

電氣泳動法에 의한 大豆 根瘤菌 *Rhizobium fredii* 와 *Bradyrhizobium japonicum*의 分類 및 同定

尹 漢 大 · 趙 武 濟 · 李 啓 瑚*

慶尙大學校 農科大學 農化學科, * 서울大學校 農科大學

(1987년 3월 24일 수리)

Identification of *Rhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum* by Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Han-Dae, Yun, Moo-Je Cho and Ke-Ho, Lee*

Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University,

* College of Agriculture, Seoul National University, Korea

Abstract

A method, based upon the separation of cellular proteins by one- and two-dimensional electrophoresis was used for distinguishing between *Bradyrhizobium japonicum* strains and *Rhizobium fredii* strains. Significant differences in protein pattern of one-dimensional SDS-PAGE were observed between *Rhizobium fredii* strains and *Bradyrhizobium japonicum* strains. The differences in six distinct main bands were observed among total 52 kinds of protein bands. Furthermore, the distribution of proteins in two groups by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis was very different. The majority of visible proteins of *Rhizobium fredii* were acidic, whereas those of *Bradyrhizobium japonicum* were basic. In addition, amino acid composition was analyzed to detect the differences between two groups. No significant differences in amino acid composition were observed between *Bradyrhizobium japonicum* strains and *Rhizobium fredii* strains. The results indicate that one- and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis were useful for identifying rhizobia isolates. One-dimensional SDS-PAGE of rhizobia proteins provided a rapid method for screening a large number of isolates, whereas two-dimensional electrophoresis was more of resolution and easiness for analyzing protein spots.

서 론

최근 새로운 분류법^{1,2)}에 의하여 *Rhizobium* 속과 *Bradyrhizobium* 속으로 나누고 있으며, Keyser³⁾ 등이 동일한 숙주 식물인 아시아 계통의 대두에서 생육속도가 빠른 근류균을 분리하고, 이들의 균학적, 생리적 특징을 조사하여 새로이 *Rhizobium fredii* 라고 명명한 바가 있다⁴⁾.

근류균의 분류에 있어 종래에는 주로 기주 식물

과의 친화성에 따라 구별되어 왔으나 하나의 균주는 한 가지 이상의 두과작물에 근류를 형성할 수 있는 기주식물의 변동성으로 인하여 분류의 어려움이 있어 생리적인 특징에 보다 더 치중하고 있는 실정이다⁵⁾.

최근에는 균을 분리, 동정하는데 생리적 특성이나 면역법에 의한 판정보다는 세포의 전반적인 유전적 배경, 즉 전세포성분의 단백질을 전기영동법에 의하여 분석 비교하여 유연관계가 멀거나 매우 유사한 것들 간의 관계를 추정하는 방법을 시

도하고 있다¹⁴⁾. 전기영동법은 신속하고 재현성이 높다는 특징이 있고 또 한편 균을 동정할 때 기존법의 취약점인 생육조건 차이에 따른 형태적, 생리적 특성의 오차를 줄일 수도 있다. Noel¹⁵⁾ 등은 일차원 전기영동법(SDS-PAGE)에 의하여 토착 대두 근류균의 분포상태를, Kamicker¹⁶⁾ 등은 대두경작지에서 점종균과 토착 대두 근류균의 분포상태를 추적 보고한 바 있다. 일차원 전기영동법은 많은 균주를 단시간에 서로 뚜렷하게 구별할 수 있고, 같은 serogroup에 있는 균주들의 구별도 가능한 이점이 있다.

한편, 일차원 전기영동법보다 단백질 해상력 및 재현성이 더 높은 이차원 전기영동법(2D-PAGE)을 Farrell¹⁷⁾이 보고한 이래 최근 균주를 동정하는 데 *Rhizobium*의 분류⁸⁾, *Spiroplasma*,¹⁰⁾ *Frankia*의 분류¹¹⁾ 등에 응용되고 있다. 따라서 본 연구자들은 전보¹²⁾에서 보고한 *Rhizobium fredii* 7균주와 *Bradyrhizobium japonicum* 9균주를 동정한 결과를 토대로 두 group 간에 있어 일차원 및 이차원 전기영동법에 의한 균의 단백질 pattern 차이 및 아미노산 조성 차이를 분석비교하고 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 전보¹²⁾에서 분리 동정한 *Bradyrhizobium japonicum* 9균주와 *Rhizobium fredii* 7균주를 사용하였으며 균의 보관 및 배양은 yeast extract mannitol (AMA) 배지¹³⁾를 사용하였다.

2. SDS-polyacrylamide gel 전기영동법(SDS-PAGE)에 의한 균체 단백질 분석

5ml AMA 액체배지에서 배양시킨 배양액(약 2×10^9 cells/ml)을 $12,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하고 10 mM tris(hydroxy-methyl) aminoethane (tris)-hydrochloride(pH 7.6) 용액에 한번 세척하고 다시 0.2ml의 동일 용액에 현탁한 다음 sonicator(MSE Scientific Instrument, Suscex, UK) 40W에서 30초간 균체를 파쇄하였다. 다시 이 파쇄액에 SDS buffer 용액(10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 3% SDS, 62mM Tris-Cl, pH 7.6) 0.2ml를 첨가하였다.

전기영동은 Laemmli의 SDS-Tris-glycine bu-

ffer system¹⁸⁾과 Studier¹⁹⁾의 discontinuous slab gel electrophoresis system을 사용하였다. 전기영동 후 25% trichloroacetic acid가 함유된 0.1% coomassie blue 용액에 1시간 정도 염색시켰으며 탈색은 7% acetic acid 용액에 10시간 정도 탈색시킨 다음 최종적으로 25% ethanol과 7% acetic acid 용액에 완전히 탈색시켰다²⁰⁾.

3. Two-dimensional polyacrylamide gel 전기영동법(2D-PAGE)에 의한 균체 단백질 분석

상기 방법과 같이 배양 및 원심분리 후 5 ml의 PBS(0.68% KH_2PO_4 , 0.89% K_2HPO_4 , 0.87% NaCl, pH 6, 7)에 세척 후 0.2ml의 0.05M Tris-Cl (pH 7.6)에 녹인 다음 sonicator에서 15초간 3번 균체를 파쇄하고 25 μ l의 sonication buffer²¹⁾를 첨가하고 4°C에서 15분간 incubation 한 다음 다시 dry ice-ethanol bath에서 동결시켰다. 이것을 다시 용해시킨 다음 120mg의 urea와 100 μ l의 lysis buffer²²⁾를 첨가한 후 dry ice-ethanol bath에서 freeze-thaw cycle을 3회 실시하고 시료를 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액 100 μ l를 isoelectric focusing (1차 전기영동)하고, SDS-dimension (2차 전기영동)은 acrylamide 12% 농도에서 전기영동하였으며, 염색 및 탈색은 1차 전기영동시와 동일하게 행하였다²³⁾.

4. 아미노산 조성 분석

균체를 AMA 액체배지 5ml에 배양한 후(약 2×10^9 cells/ml) $12,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하고 10mM Tris-Cl(pH 7.6) 용액으로 두번 세척하였다. 이 현탁액을 다시 원심분리하여 6N HCl 2ml를 가하여 $110 \pm 1^\circ C$ 로 조정된 sandbath에서 24시간 가수분해시켰다. 이 가수분해액을 다시 glass filter로 여과하고 여액을 water bath에서 염소 이온이 완전히 증발될 때까지 수 회 반복하여 건조시켰다. 건조된 sample을 다시 citrate buffer(pH 2.2) 용액으로 희석한 다음 membrane filter(pore size 0.45 μ m)로써 여과한 후 아미노산 자동분석기(LKB 4150)에서 분석하였다²⁴⁾.

결과 및 고찰

1. 일차원 전기영동법에 의한 분석

Rhizobium fredii 7균주와 *Bradyrhizobium japonicum* 9균주의 균체단백질을 SDS-polyacr-

ylamide gel 전기영동법(SDS-PAGE)에 의하여 전기영동상의 pattern을 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서와 같이 분리군주 중 fast growth, slow growth 두 group 간에는 전기영동상 현저한 차이가 나타났다. 두 group의 분리군주에서 모두 52개의 band가 관찰되었으며 이 band들을 다시 3 group으로 나누었는데 6개의 darkest band (main band)와 27개의 darker band, 19개의 light band로 구성되었다. Main band에 있어 #18, #25, #27은 *Bradyrhizobium japonicum* 군주에서, #26, #37, #38은 *Rhizobium fredii* 군주에서 단백질의 양적인 면에서 서로 차이가 있었다. *Bradyrhizobium*의 main band에서는 strain 간에 큰 차이가 관찰되지 않았으나 *Rhizobium fredii* strain ROKF 46과 strain ROKF 86에서 band #37이 다른 strain과 차이가 나타났다.

또한 분리된 단백질의 분자량을 표준 단백질 (Fig. 1)과 비교한 결과 14,600 dalton에서 178,500 dalton의 범위에 있었으며 main band인 #18은 분자량이 34,000 dalton이었으며 #25, #26, #27, #38은 각각 65,400, 62,900, 59,000, 30,700 dalton의 분자량을 가진 단백질이었다. *Rhizobium fredii*의 특이한 band #37은 분자량이 34,

000 dalton 이었다.

한편 예비 실험과정에서 균의 배양시간에 따른 단백질 band의 크기 및 위치의 차이, 즉 대수 증식기와 정상기 세포에 따라 단백질 pattern의 차이는 약간 있었으나 군주간의 전체적인 비교를 하는 데는 어려움이 없었다. 정상기 이후의 세포는 단백질 pattern의 변화가 거의 관찰되지 않았으며, 배양결과와 날짜에는 관계없이 그 pattern이 일정함을 보여주었다. 따라서 앞으로 미생물에 단백질 pattern을 비교하는 데는 정상기의 세포가 적당한 것으로 생각된다. 또한 *Rhizobium*의 SDS-PAGE 상의 band 특징은 균체 외부의 점질층이 있어 단백질의 분리를 방해하여 분자량이 큰 단백질 band에서 분리가 잘 되지 않았던 것이 특징이었다.

한편 이러한 전기영동상의 pattern 차이에 의해 Noel⁶⁾ 등은 토착 대두 근류균의 serogroup과의 비교 실험한 결과를 보고하였으며, Kamicker⁷⁾ 등은 대두 경작지에서 SDS-PAGE에 의해 점종균과 토착 근류균과의 분포 관계를 보고한 바가 있으며 점종균이 토착 근류균과의 경쟁성 유무를 조사하는데 좋은 방법이 될 수 있다는 것을 제시한 바가

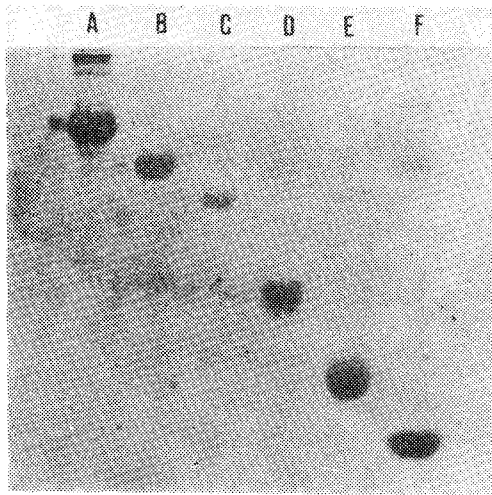


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms of standard proteins.

- A : Albumin from bovine serum (66,000)
- B : Albumin from egg (35,000)
- C : Pepsin from hog (34,000)
- D : Trypsinogen from bovine pancreas (24,000)
- E : β -Lactoglobulin from bovine (18,400)
- F : Lysozyme from egg white (14,300)

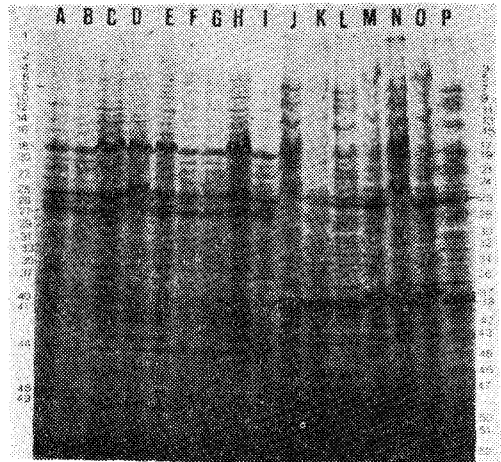


Fig. 2. Comparison of the protein patterns between *Rhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

- A~I : *Bradyrhizobium japonicum* strains ROKS
A, 14; B, 21; C, 26; D, 41; E, 43; F, 52; G, 53; H, 85; I, 89.
- J~P : *Rhizobium fredii* strains ROKF
J, 5; K, 7; L, 42; M, 46; N, 56; O, 86; P, 97.

Table 1. Amino acid composition of *Rhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum* strains

Amino acid	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains								
	14	21	26	41	43	52	53	85	89
Asp	8.29	8.22	8.04	6.18	8.14	6.97	8.25	8.32	8.30
Thr	5.63	5.49	5.51	5.36	5.07	4.03	5.57	5.66	5.56
Ser	4.93	4.74	5.27	5.01	5.13	5.62	5.53	5.51	5.06
Glu	9.20	11.30	9.84	8.54	10.00	10.96	9.32	9.86	9.77
Pro	4.77	4.44	4.53	5.43	4.17	3.39	4.48	4.41	4.86
Gly	10.59	12.29	10.56	10.15	11.00	15.92	11.27	10.82	10.85
Ala	11.74	12.67	12.24	10.42	11.64	15.32	12.26	12.17	12.27
Cys	0.11	0.07	0.14	0.09	0.06	0.12	0.22	0.11	0.22
Val	6.57	6.94	7.61	8.09	7.72	4.98	7.13	7.36	6.76
Met	0.89	0.13	0.72	0.46	0.71	0.43	2.06	0.83	1.44
Iso	4.09	4.43	4.46	3.79	4.47	3.29	4.67	4.34	4.52
Leu	7.22	7.76	7.66	6.84	7.58	5.53	7.28	7.30	7.44
Try	2.20	1.50	2.04	2.84	2.01	1.42	2.86	2.25	2.86
Phe	3.63	3.33	3.58	4.06	3.58	2.63	3.86	3.44	3.95
His	7.06	4.93	5.11	10.04	6.82	7.38	4.38	6.64	5.41
Try	2.15	2.78	1.63	3.13	1.45	0.78	1.16	0.75	0.55
Lys	6.33	4.18	6.31	6.47	6.25	8.01	5.36	5.85	5.50
Arg	4.59	4.59	4.37	3.29	4.19	3.16	4.34	4.37	4.60

Amino acid	<i>Rhizobium fredii</i> strains						
	5	7	42	46	56	86	97
Asp	8.36	9.32	8.41	8.40	9.98	9.64	9.97
Thr	5.77	5.29	5.70	5.37	5.56	5.39	5.46
Ser	5.89	5.43	4.97	5.14	5.93	5.50	5.43
Glu	8.75	9.47	9.71	10.13	10.54	10.65	10.80
Pro	4.56	3.97	4.75	4.65	3.94	3.96	4.18
Gly	10.57	10.13	10.57	10.10	10.28	10.19	10.22
Ala	11.90	11.13	12.05	12.90	11.46	11.53	11.53
Cys	0.18	0.11	0.08	0.19	0.09	0.15	0.18
Val	7.08	6.64	6.92	6.73	7.12	6.98	6.97
Met	1.06	0.69	1.31	1.77	1.06	0.78	0.90
Iso	4.91	4.17	4.06	4.48	4.52	4.66	4.77
Leu	8.40	7.74	7.17	8.28	8.18	8.11	8.13
Try	2.75	2.12	2.30	2.39	2.39	2.29	2.61
Phe	3.76	3.35	3.78	3.55	3.07	3.33	3.41
His	3.67	6.68	6.49	4.10	4.03	4.58	3.39
Try	0.53	1.10	1.43	0.61	0.62	0.45	0.39
Lys	6.25	7.26	5.87	5.47	6.09	6.62	6.61
Arg	5.55	5.10	4.45	5.51	5.16	5.18	5.23

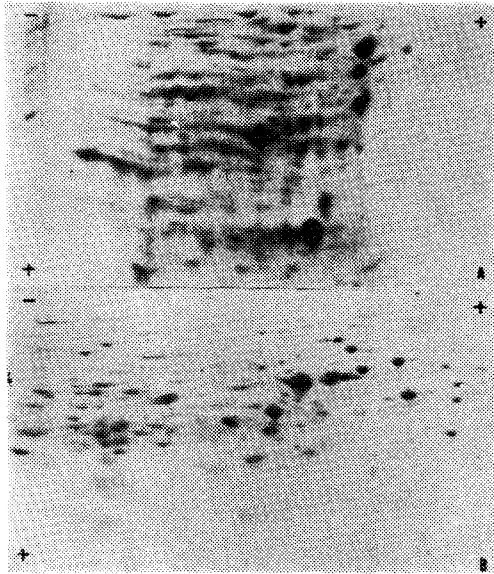


Fig. 3. Comparison of the protein patterns between *Rhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.

A : *Rhizobium fredii* ROKF 86
 B : *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26
 X-axis is isoelectric focusing (pH 8~4)
 Y-axis is SDS-dimension
 (M.W. > 160,000~15,000)

있다. 그리고 SDS-PAGE 법은 양성과 음성을 판단하는 것이 아니기 때문에 번역법과는 비교될 수 없으며 궁극적으로 pattern의 차이를 비교하는 데 의의가 있었다. 이러한 pattern의 복잡성으로 절대적인 분류는 어렵지만 서로 다른 *Rhizobium* 속을 구별하는 데는 매우 용이하였으며, 많은 수의 단백질 변수가 있지만 한 번의 실험으로 균주간의 차이를 확인할 수 있었다.

2. 이차원 전기영동법에 의한 균체 단백질 분석

Two-dimensional polyacrylamide gel 전기영동법(2D-PAGE)에 의하여 *Rhizobium fredii*와 *Bradyrhizobium japonicum*의 균체 단백질을 세포로부터 분리, 분자량 차이에 의한 전기영동상에 나타난 단백질 pattern을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3A는 *Rhizobium fredii*의 pattern을 나타냈으며, Fig. 3B는 *Bradyrhizobium japonicum* pattern을 나타내었다. Fig. 3에서 볼 때 전반적으로 두 group 사이에서 단백질의 분포가 일차원 전기영동법에서 보다 현저한 차이가 나타났

다. *Rhizobium fredii*의 단백질이 비교적 산성 쪽에 많이 분포 되었으며 *Bradyrhizobium japonicum*에서는 알칼리성 쪽에도 많이 분포하였다. 각 gel에서 왼쪽의 단백질은 알칼리성으로 pH 8이며 오른쪽은 산성으로 pH 4이다. Gel의 상단 부위는 분자량 160,000 dalton 이상으로 추정되었으며 하단 부위는 분자량 15,000 dalton 이하로 추정되었다. 이차원 전기영동법에서도 일차원 전기영동법에서와 마찬가지로 예비 실험과정에서 균의 배양시간에 따른 단백질 pattern 차이는 없었으며, 배양날짜에 따른 변화도 관찰되지 않았다.

한편 Robert⁹⁾ 등은 이차원 전기영동법을 사용하여 균의 속을 구별하였을 뿐만 아니라 균주간의 구별이 가능하였는데 *Rhizobium melolitti*의 이차원 전기영동상에서 육안으로 관찰할 수 있는 단백질 spot의 상대적 차이가 있다는 것을 보고한 바가 있다. 따라서 본 실험에서 사용한 이차원 전기영동법은 해상력 및 분리된 단백질 spot를 분석하는데 용이하였기 때문에 속 및 균주간의 특성차이를 비교하는데 좋은 방법이었음을 지적할 수 있었다.

3. 아미노산 조성에 의한 균주 분석

분리균 *Rhizobium fredii* 균주와 *Bradyrhizobium japonicum* 균주간의 아미노산 조성에 의해 두 group 간의 차이를 비교하기 위하여 18종류 아미노산을 분석한 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 보는 바와 같이 aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, valine 등은 모든 균주에 비교적 많이 함유되어 있으며, cystein, methionine, tryptophan은 그 함량이 적었다. 한편 아미노산의 조성에 의해서는 뚜렷한 차이를 발견할 수가 없었으나 대체적으로 *Rhizobium fredii* 균주에서 aspartic acid와 leucine의 함량이 *Bradyrhizobium japonicum* 균주에서 보다 다소 높았으며, histidine 함량에서는 오히려 *Rhizobium fredii* 보다 *Bradyrhizobium japonicum*이 다소 높은 것으로 나타났다. 한편 조¹⁷⁾ 등은 *Bradyrhizobium japonicum*의 wild type과 그의 mutant 사이에서 얻은 각 균주의 아미노산 조성을 비교한 결과 뚜렷한 차이가 관찰되지 않는다는 것을 보고한 바가 있다. 이러한 사실로 미루어 보아 아미노산 조성에 속 및 균주간의 차이를 비교하는 것은 부적합한 것으로 생각된다.

요 약

전보¹²⁾에서 보고한 *Bradyrhizobium japonicum* 9 균주와 *Rhizobium fredii* 7 균주의 균체 중의 단백질 pattern의 차이를 일차원 및 이차원 전기영동법에 의하여 조사하였다.

일차원 전기영동법(SDS-PAGE)에 의해서는 두 group의 균체에서 모두 52개의 band가 관찰되었고 그 중 6개의 main band로써 group간의 차이가 확인되었으며, 이차원 전기영동법(2D-PAGE)에 의한 두 group간에 단백질 구성은 *Rhizobium fredii*에서는 단백질이 산성 쪽에, *Bradyrhizobium japonicum*는 alkali성 쪽에 비교적 많이 분포되어 있었다. 또한 두 group간의 균체 아미노산 조성을 조사한 결과 조성상의 뚜렷한 차이가 없었다.

분리된 근류균을 확인하는데 전기영동법이 유용하였으며, 일차원 전기영동법은 많은 균주를 신속하게 확인할 수 있었고 이차원 전기영동법은 해상력 및 분리된 단백질을 spot를 분석하는데 용이하였다.

참 고 문 헌

1. Jordan, D.C.: Int. Syst. Bacteriol., 32 : 136 (1982)
2. Jordan, D.C., and Allen, O.N.: In Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed, Williams and Wilkins, Baltimore (1977)
3. Keyser, H.H., Bohlool, B.B., Hu, T.S. and Weber, D.F.: Science, 215 : 163 (1982)
4. Scholla, M.H., and Elkan, G.H.: Int. J.

- Syst. Bacteriol., 34 : 484 (1984)
5. Sadowsky, M.J., Keyser, H.H., and Bohlool, B.B.: Int. J. Syst. Bacteriol., 33 : 716(1983)
6. Noel, K.D., and Brill, W.J.: Appl. Environ. Microbiol., 40 : 931 (1980)
7. Kamicker, B.J., and Brill, W.J.: Appl. Environ. Microbiol., 51 : 487 (1986)
8. O'Farrel, P.H.: J. Biol. Chem., 250 : 4007 (1975)
9. Roberts, G.P., Leps, W.T., Silver, L.E., and Brill, W.J.: Appl. Environ. Microbiol., 39 : 414(1980)
10. Mouches, C., Vignault, J.G., Tully, J.G., Whitcomb, R.F., and Bove, J.M.: Curr. Microbiol., 2 : 69 (1979)
11. Benson, D.R., Buchholz, S.E., and Hanna, D.G.: Appl. Environ. Microbiol., 47 : 489 (1984)
12. Yun, H.D., Cho, M.J., and Lee, K.H.: J. Kor. Agric. Chem. Soc., 30 : 153 (1987)
13. Vincent, J.M.: A manual for the practical study of the rootnodule bacteria. Int. Biological Programme, Blackwell Scientific Publ., Oxford, England. (1970)
14. Laemmli, U.K.: Nature (London) 277 : 680 (1970)
15. Studier, F.W.: J. Mol. Biol., 79 : 237 (1973)
16. Spackman, D.H., Steein, W.H., and Moore, S.: Anal. Chem., 30 : 1190 (1958)
17. Cho, M.J., Yang, M.S., Yun, H.D., Kang, K.Y.: K.J. Appl. Microbiol. Bioeng., 13 : 79 (1985)