

면역유충(*Lucilia illustris*) 체액으로 부터 항균물질의 유도

육순학·장정순

인하대학교 이과대학 생물학과

Induction of Bactericidal Substance from the Immunized Larval Haemolymph of *L. illustris*

Yook, Soon-Hack and Chung-Soon Chang

Department of Biology, College of Sciences, Inha University

ABSTRACT: It was known that normal-haemolymph from the 3rd instar larvae of *Lucilia illustris* contain a lysozyme (or lysozyme-like substance) with bactericidal activity to gram positive bacteria, and the bactericidal activity of injured-haemolymph was increased significantly after injuring the body wall.

To elucidate the defence mechanism of insect against the nonpathogenic bacteria, the immune-haemolymph against *Escherichia coli* K-12 was prepared after immunization. The bactericidal activity between injured and immune-haemolymph was compared, and it was revealed that the immune-haemolymph showed higher titer of bactericidal activity to gram positive bacteria as well as to *Escherichia coli*.

The bactericidal substance from the immune-haemolymph was purified through a successive chromatographies on Sephacryl S-300 and CM-Sepharose CL-6B, and it was characterized as a basic protein in nature with heat stable property at acidic conditions.

KEY WORDS □ Bactericidal Substance, larval haemolymph, *Lucilia illustris*

일반적으로 고등동물에서의 면역 현상과 같이 무척추동물에서도 침입된 이 물질에 대하여 면역 방어 작용이 일어나고 특히 곤충의 경우 원시적이긴하지만 체액성 면역계와 세포성 면역계가 공존하고 있으며 면역성이 있는 물질이나 세균이 침입하였을 경우 이들을 방어할 수 있는 기작이 잘 알려져 있다(Yeaton, 1983; Cooper, 1985; Rheins & Karp, 1985). 여러가지 방어기작 중 곤충의 체내에 세균을 주입(면역)할 경우 유도 생성되는 면역방어 물질이 체액인 haemolymph 내에서 생성되어 이를 이용한 생체내 자기방어기작이 수행된다고 보고되었다.(Faye *et al.*, 1975; Pye & Boman, 1977). 면역을 실시하였을 경우

뿐만 아니라 곤충의 정상체액의 경우에도 lysozyme이나 이와 유사한 물질이 haemolymph 내에 존재함이 보고되었으나(Hoffmann *et al.*, 1981; Hultmark *et al.*, 1982; Kubo *et al.*, 1984) 이러한 물질 등의 성상이나 작용에 관한 기작은 명확하게 밝혀져 있지 않다.

곤충 체액에서의 항균력과 용균력을 갖고 있는 물질의 생성은 면역에 의해서 유도 생성되며, 면역 후 유도된 이들 단백질은 서로 다른 몇 개의 polypeptide로 이루어진 단백질분해 효소라고 보고된 바 있다(Boman *et al.*, 1974; Faye *et al.*, 1975). 지금까지의 연구결과에 의하면 곤충에 있어서 lysozyme과 면역에 의해 유도 생성되는

본 연구의 일부는 문교부 자유공모과제학술연구조성비(1986)의 지원에 의한 것임.

단백질이 체액성 면역계를 담당한다고 알려졌으며 (Qu *et al.*, 1982), 면역방어 기작에 관여하는 그 이외의 단백질에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

또한 곤충은 변태과정을 거칠 때 각 유충단계에서의 체액내 제반현상에 變化가 유발되므로 lysozyme의 활성도 역시 변화될 가능성이 있기 때문에 lysozyme의 유충단계별로 세분화하며 상호 비교해야 되는 어려움이 있어 이에 대한 비교연구가 미비한 상태이며 유충에 상처를 입히거나 세균을 면역할 경우 공히 항균력이 유도 증가되는 보고는 있으나 (Boman *et al.*, 1981; Hultmark *et al.*, 1982) 위에서 유도된 물질들의 동질성 여부와 항균력을 비교 검토한 결과는 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 파리목(Diptera)의 연두금파리 제3령충을 재료로 하여 상처를 입혔을 때 활성도가 증가한다고 보고된 바 있는 lysozyme성 용균물질과 세균을 면역시켰을 경우 생성되는 항균물질의 동질성 여부를 밝히고 *E. coli*로 면역을 시켰을 경우 생성되는 항균물질의 각종 세균에 대한 항균력을 알아보기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

면역 유충 체액의 채혈

실험재료로 사용한 연두금파리 제3령충은 시중에서 구입하여 실험실 내에서 사육하였다. 정상체액(normal-haemolymph)은 제3령충에서 직접 채혈하였으며, 면역체액(immune-haemolymph)은 saline(0.85% NaCl)에 부유되어 있는 *E. coli* (610nm에서 O.D. 0.4로 조절함)를 해부용침에 묻힌 다음 유충의 체내에 주입시켜 면역을 실시한 후 25°C에서 사육하면서 일정시간 간격으로 소량의 phenylthiourea를 함유한 시험관 내에 채혈하였다. 채혈된 각 haemolymph는 실온에 10분간 방치하여 응고시킨 후, 4°C에서 15,000×g로 20분간 원심분리하여 이물질을 제거한 후 그 상등액을 취하여 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 상처를 입힌 유충의 체액(injured-haemolymph)은 해부용침을 사용하여 체벽의 후부를 즉시 2~3회 찌른 후 상기 체액과 동일하게 일정시간 간격으로 채혈하였다(Zachary &

Hoffmann, 1984).

균주와 배지

항균력 실험에 사용된 균주는 액체배지를 이용하여 배양한 후 “냉동건조시킨” *Micrococcus luteus* (IAM 1056 strain), *Escherichia coli* (K-12 strain)와 *Bacillus subtilis*를 사용하였다. 각각의 균주는 배양후 log-phase의 것을 사용하였고 *M. luteus* 배양에는 BHI(Brain Heart Infusion), *E. coli*와 *B. subtilis*의 경우 LB (Luria-Bertani) 배지를 각각 사용하였다.

시료의 처리

분석에 사용한 시료는 각 체액에 1M acetic acid를 사용하여 최종농도가 0.25M이 되도록 처리하여 5분간 끓인 다음(100°C) 4°C에서 18,000×g로 20분간 원심분리하여 그 상등액을 실험에 사용하였다.

Nephelometric test

각각의 균주를 4°C의 PBS(phosphate buffered saline; 0.1M NaH₂PO₄, 0.1M Na₂HPO₄, 0.15M NaCl, pH6.4)에 부유시킨 후, 분광광도계(Perkin-Elmer 552S)를 사용하여 흡수파장 570nm에서 혼탁도를 O.D. 0.2~0.3에 맞춘 다음, 균주가 부유되어 있는 4°C의 PBS 1.0ml에 10μl의 시료를 첨가한 뒤 37°C에서 30분간 진탕하고 570nm에서 용균의 정도를 흡광도로 측정하였다.

Inhibition zone assay

멸균된 0.1M PBS, pH6.4에 각각의 균주를 2×10⁵ cells/200μl PBS가 되도록 조절한 후 멸균된 1% 영양한천배지 6ml에 넣어 배지가 굳기 전에 petri dish에 얇게 도포하였다. 한천배지가 굳은 뒤 직경 2.5mm의 구멍을 만들어 여기에 3μl의 체액시료를 넣고 30°C에서 18시간동안 방치시킨 다음 세균의 성장억제가 일어난 투명한 구역의 직경을 측정하였다. 대조군으로는 HEL(0.1% hen egg lysozyme, Sigma Chem. Co., USA)을 동일한 방법으로 실시하여 normal, injured 및 immune-haemolymph와의 결과를 비교 검토하였다.

항균물질의 분리

모든 분리과정은 4°C에서 실시하였으며, *E. coli*로 면역을 실시한 후 항균력이 가장 높았던 26시간째의 immune-haemolymph를 시료로 사용하

였고, 0.15M ammonium acetate, pH5.0 완충 용액으로 평형시킨 Sephacryl S-300 column (130×2cm)에 4.0ml의 시료를 넣어 gel-filtration chromatography를 행하였다. 각 분획의 유출은 동일 완충용액으로 실시하였고, 흡수파장 280nm에서의 흡광도로 측정된 각 분획의 항균력은 inhibition zone assay로 측정하였다. Gel-filtration chromatography에 의한 분획 중에서 항균력이 확인된 분획을 투석후 다시 CM-Sepharose CL-6B ion-exchanger(23×1.0cm)로 re-chromatography를 행하였다. 즉 50mM ammonium acetate, pH5.0 완충용액으로 gel을 평형시킨 후 시료를 넣고, 50mM과 700mM인 ammonium acetate 완충용액 각 150ml을 사용하여 연속농도구배로 유출시켜 얻은 각 분획을 각각 투석, 냉동 건조시켜 농축한 후, 항균력을 측정하기 위하여 inhibition zone assay법으로 행하였다.

전기영동

분리과정에서 항균력을 나타내었던 분획들을 Gabriel(1971)의 방법에 따라 15% acid-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 행하였다. 즉 tracking dye로는 methyl green을 사용하였으며 영동이 끝난 gel은 0.1% Coomassie brilliant blue R-250(in 7% acetic acid, 45% methanol)으로 염색한 후 7% acetic acid-45% methanol 용액으로 탈색하였다.

결 과

각 체액에서의 항균물질

Normal 및 injured-haemolymph의 항균력을 측정 비교하기 위하여 표준시료로 HEL(hen egg lysozyme)을 사용하여, 그람양성균인 *M. luteus*에 대한 항균력을 nephelometric test로 측정하여 표준곡선을 얻었으며, 이를 이용하여 위에 기술한 각 haemolymph에 대한 항균력 측정의 기준으로 삼았다(Fig.1). 이 표준곡선을 이용하여 *L. illustris* 제 3령충의 injured-haemolymph의 *M. luteus*에 대한 항균력은 상처를 입힌 후 35시간부터 급격하게 높아졌으며 42시간 이후에는 서서히 증가하였다(Fig.2). 동일한 방법으로 *E. coli*에

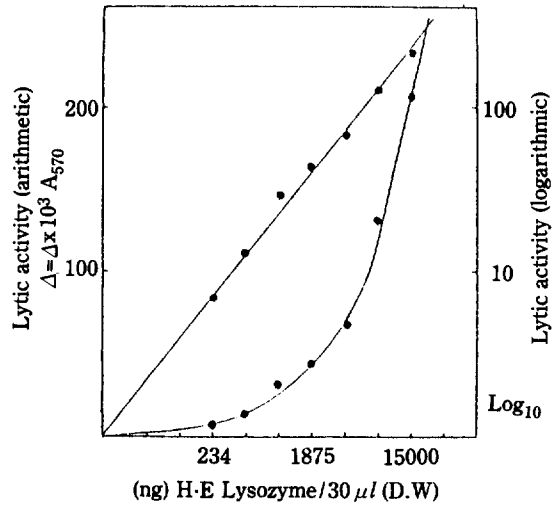


Fig. 1. Standard curve of lysozyme activity according to the Nephelometric test.

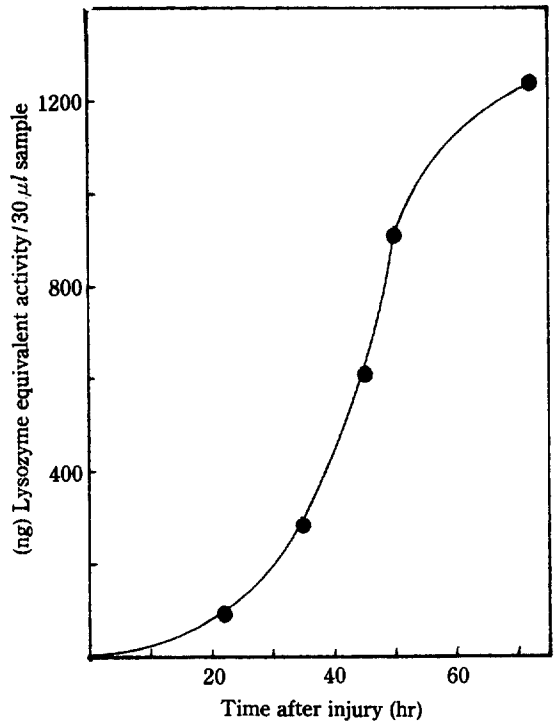


Fig. 2. Induction kinetics of bacteriolytic activity of the haemolymph after injury by Nephelometric test.

대한 injured-haemolymph의 항균력을 상기와 동일한 방법으로 측정해 본 결과 그 활성도는 없었다.

한편, 각 haemolymph를 inhibition zone

assay를 실시하여 그람양성균인 *M. luteus*와 그람음성균인 *E. coli*에 대한 항균력을 측정하였다. Normal-haemolymph는 *M. luteus*에 대해서는 성장억제가가 13.0±0.7 mm로 항균력을 나타내어 자연상태에서도 항균력이 존재하고 있음이 밝혀졌으나, *E. coli*에 대해서는 항균력이 없었다. Injured-haemolymph의 경우 상처를 입힌 후 시간이 경과함에 따라 *M. luteus*에 대한 항균력이 점차 증가하여 72시간 후에는 성장억제가가 19.0±1.2 mm에 이르렀으나 *E. coli*에 대해서는 성장억제가가 normal-haemolymph와 같이 아주 적었다(Fig. 3 & Table 1). 그러나 *E. coli*로 면역 실험을 실시한 뒤 채혈한 immune-haemolymph에 대하여 동일한 방법으로 inhibition zone assay를 실시한 결과 그람양성균인 *M. luteus*에 대한 항균력은 26시간후에 최고로 높아졌다가 점차 감소하였으며 특히 그람음성균인 *E. coli*에 대해서도 15.0±2.0 mm의 상당한 성장억제가를 보였다(Fig. 4 & Table 2). 이러한 결과는 immune-haemolymph의 경우 normal 또는 injured-haemolymph에서 발견되는 lysozyme과 유사한 성질의 항균물질이외에 그람음성균에도 항균력을

Table 1. Antibacterial activities of injured-haemolymph obtained from various time intervals after injury

Haemolymph	Diameter of inhibition zone (mm)		
	Bacterial strain		
	<i>M. luteus</i> IAM 1056	<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i>
Normal	13.0 ± 0.7	—	—
Injured(45 hr)	15.2 ± 0.6	4.0 ± 0.4	3.0 ± 0.2
Injured(52 hr)	17.0 ± 1.1	4.0 ± 0.7	3.0 ± 0.2
Injured(72 hr)	19.0 ± 1.2	5.0 ± 0.6	—
H.E lysozyme ^a	24.0 ± 0.9	2.5 ± 0.3	6.0 ± 0.8
Blank ^b	2.5 ± 0.3	2.5 ± 0.3	2.5 ± 0.3

^a0.1% lysozyme was used as a standard
^b0.15M saline was used as a reference
 All values are means ± SD for six individual tests

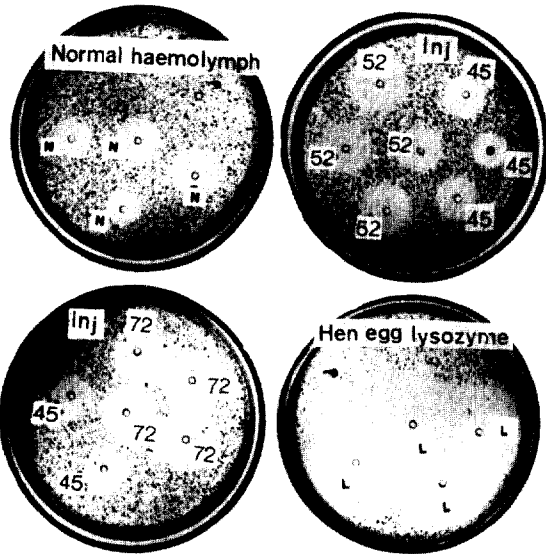


Fig. 3. Antibacterial activities of injured-haemolymph against *M. luteus* by Inhibition zone assay.
 N : Normal-haemolymph
 Inj : Injured-haemolymph (45 hrs, 52 hrs, 72 hrs)
 L : Hen-egg lysozyme

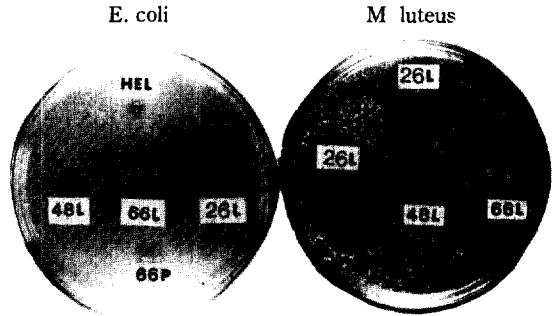


Fig. 4. Antibacterial activities of immune-haemolymph against *E. coli* and *M. luteus* by Inhibition zone assay.
 26L: 26 hrs larvae immune-haemolymph
 48L: 48 hrs larvae immune-haemolymph
 66L: 66 hrs larvae immune-haemolymph
 66P: 66 hrs pupae immune-haemolymph
 HEL: Hen-egg lysozyme

갖는 물질이 존재함을 시사하므로 전기영동을 하여 분석한 결과 26시간째의 immune-haemolymph에는 2종류의 단백질이 다량 존재함을 알 수 있었다(Fig. 5).

각 haemolymph에 존재하는 항균물질을 pH 4.0으로 조절하여 100°C에서 5분간 끓인 후 상기와 동일한 방법으로 항균력을 측정한 결과, 그 항균력은 거의 변화가 없는 내열성 물질임을 알 수 있었다.

항균물질의 분리

Injured-haemolymph에서 나타나는 그람양성균

Table 2. Antibacterial activities of immune-haemolymph obtained from various time intervals after immunization

Haemolymph	Diameter of inhibition zone (mm)		
	Bacterial strain		
	<i>M. luteus</i> IAM 1056	<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i>
Normal	13.0 ± 0.7	—	—
Immune(20 hr)	20.0 ± 1.1	4.0 ± 0.6	4.0 ± 0.4
Immune(26 hr)	28.0 ± 2.4	15.0 ± 2.0	5.0 ± 1.0
Immune(48 hr)	16.0 ± 0.9	5.0 ± 0.9	5.0 ± 0.7
Immune(66 hr)	17.0 ± 0.9	6.0 ± 0.8	6.0 ± 1.3
H.E lysozyme ^a	24.0 ± 0.9	2.5 ± 0.3	6.0 ± 0.8
Blank ^b	2.5 ± 0.3	2.5 ± 0.3	2.5 ± 0.3

^a0.1% lysozyme was used as a standard

^b0.15M saline was used as a reference

All values are means ± SD for six indivial tests

에 대한 항균물질과 immune-haemolymph에서 나타나는 그람음성균에 대하여 항균력을 갖는 물질과의 연관관계를 알아보기 위하여 항균력이 가장 높은 26시간째의 immune-haemolymph 4.2 ml을 Sephacryl S-300 column chromatography를 실시한 후 9개의 분획으로 나누어 각각의 분획에 대하여 pH7.0인 PBS buffer로 투석한 다음 *M. luteus*와 *E. coli*에 대한 항균력을 측정하였

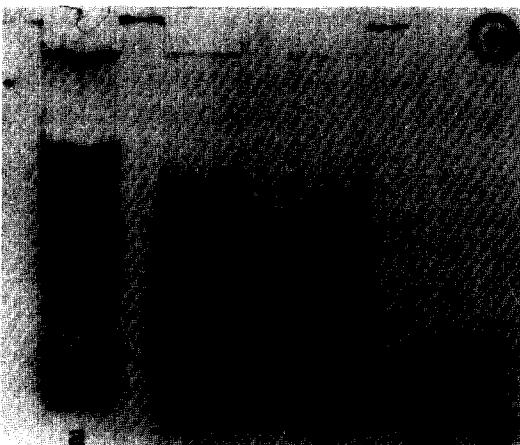


Fig. 5. Acid electrophoresis of crude immune-haemolymph on 15% polyacrylamide gel at pH 4.0.

- (a) 66 hrs larvae immune-haemolymph
- (b) 66 hrs pupae immune-haemolymph
- (c) 26 hrs larvae immune-haemolymph
- (d) Hen-egg lysozyme

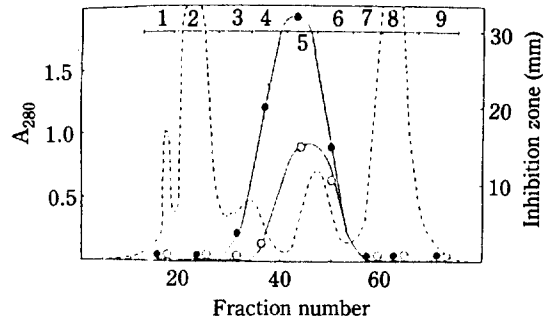


Fig. 6. Chromatographic elution profile of immune-haemolymph (26 hrs, 4.2 ml) on Sephacryl S-300 column (130x2cm) and eluted with 150mM ammonium acetate buffer, pH 5.0.

The fractions were assayed for antibacterial activity against *M. luteus* (● - ●), *E. coli* (○ - ○) and the absorbance at 280nm (----).

다(Fig. 6). Fig. 6에서 보는 바와 같이 분획 4, 5 및 6에서 두 세균에 대한 항균력을 인지할 수 있었으며 *E. coli*에 대한 항균력보다 *M. luteus*에 대한 항균력이 더 높게 나타났다. 이 분획들을 전기영동으로 분석해 본 결과 항균력이 가장 높은 5번 분획에서 2개의 band가 뚜렷이 나타났다(Fig. 7).

Gel filtration에서 항균력이 있는 4, 5 및 6번 분획을 모아 다시 CM-Sephacryl S-300 column으로 rechromatography를 실시하여 6개의 분획으로 나누었으며 (a~f) 각 분획의 항균력을 측정하여 본 결과 e와 f 분획에서 확인되었다(Fig. 8).

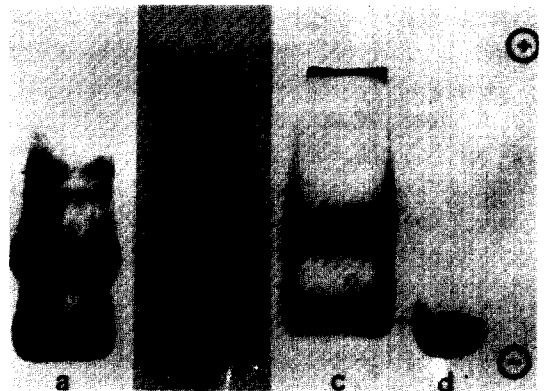


Fig. 7. Acid electrophoresis of immune-haemolymph in the course of purification on 15% polyacrylamide gel at pH 4.0.

- (a) 26 hrs larvae immune-haemolymph
- (b) Pooled fraction 4 from Fig. 6
- (c) Pooled fraction 5 from Fig. 6
- (d) Hen egg lysozyme

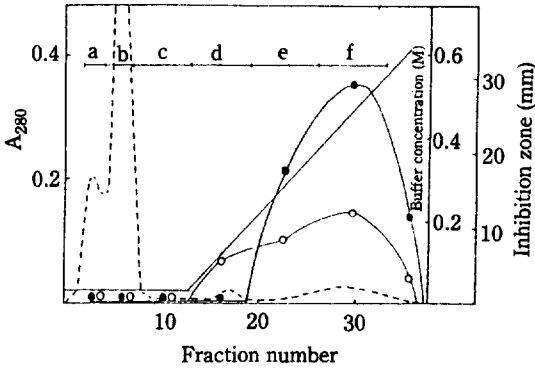


Fig. 8. Cation exchange rechromatographic elution profile of Pool 4,5 and 6 from Sephacryl S-300 on CM-Sephacryl CL-6B (23x1 cm) with a gradient (0.05-0.7M) elution of ammonium acetate buffer, pH 5.0.

The fractions were assayed for antibacterial activity against *M. luteus* (●-●), *E. coli* (○-○) and the absorbance at 280nm (---).

고 찰

일반적으로 곤충류의 경우 몇종의 세균에 대한 자기방어 기작에 대하여 많은 연구가 되어 왔으며, 특히 나비목 중 비단 나방류와 메뚜기목에 관한 연구(Boman *et al.*, 1974; Faye *et al.*, 1975; Hoffmann, 1980)가 대부분을 이루고 있다. 그 중에서도 *Samia cynthia*와 *Hyalophora cecropia*에 멸균된 물과 세균을 주입시킴으로써 항균물질을 유도할 수 있었고, 비병원성 세균을 체내에 주입시킴으로써 서로 다른 10가지 정도의 단백질이 유도 생성되었으며, 이 물질을 총괄하여 proteolytic lysozyme이라고 보고하였다(Faye *et al.*, 1975; Hultmark *et al.*, 1980)

본 연구에서도 살아있는 비병원성 세균인 *E. coli*를 유충 체내에 주입하여 얻은 체액 내의 항균물질이 한 종의 세균에만 특이하게 작용을 하는지, 혹은 여러 종의 세균에 대하여서도 공통적으로 작용을 하는지를 실험해 본 결과, 체액 내에 유도 생성된 lysozyme 성질성 물질의 존재를 확인할 수 있었으며 면역에 의해 유도 생성된 항균물질은 면역을 준 세균이외에도 여러 종의 세균에 대하여서도 넓은 항균력을 나타내었다(Fig. 3, Fig. 4).

Pye와 Boman(1977) 등은 이들 물질이 사람의 보체와 같이 연쇄적으로 활성화되어 항균작용을

나타낸다고 보고하였고, 상처를 주었을때 생성되는 몇몇 종류의 물질은 세균을 주입했을때 생성되는 단백질의 전구물질이라고 보고하고 있으며(Faye & Wyatt, 1980; Boman *et al.*, 1981), 이들 물질의 합성은 fat body cell에서 이루어진다고 보고된 바 있다(Dunn *et al.*, 1985). 최근에 이르러 환형동물을 위시하여 주로 나비목의 다른 종에 대한 면역기작에 관하여 많은 연구가 진행 중이며(Verno *et al.*, 1983, 1984; Knaap *et al.*, 1983; Hurlbert *et al.*, 1984; Vaillier *et al.*, 1985), 이들 연구의 대부분은 변태 과정 중 번데기 상태에 관한 것으로, 본 연구의 실험재료인 *L. illustris* 유충과 번데기의 항균력을 비교 분석한 결과 유충의 항균력이 번데기의 항균력보다 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 4, 5).

지금까지 항균물질에 관한 연구는 *H. cecropia*에서 가장 많이 보고된 바 있고, lysozyme을 비롯하여 cecropin(Rasmuson & Boman, 1979; Hultmark *et al.*, 1980, 1982; Steiner *et al.*, 1981)과 attacin(Hultmark *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1983; Engstrom *et al.*, 1984)이란 서로 다른 항균물질이 알려졌으며, 항균력이 가장 높은 주요 물질은 cecropin A, B 및 D로서 분자량이 작은 4Kd의 염기성 단백질이라고 보고하였고, attacin은 염기성과 산성 또는 중성의 두가지 형태가 있으며 분자량은 20Kdal 정도로 알려졌다(Boman *et al.*, 1985). 이들 보고와 본 연구의 결과와 비교하여 볼 때, *L. illustris* 경우 Fig. 6의 결과에서와 같이 그람양성 및 음성세균에 대한 항균작용의 범위가 일치하는 하고 있으나 상기 항균작용을 나타내는 체액의 chromatogram상으로 볼 때 적어도 2가지의 물질이 포함될 가능성이 있다고 생각된다.

한편 Okada 및 Natori(1984, 1985a, 1985b)는 *Sarcophaga peregrina*로부터 Sarcotoxin I를 유도한 후 이 물질을 HPLC로 분석한 결과 IA, IB와 IC의 3가지 물질로 구성되어 있다고 보고한 바 있고, 본 실험에서 얻은 항균물질의 경우 본 실험에서 재료로 사용한 *L. illustris*가 보고된 *S. peregrina*와는 계통상 근연종이고 또한 chromatography에서 2가지 물질일 가능성을 내포하고 있었으므로 위와 같은 방법으로 분석할 경우

몇가지의 아형(subtype)으로 나누어 질 가능성도 있다고 생각된다.

본 연구에 사용한 *L. illustris*의 normal-haemolymph에 있어서는 상처나 면역을 행하지 않아도 *M. luteus*에 대한 항균력이 존재하고 있었으며 injured-haemolymph에서는 상처를 준 뒤 점차적으로 증가하였다(Fig. 2). 또한 Zachary & Hoffman(1984)의 결과에서와 같이 *E. coli*에 대한 항균력은 없었다. 비병원성이면서 살아있는 *E. cloacae*와 죽은 *P. aeruginosa*를 각기 면역을 시켰을 때 유도 생성되는 항균물질에 대하여 여러 균주를 사용하여 분석하여 본 결과 동가의 항균력을 나타내었다(Hoffmann *et al.*, 1981).

지금까지 보고된 연구 중에서 실험균주로 사용한 *E. coli*는 LPS(lipopolysaccharide)층이 없는 돌연변이 개체를 사용한 것으로 본 실험에서 사용한 정상 *E. coli* K-12보다는 항균력이 높게 나타났다(Monner *et al.*, 1971; Boman & Monner, 1975). Lysozyme은 정상적으로 gram

negative 세균에 대해서는 항균력이 없는데 비하여 *L. illustris*에 면역을 준 뒤 26시간째의 immune-haemolymph의 경우 *B. subtilis*에 대해서는 항균력이 거의 없었지만 *M. luteus*에 대하여서는 normal과 injured-haemolymph의 경우보다 항균력이 높게 나타났고 원래 존재하지 않았던 *E. coli*에 대한 항균력도 높게 나타났다. 이들 항균물질에 관하여 채혈된 체액과 비교하여 볼 때 ammonium acetate buffer의 산성 pH(pH4 이하)에서 열에 강한 안정성을 나타내었다. 정제 과정에서 얻은 유도 생성된 항균물질을 lysozyme과 비교하여 볼 때 분자량과 하전 면에서 비슷한 성질을 갖고 있는 염기성 단백질이라고 생각되었다. 이러한 결과로 보아 *L. illustris*는 정상적인 상태에서 채액 내에 lysozyme과 기능적으로 유사한 물질이 존재하고 있으며 세균으로 면역을 실시한 후 그람 양성 및 음성세균을 모두 용균시킬 수 있는 비교적 광범위한 작용 영역을 갖는 이질적인 물질이 유도되어 자기방어 기작을 수행하는 것으로 생각된다.

적 요

정상 상태의 연두금 파리(*Lucilia illustris*) 제3령충의 체액(normal-haemolymph)으로 부터 그람양성 세균에 대하여 항균력이 있는 lysozyme(or lysozyme-like substance)을 확인하였으며 체액을 손상시킨 체액(injured-haemolymph)의 경우 그 항균력이 증가 되었다. 특히 비병원성 세균인 *Escherichia coli* K-12로 면역하여 얻은 체액(immune-haemolymph)의 경우 injured-haemolymph보다 그람양성 세균에 대하여 더 높은 항균력을 보였을 뿐만 아니라 그람음성 세균인 *E. coli*에 대하여도 항균력을 나타내었다.

Immune-haemolymph로 부터 유효 분획을 얻고 이에 대한 성상을 분석하기 위하여 Sephacryl S-300 및 CM-Sephacryl CL-6B로 분리시킨 결과 상기 항균물질은 염기성 단백질로서 산성하에서 내열성의 성질을 나타냈다.

REFERENCES

1. Boman, H.G., I.N. Faye, K. Paul and T. Ras-muson, 1974. Insect immunity. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in haemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infect. Immun.* **10**, 136-145.
2. Boman, H.G. and D.A. Monner, 1975. Characterization of lipopolysaccharides from *Escherichia coli* K-12 mutants. *J. Bacteriol.* **121**, 455-464.
3. Boman, H.G., A. Boman and A. Pigon, 1981. Immune and injury responses in *Cecropia* pupae-RNA isolation and comparison of protein synthesis *in vivo* and *in vitro*. *J. Insect. Physiol.* **13**, 1511-1537.
4. Boman H.G., I.N. Faye, P.V. Hofsten, K. Kockum, J.Y. Lee and K.G. Xanthopoulos, 1985. On the primary structures of lysozyme, cecropins and attacins from *Hyalophora cecropia*. *Develop. Comp. Immunol.* **9**, 551-558.
5. Cooper, E.L., 1985. Overview of humoral factors in invertebrates. *Develop. Comp. Immunol.* **9**, 577-583.
6. Dunn, P.E., W. Dai, M.R. Kanost and C. Geng, 1985. Soluble peptidoglycan fragments

- stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*. *Develop. Comp. Immunol.* **9**, 559-568.
7. Engstrom, A., P. Engstrom, Z.J. Tao, A. Carlsson and H. Bennich, 1984. Insect Immunity. The primary structure of the antibacterial protein, attacin F and its relation to two native attacin from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **3**, 2065-2070.
 8. Faye, I.N., A. Pye, T. Rasmuson, H.G. Boman and I.A. Boman, 1975. Insect Immunity. Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some haemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infect. Immun.* **12**, 1426-1438.
 9. Faye, I.N. and G.R. Wyatt, 1980. The synthesis of antibacterial proteins in isolated fat body from *Cecropia* silkworm pupae. *Experientia.* **36**, 1325-1326.
 10. Gabriel, O., 1971. Analytical disc gel electrophoresis. *Methods in Enzymol.* **22**, 565-578.
 11. Hoffmann, D., 1980. Induction of antibacterial activity in the blood of the migratory locust *Locusta migratoria* L. *J. Insect. Physiol.* **26**, 539-549.
 12. Hoffmann, D., D. Hultmark and H.G. Boman, 1981. Insect Immunity. *Galleria mellonella* and other Lepidoptera have *Cecropia* -P9-like factors active against gram negative bacteria. *Insect. Biochem.* **11**, 537-548.
 13. Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson and H.G. Boman, 1980. Insect Immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from haemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **106**, 7-16.
 14. Hultmark, D., A. Engstrom, H. Bennich, R. Kapur and H.G. Boman, 1982. Insect Immunity. Isolation and structure of Cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. *Eur. J. Biochem.* **127**, 207-217.
 15. Hurlbert, R.E., J.E. Karlinsey and K.D. Spence, 1984. Differential synthesis of bacteria-induced proteins of *Manduca sexta* larvae and pupae. *J. Insect. Physiol.* **29**, 205-215.
 16. Knaap, W.P.W., A.M.H. Boots, L.A. Asselt and T. Sminia, 1983. Specificity and memory in increased defence reactions against bacteria in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Develop. Comp. Immunol.* **7**, 435-443.
 17. Kubo, T., H. Komano, H. Okada and S. Natori, 1984. Identification of hemagglutinating protein and bactericidal activity in the hemolymph of adult *Sarcophaga peregrina* on injury of the body wall. *Develop. Comp. Immunol.* **8**, 283-291.
 18. Lee, J.Y., T. Edlund, I.N. Faye and H.G. Boman, 1983. Insect Immunity. Isolation of cDNA clones corresponding to attacins and immune protein P4 from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **2**, 577-581.
 19. Monner, D.A., S. Jonsson, H.G. Boman, 1971. Ampicillin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12 with lipopolysaccharide alterations affecting mating ability and susceptibility to sex-specific bacteriophages. *J. Bacteriol.* **107**, 420-432.
 20. Okada, M. and S. Natori, 1984. Mode of action of a bactericidal protein induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem J.* **222**, 119-124.
 21. Okada, M. and S. Natori, 1985(a). Ionophore activity of sarcotoxin I, a bactericidal protein of *Sarcophaga peregrina*. *Biochem. J.* **229**, 453-458.
 22. Okada, M. and S. Natori, 1985(b). Primary structure of Sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *J. Biol. Chem.* **260**, 7174-7177.
 23. Pye, A.E. and H.G. Boman, 1977. Insect Immunity. Purification and partial characterization of immune protein P5 from haemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae. *Infect. Immun.* **17**, 408-414.
 24. Qu, X.M., H. Steiner, A. Engstrom, H. Bennich and H.G. Boman, 1982. Insect Immunity. Isolation and structure of Cecropins B and D from pupae of the chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi*. *Eur. J. Biochem.* **127**,

- 219-224.
25. Rasmuson, T. and H.G. Boman, 1979. Insect Immunity. Purification and some properties of immune protein P4 from haemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae. *J. Insect. Physiol.* **25**, 259-264.
26. Rheins, L.A. and R.D. Karp, 1985. Ontogeny of the invertebrate humoral immune response: Studies on various developmental stages of the American cockroach. *Develop. Comp. Immunol.* **9**, 395-406.
27. Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich and H.G. Boman, 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature.* **292**, 246-248.
28. Vaillier, J., M.A. Cadoret, P. Roch and P. Vallembois, 1985. Protein analysis of earthworm coelomic fluid. III. Isolation and characterization of several bacteriostatic molecules from *Eisenia fetida andrei*. *Develop. Comp. Immunol.* **9**, 11-20.
29. Verno, P.J., W.P. Aston and J.S. Chadwick, 1983. Transfer of immunity against *Pseudomonas aeruginosa* P11-1 in *Galleria mellonella* larvae.
30. Verno, P.J., J.S. Chadwick, P. Aston and G.B. Dunphy, 1984. The *in vitro* generation of an antibacterial activity from the fat body and haemolymph of non-immunized larvae of *Galleria mellonella*. *Develop. Comp. Immunol.* **8**, 537-546.
31. Yeaton, R.W., 1983. Wound response in insects. *Amer. Zool.* **23**, 195-203.
32. Zachary, D. and D. Hoffman, 1984. Lysozyme is stored in the granules of certain hemocyte types in *Locusta*. *J. Insect. Physiol.* **30**, 405-411.

(Received Oct. 27, 1987)