

Bacillus thuringiensis 항원들의 면역학적 분석

정재득 · 박정선 · 조영수 · 홍순복 · 이형환 · 조명환*
건국대학교 생물학과

Immunological Characterization of *Bacillus thuringiensis* Antigens

Jae-Deuk Jung, Jung-Sun Park, Young-Soo Jo, Soon-Bok Hong,
Hyung-Hoan Lee and Myung-Hwan Cho*

Department of Biology, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract — This study was carried out to immunologically characterize *Bacillus thuringiensis* (B.t) antigens. Protein patterns of ultrasonicated- antigens of *B. thuringiensis* subspecies using SDS-PAGE revealed marked similarities among all the strains analyzed except for the difference between quantitative variations of bands and some protein antigens. The comparison of the protein patterns showed that the protein antigen of 45 kilodalton (kd) was common in 11 strains and that the difference between *B. thuringiensis* subsp. *canadensis* and *galleriae* was noticed in quantitative variations of bands despite of ambiguous serogrouping, suggesting a useful method for identification. All strains examined showed similar antigenic patterns in SDS-PAGE, while immunodominant bands differed in antigenic reactivity in western blot using polyclonal antibodies. Polyclonal antibody to *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* and *israelensis* in indirect immunofluorescence assay reacted with flagella and cell surface antigens. The present study indicates that SDS-PAGE and western blot analysis may be used as tools for differentiation and identification of *B. thuringiensis* subspecies.

*Bacillus thuringiensis*는 주모성 편모를 갖는 그람 양성 간균이고, 아포와 결정성 단백질을 지닌 호기성 세균으로서 아포 형성시기에 나타나는 당단백질인 결정체 단백질은 인시류와 쌍시류 초시류에 살충 효과가 있으며(1-3), 항종양효과와 면역반응을 증진시키는 특성을 지니고 있다(4, 5). *B. thuringiensis*는 *Bacillus cereus*와 매우 유사하여 보편적인 생화학적인 방법으로는 구별이 어려우나, crystal이 형성되는 것과 곤충에 살충효과가 있는 점으로 구별된다(6). *Bacillus* 분리균주들은 형태학적, 생화학적인 특성으로 분류하였고(7), 그 이후로는 편모항원에 대한 항혈청을 만들어 혈청학적인 방법과 생화학적인 방법을 보완하여 30 아종으로 동정되었다(8). 최근에는 polymerase chain reaction(PCR)를 이용하여 새로운 *B. thuringiensis* 균주들을 동정하고 새로운 분리균주들의 살충효과를 예측하는데 이용된다(9). *Bacillus* 속에서 종을 동정하기 위해서 아포항원은 영양형 세포의 항원보다

유용하다고 했다(10). *B. thuringiensis* var. *alesti*의 내독소, 영양형 세포, 정제된 내독소를 분리하여 각각에 대한 항혈청을 생산하여 Ouchterlony 이중확산 실험에서 내독소와 아포는 하나 또는 그 이상의 공통의 단백질을 지닌다고 제시했고(11), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 용해된 내독소 영양형 세포 및 기타 여러 물질에서 미생물 살충제로 이용되는 내독소의 양을 측정하는데 로켓 면역전기영동은 특이하고 신뢰성 있는 방법으로 보고된 바 있다(12). *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주에 의해 생성된 내독소 단백질간의 면역학적 관계를 살펴보기 위해 전기영동한 결과에 따르면 28, 70 및 135 kd의 단백질들은 모기에 독성효과를 갖게 되는데, 28 kd 단백질은 26, 25, 23 및 22 kd으로 분해되고, 70 kd 단백질은 38 kd으로 분해되고, 135 kd 단백질은 94, 72, 65 kd으로 분해되고(13), 유충에 독성효과를 갖는 것은 26, 28 kd 단백질과 65 또는 135 kd 단백질의 상승효과 때문이라고 했고(14), 일반적으로 세포독성 또는 용혈성의 활성은 28 kd 단백질이라고 보고되었다(15).

Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 미생물의 종을 동정하는데 유용한 방법으로(16) 가용성

Key words: *Bacillus thuringiensis*, polyclonal antibodies, common antigen, immunodominant antigen, flagella and cell surface antigen

*Corresponding author

단백질을 전기영동하여 유사한 세균들을 분류하는데 이용된다(17). DNA들간의 혼성화 실험으로 상동성을 기초로 분류한 그룹과 PAGE에 의해 분류된 그룹을 비교한 결과 아주 유사함을 보여주었다(18). Immunoblotting으로 균주들간의 폴리펩티드 내의 항원과 동일성 여부를 파악할 수 있으므로 세균들간의 항원관계를 알아보는데 유용한 방법이다(19).

면역형광물질을 이용한 연구에서 4종류의 *B. cereus* 균주들 가운데서 *B. anthracis*를 분류하기도 했고(20), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 63 kd 내독소는 *Heliothis virescens*의 중장과 말피기세관에서 결합부위를 알아보기 위해서 광학면역현미경을 이용한 결과 내독소는 특이한 막 부위에 결합하지 않고 노출된 모든 혈장막에 결합되어 있고 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 내독소 수용체는 상피세포의 정점 표면에 널리 분포되어 있음을 암시해 주었다(21).

아직까지 *B. thuringiensis* 균주들 간의 영양형 세포 항원에 대한 분석이 거의 없는 상태이므로 본 연구에서는 *B. thuringiensis* 균주들의 whole cell을 분쇄한 후 전기영동하여 항원 단백질의 양상을 비교 분석하고 BALB/c 마우스에서 생산된 다클론 항체를 이용하여 Immunoblotting을 시행하였고 간접면역형광법을 통해 항원의 분포를 분석하기 위해 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 실험동물

본 실험에 사용된 균주는 미국 오하이오 주립대학에 있는 *Bacillus* Genetic Stock Center의 Donald H. Dean 박사와 프랑스 파스퇴르 연구소의 de Barjac 박사로부터 분양받아 냉동고(-70°C)에 보관된 *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, *sotto*, *galleriae*, *canadensis*, *ostrinae*, *tolworthi*, *israelensis*, *indiana*, *yunnaensis*, *neoleonensis*, *amagiensis*과 *leesis* 균주들을 사용했다. 실험동물은 본 실험실에서 사육하고 있는 6~7주 된 BALB/c 마우스들을 면역처리용으로 사용했다.

면역처리용 항원 제조

보관된 *B. thuringiensis* 균주들을 brain heart infusion(BHI) 배지에 접종하여 28°C에서 초기대수기까지 180 rpm으로 진탕배양했다. 배양한 균주들의 편모 운동성을 높이기 위해 초자관(3×70 mm)이 들어 있는 Craigie tube에 0.2% 운동성 배지를 사용했다(6). 배양된 균주들을 파스퇴르 피펫으로 초자관에 접종하여

Craigie tube의 운동성 배지 표면으로 이동한 운동성이 강한 균들을 nutrient broth(NB) 배지에 접종하여 28°C에서 $10^8 \sim 10^9$ cells/ml 정도로 배양 후 $1,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)로 현탁시켜 2×10^7 cells/ml이 되도록 조정했다. 최종농도가 0.5%가 되도록 포르말린을 가하여 4°C에서 보관하여 면역용 항원으로 사용했다.

항혈청 제조

면역용 항원을 동량의 Freund's complete adjuvant (Gibco Lab., Grand Island, N.Y., U.S.A.)와 혼합하여 2×10^7 cell 들이 되도록 희석시킨 후 6~7주 된 BALB/c 마우스의 복강을 통해 주사하였다. 3주 후 항원과 동량의 Freund's incomplete adjuvant(Gibco Lab., Grand Island, U.S.A.)를 혼합하여 복강을 통해 주사 후 10일째 BALB/c 마우스의 꼬리에서 채혈하여 간접면역형광법을 이용해서 역가가 1,000 이상인 BALB/c 마우스의 복부 중양을 절개한 후 주사기를 이용하여 심장부위에서 혈액을 모아 $1,000 \times g$ 로 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 항혈청으로 -20°C에 보관하여 사용했다.

*B. thuringiensis*의 편모항원 제조

de Barjac(6), Nowotony(22) 및 Lövgren(32) 방법을 이용하여 편모 항원을 제조하였다. 배양된 *B. thuringiensis* var. *israelensis*와 *thuringiensis*의 편모 운동성을 높이기 위해 0.4% agar가 함유된 반고체 배지를 채운 Craigie tube의 inner tube(3×70 mm)에 멸균된 파스퇴르 피펫을 이용하여 접종시킨 후 28°C에서 배양시켜 Craigie tube의 inner tube 바깥 쪽에서 성장한 균을 다른 반고체 배지의 Craigie tube로 접종하여 최종적으로 Craigie tube의 inner tube 바깥 쪽에 14~16시간에 성장한 운동성이 좋은 균들을 Luria-Bertani(LB : Difco Lab., Detroit, Michigan, U.S.A.)의 1,000 ml 배지에 접종하여 28°C, 150 rpm으로 회전진탕배양하여 $10^6 \sim 10^9$ cells/ml 정도로 배양 후, $1,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)로 현탁시켜 최종농도가 0.5% 되도록 포르말린으로 4°C에서 24시간 고정시켰다. Magnetic stirrer를 이용하여 고정된 균들의 편모를 떨어뜨렸다. 편모와 세포를 분리하기 위해 $1,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리 후 상층액을 취해 $25,000 \times g$ 에서 2시간 원심분리하여 침전물을 멸균된 증류수로 현탁시킨 후, 1 N HCl로 pH 2가 되도록 조정하여 실온에서 30분간 정치시켰다.

그 후 35,000×g에서 1시간 원심분리시킨 후 상층액을 1 N NaOH로 pH 7로 중화시켜 편모항원으로 사용하였는데, *thuringiensis*의 경우는 편모와 세포를 분리하기 위해 10,000×g에서 15분간 원심분리 후 상층액을 취해 100,000×g에서 1시간 동안 원심분리 후 침전물을 50 mM ammonium hydrogen carbonate buffer로 현탁시켜 편모항원으로 사용하였다.

SDS -PAGE를 이용한 항원 분석

분쇄된 세포벽구성단백질을 4.6% SDS, 20% glycerol, 10% mercaptoethanol 및 0.1% bromophenol blue 및 1 M Tris-HCl(pH 6.8)로 구성되어 있는 sample buffer와 1:1 또는 1:5가 되도록 혼합하여 100°C에서 5분간 반응시킨 후 10,000×g에서 30초간 원심분리하여 시료로 준비했다. SDS-PAGE는 Laemmli(23)의 방법에 따라 SE 245-Might Small II slab-gel apparatus(Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, CA, U.S.A.)를 이용하여 시행하였다. 세포벽구성단백질은 Micro BCA protein assay reagent(Pierce, Rockford, IL, U.S.A.)에 의해 단백질을 정량하여 각 well에 20~30 µg의 단백질을 10 µl 씩 well에 넣어 전개시켰다. 세포벽 구성단백질은 5% stacking gel과 10% 또는 12.5% separating gel로 구성된 gel에 표준분자량(Bio-Rad Lab., Richmond, CA., U.S.A.)과 함께 100 V(15 mA)로 전개시킨 후, gel을 coomassie blue R-250(Bio-Rad)로 염색하거나 silver staining 하여 항원단백질을 분석했다.

Immunoblotting 용 항원 제조

보관된 균주들을 BHI 배지에 접종 후 28°C, 180 rpm, 20시간으로 진탕배양한 균들을 NB 배지에 10⁶~10⁹ cells/ml 되도록 대량 배양했다. 배양된 균들을 1,000×g로 30분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 PBS로 현탁시켰다. 이런 과정을 2회 반복했다. 침전된 세균들은 1 M NaCl과 0.01% Triton X-100 혼합용액으로 현탁시킨 후, 초음파 분쇄기(Braun-sonic 1510 Grandview Drive, South San Francisco, CA., U.S.A.)를 이용하여 200 watt에서 30초씩 15회 시행하여 위상차현미경으로 분쇄된 상태를 확인했다. 분쇄된 균체들을 10,000×g에서 10분 동안 4°C에서 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브로 옮겨 단백질을 정량한 후 분주하여 -20°C에 보관 후 immunoblotting 용 항원으로 사용했다.

Immunoblotting

Towbin(24)의 방법에 따라 SDS-PAGE로 전개된

gel을 transfer electrophoresis kit(Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, U.S.A.)를 사용하여 transfer-buffer(15.6 mM Tris, 120 mM glycine)에서 100 V (30 mA)로 90분 동안 nitrocellulose paper에 전이시킨 후, amido black 염색액(0.1% amido black/25% isopropanol/10% acetic acid)에 1분간 염색 후 탈색액(25% isopropanol/10% acetic acid)으로 탈색시켜 단백질 전이를 확인하였다. Seal-A-Meal bag에 3% BSA/TBS 용액을 넣은 후 전이된 nitrocellulose paper를 넣어 3시간 동안 흔들어 반응시켜 blocking 시키고 Tris-buffered saline(TBS : 2 M Tris/HCl pH 7.5 ; 4 M NaCl)로 30분씩 3회 세척 후 0.5% BSA/TBS에 제조된 항혈청을 100 : 1로 희석하여 37°C에서 1시간 동안 흔들면서 반응시키고 TBS로 3회 세척한 후 0.5% BSA/TBS에 horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG+M(JacksonImmuno-Research Lab., Inc., West Grove, P.A, U.S.A.)을 1,000 : 1로 희석시켜 37°C에서 1시간 동안 반응시켜, TBS로 3회 세척 후 발색용액(30 mg chloronaphthol, 11 ml methanol, 5 ml TBS, 30 ml 30% H₂O₂)으로 반응시켰다.

간접면역형광법을 이용한 항원 분포 분석

Tilahun 등(25)의 방법을 변형하여 슬라이드 위에 *B. thuringiensis* var. *israelensis*와 *thuringiensis*를 백금으로 도말 후 실온에서 건조시킨 후 열을 가하여 고정시켰다. 농도별로 희석한 항혈청을 도말된 slide glass 위에서 40분간, 37°C humid chamber에서 반응시킨 후 PBS로 5분간 3회 반복하여 세척하고, 2차 항체로는 희석된 fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgA+IgG+IgM(Cappel, Organon Teknike Corp., West Chester, PA.)를 20분간, 37°C humid chamber에서 반응시킨 후 PBS로 5분 간격으로 3회 반복하여 세척했다. 세척된 슬라이드 위에 mounting buffer(10% glycerol/PBS)를 떨어뜨리고 cover glass를 덮은 후 형광현미경(Olympus BH-2, Japan)으로 항원 분포 패턴을 관찰하였다.

결과 및 고찰

SDS-PAGE를 이용한 *B. thuringiensis* 항원 분석

B. thuringiensis subsp. *canadensis*, *thuringiensis*, *sotto*, *galleriae*, *ostrinae*, *tolworthi*, *indiana*, *yunnaensis*, *neoleonensis*, *amagiensis*, *leesis* 항원들의 양상은 다음과 같다(Fig. 1). 모두 약 25~40개의 밴드들이 나타났는데 대부분의 균주들은 유사한 양상을 보였고,

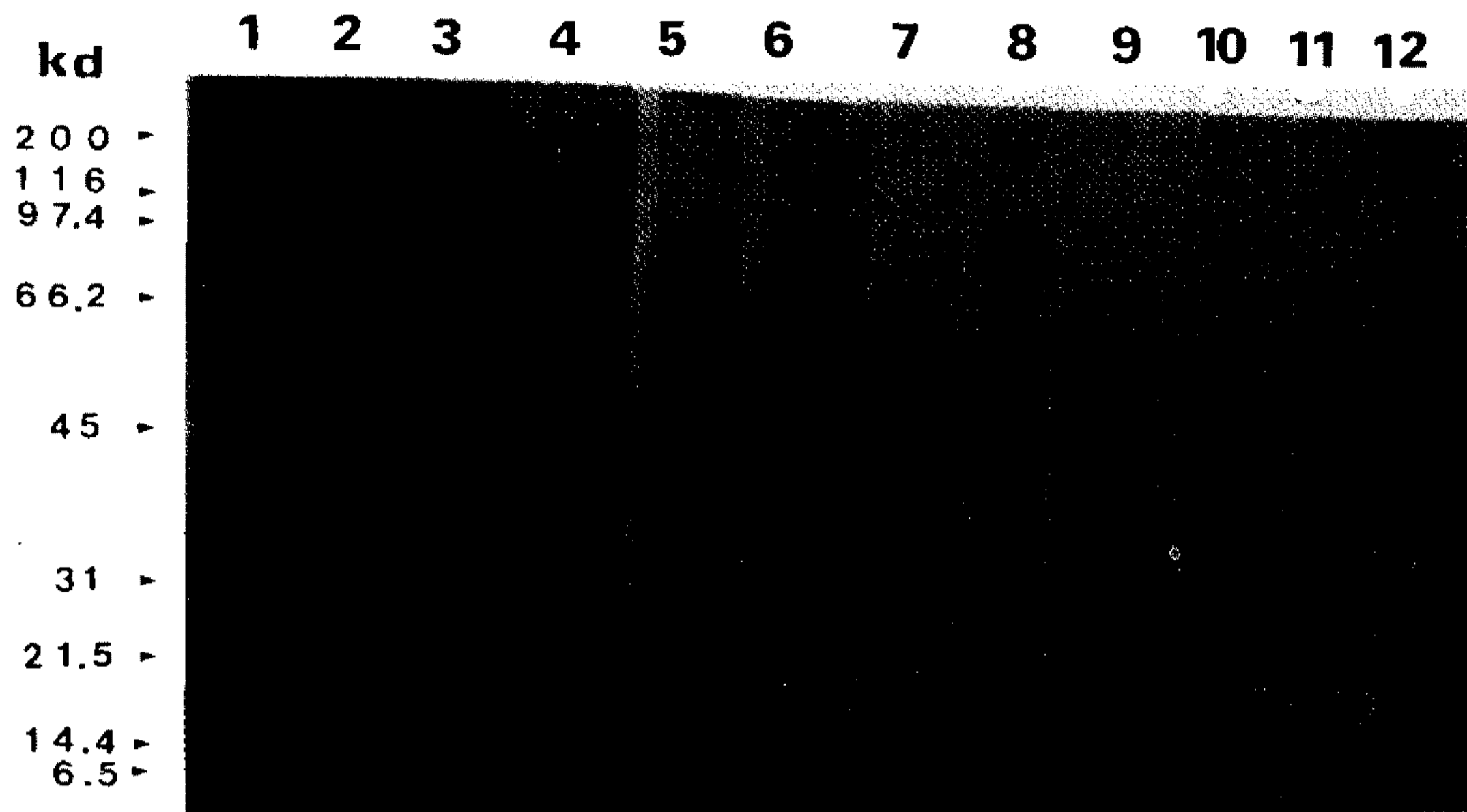


Fig. 1. Comparison of protein patterns determined by SDS-PAGE (10%) among different strains of *Bacillus thuringiensis*.

Lane 1: standard molecular weight markers (in kilodaltons), myosin (200), β -galactosidase (116), phosphorylase B (31), trypsin inhibitor (21.5), lysozyme (14.4), aprotinin. lane 2: *canadensis*, lane 3: *thuringiensis*, lane 4: *sotto*, lane 5: *tolworthi*, lane 6: *indiana*, lane 7: *ostrinae*, lane 8: *yunnanensis*, lane 9: *neoleonensis*, lane 10: *amagiensis*, lane 11: *leesis*, lane 12: *galleriae*.

항원양에 따라 염색되는 정도에 차이가 있음을 알 수 있다. *neoleonensis*와 *amagiensis*는 거의 유사한 양상을 보였으나, *neoleonensis* 균주의 31 kd, *amagiensis* 균주의 59 kd, 34 kd은 균주들간의 차이점으로 나타났고, *tolworthi*와 *indiana*는 거의 유사한 양상을 보이지만, *tolworthi* 균주의 160 kd, *indiana* 균주의 116 kd은 균주들간의 차이점으로 나타났다.

흥미로운 사실은 *B. thuringiensis* subsp. *canadensis*와 *galleriae*는 혈청학적으로 구별이 어려울 정도로 유사하다고 보고되어 있는데(26), 본 연구에서는 전기영동을 통해 *canadensis*는 61, 58, 42, 28 kd의 밴드, *galleriae*는 82, 61, 46, 44, 37, 18, 17, 4 kd의 밴드가 진하게 염색되어 쉽게 구별이 가능하게 되었다. Fig. 1에서는 SDS-PAGE를 시행한 *canadensis*를 포함한 균주들은 45 kd을 주요 공통항원으로 진하게 염색되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 42 kd은 *thuringiensis*와 *galleriae*를 제외한 9균주에서 공통항원으로 존재하는 것을 확인할 수 있었다. Smith 등(27)에 의하면 그람양성 혐기성구균의 대표적인 종으로 한 종류의 *Peptostreptococcus* 균주와 세 종류의 *Peptococcus*를 EDTA로 추출하여 전기영동한 결과 76 kd과 78 kd 사이의 범위에 이르는 항원단백질이 공통적인 주요한 항원으로 진하게 염색되는 반면, Sompolinsky 등(28)에 따르면 두종의 그람양성균과 *Pseudomonas aeruginosa*을 비롯한 29종의 그람음성균은 59~62 kd과

62~65 kd이 공통항원으로 존재한다고 보고되었다.

본 연구에서는 전기영동을 통해 *B. thuringiensis* 균주들간의 유사성, 특히 항원 및 공통항원을 파악하여 분리할 수 있음을 제시하여 주었다. 또한 다른 많은 균주들을 구분하는데 전기영동기법을 이용하는 것은 혈청학적인 방법보다 유용한 점이 있다는 것을 암시해 준다. 이런 결과는 Mulligan 등(29)의 결과가 뒷받침 해주고 있다. 따라서 균주들은 분류하는데 있어서 혈청학적인 방법과 전기영동을 통한 항원 분석이 병행되는 것이 이상적이라는 것을 제시해 주고 있다.

SDS-PAGE에 의한 *B. thuringiensis*의 편모항원 분석

일반적으로 세균의 편모 분자량은 15~62 kd(30)으로 보고되어 있는데 Lövgren 등(32)에 의하면 *B. thuringiensis* subsp. *alesti*는 32 kd의 편모항원을 지니고 있다고 규명했다. 본 연구에서도 *thuringiensis*와 *israelensis*의 편모항원을 정제하여 비교하였다(Fig. 2).

Fig. 2(A)에서 *thuringiensis*는 세포전체 항원들의 29개 밴드 중 280, 200, 103, 42, 41, 40, 37, 36, 34, 31, 30 kd 등 11개 밴드가 편모항원으로 나타났는데 그 중 42 kd은 주된 항원으로 사려되고, Fig. 2(B)에서 보는 바와 같이 *israelensis*는 세포전체 항원들의 24개 밴드 중 48, 32 kd 등 2개 폴리펩티드가 나타났으나,

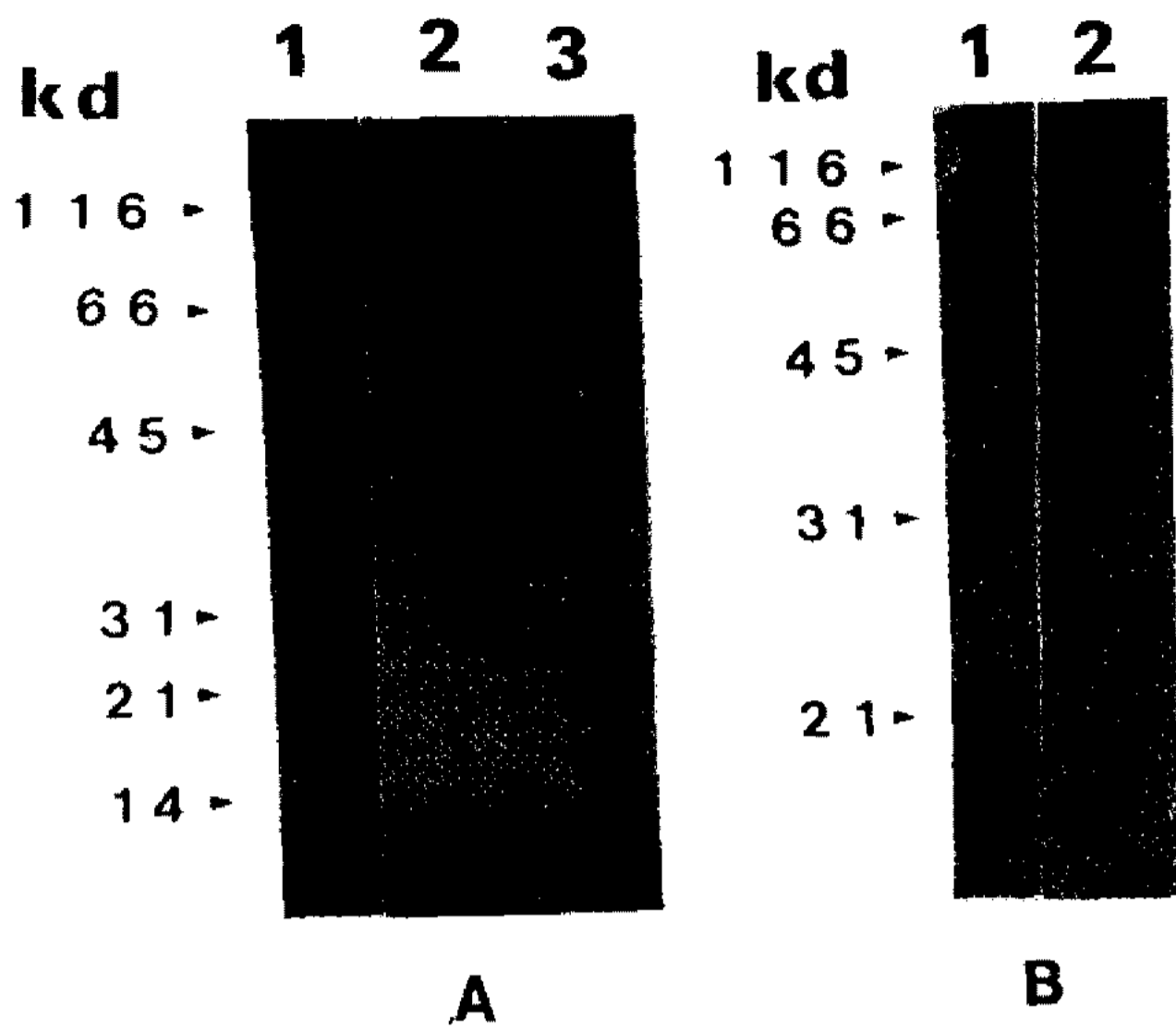


Fig. 2. Silver-stained polyacrylamide gel (10%) of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (A) and *israelensis* (B). Lane 1: standard molecular weight markers (in kilodaltons), lane 2: flagella antigens, lane 3: whole cell antigens.

32 kd이 주된 항원으로 사려된다.

Western blot을 이용한 *B. thuringiensis* 항원 분석

Triton X-100과 초음파를 이용하여 항원을 추출하는 방법은 유기용매, 계면활성제, 효소 등을 이용하는 방법보다 더 면역학적 활성을 나타내게 되므로(32) 본 연구에서도 전자의 방법으로 항원을 추출하여 SDS-PAGE로 nitrocellulose sheet에 전이시킨 후 western blot에 이용되었다. Fig. 1에서 보여준 것처럼 *B. thuringiensis* 균주들의 항원양상은 각 균주마다 항원분포가 다양하게 나타나게되므로 인식부위를 살펴보기 위해 western blot을 시행하였다. *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*(Fig. 3(A))는 52, 38, 27 kd 등 3개 밴드 가운데 38 kd, *israelensis*(Fig. 3(B))는 87, 82, 77, 73, 68, 36, 32 kd 등 7개 밴드 중 68 kd과 36 kd, *canadensis*(Fig. 4(A))는 99, 61, 55, 39, 32 kd 등 4개 밴드, *thuringiensis*(Fig. 4(B))는 62, 22, 20 kd 등 3개 밴드 중 62, 22 kd, 폴리펩티드가 주요한 항원으로 나타났다.

Western blot 분석에서 Fig. 4(B)에서 *thuringiensis*의 편모항원 42, 36 kd과 세포표면항원 71, 64, 50, 46, 28, 26 kd 등이 인지되었고, Fig. 3(B)에서처럼 *israelensis*의 표면항원 87, 82, 77, 73, 68, 36 kd과 편모항원 32 kd이 인지된 점으로 보아 *thuringiensis*와 *israelensis*는 편모항원과 세포표면항원과 반응이 일어났다는 것을 알 수 있다.

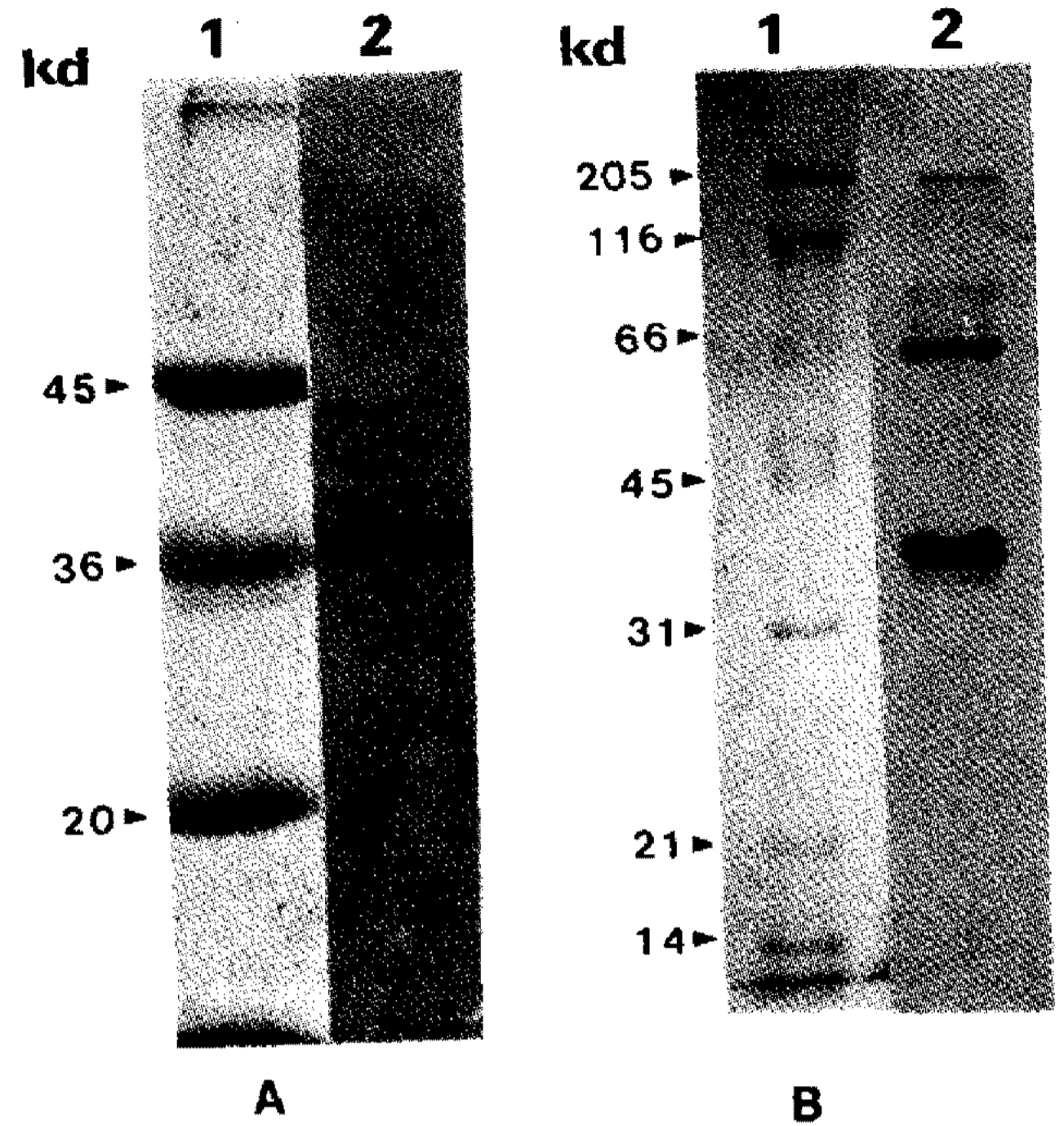


Fig. 3. Western blot of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* (A), *israelensis* (B) antigens reacted with polyclonal antibodies (lane 2) and standard molecular weight markers (lane 1).

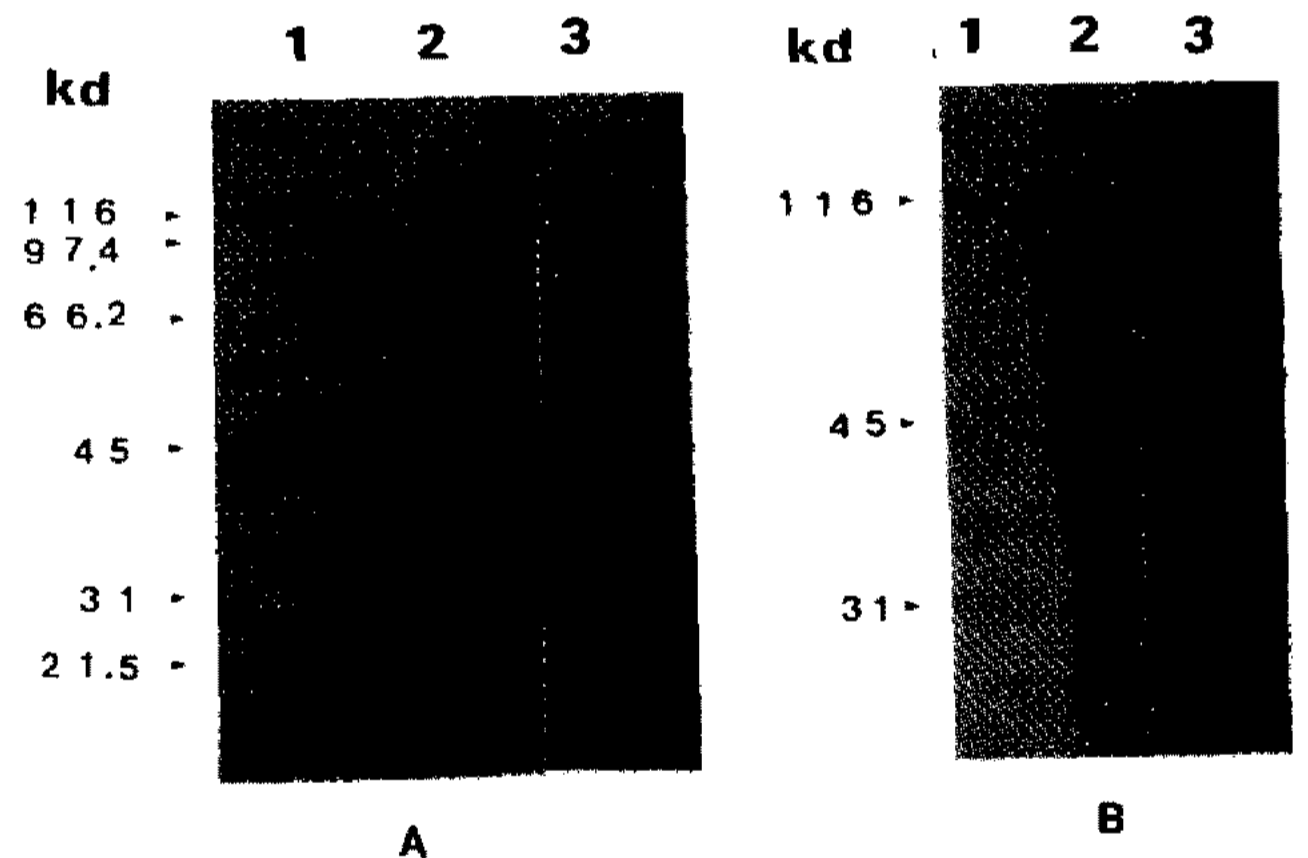


Fig. 4. Western blot of *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* (A), *thuringiensis* (B) antigens reacted with polyclonal antibodies (lane 3). Lane 1 and 2 show standard molecular weight markers and amido black-stained antigens transferred to nitrocellulose, respectively.

*israelensis*의 36 kd과 *canadensis*의 61 kd 등은 전기영동한 결과에서 항원단백질 양상은 희미하게 나타났지만, western blot에 의해 강하게 인식되는 것으로 볼 때 면역된 마우스의 면역체계에 인식되는 항원들이 다르다는 것을 입증해 주고 있다. Murakami 등(33)에 의하면 *B. cereus*에 대한 단클론 항체를 생산하여 정제된 *B. thuringiensis* subsp. *alesti*의 편모항원을 western blot 한 결과 61 kd을 인식했던 점과



Fig. 5. Indirect immunofluorescent appearance of air-dried *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* with polyclonal antibodies ($\times 1,980$).

Lövgren 등(31)은 *alesti*는 32 kd 편모항원을 지니고 있다고 규명한 점으로 미루어 보면 *canadensis*의 32 kd과 61 kd은 편모항원 중 하나로 추정할 수 있다.

따라서 *thuringiensis*와 *israelensis*는 항혈청에 의해 인식된 항원단백질은 세포표면과 편모항원에 반응했음을 제시해 주었고, 전기영동상에서 유사하게 나타났던 단백질 양상이 western blot에서는 보다 더 특이하게 면역반응이 일어나므로 아종들을 구별하는데 유용한 방법이 될 것이라 사려된다.

항원분포의 분석

*B. thuringiensis*의 혈청학적인 분류는 주모성인 편모항원을 바탕으로 이루어지기 때문에 항체를 생성하는 주된 항원으로 작용할 수 있다고 생각되어 *B. thuringiensis* 균주들에 대한 항혈청을 생산하여 인식하는 항원들의 분포를 분석하기 위해 간접면역형광법으로 형광현미경을 이용한 결과(Fig. 5) 세포표면과 편모에서 형광물질이 표지된 것으로 보아 세포표면이나 편모를 인식하고 있음을 확인했다. *thuringiensis*와 *israelensis*는 western blot에 의해 편모항원과 표면항원이 인식된 점으로 보아 다클론 항체가 편모항원과 표면항원을 인식하고 있음을 제시해 주고 있다.

요 약

B. thuringiensis 항원들의 면역학적 특성을 살펴

보기 위해 초음파를 이용하여 B.t 항원들을 분쇄하여 전기영동을 시행하였다. 단백질 양상은 균주들간에 아주 유사했으나, 밴드들의 양적인 차이와 몇 개의 분자량에 차이가 있음을 보여주었다. 단백질 양상들을 비교분석한 결과 B.t subsp. *canadensis*를 포함한 11 균주는 45 kd을 공통항원으로 지니고 있었고, *B. thuringiensis* subsp. *canadensis* 및 *galleriae*는 혈청학적으로도 구별하기 어렵지만 전기영동을 통해 두 균주들간의 차이는 양적인 변화로 쉽게 구별할 수 있는 것은 균주들을 동정하는데 하나의 유용한 방법임을 제시해 준다. 조사된 모든 균주들은 전기영동상에서 유사한 폴리펩티드 양상들을 보여준 반면, western blot에서는 항원들의 면역 반응에는 차이가 나타났다. 항원들의 분포를 살펴보기 위해 간접면역형광법을 이용한 결과 *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*와 *israelensis*는 편모항원과 세포표면항원에 반응한 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 SDS-PAGE와 western blot 분석은 아종들을 동정하는데 유용한 도구가 된다는 것을 제시해 주고 있다.

감사의 글

본 연구는 과학재단의 핵심연구과제와 건국대학교 일반연구비 지원으로 수행되었으며 깊은 감사드립니다.

참고문헌

1. Bulla, L.A. Jr., K.J. Kramer, and L.I. Davidson. 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **130**: 375-383.
2. Bechtel, D.B. and L.A. Bulla, Jr. 1976. Electron-microscopic study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **127**: 1172-1481.
3. Martin, P.A.W. and R.S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(10): 2437-2442.
4. Prasad, S.S.S.V. and Y.I. Shethna. 1974. Purification, crystallization and characterization of the antitumor and insecticidal protein subunit from the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Acta.* **363**: 558-566.
5. Prasad, S.S.S.V. and Y.I. Shethna. 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **62**: 517-523.

6. De Barjac, H. 1981. Identification of H-serotype of *Bacillus thuringiensis*, Pp. 39-42. In Microbial Control of pests and Plant diseases 1970-1980. H.D. Burges(ed.). Acad. press. New York.
7. De Barjac, H. and A. Bonnefoi. 1962. Eassi de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*. **7**: 5-31.
8. De Barjac, H. and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. **35**: 233-240.
9. Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola, and M.G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(11): 3057-3061.
10. Wolf, J. and A.N. Barker. 1968. The genus *Bacillus*: aids to the identification of its species, P. 93-109. In Identification methods for microbiologists, part B. B.M. Gibbs and D.A. Shapron (ed.). Acad. press, Inc., London.
11. Delafield, F.P., H.J. Somerville, and S.C. Rittenberg. 1968. Immunological homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **96**: 713-720.
12. Andrews, R.E. Jr., J.J. Iandolo, B.S. Campbell, L.I. Davidson, and L.A. Bulla, Jr. 1980. Rocket immunoelectrophoresis of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* supsp. *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**(5): 897-900.
13. Pfannenstiel, M.A., G.A. Couche, E.J. Ross, and K.W. Nickerson. 1986. Immunological relationships among proteins making up the *Bacillus thuringiensis* supsp. *israelensis* crystalline toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**(4): 644-649.
14. Wu, D., and F.N. Chang. 1985. Synergism in mosquitoicidal activity of 26 and 65 KDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Lett.* **190**: 232-236.
15. Davidson, E.W. and T. Yammamoto. 1984. Isolation and assay of the toxic component from the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Curr. Microbiol.* **11**: 171-174.
16. Albritton, W.L., X.P. Chen, and V. Khana. 1988. Comparison of whole cell protein electrophoretic profiles of *Haemophilus influenzae*: implementation of a microcomputer mainframe linked system and description of a new similarity coefficient. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1129-1134.
17. Moore, W.E.C., D.E. Hash, L.V. Holdeman, and E.D. Cato. 1980. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble proteins for studies of bacterial floras. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 900-9007.
18. Biavati, B., V. Scardovi, and W.E.C. Moore. 1982. Electrophoretic patterns of protein in the genus *Bifidobacteria* and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**: 358-373.
19. Whiley, R.A., R.R.B. Russell, J.M. Hardie, and D. Beighton. 1988. *Streptococcus downei* sp. nov. for strains previously described as *Streptococcus* mutants serotype h. *Int. syst. Bacteriol.* **38**: 25-29.
20. Böhm, R. and D. Strauch. 1974. Ein fluoreszenzserologischer Schnellenachweis von Milzbrandsporen durch die Anwendung der Mikrokulturmethode auf Nuchepore-filtern, *Zentralbl. Veterinaer-med, Reihe B.* **21**: 329-335.
21. Ryerse, J.S. and J.R. Beck, Jr. 1990. Light microscope immunolocalization of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin in the midgut and malpighian tubules of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. pathol.* **56**: 86-90.
22. Nowotony, A. 1986. Isolation of bacterial H-antigens, Pp. 67-68. In Basic exercise in immunochemistry(2nd ed.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
23. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature. London.* **227**: 680-685.
24. Towbin, H., T. Strehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamidegels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.
25. Tilahun, G. and P.H.G. Stockdale, 1982. Sensitivity and specificity of the indirect immunofluorescent antibody test in the study of four murine coccidia. *J. protozool.* **27**: 129-132.
26. De Barjac, H. and A. Bonnefoi. 1972. Presence of H-antigenic subfactors in serotype v of *Bacillus thuringiensis* with the description of a new type: *Bacillus thuringiensis* var. *canadensis*. *J. Invertebr. pathol.* **20**: 212-213.
27. Smith, G.L.F., C.G. Cuming, and P.W. Ross. 1986. Analysis of EDTA-soluble cell surface component of Gram-positive anaerobic cocci. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1591-1587.
28. Sompolinsky, D., J.B. Hertz, N. Hølby, K. Jensen, B. Mansa, and I. Samra. 1980. An antigen common to a wide range of Bacteria. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B.* **88**: 143-149.
29. Mulligan, M.E., S. Halebian, R.Y.Y. Kwok, W.C. Cheng, S.M. Finegold, C.R. Anselmo, D.N. Gerding, and L.R. Peterson. 1986. Bacterial agglutination and polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* **53**(2): 267-271.
30. Joys, T.M. 1989. The flagellar filament protein. *Can. J. Microbiol.* **34**: 452-458.
31. Lövgren, A., M-Y, Zhang, Å, Engström and R. Landén. 1993. Identification of two expressed fla-

- gellin genes in the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 21-30.
32. Nakazawa, F. and E. Hoshino. 1993. Immunological specificity of oral *Eubacterium* species. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2635-2640.
33. Murakami, T., K. Hiroka, T. Mikami, T. Matsu-
moto, S. Katagiri, K. Shinagawa, and M. Suzuki.
1993. Analysis of common antigen of flagella in
Bacillus cereus and *Bacillus thuringiensis*. *FEMS
Microbiol. Lett.* **107**: 179-184.

(Received 10 December 1994)