac2 유전자와 nucleotide 서열상에서는 92.2% (Fig. 25), amino acid 상에서는 91.0% (Fig. 26)의 상동성을 보였다. *cryI*-44 유전자의 1444 bp~2381 bp 부위에서 1차년도에 탐색된 *cryI*-201과 *cryI*-202 두 유전자와 일치함으로 *cryI*-44 유전자는 *cryI*-201과 *cryI*-202 유전자의 Bt toxic region (2.4 kb) fragment로 추정되었다. 이상의 실험 결과를 종합하여 보면 Bt K-1 균주는 기존에 알려진 유전자인 *cryIAa1* 및 *cryIEa* 유전자 외에도 1차년도에 탐색된 새로운 유전자와 일치하는 *cryI*-1, *cryI*-7과 *cryI*-44 등 3개의 새로운 내독소단백질 유전자를 포함하고 있었다 (Table 7). Bt 2385-1 균주의 경우 *cryI*Ja1과 동일한 염기서열을 가지는 *cryI*-15 유전자 (Fig. 27) 외에도 기존에 보고된 유전자와는 다른 두 개의 새로운 유전자도 포함하고 있었다. *cryI*-5 유전자는 *cryI*Ab1 유전자와 nucleotide 서열상에서는 97.9% (Fig. 28), amino acid 서열상에서는 98.0%의 상동성을 보였다 (Fig. 29). *cryI*-5 유전자의 3'말단의 900 bp의 염기서열은 1차년도에 Bt 2385-1 균주에서 탐색된 새로운 유전자인 *cryI*-208과 *cryI*-210과는 다른 염기서열을 나타내었다. *cryI*-12 유전자는 *cryI*Ja1 유전자와 nucleotide 서열상에서는 89.0% (Fig. 30), amino acid 서열상에서는 80.0% (Fig.

32)의 상동성을 보였다. 이 유전자 또한 3'말단의 900 bp 염기서열은 1차년도에 탐색된 *cry1-208*과 *cry1-210*과는 다른 염기서열을 나타내었다. 이상의 결과를 종합하면 Bt 2385-1 균주는 기존에 알려진 유전자인 *cry1Ja* 유전자 외에 두 개의 새로운 내독소단백질 유전자 *cry1-5*와 *cry1-12*를 포함하고 있었다. 그러나 이 두 새로운 유전자 모두 1차년도에 탐색한 2개의 새로운 유전자와는 서로 달랐으므로 이 균주에는 새로운 내독소단백질 유전자가 더 존재할 것으로 추정되었다(Table 7).



ATG1-F (33 mer)      ATGCAATGCGTACCTTACAATTGTTTAAGTAAT  
 N400-R (26 mer)    CATCGATTCGGTTCACCGCACCTTCC  
 1BeATG1-F (24 mer) ATGACTTCAAATAGGAAAAATGAG

Fig. 13. Nucleotide sequences of the *cryI*-type specific primer set, ATG1-F and N400-R, and *cryI*Be specific primer set, 1BeATG1-F and N400-R.

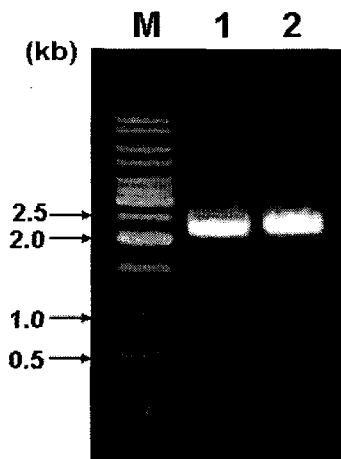


Fig. 14. PCR products amplified with the *cryI*-type specific primer set (1) and *cryI*Be specific primer set (2) from Bt K-1.

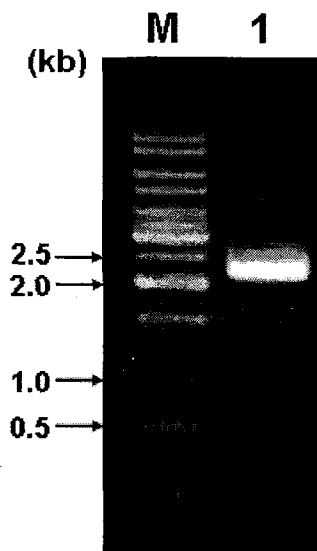


Fig. 15. PCR products amplified with the *cryI*-type specific primer set (1) from Bt 2385-1.

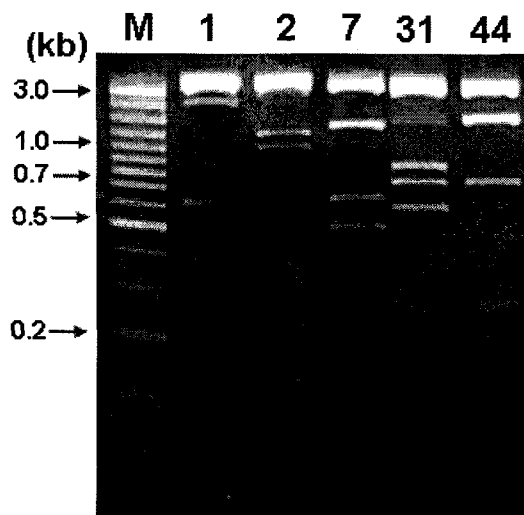


Fig. 16. *EcoR* I digested plasmid DNA pattern of *cry1-1*, *cry1-2*, *cry1-7*, *cry1-20*, *cry1-31* and *cry1-44* genes from Bt K-1.

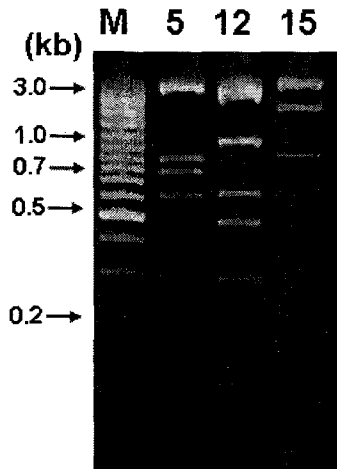


Fig. 17. *EcoR* I digested plasmid DNA pattern of *cryI-5*, *cryI-12*, *cryI-15* genes from Bt 2385-1.

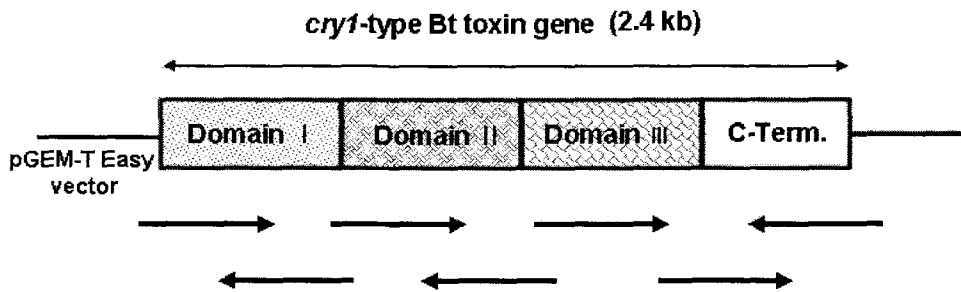


Fig. 18. Sequencing strategy of *cryI*-type genes from Bt K-1 and Bt 2385-1. Arrow indicates the direction of nucleotide sequence analysis.



```

ATGCAATGCG TGCCTTATAA TTGTTTAAAT AATCCTGAAA ATGAGATATT AGATATTGAA AGGTCAAATA 70
GTACTGTAGC AACAAACATC GCCTTGGAGA TTAGTCGTCT GCTCGCTTCC GCAACTCCAA TAGGGGGGAT 140
TTTATTAGGA TTGTTTGATG CAATATGGGG GTCTATAGGC CCTTCACAA TGGGATTTATT TTTAGAGCAA 210
ATTGAGCTAT TGATTGACCA AAAAATAGAG GAATTCGCTA GAAACCAGGC AATTTCTAGA TTGGAAGGGA 280
TAAGCAGTCT GTACGGAATT TATACAGAAG CTTTTAGAGA GTGGGAAGCA GATCCTACTA ATCCAGCATT 350
AAAAGAAGAG ATGCGTACTC AATTTAATGA CATGAACAGT ATTCTTGTA CAGCTATTCC TCTTTTTTCA 420
GTTCAA AATT ATCAAGTCCC ATTTTTATCA GTATATGTTC AAGCTGCAAA TTTACATTTA TCGGTTTTGA 490
GAGATGTTTC AGTGTTTGGG CAGGCTTGGG GATTTGATAT AGCAACAATA AATAGTCGTT ATAATGATCT 560
GACTAGACTT ATTCCTATAT ATACAGATTA TGCTGTACGC TGGTACAATA CGGGATTAGA TCGCTTACCA 630
CGAACTGGTG GGCTGCGAAA CTGGGCAAGA TTTAATCAGT TTAGAAGAGA GTTAACAATA TCAGTATTAG 700
ATATTATTTT TTTTTTCAGA AATTACGATT CTAGATTATA TCCAATPCCA ACAAGCTCCC APTAACGCG 770
GGAAGTATAT ACAGATCCGG TAATTAATAT AACTGACTAT AGAGTTGGCC CCAGCTTCGA GAATATTGAG 840
AACTCAGCCA TTAGAAGCCC CCACCTTATG GACTTCTTAA ATAATTTGAC CATTGATACG GATTTGATTA 910
GAGGTGTTCA CTATTGGGCA GGCATCGTG TAACTTCTCA TTTTACAGGT AGTTCCTAAG TGATAACAAC 980
CCCTCAATAT GGGATAACCG CAAATGCGGA ACCAAGACGA ACTATTGCTC CTAGTACTTT TCCAGGTCTT 1050
AACCTATTTT ATAGAACATT ATCAAATCCT TTCTTCCGAA GATCAGAAAA TATTACTCCT ACCTTAGGGA 1120
TAAATGTAGT ACAGGGAGTA GGGTTCATTC AACCAAATAA TGCTGAAGTT CTATATAGAA GTAGGGGGAC 1190
AGTAGATTCT CTTAATGAGT TACCAATTGA TGSTGAGAAT TCATTAGTTG GATATAGTCA TCGATTAAGT 1260
CATGTTACAC TAACCAGGTC GTTATATAAT ACTAATATAA CTAGCCTGCC AACATTTGTT TGGACACATC 1330
ACAGTGCTAC TAATACAAAT ACAATTAATC CAGATATTAT TACACAAATA CCTTTAGTGA AAGGATTTAG 1400
ACTTGGTGGT GGCACCTCTG TCATTAAGG ACCAGGATTT ACAGGAGGGG ATATCCTTCG AAGAAATACC 1470
ATTGGTGAAT TTGTGTCTTT ACAAGTCAAT ATTAACTCAC CAATTAACCA AAGATACCGT TTAAGATTTT 1540
GTTATGCTTC CAGTAGGGAT GCACGAATTA CTGTAGCGAT AGGAGGACAA APTAGAGTAG ATATGACCTT 1610
TGAAAAAACC ATGGAAATFG GGGAGAGCTT AACATCTAGA ACATTTAGCT ATACCAATTT TAGTAATCCT 1680
TTTTCAATTA GGGCTAATCC AGATATAATT AGAATAGCTG AAGAACTTCC TATTCGTGGT GGTGAGCTTT 1750
ATATAGATAA AATGAACTT ATTCTAGCAG ATGCAACATT TGAAGRAGAA TATGATTTGG AAAGAGCACA 1820
GAAGGCGGTG AATGCCCTGT TTA CTCTAC AAATCAACTA GGGCTAAAAA CAGATGTGAC GGATTATCAT 1890
ATTGATCAAG TTTCCAATTT AGTTGAGTGT TTATCGGATG AATTTTGTCT GGATGAAAAG AGAGAATTAT 1960
CCGAGAAAGT CAAACATGCG AAGCGACTCA GTGATGAACG GAATTTACTT CAGATCCAA ACTTCAGAGG 2030
GATCAATAGG CAACCAGACC GTGGCTGGAG AGGAAGCAGG GATATTACTA TCCAAGGTGG AGATGACGTA 2100
TTCAAAGAGA ATTACGTCAC ATTACCGGGT ACCTTTGATG AGTGCTATCC AACGTATTTA TATCAAAAAA 2170
TAGATGAGTC GAAGTTAAA GCTTATACCC GCTATGAATT AAGAGGGTAT ATCGAGGATA GTCAGACTT 2250
AGAAATCTAT TTAATTCGCT ACAATGCAAA ACACGAGACA GTAAACGTGC CAGGTACGGG TTCCTTATGG 2320
CCGCTTTCAG CCCAAGTCC AATCGGAAAG TGTGGAGAAC CGAATCGATG 2370

```

Fig. 19. Nucleotide sequence of the *cryI-2* gene from Bt K-1.

ATGGAATGCA TTCCTTATAA TTGTTAAGT AACCCTGAAG TAGAAGTATT AGGTGGAGAA AGAATAGAAA 70  
 CTGGTTACAC CCCAATCGAT ATTTCCCTTGT CGCTAACGCA ATTTCTTTTG AGTGAATTTG TTCCCAGTGC 140  
 TGGATTTGTS TTAGGACTAG TTGATATAAT ATGGGGAAAT TTTGGTCCCT CTCAATGGGA CGCATTTCCT 210  
 GTACAAATTS AACAGTTAAT TAACCAAAGA ATAGAAGAAT TCGCTAGGAA CCAAGCCATT TCTAGATTAG 280  
 AAGGACTAAG CAATCTTTAT CAAATTTACG CAGAATCTTT TAGAGAGTGG GAAGCAGATC CTAATAATCC 350  
 AGCATTAAAG GAAGAGATGC GTATTCAATT CAATGACATG AACAGTGGCC TTACAACCGC TATTCCTCTT 420  
 TTGGCAGTTC AAAATTATCA AGTTCCTCTT TTATCAGTAT ATGTTCAAAG TGCAAAATTA CATTTATCAG 490  
 TTTTGAGAGA TGTTCAGTG TTTGGACAAA GGTGGGGATT TGATGCCGCG ACTATCAATA GTCGTATAAA 560  
 TGATTTAACT AGGCTTATTG GCAACTATAC AGATTATGCT GTGCGCTGGT ACAAACGGG ATTAGAGCGT 630  
 STATGGGGAC CGGATTCAG AGATTGGGTG AAGTATAATC AATTTAGAA AGAGCTAACA CTTACTGTAT 700  
 TAGATATCGT TGCTCTATTC TCAAAATATG ATAGTCGAG GTATCCAAT CGAACAGTT CCCAAATTAAC 770  
 AAGAGAAAT TATACGAACC CAGTATTAGA AAATTTGAT GGTAGTTTTC GTGGAATGGC TCAGAGAAATA 840  
 GAACAGAAAT TTAGGCAACC ACATCTTATG GATATCCCTA ATAGTATAAC CATTTATACT GATGTGCATA 910  
 GAGGCTTTAA TTATGGTCA GGGCATCAAA TAACAGCTTC TCCTGTAGGG TTTTCAGGAC CAGAAATTCGC 980  
 ATTCCTTTA TTTGGGAATG CGGGGAAATG AGCTCCACCC GTACTTGTCT CATTAACTGG TTTGGGGATT 1050  
 TTTAGAACAT TATCTTCACC TTTATATAGA AGAATTTAC TTGGTTCAGG CCCAAATAAT CAGGAACTGT 1120  
 TTGCCCTTGA TGGAACGGAG TTTTCTTTG CCTCCCTAAC GACCAACTTG CTTTCCAATA TATATAGACA 1190  
 AAGGGGTACA GTCGATTCAC TAGATGTAAT ACCGCCACAG GATAATAGTG TACCACCTCG TGCGGGATTT 1260  
 AGCCATCGAT TGAGTCATGT TACAATGCTG AGCCAAGCAG CTGGAGCAGT TTACACCTTG AGAGCTCCAA 1330  
 CGTTTTCTTG GCAGCATCGC AGTGCTGAAT TTAATAATAT AATTCCTTCA TCACAAATTA CACAAATACC 1400  
 TTTAACAAAA TCTACTAATC TTGGCTCTGG AACTTCTGTC GTTAAAGGAC CAGGATTTAC AGGAGGAGAT 1470  
 ATTCCTCGAA GAATTCACC TGGCCAGATT TCAACCTTAA GAGTAAATAT TACTGCACCA TTATCACAAA 1540  
 GATATCGGGT AAGAAATCGC TACGCTTCTA CTACAAATTT ACAATCCAT ACATCAATTG ACGGAAAGACC 1610  
 TATTAATCAG GGTAAATTTT CAGCAACTAT GAGTAGTGGG AGTAATTTAC AGTCCGGAA GCTTTAGGACT 1680  
 GTAGGTTTTA CTACTCCGT TAACTTTCA AATGGATCAA GTGTATTTAC GTTAAAGTGT CATGTCTTCA 1750  
 ATTCAGGCAA TGAAGTTTAT ATAGATCGAA TTGAATTTGT TCCGGCAGAA GTAACCTTTG AGGCAGAAATA 1820  
 TGATTTAGAA AGAGCACAAA AGGCGGTGAA TGAGCTGTTT ACTTCTTCCA ATCAAATCGG GTTAAAAACA 1890  
 GATGTGACGG ATTATCATAT TGATCAAAGTA TCCAATTTAG TTGAGTGTTT ATCAGATGAA TTTTGTCTGG 1960  
 ATGAAAAACA AGAATTGTC GAGAAAGTCA AACATGCGAA GCGACTTAGT GATGAGCGGA ATTTACTTCA 2030  
 AGATCCAAAC TTCAGAGGGA TCAATAGACA ACTAGACCCT GGCTGGAGAG GAAGTACGGA TATTACCATC 2100  
 CAAGGAGGCG ATGACGTATT CAAAGAGAAT TACGTTACGC TATTGGGTAC CTTTGATGAG TGCTATCCAA 2170  
 CGTATTTATA TCAAAAAATA GATGAGTCGA AATTAAGAGC CTATACCCGT TATCAATTA GAGGGTATAT 2240  
 CGAAGATAGT CAAGACTTAG AAATCTATTT AATTCGCTAC AATGCAAAAC ATGAAACAGT AAATGTGCCA 2310  
 GGTACGGGTT CCTTATGGCC GCTTTCAGCC CAAAGTCCAA TCGGAAAAGT TGGAGAGCCG AATCGATG 2378

Fig. 20. Nucleotide sequence of the *cryI-3I* gene from Bt K-1.

```

ATGGAATGCA TTCCTTATAA TTGTTTAAAT AATCCCGAGA GTGAGATATT GGATATTGAA GGTTTAAGTA 70
CTAGAAGTCG AGAACCAAGTG GCAGAAATTA GTTTGGGGCT CACGCGTTTT CTGTTGGAGA ATCTTTTCCC 140
AGGTGCAACT TTTGGATTTG GTTTATTGCA TATTATTGSG GGGATTTTTG GGCCTGATCA ATGGAGTATG 210
TTTCTTGAAC AAATTGAACA ACTAATTGAC CAGAGAATAG AGACAGTCGA AAGGAATAGG GCAATTCAA 280
CATTAAATGG GTTATCAAAT AGTTATGATG TTAATATTGA AGCGTAAAA GAATGGGAAA ATAATCCTGA 350
TAATTCAGCT TCACAAGAAA GAGTACGTAA TCGCTTTCGG ACAACTGACG ATGCTTTGAT AACTAGCATT 420
CCTCTTTTAG CCATTCCGAA TTTTGAATA GCTACTTTAT CGGTGTATGT TCAGCTGCC AATCTACATT 490
TATCCTTATT AAGGGTTGCA GTGTTTTTCG GAGAAAGATG GGGATTAACA CAAATAAATG TAGATGACTT 560
GTACAGGAGA TTAACGAATA ATATCAGAAA ATATTCAGAT CATTGTGCAC GATGGTATAA TGAAGGATTA 630
GATAATATTT CTGGTTTATC TCGATCTATT AACTTCCAAA GAGAAGTAAC AATCTCTGTC TTAGATATTG 700
TTGCGCTTTT CCCGAACTAT GACATCCGAA CATATCCAAT TTCAACAACA AGCCAATTA CAAGGGAGAT 770
ATTACATCT CCAATTGTTG TCCCTAATGA TTTTAGTGTG GCCTACGAGG GGGTAAGGAG AGGCCACAC 840
CTATTTGATT TTTTAGAGAA ACTTGTTATT TATACCGTG ATCGAAGTGG GATTCGCCAT TGGGCGGGAC 910
ATGAAATAAC TTCTAGACGT ACTGATTCAT ACCACGGTAT AATTCGTTAC CCTCTTTATG GAACAGCAGC 980
AAATGCAGAA AGTCCATATA CTCTTGCCCT TCAACCTTCT GAAAGTATTT ATAGAACGTT ATCAGAACCT 1050
ATATTTTCAC AAATGSGTGG GCTGTCTCCT CATAGAAGGA GAGTAGTAGA GGGAGTAGAG TTCTCTATTG 1120
TAAATAATAA CGTAAATCCT TCGTCAATTTG TATATAGAAG AAAGSGTTCG TTAGATTCTT TTAGTGTAGT 1190
ACCACCTGAA GATGAAAGTG TACCACCTTA TATTGGCATC AGTCATCAAT TATGCCATGT TGGATTTGGT 1260
CGTACAAATG TAATCTTTGA ACCAAGTAAT TTCGCTAGGG TTCCAGTATT CTCCTGGACA CATCGTAGTG 1330
CAACCCCTAC AAATACAATT GATCCAGATA GAATTACCCA AATACCTTCA GTGAAAGCGA GTTCTCTTCG 1400
TAATCTACT GTTGTAGTG GACCAGGATT TACTGGAGGG GATATTGTTC GAATGGGAGC AGTGCACCAA 1470
ATATATGCAA CGGATTTAAG FATGAATGTT CGACCTAGTG TTGCATTGAG CAGATATCTT ATAGACTTC 1540
GCTATGCTTG TAGGGGGAGT TCAAAATAG TTATACACGG TCCTTCTATT AGATTTGAT CGCTCCCAAG 1610
TACAAATGAGT AATGATGAAC CTTTAAATA TCAATCAATTT AGATACGCAA GTATCACAAC TCCAAATACC 1680
CGTCCAAAT ATAAATATGTT TAATTTATCT ATATCCAGAA TTTCAGGTGT CCAAAATTTG TTTATAGATC 1750
GAATAGAATT CATTCCAGTA GATGCAAACT TCGAAGCAGA ACGAGATTTA GAGAGAGCGC AGAAGGCGGT 1820
GAATGCTCTG TTTACTTCCA CAAACCAAAG AGGACTAAAA ATAGATGTGA CTGACTATCA TATTGATCAA 1890
GTATCCAATT TAGTTGATTG CTTATCGGAT GAATTTTGTG TGGATGAAA GCGAGAATTE TCCGAGAAAG 1960
TCAAAATGCG GAAGCGACTC AGTGATGAAC GCAATTTACT CCAAGATTTA AATTTCAAAG ACATTAATAG 2030
GCAACCAGAA CGTGGTTGGA GCGGAAGTAC AGGGATTACC ATCCAAGGAG GAGATGACGT ATTCAAAGAG 2100
AATTACGTTA CACTACCAGG TACCTTTGAT GAGTGCTATC CAACATATTT GTATCAAAA ATCGATGAAT 2170
CAAAATTTAA AGCCTATACC CGCTATCAAT TAAGAGGATA CATCGAAGAT AGTCAAGACT TAGAAATCTA 2240
TTTAATTCGC TCAATGCAA AACATGAGAC AGTAAATGTT CCTGGCTCTG GCTCCTTATG GCCACTTTCA 2310
GTCGAAAGCT CAGTTGAAA ATGCGGAGAG CCAATTCGAT G 2351

```

Fig. 21. Nucleotide sequence of the *cryI-1* gene from Bt K-1.

```

cryI-1:      MECIPYNC LN NPES E ILDIEGLSTRSREQVAE I SLGLTRFLEENL FPGATFGFGLFDIIW 60
cryIHb1:    -*V*****K**KI*M*****I*S*****S*L***S***** 60
cryI-1:      G I F G P D Q W S M F L E Q I E Q L I D Q R I E T V E R N R A I Q T L I G L S N S Y D V N I E A L K E W E N N P D N S A 120
cryIHb1:    *V I *****L**T*****A H V **Q**S R *E**G D**E*Y**S*R***A S*N*E S 120
cryI-1:      S Q E R V R N R F E T T D D A L I T S I P L L A I P N F E I A T L S V Y V Q A A N L H L S L L R V A V F F G E R W G L T 180
cryIHb1:    **Q D*****S N**N****A**I*REQG***P L*T*****D**Y**Q****D 180
cryI-1:      Q I N V D D L Y R R L T N N I R K Y S D H C A R W Y N E G L D N I S G L S - R S I N F Q R E V T I S V L D I V A L F P N 239
cryIHb1:    T I T *N N H *N**I*L*NT*****Q*F*R****F G V V T A *Y L D***** 240
cryI-1:      Y D I R T Y P I S T T S Q L T R E I F T S P I V V P N - D F S V A Y E G V R R A P H L F D F L E K L V I Y T G D R S G I 298
cryIHb1:    *****Q*L*****Y**V A E *G A S L M *D L R N I L *E***M***T R*****V Q G** 300
cryI-1:      R H W A G H E I T S R R T D S Y H G I I R Y P L Y G T A A N A E S P Y T L A L Q P S E S I Y R T L S E P I F S Q T G G L 358
cryIHb1:    Y*****S**T*G N L S S N *Q F*****S***D R *F N**T H Y**T*****A**Y*V S*** 360
cryI-1:      S P H R R R V V E G V E F S I V - N M N V N P S S F Y Y R R E G S L D S F T E L P P E D E S V P P Y I G I S H Q L C H V 417
cryIHb1:    **N*T*A***R*L T A R D**L*S L P*L**K E*****N E*****Y**R***A 420
cryI-1:      G F G R T N V I F E P S N F A E V P V F S W T H R S A T P T N T I D P D R I T Q I P S V K A S S L R N S T - V V S G P G 476
cryIHb1:    R*A**S S*V L*****I*****G***E V S S S*****W***H T *D S G A F *I K*** 480
cryI-1:      F T G G D I V R M G A V H Q I Y A T D L S M N V R P S V A L S R Y L I E L R Y A C --- R G S S N I V I H G P S I R F V 533
cryIHb1:    *****L T R P N L G T L G *L R V T L T G Q L P --- Q T *N**I***S T A N**G T L *F S Q P**Y G - L 536
cryI-1:      S L P S T M S N D E P L T Y Q S F R Y A S I T T P I T - R P I Y N M F N L S I S R I S G V Q N L F I D R I E F I P V D A 592
cryIHb1:    T F *K**D I*****S R**A R T T L F****F T Q A Q A E L**T*Q-----G V Y*****N A 591
cryI-1:      N F E A E R D L E R A Q K A V N A L F T S T N Q R G L K I D V T D Y H I D Q V S N L Y D C L S D E F C L D E K R E L S E 652
cryIHb1:    T***Y*****E*****S**L**T*L*****I***** 651
cryI-1:      K V K H A K R L S D E R N L L Q D L N F E D I N R Q P E R G W S G S T G I T I Q G G D D V F K E N Y V T L P G T F D E C 712
cryIHb1:    *****R G*****D***R***D*****N***** 711
cryI-1:      Y P T Y L Y Q K I D E S K L K A Y T R Y Q L R G Y I E D S Q D L E I Y L I R Y N A K H E T V N V P G S G S L W P L S V E 772
cryIHb1:    ***** 771
cryI-1:      S S V G R C G E P N R 783
cryIHb1:    *P I***** 782

```

Fig. 22. Comparison of deduced amino acid sequences between the *cryI-1* gene from Bt K-1 and *cryI**Hb**1* gene (GenBank Accession No. U35780).

ATGACTTCAA ATAGGAAAA TGAGAATGAA ATTATAAATG CTTTATCGAT TCCAGCTGTA TCGAATCATT 70  
 CCGCACAAAT GAATCTATCA ACCGATGCTC GTATTGAGGA TAGCTTGTGT ATAGCCGAGG GGAACAATAT 140  
 CGATCCATTT GTTAGCGCAT CAACAGTCCA AACGGGTATT AACATAGCTG GTAGAATACT AGGTGTATTA 210  
 GGCGTACCGT TTGCTGGACA AATAGCTAGT TTTTATAGTT TTCTTGTGG TGAATTATGG CCCCGCGGCA 280  
 GAGATCCTTG GGAATTTTC CTAGAACATG TCGAACAACT TATAAGACAA CAAGTAACAG AAAATACTAG 350  
 GGATACGGCT CTTGCTCGAT TACAAGGTTT AGGAAATTC TTTAGAGCCT ATCAACAGTC ACTTGAAGAT 420  
 TGGCTAGAAA ACCGTGATGA TGCAAGAACG AGAAGTGTTT TTTATACCCA ATATATAGCC TTAGAACTTG 490  
 ATTTTCTTAA TGCGATGCCG CTTTTCGCAA TTAGAAACCA AGAAGTTCCA TTATTAATGG TATATGCTCA 560  
 AGCTGCAAAAT TTACACCTAT TATTAATGAG AGATGCCTCT CTTTTGGTA GTGAATTTGG GCTTACATCC 630  
 CAAGAAATTC AACGTTATTA TGAGCGCCAA GTGGAAAAA CGAGAGAATA TTCTGATTAT TGGCAAGAT 700  
 GGTATAATAC GGGTTTAAAT AATTTGAGAG GGACAAATGC TGAAGTTGG TTGCGATATA ATCAATTCGG 770  
 TAGAGACTTA ACGCTAGGAG TATTAGATCT AGTGGCATA TTCCCAAGCT ATGACACGGC TGTATATCCA 840  
 ATGAATACCA GTGCTCAATT AACAGAGAA ATTTATACAG ATCCAATTGG GAGAACAAAT GCACCTTCAG 910  
 GATTTGCAAG TACGAATTTG TTTAATAATA ATGCACCATC GTTTTCTGCC ATAGAGGCTG CCGTATTAG 980  
 GCCTCCGCAT CTACTTGATT TTCCAGAACA GCTTACAATT TTCAGCGTAT TAAGTCGATG GAGTAATACT 1050  
 CAATATATGA ATTACTGGGT GGGACATAGA CTTGAAATCGC GAACAATAAG GGGGTCATTA AGTACCTCGA 1120  
 CACACGGAAA TACCAATACT TCTATTAATC CTGTAACATT ACAGTTCACA TCTCGAGACG TTTATAGAAC 1190  
 AGAATCATTT GCAGGGATAA ATATACTTCT AACTACTCCT GTGAATGGAG TACCTGGGC TAGATTTAAT 1260  
 TGGAGAAATC CCCTGAATTC TCTTAGAGGT AGCCTTCTCT ATACTATAGG GTACTGGA GTGGGACAC 1330  
 AACTATTTGA TTCAGAACT GAATTACCAC CAGAAACAAC AGAAGACCA AATTATGAAT CTTACAGTCA 1400  
 TAGATTATCT AATAAAGAC TAATATCAGG AACACTTTG AGAGCACCAG TATATTCTTG GACGCACCGT 1470  
 AGTGCAGATC GTACAAATAC CATTAGTTCA GATAGCATAA CACAAATACC ATTGGTAAA TCATTCAACC 1540  
 TTAATTCAGG TACTTCTGTA GTCAGTGGCC CAGGATTTAC AGGAGGGGAT ATAAATCCGA CTAACGTAA 1610  
 TGGTAGTGT AATAAGTATGG GTCTTAATTT TAATAATACA TCATTACAGC GGTATCGCST GAGAGTTCGT 1680  
 TATGCTGCTT CTCRAACAAT GGTCTGAGG GTAACGTGCG GAGGGAGTAC TACTTTTGT CAAGGATTC 1750  
 CTAGTACTAT GAGTGCAAT GAGTCTTGA CATCTCAATC ATTTAGATTT GCAGAAATTC CTGTAGGTAT 1820  
 TAGTGCATCT GGCAGTCAA CTGCTGGAAT AAGTATAAGT AATAATGCAG GTAGACAAAC GTTTCACCTT 1890  
 GATAAAATTG AATTCATTC AATTACTGCA ACCTTCGAG CAGAATATGA TTTAGAAA GAAGGCAAGAGG 2960  
 CCGTGAATGC TCTGTTTACT AATACGAATC CAAGAAGGT GAAACAGGT GTGACAGATT ATCATATTGA 2030  
 TGAAGTATCC AATTTAGTGG CGTGTPTATC GGATGAATTC TGCTTGGATG AAAAGAGAGA ATTACTTGAG 2100  
 AAAGTGAAT ATGCGAAACG ACTCAGTGAT GAAAGAACT TACTCCAAG TCCAACTTC ACATCCATCA 2170  
 ATAAGCAACC AGACTTCATA TCTACTAATG AGCAATCGAA TTTACATCT ATCCATGAAC AATCTGAACA 2240  
 TGGATGGTGG GGAAGTGAGA ACATTACAAT CCAGGAAGGA AATGACGTAT TAAAGAGAA TTACGTCACA 2310  
 CTACCGGTA CTTTTAATGA GTGTTATCCG ACGTATTTAT ATCAAAAAAT AGGGGAGTCC GAATTAAGA 2380  
 CTTATACTCG CTACCAATTA AGTGGCTATA TTGAAGATAG TCAAGATTA GAGATATATT TGATTCGTTA 2450  
 CAATGCGAAA CATGAACAT TGGATGTTCC AGGTACCGAG TCCGTATGGT CGCTTTCAGT TGAAGCCCA 2520  
 ATCGGAAGGT GCGGTGAACC GAATCGATG 2549

Fig. 23. Nucleotide sequence of the *cryI-7* gene from Bt K-1.

```

cryI-7:      MTSNRKRNENE IINALS IPAVSNHSAQMNLSTDARIEDSLC I AEGNN I DFFVSA STVQTGI 60
cryIBe1:     ***** 60
cryI-7:      NIAGR ILGVLGVPPFAGQ IASFYSLVGLWPRGRDPWE IFLHVEQLIRQQYTENTRDTA 120
cryIBe1:     ***** 120
cryI-7:      LARLQGLGNSF RAYQQSLEDWLENRDDA RTRSVLYTQY IALELDFLNAMPLFA IRNQEYP 180
cryIBe1:     ***** 180
cryI-7:      LLMVYQA ANLHLLLRDASLFGSEFGLTSQE IQRYYERQVEK TREYSDYCA RWYNTGLN 240
cryIBe1:     ***** 240
cryI-7:      NLRGTA ESWLRYNQFRDLTLGVLDLVA LFPSYDTRVYPMNTSAQL TREIYTDPIGRTN 300
cryIBe1:     ***** 300
cryI-7:      APSGF ASTNWFMNAPSFS AIEAAV I RPPHLLDFPEQLTIFSVLSRWSENTQYMNWVVGHR 360
cryIBe1:     ***** 360
cryI-7:      LESRT IRGSLSTSTHGNTNTSINPVTLQFTSRDVYRTESFAGINILLTPVNGVPPWARFN 420
cryIBe1:     ***** 420
cryI-7:      WRNPLNSLEGSLLYTI GYTGVTQLFDS ETELPPE TTERPNYESYSHRLSNI RLI SGNTL 480
cryIBe1:     ***** 480
cryI-7:      RAPVYSWTHRSADRTNT ISSDS I TQ I PLYKSFNLNSGT SVVSGPGFTGGD I I RTNVNGSV 540
cryIBe1:     ***** 540
cryI-7:      LSMGLNFNNTSLQRYRYRVRYA ASQTMVLEVTVGGSTTFDQGF PSTMSANESLTSQSF BF 600
cryIBe1:     ***** 600
cryI-7:      AEFPGISASGSQTAG I SISMNAGBQTFHFDK IEF IPITATFEAEYDLERAQEAVNALFT 660
cryIBe1:     ***** 660
cryI-7:      NTPRRLKTVTDYHI DEVSNLVACLSD EFCLEKRELLEKVKYAKRLSDERNLLQDPNF 720
cryIBe1:     ***** 720
cryI-7:      TSINRQPDFISTNEQSNFTS IHEQSEHGWWGSENI TIQEGNDVFKENYVTLPGTFNECYP 780
cryIBe1:     ***** I***** 780
cryI-7:      TYLYQKIGESLKYTRYQLSGY IEDSQDLE IYL I RYNAKHETLDVPGTESVWLSVESP 840
cryIBe1:     ***** P***** 840
cryI-7:      IGRCGEPNR 849
cryIBe1:     ***** 849

```

Fig. 24. Comparison of deduced amino acid sequences between the *cryI-7* gene from the Bt K-1 and *cryI*Be*1* gene (GenBank Accession No. AF077326).

```

ATGCAATGCG TACCTTACAA TTGTTTAAGT AACCCGTGAAG TAGAAGTATT AGGTGGAGAA AGAATAGAAA 70
CTGGTTACAC CCCAATCGAT ATTTCCCTTGT CGCTAACGCA ATTTCTTTTG AGTGAATTTG TTCCCCTGTC 140
TGGATTTGTG TTAGGACTAG TTGATATAAT ATGGGGAAAT TTTGGTCCCT CTCAATGGGA CGCATTTCCT 210
GTACAAATTG AACAGTTAAT TAACCAAAGA ATAGAAGAAT TCGCTAGGAA CCAAGCCATT TCTAGATTAG 280
AAGGACTAAG CAATCTTTAT CAAATTTACG CAGAATCTTT TAGAGAGTGG GAAGCAGATC CTAATAATCC 350
AGCATTAAAG GAAGAGATGC GTATTCAATT CAATGACATG AACAGTGCCC TTACAACCGC TATTCCTCTT 420
TTTGCAGTTC AAAATTATCA AGTTCCTCTT TTATCAGTAT ATGTTCAAGC TGCAAATTTA CATTTATCAG 490
TTTTGAGAGA TGTTTCAGTG TTTGGACAAA GGTGGGGATT TGATGCCGCG ACTATCAATA GTCGTTATAA 560
TGATTTAACT AGGCTTATTG GCAACTATAC AGATTATGCT GTGCGCTGGT ACAATACGGG ATTAGAGCGT 630
GTATGGGGAC CGGATTCTAG AGATTGGGTA AGGTATAATC AATTTAGAAG AGAGCTAACA CTTACTGTAT 700
TAGATATCGT TGCTCTATTC TCAAATTATG ATAGTCGAAG GTATCCAATT CGAACAGTTT CCCAATTAAC 770
AAGAGAAATT TATACGAACC CAGTATTAGA AAATTTTGAT GGTAGTTTTC GTGGAATGGC TCAGAGAATA 840
GAACAGAATA TTAGGCAACC ACATCTTATG GATATCTTAA ATAGTATAAC CATTTATACT GATGTGCATA 910
GAGGCTTTAA TTATTGGTCA GGGCATCAAA TAACAGCTTC TCCTGTAGGG TTTTCAGGAC CAGAAATTCG 980
ATCCCTTTA TTTGGGAATG CGGGGAAATGC AGCTCCACCC GTRACTTGTCT CATTAACCTG TTTGGGGATT 1050
TTTAGAACAT TATCTTCACC TTTATATAGA AGAATTATAC TTGGTTCAGG CCCAATAAT CAGGAACTGT 1120
TTGTCCTTGA TGGAACGGAG TTTTCTTTTG CCTCCCTAAC GACCAACTTG CCTTCCACTA TATATAGACA 1190
AAGGGGTACA GTCGATTAC TAGATGTAAT ACCGCCACAG GATAATAGTG TACCACCTCG TCGGGGATTT 1260
AGCCATCGAT TGAGTCATGT TACAATGCTG AGCCAAGCAG CTGGAGCAGT TTACACCTTG AGAGCTCCAA 1330
CGTTTTCTTG GCAGCATCGC AGTGCTGAAT TTAATAATAT AATGCAATG GATAGTATTA CTCAAATCCC 1400
TGCAGTGAAG GGAACCTTTC TTTTTAATGG TTCTGTAATT TCAGGACCAG GATTTACTGG TGGGGACTTA 1470
GTTAGATTA ATAGTAGTGG AAATAACATT CAGATAGAG GGTATATTGA AGTTCCAATT CACTTCCCAT 1540
CGACATCTAC CAGATATCGA GTTCGTGTAC GGTATGCTTC TGTAAACCCG ATTCACCTCA ACGTTAATTG 1610
GGGTAATTCA TCCATTTTTT CCAATACAGT ACCAGCTACA GCTACGTCA TAGATAATCT ACAATCAAGT 1680
GATTTGGTT ATTTGAAAAG TGCCAATGCT TTTACATCTT CATTAGGTA TATAGTAGGT GTTAGAAATT 1750
TTAGTGGGAC TGCAGGAGTG ATAATAGACA GATTTGAATT TATCCAGTT ACTGCAACAC TCGAGGCTGA 1820
ATATAATCTG GAAAGAGCGC AGAAGGCGGT GAATGCGCTG TTTACGTCTA CAAACCAACT AGGGCTAAAA 1890
ACAATGTAA CGGATTATCA TATTGATCAA GTGTCCAATT TAGTTACGTG TTTATCGGAT GAATTTTGTG 1960
TGGATGAAAA GCGAGAATTG TCCGAGAAAAG TCAAACATGC GAAGCGACTC AGTGATGAAC GCAATTTACT 2030
CCAAGATTCA AATTTCAAAG ACATTAATAG GCAACCAGAA CGTGGGTGGG GCGGAAGTAC AGGGATTACC 2100
ATCCAAGGAG GGGATGACGT ATTTAAAGAA AATTACGTCA CACTATCAGG TACCTTTGAT GAGTGCTATC 2170
CAACATATTT GTATCAAAAA ATCGATGAAT CAAAAATAAA AGCCTTTACC CGTTATCAAT TAAGAGGGTA 2240
CATCGAAGAT AGTCAAGATT TAGAAGTTTA TTTGATCCGT TACAATGCAA AACACGAAAC GTTAAACGTG 2310
CCAGGTACGG GTTCCTTATG GCCACTTGCA GTTAAAAGTC CAATTGGAAG GTGCGGTGAA CCGAATCGAT 2380
G

```

Fig. 25. Nucleotide sequence of the *cryI-44* gene from Bt K-1.

```

cryI-44   MQCVFYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLEFVPGAGFVGLGLVDIIWGI   60
cryIΔc2   -E*I***** 60
cryI-44   FGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALR 120
cryIΔc2   ***** 120
cryI-44   EEMBIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDA 180
cryIΔc2   ***** 180
cryI-44   TINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDQVRYNQFRRELTLTVLDIVALF 240
cryIΔc2   ***** 240
cryI-44   SNYDSRRYPVRTYSQLTREIYTMPVLENFDGSGFRGMAQRIEQNIRQPHLMDILNSITIYT 300
cryIΔc2   *****-**-**RS*-***** 297
cryI-44   DVHRGFNYWSGHQITASPVGFGSPEFAFPLFGNAGNAAPPV-LVSLTGLGIFRTLSSPLY 359
cryIΔc2   *--**Y-*****-*****-***Y*TM*****-RI*AQL*Q*VY****TFY 351
cryI-44   RRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTLNLPSTIYRQRGTVDSDLVIPPQDNSVPPRAG 419
cryIΔc2   **PF-NI*I***Q*S*****AYGT-SS***AV**KS*****E***N*N***Q* 409
cryI-44   FSHRLSHVTML-SQAAGAVYTLRAPTFSWQHRSAEFNNIIASDSITQIPAVKGNFLNGS 478
cryIΔc2   *****S*FR*GSSSS*SI I***M**I***** 469
cryI-44   VISGPGFTGGDLVRLNSSGNNIQNRGYIEVPIHFPSTSTRYRVVRYASVTPIHLNVNWG 538
cryIΔc2   ***** 529
cryI-44   NSSIFSNVTPATATSLDNLQSSDFGYFESANAFSSLGNIVGVYRNFSGTAGVIIIRFEFI 598
cryIΔc2   ***** 589
cryI-44   PYTATLEAEYNLERAKAVNALFTSTNLGLKTNVTDYHIDQVSNLYTCLSD EFCLEKR 658
cryIΔc2   ***** 649
cryI-44   ELSEKVKHAKKLSDEBNLLQDSNFKDINRQPERGWGGSTGITIQGGDDVFKENYVTLSGT 718
cryIΔc2   ***** 709
cryI-44   FDECYPTYLYQKIDESKLFKAFTEYQLRGIYIEDSQDLEVYLIRYNAKHETLNVPGTGLSWP 778
cryIΔc2   *****I*****V***** 769
cryI-44   LAVKSPIGRGCEPNR 793
cryIΔc2   *SAQ***K***** 883

```

Fig. 26. Comparison of deduced amino acid sequences between the *cryI-44* gene from Bt K-1 and *cryIΔc2* gene (GenBank Accession No. M35524).



ATGCAATGCA TACCATATAA TTGCTTAAGT AATCCTGAGG AAGTACTTTT GGATGGGGAG AGGATATTAC 70  
 CTGATATCGA TCCACTCGAA GTTCTTTTGT CGCTTTTGCA ATTTCTTTTG AATAACTTTG TTCCAGGGGG 140  
 AGGCTTTTAT TCAGGATTAG TTGATAAAAT ATGGGGGGCT TTGAGACCAT CTGAATGGGA CTTATTTCTT 210  
 GCACAGATTG AACGGTTGAT TGATCAAAGA ATAGTAGCAA CAGTAAGAGC AAAAGCAATC ACTGAATTAG 280  
 AAGGATTAGG GAGAAATTA CAAATATACG CTGAAGCATT TAAAGAAATGG GAATCAGATC CTGATAACGA 350  
 AGCGGGTAAA AGTAGAGTAA TTGATCGCTT TCGTACTACT GATGGTCTAA TTGAAGCAA TATCCCTTCA 420  
 TTTCGGATAA TTGGATTGTA AGTGCCACTT TTATCGGTTT ATGTTCAAGC AGCTAATCTA CATCTCGCTC 490  
 TATTGAGAGA TTCTGTTATT TTTGGAGAGA GATGGGGATT GACGACAAA AATGTCAATG ATATCTATAA 560  
 TAGACAAATT AGAGAAATTC ATGAATATAG CAATCATTGC GTAGATACGT ATAACACAGA ACTAGAACGT 630  
 CTAGGGTTTA GATCTATAGC GCAGTGGAGA ATATATAATC AGTTTAGAAG AGAACTAACA CTAAGTGTAT 700  
 TAGATATTGT CGCTCTTTTC CCGAAGTATG ACAGTAGACT GTATCCGATC CAAACTTTTT CTCAATTGAC 770  
 AAGAGAAATT GTTACATCCC CAGTAAGCGA ATTTTATTAT GGTGTTATTA ATAGTGGTAA TATTAATTGGT 840  
 ACTCTTACTG AACAGCAGAT AAGGCGACCA CATCTTATGG ACTTCTTTAA CTCCATGATC ATGTATACAT 910  
 CAGATAATAG ACGGGAACAT TATTGGTCAG GACTTGAAT GACGGCTTAT TTTACAGGAT TTGCAGGAGC 980  
 TCAAGTGTCA TTCCCTTTAG TCGGACTAG AGGGGAGTCA GCTCCACCAT TAACTGTTAG AAGTGTAAAT 1050  
 GATGGAAATTT ATAGAATATT ATCGGCACCG TTTTATTCAG CGCTTTTCT AGGCACCATT GTATTGGGAA 1120  
 GTCGTGGAGA AAAATTTGAT TTTGCGCTTA ATAATATTTT ACCTCCGCCA TCTACAATAT ACAGACATCC 1190  
 TGGAACAGTA GATTCACTAG TCAGTATACC GCCACAGGAT AATAGCGTAC CACCGCACAG GGGATCTAGT 1260  
 CATCGATTAA GTCATGTTAC AATGCGCGCA AGTTCCCTTA TATTCCATTG GACGCATCGC AGCGCAACCA 1330  
 CTACAAATAC AATTAATCCA AATGCTATTA TCCAAATACC ACTAGTAAA GCATTTAACC TTCATTCAGG 1400  
 TGCCACTGTT GTTAGAGGAC CAGGGTTTAC AGGTGGTGAT ATCCTTCGAA GAACGAATAC TGGCACATTT 1470  
 GCAGATATGA GAGTAAATAT TACTGGGCCA TTATCCCAA GATATCGTGT AAGAATTCGC TATGCTTCTA 1540  
 CGACAGATTT ACAATTTTTC ACGAGAATCA ATGGAACTTC TGTAAATCAA GGTAAATTTCC AAAGAATAT 1610  
 GAATAGAGGG GATRAATTTAG AATCTGGAAA CTTTAGGACT GCAGGATTTA GTACGCCTTT TAGTTTTTCA 1680  
 AATGCGCAAA GTACATTCAC ATTGGGACT CAGGCTTTTT CAAATCAGGA AGTTTATATA GATCGAATTG 1750  
 AATTTGTCCC GGCAGAAGTA ACATTCGAGG CAGAATCTGA TTTAGAAAGA GCGCAAAAAG CGGTGAATGC 1820  
 CCTGTTTACT TCTACAAACC AACTAGGGCT AAAAACAGAT GTGACGGATT ATCAGATTGA TCAAGTGTCC 1890  
 AATTTAGTAG AATGTTTATC AGATGAATTT TGTCTGGATG AAAAGAGAGA ATGTCCGAG AAAGTCAAAAC 1960  
 ATGCAAAGCG ACTTAGTGAT AAGCGGAACC TACTTCAAGA TCCAAACTTC ACATCTATCA ATAGACAACT 2030  
 AGACCGTGGT TGGAGAGGAA GTACGGATAT TACCATCCAA GGAGGAAATG ACGTATTCAA AGAGAATTAC 2100  
 GTCACACTAC CAGGTACCTT TGATGAGTGT TATCCAACGT ATTTGTATCA AAAAATAGAT GAGTCAAAAT 2170  
 TAAAAGCCTA TACTCGCTAT GAATTAAGAG GGTATATTGA AGATAGTCAA GATTTAGAG TCTATTTGAT 2240  
 TCGTTACAAAT GCGAAACATG AAACAGTAAA TGTTCGGGT ACAGGGTCTT TATGGCCGCT TTCAGTCGAA 2310  
 AGCCCAATCG GAAGGTGCGG AGAACCGAAT CGATG 2345

Fig. 27. Nucleotide sequence of the *cryI-15* gene from Bt 2385-1.

ATGCAATGCG TACCTTACAA TTGTTAAAGT AACCCCTGAAG TAGAAGTATT AGGTGGAGAA AGAATAGAAA 70  
 CTGGTTACAC CCCAATCGAT ATTTCCCTGT CGCTAACGCA ATTTCTTTTG AGTGAATTTG TTCCCGGTGC 140  
 TGGATTTGTG TTAGGACTAG TTGATATAAT ATGGGGAAAT TTTGGTCCCT CTCAATGGGA CGCATTCTTT 210  
 GTACAAATTG AACAGTAAAT TAACCAAAGA ATAGAAGAAT TCGCTAGGAA CCAAGCCATT TCTAGATTAG 280  
 AAGGACTAAG CAATCTTTAT CAAATTTACG CAGAATCTTT TAGAGCGTGG GAAGCAGATC CTAATAATCC 350  
 AGCATTAAAG GTAGAGATGC GTATTCAATT CAATGACATG AACAGTGCCC TTACAACCGC TATTCCTCTT 420  
 TTTGCAGTTC AAAATTATCA AGTTCCCTCTT TTATCAGTAT ATGTTCAAGC TGCAAATTTA CATTTATCAG 490  
 TTTTGAGAGA TGTTCAGTG TTTGGACAAA GGTGGGGATT TGATGCCACG ACTATCAATA GTCGTTATAA 560  
 TGATTTAACT AGGCTTATTG GCAACTATAC AGATTATGCT GTACGCTGGT ACAATACGGG ATTAGAGCGT 630  
 GTATGGGGAC CGGATTCTAG AGATTGGATA AGATATAATC AATTTAGAAG AGAATTAACA CTAACTGTAT 700  
 TAGATATCGT TTCTCTATTT CCGAACTATG ATAGTAGAAC GTATCCAATT CGAACAGTTT CCCAATTAAC 770  
 AAGAGAAATT TATACAAACC CAGTATTAGA AGATTTTAAAT GGTAGTTTTT GAGGCTCGGC TCAGGGCATA 840  
 GAACAAAGTA TTAGGAGTCC GCATTTGATG GATATACTTA ATAGTATAAC CATCTATACG GATGCTCATA 910  
 GGGGTTATTA TTATTGGTCA GGGCATCAAA TAATGGCTTC TCCTGTCCGT TTTTCGGGGC CAGAATTCAC 980  
 GTTCCCGCTA TATGGAACCA TGGGAAATGC AGCTCCACAA CAACGTATTG TTGCTCAACT AGGTCAGGGC 1050  
 GTGTATAGAA CATTATCCTC TACTTTTTAT AGAAGTCCCT TTAATATAGG GATAAATAAT CAACAACAT 1120  
 CTGTTCTTGA CGGGACAGAA TTTGCTTATG GAACCTCCTC AAATTTGCCA TCCGCTGTAT ACAGAAAAAG 1190  
 CGGAACGGTA GATTCGCTGG ATGAAATACC ACCACAGAAAT AACAACTGC CACCTAGGCA AGGATTTAGT 1260  
 CATCGATTA GCCATGTTTC AATGTTTCGT TCAGGATTTA GTAATAGTAG TGTAAGTATA ATAAGAGCTC 1330  
 CTATGTTCTC TTGGATACAT CGTAGTGCTG AATTTAATAA TATAATTCCT TCATCACAAA TTACACAAAT 1400  
 ACCTTTAACA AAATCTACTA ATCTTGGCTC TGGAACCTCT GTCGTTAAAG GACCAGGATT TACAGGAGGA 1470  
 GATATTCTTC GAAGAACCTC ACCTGGCCAG ATTTCAACCT TAAGAGTAAA TATTACTGCA CCATTATCAC 1540  
 AAAGATATCG CGTAAGAATT CGTTACGCTT CTACTACAAA TTTACAATTC CATACTCAA TTGACGGAA 1610  
 ACCTATTAAT CAGGGGAATT TTTCAGCAAC TATGAGTAGT GGGAGTAATT TACAGTCCGG AAGCTTTAGG 1680  
 ACTGCAGGTT TTAATACTCC GTTTAACTTT TCAAATGGAT CAAGTGTATT TACGTTAAGT GCTCATGTCT 1750  
 TCAATTCAGG CAATGAAGTT TATATAGATC GAATTGAATT TGTTCCGGCA GAAGTAACTT TTGAGGCAGA 1820  
 ATATGATTTA GAAAAGGCAC AGAAGGCGGT GAATGCGCTG TTTACTTCTT CCAATCAAAT CGGGTTAAAA 1890  
 ACAGATGTGA CGGATTATCA TATTGATCAA GTATCCAATT TAGTTGAGTG TTTATCAGAT GAATTTTGTC 1960  
 TGGATGAAAA ACAAGAATTG TCCGAGAAA GTCAAACATGC GAAGCGACTT AGTGATGAGC GGAATTTACT 2030  
 TCAAGATCCA AACTTCAGAT GGATCAATAG ACAACTAGAC CGTGGCTGGA GAGGAAGTAC GGATATTACC 2100  
 ATCCAAGGAG GCGATGACGT ATTCAAAGAG AATTACGTTA CACTACCAGG TACCTTTGAT GAGTGCTATC 2170  
 CAACGTATTT ATATCAAAAA ATAGATGAGT CGAAATTTAA AGCCTATACC CGTTATCAAT TAAGAGGGTA 2240  
 TATCGAGGAT AGTCAAGACT TAGAAATCTA TTTAATTCGC TACAATGCAA AACATGAAAC AGTAAATGTG 2310  
 CCAGGTACGG GTTCCTTATG GCCGCTTTCA GCCCAAAGTC CAATCGGAA GTCGCGTGAA CCGAATCGAT 2380  
 G 2381

Fig. 28. Nucleotide sequence of the *cryI-5* gene from Bt 2385-1.

```

cryI-5:      MQCVPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLEFVPGAGFVLGLVDI IWGI 60
cryIAbI:    -E***** 60
cryI-5:      FGPSQWDAFLVQIEQLINQRI EEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFRAW EADPTNPALR 120
cryIAbI:    ***** 120
cryI-5:      VEMRIQFNDMNSALTTA IPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSYFGQRWGF DAT 180
cryIAbI:    *****A 180
cryI-5:      TINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFBRELITVLDIVSLF 240
cryIAbI:    ***** 240
cryI-5:      PNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTNPVLEDFNGSFRGSAQGIEQSI RSPHLM DILNSIT IYT 300
cryIAbI:    *****N*D***** 300
cryI-5:      DAHRGYYYWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAA PQRIV AQLGGQVYBTLSSTFY 360
cryIAbI:    ***** 360
cryI-5:      RSPFNIGINNQLSVLDGTEFAYGTSSNLPSAVYRKSGTVDSLDE IPPQNNV PPRQGFS 420
cryIAbI:    ***** 420
cryI-5:      HRLSHVSMFESGFSNSSVSI I RAPMF SWIHRS AEFNNI IPSSQITQI PLTKSTNLGSGTS 480
cryIAbI:    ***** 480
cryI-5:      VYKGPGF TGGDILRRTSPGQI STLRYNITAPLSQRYEVRIRYASTNLQFHTSIDGRPIN 540
cryIAbI:    ***** 540
cryI-5:      QGNFSA TMSGSLNLSGGSFRTAGFTT PENFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPA 600
cryIAbI:    ***** 600
cryI-5:      EYTFEA EYDLERAQKAVNALFTSSNQ IGLKTDVTDYHI DQVSNLVECL SDEFCLDERQEL 660
cryIAbI:    *****E*****K** 660
cryI-5:      SEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRWINRQLDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYVTLPGTFD 720
cryIAbI:    *****G*****L**** 720
cryI-5:      ECPYTYLYQKIDESK LKAYTRYQLRGYIEDSQDLEIYLI RYNAKHETVNVPGTGS L WPLS 780
cryIAbI:    ***** 780
cryI-5:      AQSPIGRC 788
cryIAbI:    *P****K* 788

```

Fig. 29. Comparison of deduced amino acid sequences between the *cryI-5* gene from Bt K-1 and *cryIAbI* gene (GenBank Accession No. M23898).

```

ATGCAATGCG TACCTTACAA TTGTTAAAGT AATCCTGAGG AAGTATTTTT GGATGGGGAG AGGATATTAC 70
CTGATATCGA TCCACTCGAA GTTTCTTTGT CGCTTTTGCA ATTTCTTTTG AATAACTTTG TTCCAGGGGG 140
GGGGTTTATT TCAGGATTAC TTGATAAAAT ATGGGGGGCT TTGAGACCAT CTGATTGGGA ATTATTTCTT 210
GAACAGATTG AACAGTTGAT TGATCGAAGA ATAGAAAGAA CAGTAAGAGC AAAAGCAATC GCTGAATTAG 280
AAGSTTTAGG GAGAAGTTAT CAACTATATG GAGAGGCATT TAAAGAGTGG GAAAAAATC CAGATAACAC 350
AGCGGCTCGG TCTAGAGTAA CTGAGAGATT TCGTATAATT GATGCTCAA TTGAAGCAA TATCCCTTCG 420
TTTCGGGTTT CCGGATTTGA AGTGCCACTT CTATTGGTTT ATACCCAAGC AGCTAATTTG CATCTCGCTC 490
TATTAAGAGA TTCTGTTGTT TTTGGAGAGA GATGGGGATT GACGACTACA AATGTCAATG ATATCTATAA 560
TAGACAAGTT AATAGAATTG GTGAATATAG CAAGCATTGT GTAGATACGT ATAAACAGA ATTAGAACGT 630
CTAGGATTTA GATCTATAGC GCAATGGAGA ATATATAATC AGTTTAGAAG GGAATTGACA CTAACGGTAT 700
TAGATATTGT CGCTGTTTTT CCGAACTATG ATAGTAGACT GTATCCGATT CGAACAAATTT CTCAAATTGAC 770
AAGAGAAAT TATACATCCC CAGTAAGCGA ATTTTATTAT GGTGTCATTA ATAGTAATAA TATAAATTGGT 840
ACCTTACTG AACAGCAAA AAGGCGACCA CATCTTATGG ACTTCTTTAA CTCCATGATC ATGTATACGT 910
CAGATAATAG ACGAGAACAT TATTGGTCAG GACTTGAAT GACGGCTACT AATACTGAGG GACATCAAA 980
GTCATTCCTT TTAGCTGGGA CTATAGGGAA TTCAGTCCA CCAGTAACTG TTAGAAATAA TGSTGAGGGA 1050
ATTTATAGAA TATTATCGGA CACATTTTAT TCAGCACCTT TTCTAGGCAC AAGTGTGCTA GGAAGTCGTG 1120
GGGAAGAAAT TGCTTTTGCA TCTAATACTA CTACAAGTCT GCCATCTACA ATATATAGAA ATCGTGGAA 1190
AGTAGATTCA TTAGTCAGCA TACCGCCACA GGATTATAGC GTACCACCGC ACAGGGGGTA TAGTCATTTA 1260
TTAAGTCACG TTACGATGCG CAATAGTTCT CCTATATGCC ACTGGACACA TCSTAGTGCA ACCCCTAGAA 1330
ATACAATTGA TCCAGATAGT ATCACTCAA TTCCAGCAGT TAAGGGAGCG TATATTTTTA ATAGTCCAGT 1400
CATTACTGGG CCAGGACATA CAGGTGGGGA TATAATAAGG TTTAACCTTA ATACTCAGAA CAACATAAGA 1470
ATTCCATTTT ATTCAAATGC GGTCCAGCGT TATCGAATTA GAATGCGTTA TGCGGCAGAA GCTGATTGTA 1540
TTTTAGAAA GGGAGTAAAC ATTGTTACTG GGGCAGGGGT CACCTTTAGG CCAATTCCTA TTAAGCTAC 1610
AATGACTCCT GGAAGTCCTT TAACATATTA CAGCTTCCAG TATGCAGATT TAAATATAAA TCTTACTGCG 1680
CCGATAAGAC CTAATAATTT TGTATCTATT AGACGTTCAA ACCAACCCAGG AACCTTTTAT ATAGTAGAA 1750
TTGAATTCAT TCCAATTGAC CCAATCCGTG AGGCAGAAC TGAATTTAGAA AGAGCGCAA AGGCGGTGAA 1820
TGCGCTGTTT ACTTCTTCCA ATCAACTAGG ATTAACAACA GATGTGACGG ATTATCATAT TGATCAAGTG 1890
TCCAATTTAG TTGCGTGTGTT ATCGGATAAA TTCTGCCTGG ATGAAAAGCG AGAATTGTCC GAGAAAGTTA 1960
AACATGCGAA GCGACTCAGT GATGAGAGAA ATTTACTCCA AGATCAAAAC TTTACAGGCA TCAATAGSCA 2030
AGTAGACCST GGGTGGAGAG GAAGTACGGA TATTACCATC CAAGGAGGGA ATGATGTATT CAAAGAGAA 2100
TACGTACAC TACCAGGTAC CTTTGATGAG TGTTACCAA CGTATTTGTA TCAAAAAATA GATGAGTCAA 2170
AATTAAAACC TTATACTCGC TATGAATTA GAGGGTATAT TGAAGATAGT CAAGACTTAG AAGTCTATTT 2240
GATCCGTTAC AATGCAAAAC ACGAAACGTT AAATGTGCCA GGTACGGGT CTTATGGCC ACTTGCAGCC 2310
GAAAGTTCAA TCGGAAGGTG CGSTGAACCG AATCGATG 2348

```

Fig. 30. Nucleotide sequence of the *cryI-12* gene from Bt 2385-1.

```

cryI-12      MQCVPYNCLSNPEEVFLDGERILPDI DPLEVSLSL LQFLNNFVPGGGFISGLLDKIWGA 60
cryIJa1:    -**I*****L*****V***** 60
cryI-12      LRPSDWELFLEQIEQLIDRR IERTVRAKAI AELEGLGRSYQLYGEAFKWEKTPDNTAAR 120
cryIJa1:    ****E**D***A***R***Q***A*****T*****N**I*A*****SD***E*** 120
cryI-12      SRVTERFRIIDAQIEANIPSFVYSGFEVPLLLVYTQAANLHLALLRDSVYFGERWGLTTT 180
cryIJa1:    ***ID***L*GL*****I*****S**V*****T***** 180
cryI-12      NVNDIYNRQVNRI GEYSKHCVDTYKTELERLGFRSIAQWRIYNQFRELTLTVLDIVAVF 240
cryIJa1:    *****REIH***N*****N*****L* 240
cryI-12      PNYDSRLYPIRTISQLTREIYTPSYSEFYGYVINSNNIIGTLTEQQIRBPHLMDFNSMI 300
cryIJa1:    *****Q*F*****V*****G***** 300
cryI-12      MYTSDNRREHYWSGLEMTA--TNTTEGHQRSFPLAGTIGNSAPPVTVRNNGEGIYRILSDT 358
cryIJa1:    *****YF*GF*A*V***V**R*E***L***SYNG*****AP 360
cryI-12      FYSAPFLGTSVLGSRGEEFAFASNTTSLPSTIYRNRGTVDSLYSIPPQDYSVPPHRGYS 418
cryIJa1:    *****I*****K*D*L*NI SPP*****HP*****N*****S* 420
cryI-12      HLLSHVTMRNSSPI FHWTHRSATPRNTIDPDSITQIPAVKGAYIFN-SPVITGPGHTGGD 477
cryIJa1:    *****A*****TT***N*A*T**L**A FNLHSGAT*VR***F*** 480
cryI-12      IIRFNPNTQNNIRIPFHSNAVQRYRIRMKYAAEADCILESGVNIYTGAGVTFRPIPIKA 536
cryIJa1:    *LR*T*TG*FADM*VNI TGPLSQRYR+R+RYASTTDLQFFTRI*----*TSVNQGNFQR 536
cryI-12      TMTPGSPLTYYSFYADLNINLTAPIRPNNFYSIRRSNQPGNLYIDRIEPIPIPIREAE 596
cryIJa1:    **NR*DN*ESGN*RT*GFSTPFSFSNAQST*TLGTQAFSNQEV*****V*AEYTF*** 596
cryI-12      HDLERAQKAVNALFTSSNQLGLKTDVTDYHIDQVSNLYACLSDKFCLEKRELSEKVKHA 656
cryIJa1:    S*****T*****Q*****E***E***** 656
cryI-12      KRLSDERNLLQDQNF TGINRQVDRGWRGSDITIQGGNDVFKENYVTLPGTFDECYPTYL 716
cryIJa1:    ****K*****P***S***** 716
cryI-12      YQRIDESKLPYTRYELRGYIEDSQDLEVYLI RYNAKHETLNYPGTGSLWPLAAESSIGR 776
cryIJa1:    *****L*A*****V*****SV**P*** 776
cryI-12      CGEPNR 782
cryIJa1:    ***** 781

```

Fig. 31. Comparison of deduced amino acid sequences between the *cryI-12* gene from Bt 2385-1 and *cryIJa1* gene (GenBank Accession No. L32019).

Table 7. Homology (%) between nucleotide and deduced amino acid sequences of the *cryI*-type genes from Bt K-1 and Bt 2385-1, and known *cry* genes.

strains	<i>cryI</i> -type genes	Max. homology (%)		
		Nucleotide	Deduced amino acid	Known genes
Bt K-1	<i>cryI-1</i>	73.3	78.0	with <i>cryIHb1</i>
	<i>cryI-2</i>	100	100	with <i>cryIEa1</i>
	<i>cryI-7</i>	99.8	99.7	with <i>cryIBe1</i>
	<i>cryI-31</i>	100	100	with <i>cryIAa1</i>
	<i>cryI-44</i>	92.2	91.0	with <i>cryIAc2</i>
Bt 2385-1	<i>cryI-5</i>	97.9	98.0	with <i>cryIAb1</i>
	<i>cryI-12</i>	89.0	80.0	with <i>cryIJa1</i>
	<i>cryI-15</i>	100	100	with <i>cryIJa1</i>

(5). 곤충병원성 Bt로부터 신규 살충성 유전자 발현 및 기능 분석

새로운 *cryI*-type 유전자의 나비목 곤충에 대한 활성을 알아보기 위하여 위 실험에서 클로닝한 5종의 새로운 유전자들을 baculovirus expression vector systems (BEVS)에 적용하여 발현시켰다. Bgl IIATG1-F와 Not IN400-R 프라이머 set을 디자인하여 새로운 *cryI*-type 유전자를 증폭한 다음 pOB1 vector에 클로닝하여 각 유전자들의 transfer vector인 pBacPH-novel gene 들을 제작하였다 (Fig. 32). 이렇게 제작된 transfer vector를 bApGOZA DNA와 함께 Sf9 cell에 감염시켜 새로운 Cry1-type 내독소 단백질 재조합 바이러스들을 만들었다 (Fig. 33). 위상차 현미경을 이용하여 polyhedrin promoter의 조절 하에서 새로운 내독소 단백질 재조합 바이러스들의 다각체를 확인할 수 있었다 (Fig. 34, Fig. 35). SDS-PAGE 분석 실험에서 재조합 바이러스들 모두 120 - 130 kDa의 재조합 단백질을 생산하였고 (Fig. 36) trypsin을 처리 하였을 때 모두 65

kDa의 active form으로 activation되는 것을 확인하였다 (Fig. 37). 작물형질전환용으로의 가능성을 확인하기 위하여 배추좀나방과 과밤나방에 대하여 독성검정을 수행하였다. 결과 5종의 재조합 바이러스 모두 Ap1Ac에 비하여 배추좀나방에 높은 살충성을 나타내었고, Ap1과 Ap5 바이러스는 과밤나방에도 높은 살충성을 나타내었다 (Fig. 38). 이로부터 새롭게 분리된 5종의 *cryI*-type 유전자들은 모두 작물형질전환체 유전자에 적합하며 그중 *cryI*-44는 배추좀나방 방제용 작물형질전환체에, *cryI*-5는 과밤나방 방제용 작물형질전환체의 제작에 유리할 것으로 고려된다.

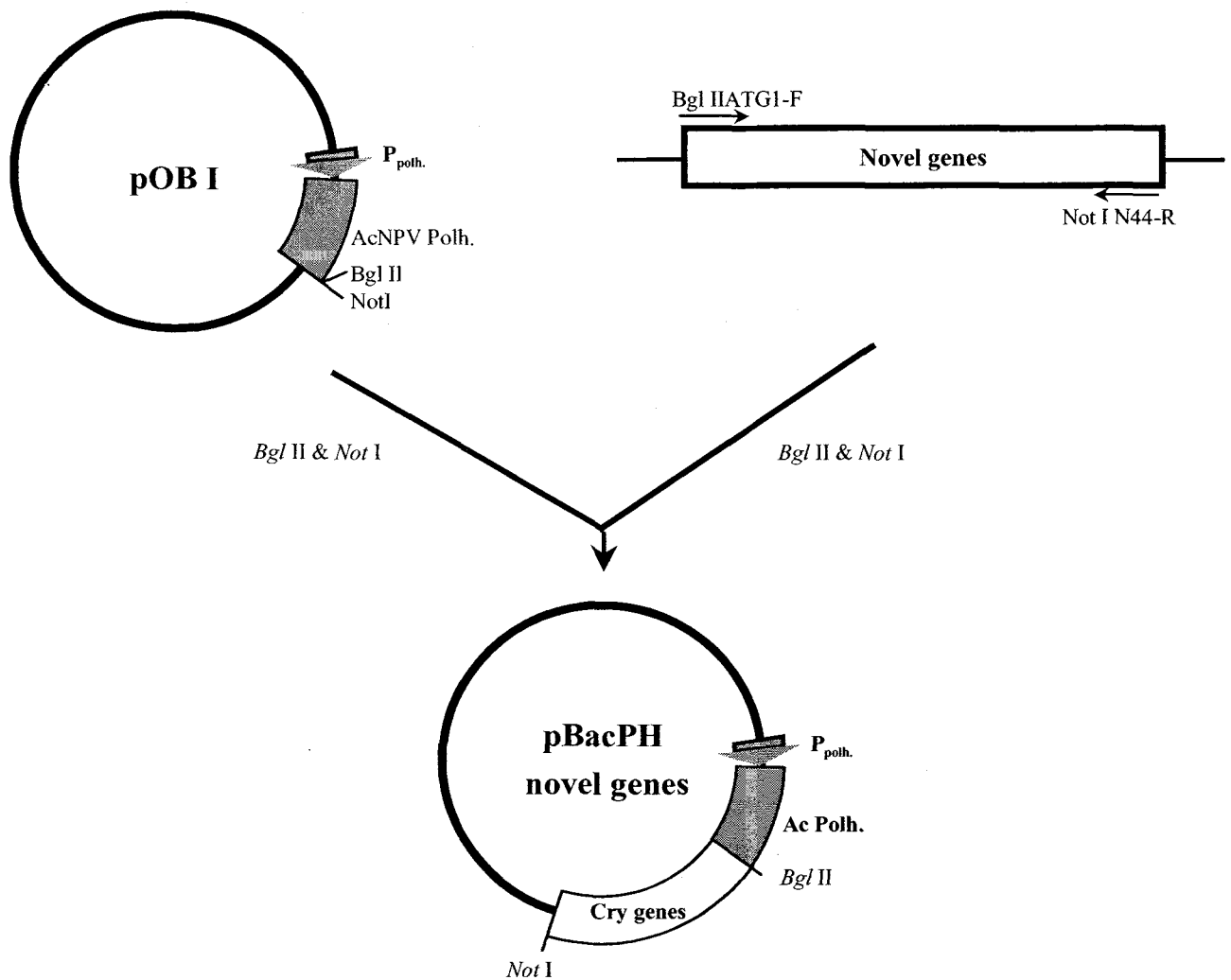


Fig. 32. General construction map of the transfer vectors. The 2.4 kb PCR-amplified fragments were cloned into pOB1 vector.

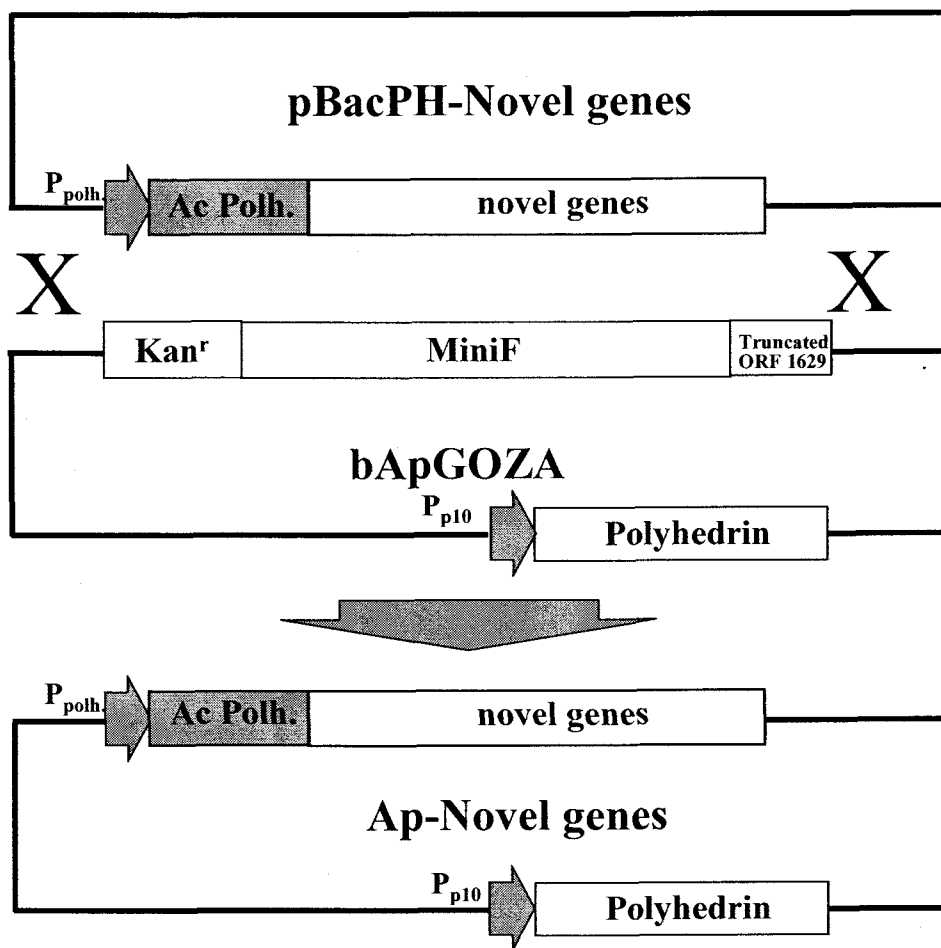


Fig. 33. Schematic diagram of construction of the novel recombinant viruses



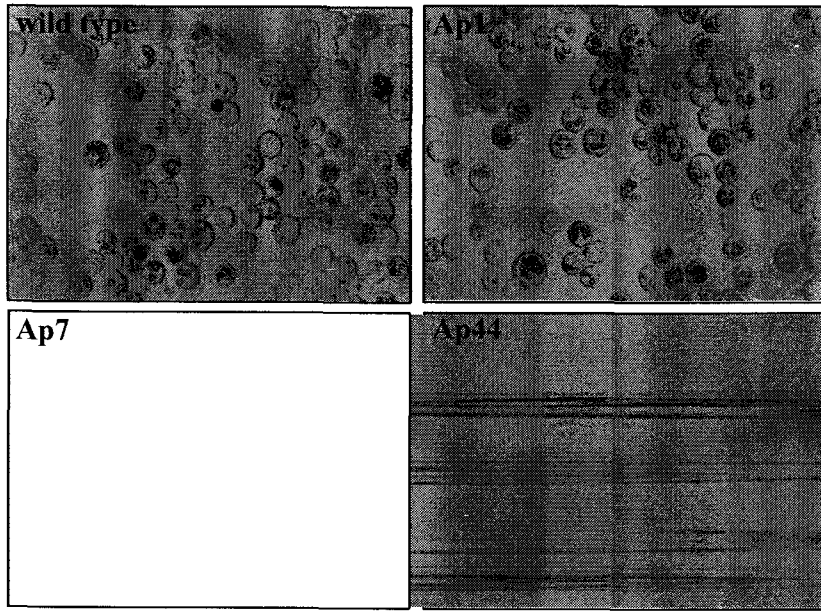


Fig. 34. Phase-contrast microscopy of Sf-9 cells infected with wild-type AcNPV and recombinant baculoviruses, which containing the novel genes from Bt K-1 strain.

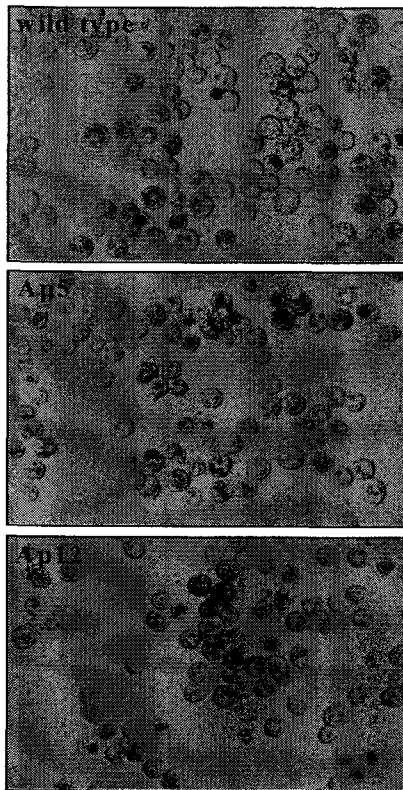


Fig. 35. Phase-contrast microscopy of Sf-9 cells infected with wild-type AcNPV and recombinant baculoviruses, which containing the novel *cryI*-type genes from Bt 2385-1 strain.

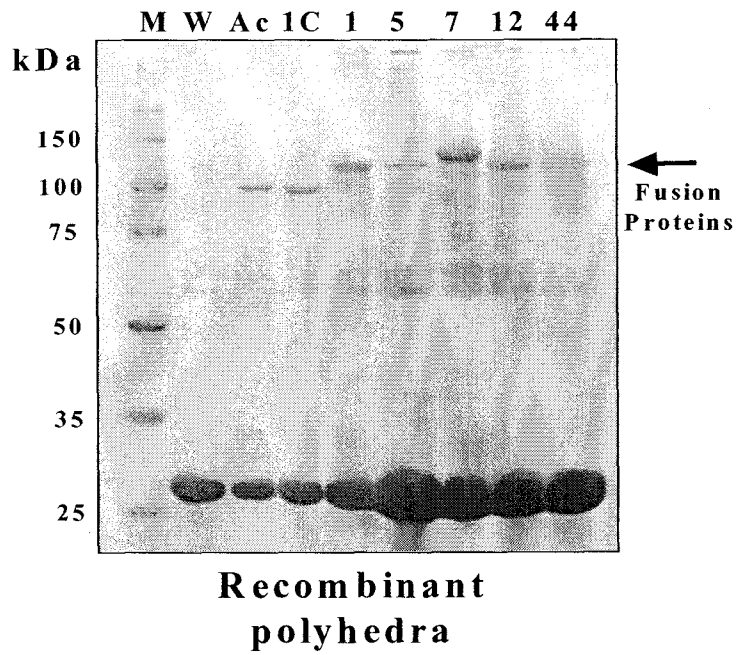


Fig. 36. SDS-PAGE analysis of the recombinant viruses which containing the novel Cry1-type proteins from Bt K-1 and Bt 2385-1 strains.

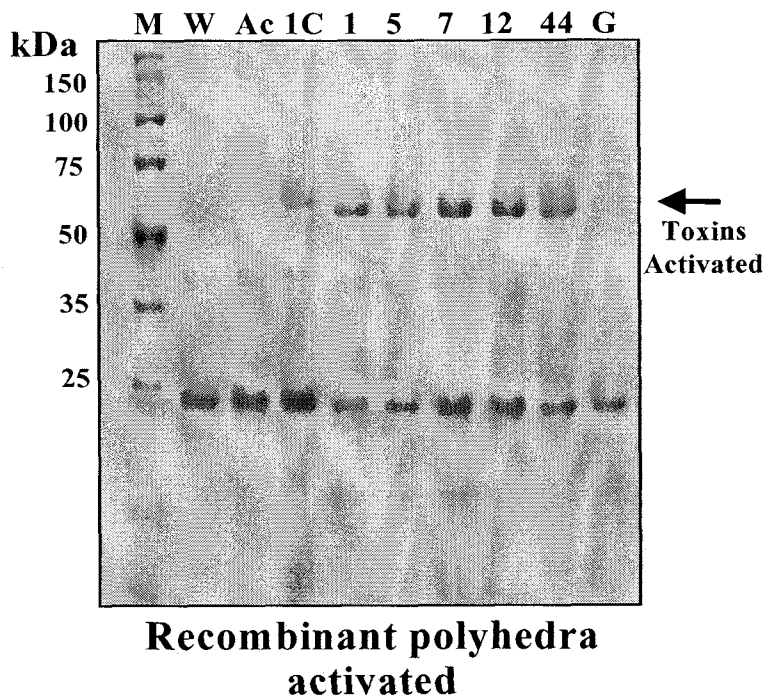


Fig. 37. Activation analysis of the recombinant viruses which containing the novel Cry1-type proteins from Bt K-1 and Bt 2385-1 strains.

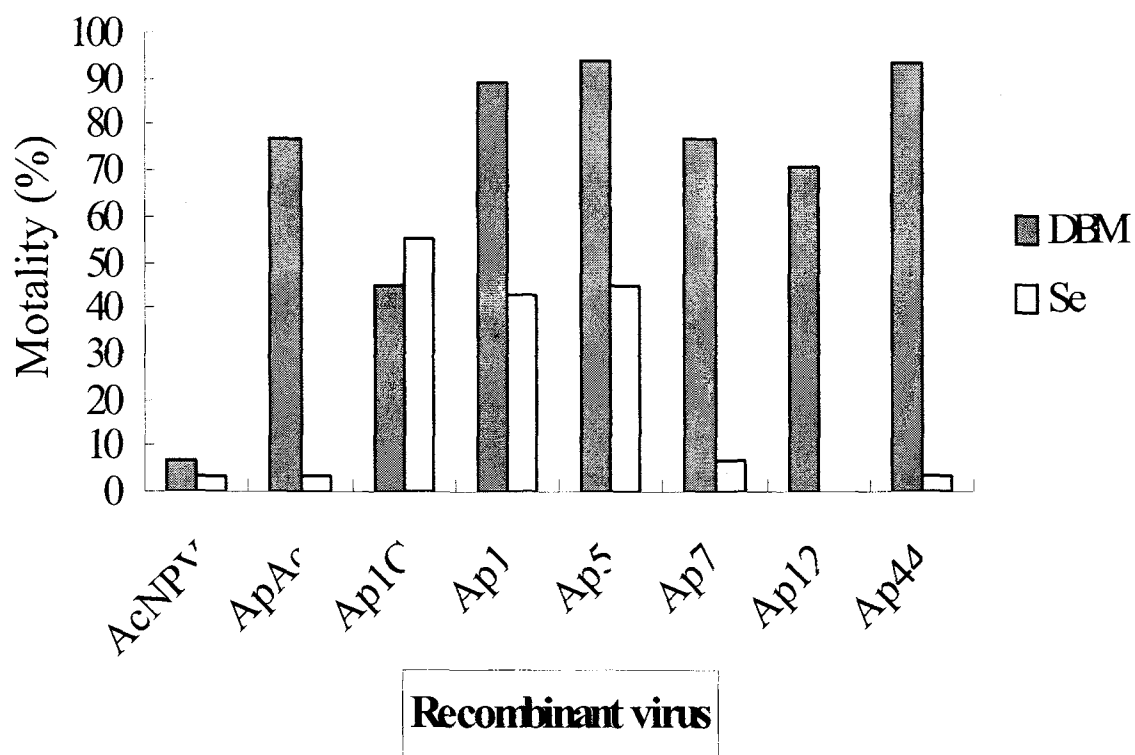


Fig. 38. Toxicity assay analysis of the recombinant viruses which containing the novel Cry1-type proteins from Bt K-1 and Bt 2385-1 strains.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구개발의 최종목표: 곤충병원 미생물로부터 신규 살충성 유전자들을 선발하고, 형질전환용 유전자로의 이용가능성을 확인한다.

### 1. 곤충병원성 미생물로부터 신규 살충성 유전자 탐색

가. 전국의 각 sample로부터 125종의 Bt 균주를 분리하여 Database를 제작하였고 이중에서 나비목에 독성을 보이는 56개의 Bt 균주를 분리하였다.

나. 56개의 Bt 균주로부터 PCR-RFLP를 통하여 7 종의 새로운 *cryI*-type 유전자를 탐색하였다.

### 2. Bt 살충성 유전자 클로닝과 구조분석

가. Bt K-1 균주와 Bt 2385-1 균주를 선발하고 이로부터 5종의 새로운 *cryI*-type 내독소 단백질 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였다.

### 3. 형질전환용 살충성 유전자로의 이용가능성 확인

가. 독성검정을 통하여 5종의 새로운 *cryI*-type 내독소 단백질은 모두 배추좀나방에 높은 살충력을 보였으며 그 중 2종은 과밤나방에 대하여서도 높은 살충력을 보였다.

4. 변형된 *cryI*Ac 유전자를 지닌 형질전환체 벼생산: Bt 본래의 내독소 단백질 유전자 *cryI*Ac (이하 “wt-*cryI*Ac” 로 약함)는 3,537 bp로 아미노산 1,178 개를 코드하고 있다. 이 wt-*cryI*Ac 유전자 중 앞부분 1,854 bp가 곤충 독성에 직접관련있다. 따라서 이 부분을 수정 합성함으로써 아미노산 배열은 변화시키지 않고 DNA 염기배열만 변형된 합성 곤충 독소 유전자를 만들었다. 분자생물학적인 방법으로 형질전환체(T1, T2)의 세대진전을 통한 안정적인 유전자 발현을 분석한후 생물검정을 실시하였다. 검정결과로는 먹노린재와 이화명나방에서 효과적이었고 특히 포장시험에서 흑명나방에 대하여 현저한 방제효과를 보였다.

5. 흡즙곤충에 대한 재조합 유전자작성 및 기작구명 : 흡즙곤충에 살충력이 있는 재조합 단백질을 만들기 위해 B.t.결정체 생산 유전자와 감자열편바이러스(PLRV)의 피복단백질을 결합한 융합단백질을 생산하였다.

6. 효과적인 유전자발현을위한 조직특이 프로모터개발 : 뿌리에서 선별적으로 발현하는 유전자들의 2kb upstream 부위를 binary vector에 클로닝하여 최종적으로 애기장대에서 프로모터의 활성여부에 따라 GFP나 GUS가 발현되도록 하였다.

## 제5장 결과의 활용계획

### 1) 활용 분야

- 해충 저항성 고부가가치성 벼, 감자 및 토마토 품종 개발
- 농약 사용 절감에 의한 환경 보호
- 유전자를 이용한 다른 새로운 농작물의 개발
- 개량 품종의 개별 농가 보급
- 국내 벼, 감자 및 토마토 재배 농가의 경쟁력 강화로, WTO개방에 의한 국내 시장 보호 및 고소득 가능

## 2) 활용 방안

- 환경 보호 인식 증진 홍보용으로 활용 가능
- 본 연구가 성공적으로 수행되면 추가 연구를 통해 형질전환 방법으로 개발 가능한 작물의 범위가 확대될 것임
- 기존 재래육종과 유전공학 기술에 의해서 얻어진 품종의 교배에 의한 새로운 신품종 창출에 대한 연구는 앞으로 계속적으로 공급될 유전자 전환체의 유전 분석이 가능할 뿐만 아니라 기존 품종의 우량형질이 더욱 강해지는 새로운 기술의 개발이라 할 수 있음
- 본 연구 결과 얻어지는 살충성벼는 안정성 등을 검토한 후 곧 바로 국가기관인 농촌진흥청 산하 작물시험장의 수도육종과의 중간 모본 자료로 제공하여 지역적응 시험을 걸쳐서 새로 제정된 종자 산업법 내용에 따라 등록되어 농가에 보급되어질 예정
- 본 연구가 성공적으로 수행되면 추가 연구를 통해 형질전환 방법으로 개발 가능한 새로운 품종의 벼는 내재해성에 관련된 품종 등이 있다.
- 새로운 흡습해충 방제법으로 원천기술 재산권 확보 : 특허획득
- 흡습해충 저항성 형질전환 작물 개발 : 종묘회사와 협력
- 다른 흡습해충에 원천기술 응용
- 선충류에 원천기술 응용
- 생명공학을 이용한 새롭고 다양한 신품종 농작물의 개발을 통해 고부가가치를 창출할 수 있는 고유기술을 육성하고 첨단농법을 개발하여 국제적 우위확보를 시도한다.
- 유용유전자의 확보로 미래에 분자생물학적 방법을 이용한 유용유전자 발현 작물을 손쉽게 확보할 수 있다.
- 낙후된 농업을 고부가가치 생산산업으로 전환할 수 있고 첨단과학농업을 실현한다.
- 기술자립 및 기술수출을 가능하게 한다.
- 현재 국내 여러 농약회사(한농, 경농, 미성, 동방, 전진, 동양 등)에서 이미 외국에서 상품화되어 있는 미생물 살충제를 수입하여 시판하고 있는 점을 고려할 때 해충에 대한 미생물 농약의 국내 개발이 시급하다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 특허와 기술을 민간 농약회사에 이전함으로써 국내 농약회사내에서의 미생물 살충제 연구를 활성화시키는 물론 농약산업체에 중요한 활용자료(know-how)로 제공하는 것이 가능하며 제품화와 실용화로 국내농약회사를 육성하고 나아가서 국가경쟁력 강화에도 크게 기여할 것으로 예상됨
- 현재 개발되어 있는 미생물 살충제보다 한단계 발전된 강한 살충력과 속효성을 가지는 미생물 살충제 개발에 이용할 수 있을 것이며, 유전공학기술을 통한 유전자조작등의 기술을 관련된 분야에 접목시킬 수 있음
- 서로 다른 미생물로부터 분리된 살충성 유전자는 작용메카니즘 및 활용범위에 따라 다른 미생물 균주와 유전자 등과 상호 조합 및 이용이 가능하게 되어 보다 유용하게 이용될 수 있음

- 미생물살충제로의 개발 및 산업적 활용  
현재 국내 여러 농약회사(한농, 경농, 미성, 동방, 전진, 동양 등)에서 이미 외국에서 상품화되어 있는 미생물 살충제를 수입하여 시판하고 있는 점을 고려할 때 해충에 대한 미생물 농약의 국내 개발이 시급하다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 특허와 기술을 민간 농약회사에 이전함으로써 국내 농약회사내에서의 미생물 살충제 연구를 활성화시키는 것은 물론 농약산업체에 중요한 활용자료(Know-How)로 제공하는 것이 가능하며 제품화와 실용화로 국내농약회사를 육성하고 나아가서 국가경쟁력 강화에도 크게 기여할 것으로 예상된다.
- 살충성 유전자의 미생물 균주간의 이용  
서로 다른 미생물로부터 분리된 살충성 유전자는 그 작용기작 및 활용범위에 따라 다른 미생물 균주 및 유전자 등과 상호 조합 및 이용이 가능하게 되어 보다 유용하게 이용될 수 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 7 장 참고문헌

An, G., P. R. Evert, A. Mitra, and S. B. Ha. 1988. Binary vectors. In Plant Molecular Biology Manual A3 (Glelvin, S. B. and Schilperoot, R. A., eds) Dordrecht: Kluwer Academic Press, PP. 1-19.

Bai, C., Degheele, D., Jansens, S. and Lambert, B. (1993) Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). *Journal of Invertebrate Pathology* 63, 211-215.

Baum, J. A. and M. P. Gilbert. (1991) Characterization and comparative sequence analysis of replication origins from three large *Bacillus thuringiensis* plasmids. *J. Bacteriol.* 173: 5280-5289

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Ecola, S. and Koziel, M. G.. (1991) Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3057-3061.

Ceron, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Linda, L. and

- Bravo, A. (1994) PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 353–356.
- Ceron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, L. and Bravo, A. (1995) Specific PCR primers detected to identify *cryI* and *cryIII* gene within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3826–3831.
- Chambers, A. J., Jelen, A., Gilbert, M. P., Jany, C. S., Johnson, T. B. and Gawron–Burke, C. (1991) Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Journal of Bacteriology* **173**, 3966–3976
- Chang, J. H., J. Y. Roh, Y. H. Je, H. W. Park, B. R. Jin, S. D. Woo, and S. K. Kang. (1998) Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD–1 encoding  $\delta$ –endotoxin CryIE. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 387–390.
- Dubnau, D. and R. D. Abenson. 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **56**: 209–221.
- Gleave, A. P., Williams, R. and Hedges, R. J. (1993) Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV*–like insecticidal protein genes and characterization of *cryV* gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1683–1687.
- Hofte, H. and Whiteley, H. R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Review* **53**, 242–255.
- Kalman, S., Kiehne, K. L., Libs, J. L. and Yamamoto, T. (1993) Cloning of a novel *cryIC*–type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1131–1137.
- Kronstad, J. W., Schnepf, H. E. and Whiteley, H. R. (1983) Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Journal of Bacteriology* **154**, 419–428.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Laurent, P., Ripouteau, H., Dumanoir, V. C., Frachon, E. and Lecadet, M. M. (1996)

A micromethod for serotyping *Bacillus thuringiensis*. *Letters in Applied Microbiology* 22, 259–261.

Moar, W., Pusztai–Carey, M., Faassen, H. V., Bosch, D., Frutos, R., Rang, C., Luo, K. and Adang, M. J. (1995) Development of *Bacillus thuringiensis cryIC* resistance by *Spodoptera exigua* (H?ner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2086–2092.

Nickerson, K. W., St Julian, G. and Bulla Jr, L. A. (1974) Physiology of spore forming bacteria associated with insects : Radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology* 28, 129–132.

Ohba, M. and Aizawa, K. (1978) Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 32, 303–309.

Rhim, S. L., H. W. Cho, B. D. Kim, W. Schnetter, and K. Geider. 1995. Development of insect resistance in tomato plants expressing the  $\delta$  –endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Molecular Breeding* 1: 229–236.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775–806.

Splittstoesser, C. M., and H. Tashiro. 1981. Insect disease caused by bacilli without toxic mediated pathologies. p. 189–208. In E. W. Davidso (ed.), Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Allanheld, Osmum Publications, Totowa, N.J.

Splittstoesser, C. M., H. Tashiro. and S. L. Lin. 1978. Infection of European chafer, *Amphimallon majalis*, by *Bacillus popilliae*: light and electron microscope observations. *J. Invertebr. Pathol.* 31: 84–69

Steinhous, E. A. 1949. "Principles of insect pathology" McGraw–Hill, New York



Tabashnik, B., Liu, Y., Finson, N., Masson, L. and Heckel, D. G. (1997) One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1640–1644.

Thomas, W. E. and Ellar, D. J. (1983) *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal  $\delta$ -endotoxin: Effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cell Science* 60, 181–197.

Visser, B., Munsterman, E., Stocker, A. and Dirkse, W. G. (1990) A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *Journal of Bacteriology* 172, 6781–6788.

Visser, B., T. van der Salm, W. van den Brink and G. Folkers. (1988) Genes from *Bacillus thuringiensis entomocidus* 60.5 coding for insect-specific toxins. *Mol. Gen. Genet.* 212: 219–224.

Whiteley, H. R. and H. E. Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 549–576.

Whitlock, H. V., Lo, M. C., Kuo, M. H. and Soong, T. S. (1991) Two new isolates of *Bacillus thuringiensis* pathogenic to *Spodoptera litura*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58, 33–39.

Wilcks, A., L. Smidt, O. A. Økstad, A. KolstØ, J. Mahillon and L. Andrup. (1999) Replication Mechanism and Sequence Analysis of the Replicon of pAW63, a Conjugative Plasmid from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 181: 3193–3200. Herman, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242–255.

Whiteley, H. R. and H. Ernest Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 549–576.

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.