

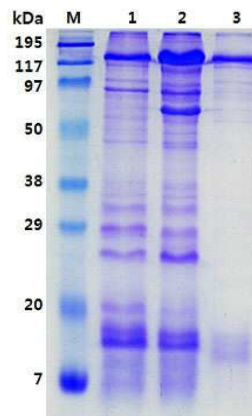
	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0103190 (43) 공개일자 2010년09월27일
<hr/>		
(51) Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01) C12R 1/07 (2006.01)	(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교	
(21) 출원번호 10-2009-0021671	(72) 발명자 유용만 대전광역시 서구 월평2동 무지개아파트 103동 604호	
(22) 출원일자 2009년03월13일 심사청구일자 2009년03월13일	최수연 대전광역시 서구 도마동 37-17 (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 최규환	
전체 청구항 수 : 총 12 항		

(54) 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 주로 충청남북도의 논, 밭, 과수원을 중심으로 채집한 토양 시료에서 분리한 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주, 상기 균주가 가지고 있는 나비목뿐만 아니라 파리목에 대한 우수한 살충 효과 및 대상 해충의 성장저해 효과를 나타내는 균주를 이용한 해충 살충제로의 이용 가능성에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 살충용 조성물, 상기 균주 배양액을 포함하는 살충용 조성물의 제조 방법, 상기 살충제를 식물 또는 토양에 처리하여 해충을 방제하는 방법 및 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주의 배양에 의해 얻어진 전독소(protoxin) 단백질 및 독소(toxin) 단백질에 관한 것이다. 상기 살충제는 화학 살충제에 저항성이 강한 해충 방제에 탁월한 효과를 나타냄으로써 친환경 농업의 육성에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

조민수

대전광역시 중구 석교동 금실빌라 301호

김태환

충청남도 천안시 동남구 용곡동 583번지 세광2차아파트 213동 1402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009010FT113273333

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 공동연구사업

연구과제명 자원순환형 친환경 유기농업기술개발 , 유통미생물 살충제 농약절감 모델 개발 및 신규 세균 살충제의 제작기술 개발

기여율

주관기관 서울대학교

연구기간 2009년 01월 01일 ~ 2011년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주 (IMER00511).

청구항 2

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 해충의 살충용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 해충은 나비목 또는 파리목인 것을 특징으로 하는 해충의 살충용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 해충은 담배거세미나방, 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 지하집 모기인 것을 특징으로 하는 해충의 살충용 조성물.

청구항 5

제1항의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주의 유효량을 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 해충은 나비목 또는 파리목인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 해충은 담배거세미나방, 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 지하집 모기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주를 배양하는 단계를 포함하는 해충의 살충용 조성물의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 해충은 나비목 또는 파리목인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 해충은 담배거세미나방, 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 지하집 모기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 전독소 (prototoxin) 단백질.

청구항 12

해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 70kDa 및 61kDa으로 이루어진 독소(toxin) 단백질.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 토양에서 분리한 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 균주 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주, 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 해충 살충용 조성물, 상기 균주 배양액을 포함하는 살충용 조성물의 제조 방법, 상기 살충제를 식물 또는 토양에 처리하여 해충을 방제하는 방법 및 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주의 배양에 의해 얻어진 전독소(prototoxin) 단백질 및 독소(toxin) 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 담배거세미나방은 가해하는 기주의 종류가 100 여종 이상인 광식성 및 잡식성 해충으로 이 유충은 선천적으로 약제에 대한 높은 내성과 낮은 감수성으로 어린 유충기를 제외한 중령 이상의 유충은 약제방제가 매우 어려운 대표적인 난방제 해충으로 알려져 있다 (Choi *et al.*, Kor. J. Appl. Entomol., 1996, 35: 249-253; Bae *et al.*, Kor. J. Appl. Entomol., 2003, 42: 225-231).
- [0003] 상기 해충의 방제는 주로 살충제에 의존하고 있었으나 약제 저항성이 나타나면서 (Kim and Shin, F. Inst. Agr. Res. Util. Gyeongsan National. Univ., 1987, 21: 105-122) 방제가 어려워지고 있는 실정이다. 또한, 살충제 사용으로 인한 환경오염과 이에 따른 생태계 파괴 등의 문제가 잇따른다. 생태계 보호 및 농작물 생산 증대를 위한 종합적 해충방제 방법이 도입되고 살충제의 사용이 억제됨에 따라 생물학적인 방법에 의한 해충방제에 대한 관심이 매우 높아지고 있다. 이에 대표적인 것이 곤충병원성 세균인 비티 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 균주를 이용한 미생물 농약이다.
- [0004] 비티 균주를 이용한 미생물 농약은 비티 균주 및 이들이 생산하는 내독소 단백질로 유용한 해충 살충제로 사용될 수 있으며 특히, 친환경 농업을 선호하는 선진국에서는 나비목 해충을 방제하기 위해 개발된 생물농약 균주로는 아종 아이자와이(*aizawai*), 엔토모시더스(*entomocidus*), 쿠르스타키(*kurstaki*), 튜린지엔시스(*thuringiensis*), 갤러리아(*galleriae*) 등으로 다양하게 사용되고 있다. 그러나 현재 우리나라에서는 아종 아이자와이 및 쿠르스타키 균주만이 생물농약으로 사용되고 있으며, 담배거세미나방 유충에 대한 방제용으로는 아이자와이(*aizawai*)만이 등록되어 있다.
- [0005] 현재까지, 380 가지 이상의 살충성 단백질 유전자의 복제와 분석이 이루어졌으며, 아미노산 유사성을 토대로 Cry 유전자는 32 개의 그룹, cyt 유전자는 2 개의 그룹으로 분류되고 있다 (Crickmore *et al.*, Microbiol. Mol. Bio. Rev., 1998, 62:807-813). 이러한 비티 중에서 스포돔테라(*Spodoptera*) 속에 대한 생물활성을 나타내는 균주는 아주 적은 수로 보고되고 있다. Cry 유전자 중에서 Cry1Ad, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, Cry1I, Cry1J, Cry2Aa4 및 Cry9C가 스포돔테라(*Spodoptera*) 속에 대하여 독성이 있다고 밝혀졌다. 그러나, 담배거세미나방에 대한 비티 균주의 생물검정에 대한 실험은 활발히 이루어지지 않았으며, 활성이 있다고 밝혀진 Cry 유전자는 Cry2Aa4만이 보고되었다 (toxicity data at: www.glfrc.forestry.ca/Bacillus/Database).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0006] 본 발명자들은 대표적인 난방제 해충으로 알려진 담배거세미나방 유충 방제를 목적으로 종래에 보고된 비티 균주와는 다른 특성을 가지는 비티 균주를 분리하여 다양한 종류의 나비목 및 파리목 해충의 유충에 대한 생물검정을 통하여 고도의 활성을 나타내는 균주를 선별하여 살충성 단백질의 특성 조사에 대한 연구를 수행하여 해충 살충제로서 사용될 수 있는지 알아보고자 한다.
- [0007] 본 발명은 나비목 해충인 담배거세미나방 유충에 고도로 활성을 보이는 새로운 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주 및 내독소 단백질을 유효성분으로 함유하는, 배추좀나방, 과밤나방, 지하집모기 등의 나비목 및 파리목 해충방제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키

(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 살충용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 균주의 유효량을 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 균주의 유효성분을 함유하는 살충용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 균주의 배양에 의해 얻어진 전독소(protoxin) 단백질 및 독소(toxin) 단백질을 제공한다.

효 과

[0013] 본 발명의 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주에 의하여 생산되는 내독소 단백질은 담배거세미나방 뿐만 아니라 다양한 나비목 및 파리목 곤충에도 고도의 활성을 보이는 것으로 나타났다. 따라서 상기 내독소 단백질을 함유하는 본 균주는 환경친화적인 조성물로서 섭식 저해 및 살충 효과를 보이므로, 무공해성 해충 방제용 제제의 개발 등에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 토양으로부터 분리된, 해충에 대해 살충효과를 가지는 신규한 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주를 제공한다.

[0015] 더욱 상세하게는 나비목 및 파리목 해충에 살충 효과가 높은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주 KB099 (IMER00511)를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명에서는 또한, 신규한 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주 KB099 (IMER00511)의 순수배양물을 유효성분으로 함유하는 해충의 살충용 조성물을 제공한다. 상기 조성물에서, 상기 해충은 나비목 또는 파리목일 수 있으며, 상기 해충은 담배거세미나방, 파밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 지하집모기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에서는 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주 (IMER00511) 또는 이의 순수배양물을 함유하는 조성물의 유효량을 해충의 방제를 위하여 식물 또는 토양에 살포하는 것을 특징으로 하는 해충의 방제 방법을 제공한다. 상기 방제 방법에서, 상기 해충은 나비목 또는 파리목일 수 있으며, 상기 해충은 담배거세미나방, 파밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 지하집모기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명에서는 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주 (IMER00511)의 순수배양물을 유효성분으로 함유하는 해충의 살충용 조성물의 제조 방법을 제공한다. 상기 제조 방법에서, 상기 해충은 나비목 또는 파리목일 수 있으며, 상기 해충은 담배거세미나방, 파밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 지하집모기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명에서는 또한, 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 전독소(protoxin) 단백질을 제공한다.

[0020] 본 발명에서는 또한, 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 70kDa 및 61kDa으로 이루어진 독소(toxin) 단백질을 제공한다. 130kDa인 전독소(protoxin) 단백질은 곤충의 중장 내 소화효소에 의해 70kDa 및 61kDa으로 이루어진 독소(toxin) 단백질로 분해될 수 있다.

[0021] 이하, 본 발명의 설명에 사용되어지는 용어의 정의는 다음과 같다.

[0022] “살충성”은 식물해충의 사망률을 증가시키거나 성장물을 저해하는 물질의 능력을 의미한다.

[0023] “유효량”은 유익한 또는 원하는 결과를 일으키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상으로 투여될 수 있다.

[0024] “조성물”은 비활성(예를 들어, 검출가능 약품 또는 표지 또는 액체 담체) 또는 활성(예를 들어, 보조제)인, 담체 또는 조성물과 같이 활성제 및 또 다른 화합물의 조합을 의미하도록 의도된다.

- [0025] 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB099 균주는 주로 충청도, 전라도, 경기도 일대의 논, 밭, 과수원을 중심으로 한 총 115 개의 토양샘플에서 분리된 비티 균주들 중에서 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주가 담배거세미나방 유충에 대하여 고도의 살충 활성을 보였으며, 특히 배추좀나방, 작은각시들명나방, 벼애나방, 지하집모기 유충에 뛰어난 살충 효과를 가진다. 또한 담배거세미나방 유충을 대상으로 방제용으로 등록되어 있는 비티 제품인 T사 및 S사의 비티 아종 아이자와이 균주, 및 본 발명의 균주인 KB099 간의 독성 비교 실험에서 KB099 균주가 상기 두 등록 제품보다 높은 활성을 보이는 것을 확인하였다. 또한 KB099 균주의 결정체-포자 균액 및 인공먹이를 먹인 담배거세미나방 유충은 섭식 저해 현상을 보였다. KB099 균주를 적절한 배지, 예를 들어 GYS 배지 (0.1% 글루코스, 0.2% 효모추출물, 0.05% 인산제일칼륨, 0.2% 황산암모늄, 0.002% 황산마그네슘, 0.005% 황산망간, 0.008% 염화칼슘)에서 28 내지 30℃, 바람직하게는 30℃에서 산소분압 30 내지 70%, 바람직하게는 60%하에 160 내지 200 rpm으로 3 내지 5일 동안 배양한 후, 이 배양액을 원심분리하여 균체를 수확하고, 이 균체 10 내지 40 중량 %, 바람직하게는 20 중량 %를 해충 살충제에 통상적으로 사용되는 첨가제 60 내지 90 중량 %, 바람직하게는 80 중량 %와 혼합하여 해충 살충제를 제조할 수 있으며, 이때 첨가제로는 NT-NX250L, NK-EPB100 등의 계면활성제, 화이트카본, 텍소렉스-25 등의 보조제, 카울린 등의 증량제 등을 사용할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 살충용 조성물을 적용할 수 있는 식물은 특별히 제한되지는 않으며, 배추, 양배추, 오이, 무, 들깨, 고추, 결구상추(양상추), 딸기, 토마토, 파, 담배, 등의 경제작물 이외에도 화훼 또는 특용작물 등의 식물 표면이나 이들 식물이 성장하고 있는 토양에 처리될 수 있으며 또는 재배하여 수송 또는 저장 중인 채소 표면에도 처리될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 Bt 아종 쿠르스타키 KB099 균주를 함유하는 해충 방제용 조성물, 더욱 바람직하게는 나비목 및 파리목 해충 방제에 유용한 조성물은 Bt 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 배양액 또는 건조분말 5 내지 90 중량%에 계면활성제, 무기염류, 보조제, 결합제 및 증량제 등을 혼합하여 해충 살충용 조성물로 제조할 수 있다.
- [0028] 상기 무기염류는 Bt 아종 쿠르스타키 KB099 내독소 단백질과 함께 해충의 중장에 들어가서 독소 단백질이 빠르게 활성독소의 형태로 전환되는 것을 도와주거나 중장벽에 물리적인 상처를 주어 독소의 활성을 증진시킬 뿐만 아니라, 해충의 체내에서 생리적인 변화를 유도하여 독소의 작용효과를 높일 수 있도록 작용하는 물질로서 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 구입하여 사용할 수 있는 것이다.
- [0029] 상기 계면활성제는 분자 중에 친수성 분자단 및 친유성 분자단을 동시에 갖는 양친매성 물질로서, 세정력, 분산력, 유화력, 가용화력, 습윤력, 살균력, 기포력 및 침투력이 우수하다는 특징을 갖는 것으로 이해되는 물질로서, 본 발명에 따른 해충 살충용 조성물 중의 비티가 효과적으로 약효를 발현하도록 수화, 현탁, 분산시키는 작용을 하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0030] 상기 계면활성제로는 알킬벤젠설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트, 디알킬설포석시네이트, 리그닌설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트포르마린축합물, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설포네이트와 같은 설포네이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설페이트와 같은 설페이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 나프탈렌설포석시네이트, 폴리옥시알킬렌석시네이트와 같은 석시네이트의 나트륨염 또는 칼슘염 등의 음이온성 계면활성제, 에톡실화 알킬에테르, 폴리옥시알킬렌알킬페닐폴리머, 다중 알코올과 같은 비이온성 계면활성제가 단독으로 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있으며, 이들은 모두 예시적으로 열거한 것들로서 이들 이외의 계면활성제가 사용될 수 있음은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 용이하게 이해될 수 있을 것이다.
- [0031] 상기 증량제는 상기 계면활성제와 함께 사용되어 상기 계면활성제를 흡착, 분산화하고, 이 계면활성제, 약효 증진제, Bt 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 배양액 또는 건조분말과 함께 비티제 조성물의 미립자 표면을 이루는 물질로 작용하며, 진분, 대두박, 밀기울, 입상 섬유질, 유안, 규조토, 제올라이트, 벤토나이트, 탈크, 카울린, 파이로필라이트, 화이트카본 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0032] 상기 결합제는 상기 활성성분인 비티 균주의 건조분말을 포함하여 약효 증진제, 증량제 등을 서로 결합시키는 역할을 하는 것으로서, 수용성 진분, 텍스트린, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴산나트륨, 폴리비닐알코올, 아라비아검 또는 잔탄검 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0033] 방제 대상인 해충은 디프테라(Diptera) 또는 레피도프테라(Lepidoptera)이다. 특히 바람직한 양태에서, 해충은 양배추거세미나방[cabbage looper, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)], 벨벳빈 카테르필라[velvetbean caterpillar, 안티카르시아 겐마탈리스(*Anticarsia gemmatalis*)], 배추좀나방[diamondback moth, 플루텔라 크

실로스텔라(*Plutella xylostella*)], 담배나방[tobacco budworm, 헬리오티스 비레센스(*Heliothis virescens*)], 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 흰불나방(*Hyphantria cunea*), 누에(*Bombyx mori*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 작은각시들명나방(*Palpita indica*), 벼애나방(*Naranga aenescens*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*), 지하집모기, 이집트숲모기 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 상기 해충 살충제는 입제, 분제, 액상수화제, 수화제 등의 형태로 제형화 될 수 있는데 이에 한정되지는 않으며, 수화제가 바람직하다.

[0035] 제형화된 살충제는 사용전에 물에 500 내지 2,000 배, 바람직하게는 약 1,000 배로 희석하여 사용할 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 상기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0037] <실시예 1> 토양 시료의 채집과 비티 균주의 분리 및 동정

[0038] 토양 시료는 주로 충청도, 전라도, 경기도 일대의 논, 밭, 과수원을 중심으로 이전에 생물농약을 처리하지 않은 토양에서 총 115 개의 시료를 채취하였다. 비티 균주의 분리는 Ohba 및 Aizawa (1978, Appl. Environ. Microbiol. 28: 124-128) 방법에 따라 하기와 같이 실시하였다. 채취된 토양 시료 1 g을 시험관에 넣고, 멸균 증류수 9 ml를 첨가하여 3~4 회 정도 강하게 교반하여 65℃에서 30 분간 열처리하였다. 열처리 후 5 분간 정치하여 흙을 가라앉히고 상청액을 10^{-3} 까지 희석하여 영양평판배지(Nutrient agar)에 고르게 도말하였다. 상기 평판배지를 27℃에서 3~4일간 배양 후 위상차현미경 1,000배로 내독소 단백질 및 포자를 형성하는 균주를 선별하였다 (표 1). 분리된 총 46 개의 비티 균주 중 담배거세미나방에 고활성을 보이는 비티 KB099 균주는 보은군 무밭에서 채집한 토양에서 분리되었다. 비티 KB099 균주의 편모항원을 기존의 항혈청과 응집반응(agglutination)에 의한 방법으로 동정한 결과 상기 항원 및 기존의 바실러스 투린지엔시스 쿠르스타키의 항혈청간에 응집반응이 일어났다 (표 2).

[0039] 상기 *Bt* 아종 쿠르스타키 KB099 균주를 농촌진흥청지정 농업유전자원관리기관인 목원대학교 미생물생태자원연구소(IMER)에 2009년 1월 14일자로 기탁하였다 (기탁번호: IMER00511).

[0040] 표 1. 작물 토양 샘플로부터 채집된 바실러스 투린지엔시스의 분리

[0041]

작물토양 종류		토양 시료수	분리된 비티 균주의 수	비티 분리율(%)
식용작물		29	17	58.6
공예작물		20	4	20.0
과채류	채소류	54	25	46.2
	과수류	8	0	0.0
기타		4	0	0.0
총계		115	46	40.0

[0042] 표 2. 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 혈청형 분류

[0043]

분리균주	편모항원 분류	아종	응집반응
비티 KB099	3abc	쿠르스타키(kurstaki)	+

[0044] <실시예 2> 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주가 생산하는 내독소 단백질의 형태 분석

[0045] 영양평판배지(Nutrient agar) 상에서 27℃, 3일 이상 자가분해(autolysis)를 일으킨 콜로니(colony)를 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후, 위상차현미경 하에서 1,000 배로 내독소 결정 단백질의 형태를 관찰하였다 (Kim *et al.*, Korean J. Seric. Sci., 1995, 37, 57-61).

[0046] 주사전자현미경으로 관찰할 시료는 2.5% 글루타르알데히드(Glutaraldehyde) 용액에 넣고 4℃에서 2 시간 동안 전고정을 하고, 전고정한 시료를 증류수로 3 회 세척하고 탈수 후, 4℃에서 12 시간 방치하였다. 50% 초산이소아밀(Isoamyl acetate)로 10 분간 치환하고, 100% 초산이소아밀(Isoamyl acetate)에 5 분간 침지하여 임계점

건조를 하였다. 건조된 시료를 금으로 피막을 입혀 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였다.

[0047] KB099 균주의 내독소 단백질은 윤곽이 뚜렷한 이중 피라미드형의 결정체 구조임을 확인하였다 (도 2a 및 도 2b). 내독소 단백질의 형태는 살충성을 나타내는 대상 곤충의 숙주범위와 밀접한 관계를 나타내는 정보를 주는데 (Maeda *et al.*, Current Microbiol., 2000, 40, 413-422), 상기 구조는 나비목에 독성을 갖는 내독소 단백질의 전형적인 형태로써 이전의 보고와 일치한다 (Whiteley and Schnepf, Ann. Rev. Microbiol., 1986, 40, 549-576).

[0048] <실시예 3> 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 내독소 단백질의 전기영동 분석

[0049] 선발된 비티 균주를 영양평판배지(Nutrient agar)에 접종하고 27℃에서 4~6일간 배양 후 위상차현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하면서 내독소 단백질이 형성되었을 때, 배지 위의 균을 모아 원심분리하여 균주만을 수확한 균액을 PBS 버퍼를 사용하여 원심분리 튜브에 집균하여 15,000 rpm으로 4℃에서 10 분간 원심분리한다. 원심분리 후, 상층액은 버리고 세척 버퍼 I (500 mM 염화나트륨, 2% 트리톤 X-100)로 3 회, 세척 버퍼 II (500mM 염화나트륨)로 2 회 세척하였다. 세척된 내독소 단백질은 멸균수를 첨가하여 -20℃에서 실험에 사용할 때까지 저장하였다. 상기 방법으로 얻은 내독소 단백질 결정체를 Laemli의 방법(Laemli, 1970, Nature, 227, 680-685)에 따라 하기와 같이 전기영동(SDS-PAGE)하였다. 즉, 내독소 단백질 결정체 일정량에 10 배 부피의 시료 완충액(1M Tris-HCl(pH 6.8) 0.6 ml, 50% 글리세롤 5 ml, 10% SDS 2 ml, 2-머캅토에탄올 0.5 ml, 1% 브로모페놀블루 1 ml, 증류수 0.9 ml)을 첨가하고 95℃에서 약 10분간 가열 후 상온에서 잠시 정치시키고, 원심분리하여 상층액을 회수한 다음, 10% SDS-전기영동을 실시하였다. 대조구로서 아이자와이와 쿠르스타키 HD-1 균주의 내독소 단백질 시료를 사용하였다.

[0050] 도 3의 내독소 단백질의 SDS-PAGE 결과에서 보면, 같은 아종인 쿠르스타키에 속하는 HD-1 균주는 각각 Cry1 형과 Cry2 형의 내독소 단백질 (Jaoua S. *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 1996, 145: 349-354)에 해당하는 약 130 kDa와 65 kDa의 밴드를 나타냈으나, KB099 균주는 같은 아종임에도 불구하고 아이자와이와 같이 130 kDa만의 내독소 결정체 단백질 밴드를 보였다.

[0051] <실시예 4> 다양한 단백질 분해효소의 처리에 따른 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 내독소 단백질의 전기영동 분석

[0052] 담배거세미나방 유충의 중장 내 소화효소의 준비를 위해, 담배거세미나방 100 마리의 5령 유충을 -4℃에 10 초간 둔 후, 멸균된 해부용 칼을 이용하여 해부하여 중장만을 냉각한 원심분리 튜브에 넣고 13000xg, 4℃에서 15분간 원심분리하였다. 연한 갈색을 띄는 상층액만을 에펜돌프 튜브에 넣어 -20℃에 보관하였다. 내독소 단백질 결정체 1 μl를 50 mM NaOH 수용액에 5분 처리한 후 원심분리하여 상층액을 버리고 담배거세미나방 중장액 1 μl (0.04 μg/ml)와 혼합하여 교반한 후, 37℃에서 15 분간 반응시켜 Laemli의 방법에 따라 수행하였다 (Zhong *et al.*, J. Invertebr. Pathol., 2000, 76, 131-139). KB099 균주의 내독소 단백질에 소화효소를 처리한 독소 단백질로 살충 효과가 나타나는 단백질은 70, 61 kDa이다 (도 4).

[0053] <실시예 5> 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 살충 효과

[0054] 총 115개의 토양 시료 중에서 담배거세미나방에 높은 활성을 보이는 균주를 선발하기 위해서 같은 농도의 포자-결정체 균액을 만들어 활성실험을 하고, 선발된 균주가 다른 해충에도 활성이 있는지 알아보기 위해 다양한 해충을 대상으로 활성실험을 하였다.

[0055] 분리된 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주, 비교 균주 (비티 아종 쿠르스타키 HD-1) 및 상품화된 생물농약의 비티 균주를 영양평판배지(Nutrient agar)에 접종하고 27℃에서 4~6일간 배양 후 위상차현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하면서 내독소 단백질이 형성되었을 때, 배지 위의 균을 모아 원심분리하여 균주만을 수확한 후, 멸균수 2 ml를 첨가하여 약 1.5×10^7 cfu/ml에 해당하는 균액을 정성적 생물검정에 사용하였다.

[0056] 담배거세미나방 및 과밤나방에 대한 생물검정은 균주 농도 약 1.5×10^6 cfu/ml에 해당하는 희석액 100 μl를 0.5 g의 인공사료에 첨가하여 2령 말기 유충을 5 마리씩 넣고 4 회 반복 실시하여 24 시간 단위로 120 시간 동안

치사율을 조사하였다.

[0057] 배추좀나방 및 작은각시들명나방에 대한 생물검정은 Tabashnik *et al* (1990, J. Econ. Entomol. 84: 49-55)의 방법에 따른 잎 디스크 침지법을 수정하여 실시하였다. 3×3 cm의 배춧잎을 균주 농도 약 1.5×10^5 cfu/ml에 해당하는 희석액 20 ml에 침지하여 건조 후, 2령 유충 10 마리씩을 3회 반복 실시하여 24시간 단위로 72시간 동안 치사율을 조사하였다.

[0058] 벼애나방 및 흑명나방에 대한 생물검정은 약 15cm의 옥수수 유묘 35주에 각각의 *B. thuringiensis* 균주의 1.5×10^5 cfu/ml 희석액 10 ml를 분무하고 음건한 뒤 3령된 벼애나방 및 흑명나방 유충 20 마리씩을 접종하여 72시간까지 검정하였다.

[0059] 지하집모기에 대한 생물검정은 누대 사육하면서 2~3일 된 모기유충 10마리를 30 ml의 물에 넣고, 1.5×10^5 cfu/ml의 균액 300 μ l를 접종하였다. 사망률은 24시간 및 48시간 후에 사충수를 조사하였고, 3회 반복 실험하였다.

[0060] 반수치사 농도 실험은 5마리씩 4회 반복 실시하였으며, 희석농도는 유충이 모두 사망하는 농도에서 약 3배씩 희석하여 모두 생존하는 농도까지 총 7희석농도의 조사한 사충율로 Finney (1971, Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Co.)의 probit 계산법에 기초한 PC 프로그램 (Raymond, Cah. ORSTOM, Ser. Ent. Med. et Parasitol., 1985, 22, 117-121)을 이용하여 반수치사 농도(LD₅₀)를 산출하였다.

[0061] 표 3은 총 115개의 토양샘플에서 분리된 46개의 비티 균주들을 담배거세미나방에 대하여 1.5×10^6 cfu/ml 농도의 균액을 처리했을 때, 사충율 90%를 초과하는 균주는 KB099, CAB159 및 CAB162로 이중 100%의 높은 사충율을 보인 균주는 CAB162 및 KB099 균주이지만, KB099 균주가 CAB162 균주에 비해 하루 빠른 100%의 사충율을 보였고, 반수치사 농도값을 조사한 결과 KB099 균주가 CAB162 균주에 비해 활성이 높은 균주인 것으로 나타났다 (도 2, 표 4)

[0062] 표 3. 담배거세미나방 유충에 대해 높은 활성을 보이는 Bt 분리균

시험 해충	비티 분리균 (>90% 사충율)
담배거세미나방	KB099, CAB159, CAB162 (3)

[0064] 표 4. 담배거세미나방 유충에 대해 활성이 있는 비티 아종 쿠르스타키 KB099 및 CAB162 분리균의 반수치사농도 값

비티 균주	시험 해충 수	치사 농도 LD ₅₀ (μ g/ml)
비티 쿠르스타키 KB099	120	0.089 (0.071-0.115)
비티 쿠르스타키 CAB162	120	3.144 (2.678-3.771)

[0066] 담배거세미나방에 대하여 고효성을 가진 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주 및 나비목해충 방제를 위한 생물농약으로 가장 많이 사용된 비티 아종 쿠르스타키 HD-1 균주간에 담배거세미나방에 대한 활성검정을 비교한 결과, 비티 아종 쿠르스타키 KB099 및 HD-1균주의 반수치사 농도값(LD₅₀)이 각각 0.513 μ g/ml 및 0.089 μ g/ml로 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주가 비교 균주인 비티 아종 쿠르스타키 HD-1균주에 비해서 상당히 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다 (표 5).

[0067] 표 5. 담배거세미나방 유충에 대해 활성이 있는 비티 아종 쿠르스타키 KB099 및 비교균주인 비티 아종 쿠르스타키 HD-1의 독성비교

비티 균주	시험 해충 수	치사 농도 LD ₅₀ (μ g/ml)
비티 쿠르스타키 HD-1	120	0.513 (0.418-0.626)
비티 쿠르스타키 KB099	120	0.089 (0.071-0.115)

[0069] 담배거세미나방에 대하여 높은 활성을 보이는 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 령기별 독성 정도를 자세하게 알아보기 위하여 담배거세미나방 1령부터 6령까지 유충의 살충 활성을 보면, 1 및 2령 유충은 5일 만에 100%의 높은 사충율을 보였고, 3령은 약 50%, 반면에 노령 유충기인 4, 5, 6령 유충은 40% 이하의 낮은 사충율을

보였다 (도 5). 상기 결과는 화학약제를 처리했을 때와 달리 1 및 2 령 유충만이 감수성이 높았고 3 령부터 6 령까지 유충의 감수성이 현저히 낮아져 방제가 매우 어려운 것으로 확인되었다. 령기별 활성시험에서 2, 3 및 4 령기의 반수치사 농도값 (LD₅₀)은 0.089 µg/ml, 0.271 µg/ml, 0.389 µg/ml로 2 령이 가장 감수성이 높았고, 3 및 4 령은 2 령에 비하여 약 3 및 4 배의 높은 농도 값을 보였다. 3 및 4 령의 반수치사 농도값(LD₅₀)은 크게 차이가 나타나지 않았다 (표 6).

표 6. 다양한 령기의 담배거세미나방 유충에 대한 비티 아종 쿠르스타키 KB099의 독성비교

비티 균주	유충 세대	시험 해충 수	치사 농도 LD ₅₀ (µg/ml)
비티 쿠르스타키 KB099	2 령	120	0.089
	3 령	120	0.271
	4 령	120	0.389

<실시예 6> 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 생물농약으로의 상품화 가능성

본 발명의 균주의 생물농약으로서의 이용 가능성을 검토하기 위해서 기존에 담배거세미나방의 방제를 위해 등록된 2 가지 생물농약 및 선발된 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주간에 생물활성을 비교하였다. 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주, 상품화된 T 제품 및 S 제품의 반수치사 농도 (LD₅₀) 값은 각각 0.15 µg/ml, 0.67 µg/ml, 0.34 µg/ml로 KB099 균주가 상품화된 두 균주에 비해서 T 제품과는 약 4 배, S 제품과는 3 배의 낮은 농도 값으로 가장 높은 활성을 나타냈다 (표 7). 뿐만 아니라, 담배거세미나방 유충을 방제하기 위해 등록된 균주의 아종은 스포돗테라(Spodoptera) 종에 활성이 있다고 알려진 아이자와이(aizawai)이나 상기의 균주는 쿠르스타키로 기존의 기주 범위와는 다른 특성을 가지고 있음을 알 수 있다.

표 7. 생물농약으로 등록된 두 균주와 비티 아종 쿠르스타키 KB099 분리균의 반수치사농도 값

비티 균주	시험 해충 수	치사 농도 LD ₅₀ (µg/ml)
비티 쿠르스타키 KB099	120	0.15
비티 아이자와이 (T사 생물농약 균주)	120	0.67
비티 아이자와이 (S사 생물농약 균주)	120	0.34

생물농약으로 등록되기 위해서는 넓은 기주 범위를 나타내야 하므로 다양한 해충을 대상으로 활성을 시험하였다. 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주에 대해서 다른 해충의 활성범위를 알아보기 위하여 배추좀나방, 지하집모기, 이집트숲모기에 대한 반수치사 농도 값(LD₅₀)을 각각 조사하였다. 생물검정에서 KB099 균주는 배추좀나방, 지하집모기 및 이집트숲모기에 각각 0.0006 µg/ml, 0.4339 µg/ml 및 0.2922 µg/ml로 나비목 해충인 배추좀나방 뿐만 아니라 파리목에 속하는 모기 유충에 대해서 활성이 있었다 (표 8).

표 8. 배추좀나방, 지하집모기, 이집트숲모기 유충에 대한 비티 아종 쿠르스타키 KB099 분리균의 독성 비교

비티 균주	시험 해충 종류		
	치사농도 LD ₅₀ (µg/ml)		
	배추좀나방	지하집모기	이집트숲모기
비티 쿠르스타키 KB099	0.0006	0.4339	0.2922

담배거세미나방에 고효율인 비티 아종 KB099 균주는 담배거세미나방 외에도 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 작은각시들명나방(*Palpita indica*), 벼애나방(*Naranga aenescens*), 지하집모기(*Culex pipiens*)에 대해 100%의 높은 활성을 보였다 (표 9).

표 9. 다양한 해충에 대한 비티 아종 쿠르스타키 KB099 분리균의 활성 정도

시험 해충 종류	활성 정도 (사충율 %)
배추좀나방	+++ (100)
작은각시들명나방	+++ (100)
벼애나방	+++ (100)

흑명나방	+	(66)
파밤나방	++	(88)
집파리	-	(0)
지하집모기	+++	(100)
+++ 고효율성, 사충율 90% 초과; ++ 활성, 사충율 70% 초과 90%이하; + 저활성, 사충율 50% 초과 70% 이하; - 효과없음, 사충율 50% 이하		

[0082] <실시예 6> 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 섭식 저해 효과

[0083] 선발된 비티 균주를 영양평판배지(Nutrient agar)에 접종하고 27℃에서 4~6일간 배양 후 위상차현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성 유무를 관찰하면서 내독소 단백질이 형성되었을 때, 배지 위의 균을 모아 원심분리기하여 균주만을 수확한 균액 (단백질량 1.267 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 10,000 배까지 희석하여, 인공 먹이 0.5 g당 각 희석액 100 μl 를 첨가하여 체중이 약 5-9 μg 인 담배거세미나방 3령 유충 98 마리를 5일간 먹이고 체중을 측정하였다.

[0084] 비티의 살충성 단백질이 곤충 중장의 수용체에 결합함으로써 구멍이 생김으로 인하여 섭식이 중단되는 섭식 저해 현상이 나타나는데, 상기 특성이 KB099 균주에 나타나는지 확인하였다. 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주를 섭식한 해충의 일부는 사망하고 나머지 살아있으나, 5일 후 유충의 무게는 대조구의 116.4 μg 에 비하여 사망률이 84%인 경우 약 30 배 적었다 (표 10). 상기 결과는 비티를 섭식하면 패혈증에 죽기도 하지만 섭식 중단으로 아사하기도 하므로, 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 내독소 단백질로 인한 섭식 저해로 유충의 무게 증가율이 감소하였음을 알 수 있다 (도 6).

[0085] 표 10. 비티 아종 쿠르스타키 KB099 분리균을 먹인 담배거세미나방 3령 유충의 무게 증가율

[0086]

살충성 단백질 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	시험 해충	체중 증가율 (μg)	치사율 (%)
대조구	98	116.4 $\pm$ 27.9a	0
0.0001267	98	95.9 $\pm$ 8.8 b	0
0.001267	98	77.3 $\pm$ 17.1 c	4
0.012670	98	46.4 $\pm$ 9.5 d	12
0.126700	98	34.4 $\pm$ 4.2 d	34
1.267000	98	4.0 $\pm$ 1.2 e	84

[0087] <실시예 7> 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 플라스미드 분석

[0088] 10 ml의 LB 배지에서 27℃, 16 시간 키운 균 1 ml를 SPY 배지 (0.2% 황산암모늄, 1.4% 인산제일칼륨, 0.6% 인산제이칼륨, 0.1%, 구연산 나트륨, 0.2% 황산마그네슘, 0.1% 효모추출물 및 0.1% 포도당) 100 ml에 다시 접종하고, 600 nm에서의 흡광도가 0.7이 될 때까지 27℃에서 배양하였다. 배양된 균을 10,000 rpm으로 5 분간 원심분리하여 균체를 수확하고 P1 용액 (50 mM TrisCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA) 및 라이소자임 (lysozyme)을 처리한 후 37℃에서 1 시간 배양하였다. P2 용액 (200 mM 수산화나트륨, 1% SDS), P3 용액 (3 M 초산칼륨)을 차례로 넣고, 12,000 rpm으로 30 분간 원심분리하여 모은 상층액을 50 ml의 튜브에 장착한 쿼엔-팁(Qiagen-tip)에 넣어 흐르게 한 뒤 QBT 용액 (750 mM 염화나트륨, 50 mM MOPS, 15% 이소프로판올, 0.15% 트리톤), QC 용액 (1 M 염화나트륨, 50 mM MOPS, 15% 이소프로판올)을 차례로 처리한다. 그리고 새로운 50 ml 튜브에 쿼엔-팁(Qiagen-tip)을 장착하고 플라스미드 DNA 추출용 용액인 QF 용액 (1.25M 염화나트륨, 50mM TrisCl, 15% 이소프로판올)을 처리하여, 추출된 플라스미드 DNA에 0.7 ml의 이소프로판올을 넣고 13,000 rpm으로 30 분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, 70% 알코올을 넣어 원심분리한 후 상층액을 버리고, 수집한 플라스미드를 약 10 분 건조시키고, 멸균수로 녹인 후 0.7% 아가로스 겔에서 전기영동하여 플라스미드 DNA 패턴을 확인하였다. 대조구로서 비티 아종 쿠르스타키 HD-1 균주를 사용하였다.

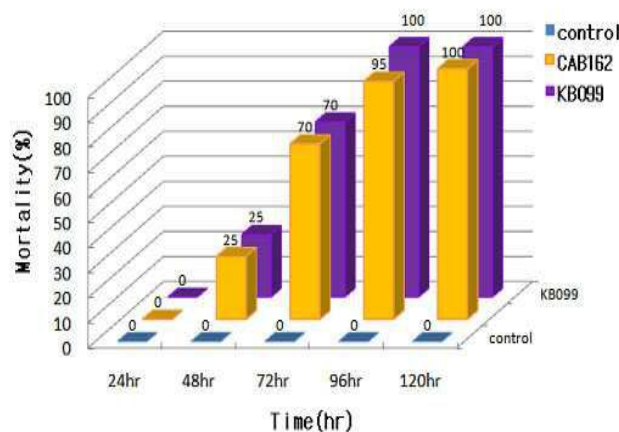
[0089] 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 플라스미드 패턴은 비티 쿠르스타키 HD-1과 전혀 다른 패턴을 보이는 것으로 보아, 상기 두 균주는 분류학적으로 같은 아종에 속하지만 KB099 균주는 HD-1와는 특성이 다른 균주인 것을 알 수 있다 (도 7).

도면의 간단한 설명

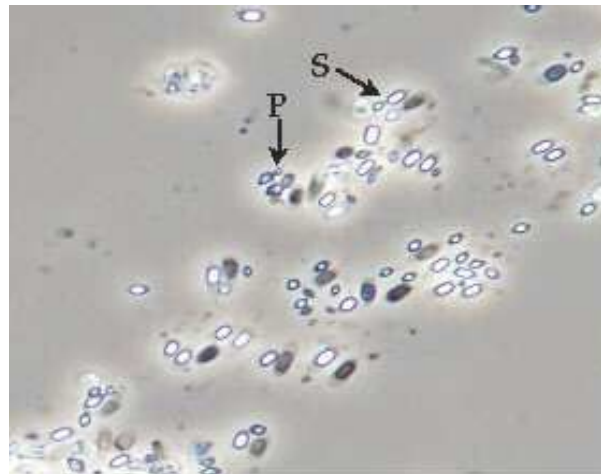
- [0090] 도 1은 담배거세미나방 유충에 대한 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주 및 CAB162 균주간의 사충율 추이 그래프이다.
- [0091] 도 2는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 내독소 단백질(P) 및 포자(S)의 위상차현미경 사진 (a; $\times 1,000$), 및 주사전자현미경 사진 (b; $\times 6,000$)이다.
- [0092] 도 3은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 내독소 단백질의 SDS-PAGE 결과이다. 단백질 표준 분자량 마커 (M), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 전독소 (레인 1), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 전독소 (레인 2), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 전독소 (레인 3).
- [0093] 도 4는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주의 내독소 단백질에 담배거세미나방 유충의 중장 내 소화효소를 처리한 SDS-PAGE 결과이다. 단백질 표준 분자량 마커 (M), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099의 전독소 단백질 (레인 1), 담배거세미나방 유충의 중장액을 처리한 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099의 내독소 단백질 (레인 2).
- [0094] 도 5는 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주를 담배거세미나방의 1 부터 6 령까지의 유충에 처리하여 사충 활성을 나타낸 그래프이다.
- [0095] 도 6은 담배거세미나방 4 령 유충에 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균액을 섭식시켰을 때 섭식 저해 현상을 보여주는 사진이다. A: 무처리구, B: 섭식 저해된 4령 유충.
- [0096] 도 7은 비티 아종 쿠르스타키 KB099 균주로부터 분리된 전체 플라스미드 DNA 패턴을 나타내는 아가로스겔 사진이다. 람다 DNA를 *HindIII* 효소로 절단한 DNA 마커 (M), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 플라스미드 DNA (레인 1), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 플라스미드 DNA (레인 2).

도면

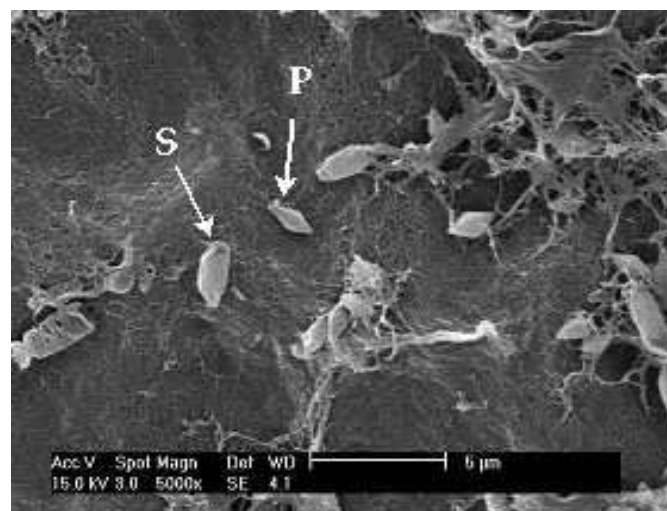
도면1



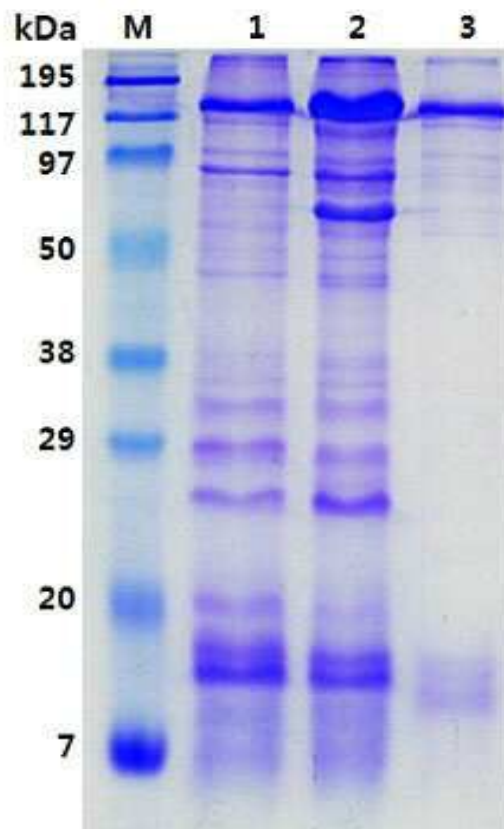
도면2a



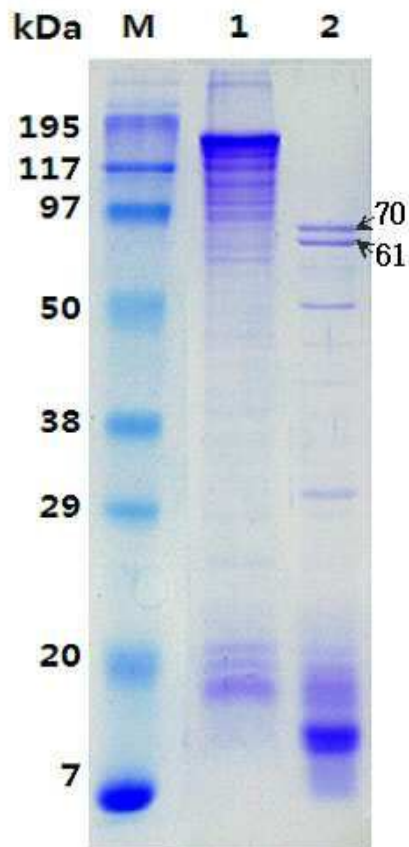
도면2b



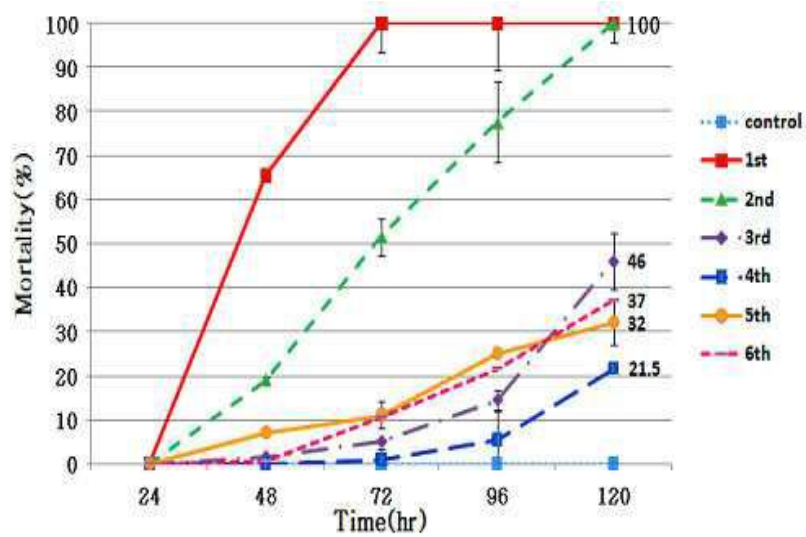
도면3



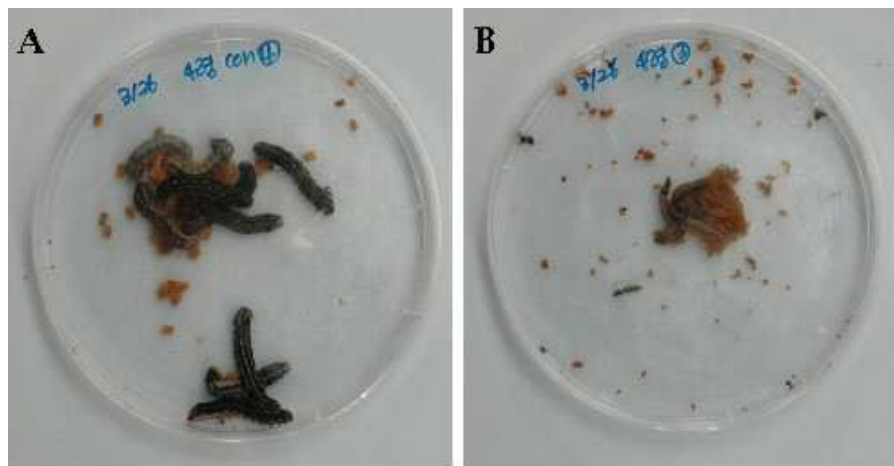
도면4



도면5



도면6



도면7

