

균사 외피 항체를 이용한 *Streptomyces* 속 균주들의 혈청학적 유사성 분석

조성기 · 김재현*

단국대학교 미생물학 전공 및 기초과학연구소

Streptomyces 5균주 간의 유사도를 혈청학적 방법으로 측정하였다. 항원으로는 충분히 성장한 균체의 외피를 Tween 20으로 용출시킨 용액을 사용하였고 항체는 토끼를 면역시켜 얻었다. 면역확산과 ELISA 결과 항원-항체 반응의 정도가 균주간의 분류학적 유사성과 비례적으로 반영되지 않았다. 즉 군집 A에 속하는 균주들 사이의 항원-항체 반응이 낮게 측정된 반면에 군집 F의 *Streptomyces lavendulae*와 군집 A의 *Streptomyces viridochromogenes*가 특이적으로 비교적 높게 나타났다.

Key words □ envelope antigen, serological correlation, similarity, *Streptomyces*

*Streptomyces*는 균사체 형태로 성장하는 세균으로써, 균사체 발달과 포자 형성의 복잡한 생활사를 갖고 있다. 또한 *Streptomyces*는 수많은 항생 물질의 생산 균으로도 잘 알려져 있고 이 또한 생활사의 전환과 관련이 있다고 생각되고 있다. 그렇기 때문에 *Streptomyces*는 세균 분화를 연구하는데 필요한 모델일 뿐만 아니라 새로운 항생 물질을 탐색하는 재료가 되기도 한다(2).

그리고 새로운 *Streptomyces* 균주의 발견이 새로운 유용물질의 발견과 이어질 수 있다는 신념은 학자들로 하여금 많은 수의 균주를 분리하게 하였고 이들의 체계적 분류는 필수적으로 뒤따른 과제였다(10). 이를 위하여 International Streptomyces Project를 수행하여 균주의 형태적 생리적 특성을 객관적으로 기술하였고(9), 균체 성분의 공통점을 체계화하여 화학적 분류 기준이 확립되었다(3). 그러나 약 600 종에 이르는 *Streptomyces*는 과도하게 세분화(overspeciation)되었다는 인식 아래 다양한 형태적 생리적 검사 결과를 동등한 위치에서 객관적으로 평가하고, 균주 간의 확률론적 유사성에 근거한 수리 분류 체계가 이루어졌다(14). 그 결과 대부분의 균주는 몇 개의 주군집(major cluster)에 속하는 것을 알게 되었고 많은 수의 동의어(synonym)를 정리할 수 있었다. 이후에는 리보솜 RNA 서열이나 DNA-DNA 접합을 비롯한 다양한 분자생물학적 분석이 활발해지면서 계통분류학적 체계가 도입되어 자연분류학적 *Streptomyces* 분류에 접근하게 되었다(11). 그러나 생태계에서의 군 다양성 분석, 새로운 균주 탐색 등의 목적을 위해서는 종 이하의 보다 세부적인 분류가 필요하며 형태적 생화학적 표현형질을 비교 분석하는 고전적 방법을 기초로 한 분류체계가 여전히 유효하다(1).

혈청학적 방법을 사용한 *Streptomyces*의 분류는 수리분류에서

밝혀진 체계를 대체로 확인하는 결과를 얻었으나 *Streptomyces verticillium*이 *Streptomyces* 속으로 분류되어야 한다는 것을 밝히기도 하였다(8). 이후 혈청학적 분류는 이루어지지 않고 있는데, 본 실험에서는 몇 가지 선별된 *Streptomyces* 균주의 세포막과 세포벽을 항원으로 생산한 외피 항체를 사용하여 균주 간의 유사도를 비교하면서 이 방법의 유용성을 논하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양

실험에 사용된 균주는 *Streptomyces griseus* KCTC 9080, *Streptomyces coelicolor* KCTC 9005, *Streptomyces argenteolus* KCTC 1742, *Streptomyces viridochromogenes* KCTC 9009, *Streptomyces lavendulae* KCTC 9007 및 *Escherichia coli*이다. 배지는 International Streptomyces Project의 No. 2 배지인 yeast extract-malt extract (YEME) medium을 사용하였다. 그 조성은 yeast extract (Difco, USA) 4.0 g, malt extract (Difco, USA) 10.0 g, glucose 4.0 g, 증류수 1.0 L, pH 7.0 이다. 대조균으로 사용된 *E. coli*는 LB medium에서 배양하였다.

계대배양이나 포자를 얻기 위해서 한천(2%)이 첨가된 YEME 사면 배지를 사용하였다. 배양온도는 30°C로 유지하였다. 포자가 충분히 형성된(7-10일 배양) YEME 사면배지에 멸균된 인산완충 식염수(PBS) 5 ml을 넣고, 멸균된 면봉으로 사면 표면을 부드럽게 문지른 다음 탈지면이 채워진 주사기를 통과시켜 포자용액을 얻었다. 포자를 PBS로 세척한 다음 진탕배양에 접종하였다.

진탕배양을 위하여 멸균된 YEME 배양액 50 ml가 들어 있는 250 ml 삼각플라스크에 포자용액 4 ml을 접종하여 30°C, 120×g에서 배양하였다. 각 균주 별로 배양액의 색깔 변화와 특이적 냄새의 변화가 충분히 일어난 시점에 균체를 수확하고 PBS로 3회

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-550-3452, Fax: 82-41-550-3409
E-mail: jaehkim1@dankook.ac.kr

세척하였다.

외피(세포막/세포벽) 항원 제조

충분히 성장한 *S. griseus* (7일 배양), *S. coelicolor* (5일 배양), *S. lavendulae* (10일 배양), *S. argenteolus* (5일 배양) 및 *S. viridochromogenes* (7일 배양)의 균사체가 들어 있는 시험관을 얼음 수조에 담긴 채로 20초간 Brinkmann homogenizer로 균사체를 깨고 20초간 냉각시키는 것을 6회 반복하여 2분간 균사체를 파괴하였다. 20,000×g로 15분간 원심분리하면 세포막과 세포벽 조각이 깨어지지 않은 균사체와 함께 가라앉는다. 상층액은 버리고 가라앉은 침사에서 위쪽의 깨어진 세포막과 세포벽의 분질(연한 층)을 아래쪽의 진한 층의 깨어지지 않은 균사체와 구분하여 부드럽게 긁어모아 PBS에 다시 부유시켜 20,000×g로 15분간 원심침전 하여 세척하는 것을 2회 반복하였다. 남아 있는 균사체를 제거하고 PBS-Tween 20 (0.2%)에 다시 부유시킨 다음 sonicator (Fisher, USA)로 20초 처리 20초 냉각을 반복하며 총 2분간 초음파 파쇄하였다. 이것을 4°C에서 2시간 방치하여 가라앉은 침전물을 버리고 상층액을 항원으로 사용하였다(5). 이렇게 준비된 항원용액의 단백질 함량을 Lowry법으로 측정하였다.

항혈청 제조

위에서 제조된 외피 항원 중 *S. griseus*, *S. coelicolor*, *S. lavendulae*, 등 세 균주에 대한 항혈청을 얻기 위하여 항원 용액 (10 mg protein/ml)을 Freund's incomplete adjuvant (GIBCO, USA)와 1:1로 혼합하여 1 ml 씩을 3주 간격으로 3회 토끼 대퇴부에 근육 주사하였다(Kirby and Rybicki, 1986). 세번째 면역화한 후 1주일째부터 1주일 간격으로 혈액 20 ml을 귀 가장자리의 정맥으로부터 채취하였다. 채취된 혈액이 담긴 시험관을 실온에서 1시간 방치하여 응고시킨 후 면봉으로 응고 덩어리와 기벽 사이를 떼고 4°C에서 2,500×g로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하고 다시 1,500×g로 15분간 원심침전하여 섞여 있는 적혈구를 제거하고 혈청을 얻었다.

이중면역확산법

PBS-sodium azide (0.02%)에 정제된 한천(Merck, USA)을 1%(w/v)되게 넣고 15분간 중탕하여 녹인 다음, 45°C로 식혀서 페트리디시 당 36 ml씩 분주하여 수평대 위에서 굳혔다. 형판 위에 겔을 올려놓고 well을 만들었다. 가운데 well에 항혈청을 넣고 주변 well에 항원 용액을 4 mg protein/ml 농도로 넣은 다음 실온의 습윤조에 정치시켜 침강선이 형성된 후 PBS-azide 용액에 담가서 침강선 이외의 용매들을 투석시켰다(6).

ELISA

각 균주의 외피 항원이 상기한 방법으로 제조한 세 가지 항혈청과 결합하는 정도를 측정하기 위하여 indirect-ELISA를 실시하였다(12, 13). 간략히 기술하면, 96-well polystyrene microplate에 항원 용액을 2 mg protein/ml 농도로부터 2배수로 희석하여 200 µl/well 씩 3배수로 넣고 37°C 습윤배양기에 2시간 동안 항원부

착(coating)시킨 다음, PBS-Tween 20 (0.4%, 0.2%, 0.1%)에 5분간씩 담가(soaking) 3회 세척한 다음, 0.5% bovine serum albumin (BSA)-PBS-Tween (0.1%)를 200 µl/well씩 3배수로 넣고 37°C 습윤배양기에 2시간 정치하여 항원이 붙지 않고 남아 있는 표면을 blocking 시켰다. 다음에 PBS로 3회 세척하고 0.05% BSA-PBS-Tween (0.05%)에 1/100로 희석된 항혈청을 넣고 (200 µl/well) 37°C에 1시간 정치하여 항원-항체를 결합시킨 다음, PBS로 3회 세척한 다음, alkaline phosphatase가 붙여있는 염소의 항-토끼 IgG 항체(Sigm, USA)를 PBS에 1 µg 항체/ml 농도로 희석하여 200 µl/well 씩 넣고 37°C에서 1시간 정치하여 결합시킨 다음, PBS로 3회 세척하였다. 이어서 10% (w/v) diethanolamine 용액 (pH 9.8)에 1 mg/ml로 희석된 *p*-nitrophenyl phosphate를 200 µl/well씩 넣고 어두운 실온에서 30분 동안 *p*-nitrophenol이 유리된 양(발색정도)을 Titertek Multiskan microplate reader (MK II, Flow Lab, USA)로 405 nm에서 측정하였다. 이때 대조군으로 *E. coli* 항원을 사용하여 비특이적 항원에 의한 항원-항체 반응을 상쇄하였다. 그러나 면역화 되지 않은 토끼의 항체를 대조군으로 사용한 비특이적 항체에 의한 항원-항체 반응을 상쇄하지는 않았다.

결과 및 고찰

각 균주의 진탕배양 특성

다섯 가지 균주의 포자를 각각 일정량씩 50 ml의 배양액에 접종하여 배양시간이 경과함에 따른 성장 특성을 각 균주 고유의 색깔과 냄새로 관찰하였다. *S. griseus*는 배양 3일 후부터 고유의 냄새가 나기 시작하여 7일 후에는 배지와 균사체가 연한 노란색을 띄었다. *S. coelicolor*는 3일 후에 붉은 갈색을 띄기 시작하여 5일 후에는 배지와 균사체가 진한 붉은 갈색으로 되었고, 항원 용액을 만들어 냉장고에 보관하면 청색에 가까운 보라색으로 변하였다. *S. argenteolus*는 2일 후부터 고유한 냄새가 나기 시작하여 5일 후에는 그 냄새가 심하게 났으나 배지나 균사체에는 특이적인 색깔이 없었다. *S. viridochromogenes*는 3일 후부터 약하게 냄새가 나기 시작했으며 5일째에 연한 녹색색을 띄기 시작하여 그 후 7일째에는 좀더 진해져서 균사체도 그 색깔을 띠었다. *S. lavendulae*는 3일 후부터 연한 녹색을 띄기 시작하여 점점 진해져서 8일 후에는 진한 녹색의 균사체가 되었다.

면역확산법에 의한 균주간 상관관계 검색

충분히 분화된 5가지 균주들(Table 1)의 외피 항원과 세 가지 균주에 대한 항혈청을 이용하여 면역 확산법을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

*S. griseus*에 대한 항혈청에 대하여 *S. griseus*의 항원은 적어도 4개의 침강선을 보였으며 고유의 침강선 두개가 거의 겹쳐 진하게 나타났으며, *S. coelicolor*의 항원은 가늘고 약한 침강선 두개를 형성하였으며 *S. lavendulae*와 *S. argenteolus*의 항원은 하나의 약한 침강선을 각각 형성하여 *S. griseus*와 *S. coelicolor* 간에 좀더 유사성이 큰 것으로 관찰되었다(Fig. 1A).

Table 1. Affinity among five strains of *Streptomyces* based on ELISA

Strain ^a	Cluster group & number	Percentage similarity to ^b		
		<i>S. griseus</i>	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. lavendulae</i>
<i>S. griseus</i> KCTC 9080	A, 1B	100	31±4	7±2
<i>S. coelicolor</i> KCTC 9005	A, 1A	33±4	100	22±3
<i>S. argenteolus</i> KCTC 1742	A, 15	12±2	8±2	18±3
<i>S. viridochromogenes</i> KCTC 9009	A, 27	9±2	20±2	51±5
<i>S. lavendulae</i> KCTC 9007	F, 61	16±2	26±3	100
<i>E. coli</i>	NA	0	0	0

NA, Not applicable.

^aKCTC, Korean Collection for Type Cultures.

^bThe similarities to *S. griseus*, *S. coelicolor* and *S. lavendulae* were measured by ELISA using cell envelopes antisera to these strains.

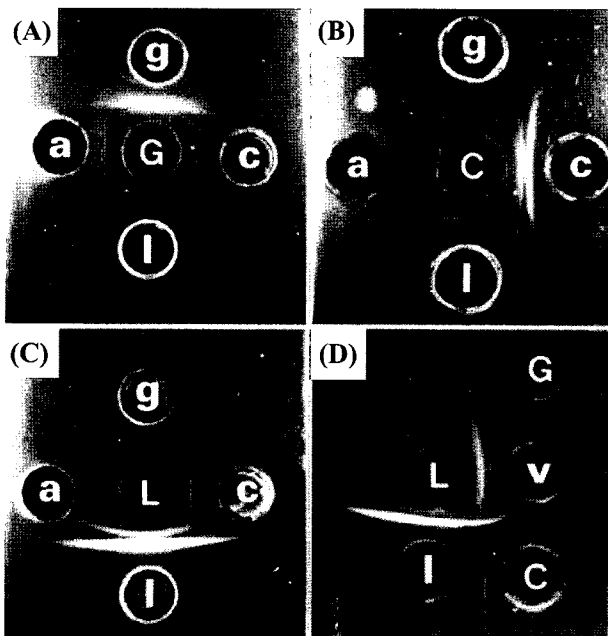


Fig. 1. Immunodiffusion analyses of the relationships among 5 strains of *Streptomyces* by means of the reference system. G, C and L: antisera against (A) *S. griseus*, (B) *S. coelicolor* and (C and D) *S. lavendulae*, respectively. g, c, l, a and v: antigens of fully differentiated *S. griseus*, *S. coelicolor*, *S. lavendulae*, *S. argenteolus* and *S. viridochromogenes*, respectively.

*S. coelicolor*에 대한 항혈청에 대하여 *S. coelicolor*의 항원은 3개의 침강선을 형성하였으며 그 중 고유의 침강선 2개가 진하게 나타났으며 *S. griseus*와 *S. lavendulae*의 항원은 각각 하나의 약한 침강선을 형성하였으며 *S. argenteolus*의 경우 침강선이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

*S. lavendulae*에 대한 항혈청에 대하여 *S. lavendulae* 항원은 크고 진한 침강선 2개를 형성하였으며 *S. griseus*의 항원은 침강선을 거의 형성하지 않았으며 *S. coelicolor*와 *S. argenteolus*의 항원은 각각 2개의 약한 침강선을 보였다(Fig. 1C).

*S. viridochromogenes*의 항원은 *S. griseus*에 대한 항혈청에 대해서는 침강선을 형성하지 않았으나 *S. coelicolor*에 대한 항혈청

에 대하여는 아주 약한 침강선 2개를 형성하였으며 *S. lavendulae*에 대한 항혈청에 대해서는 진한 침강선 하나와 약한 침강선 2개를 형성하여 *S. viridochromogenes*와 *S. lavendulae* 간의 유사성이 상당히 큰 것으로 관찰되었다(Fig. 1D).

여기에서 *S. griseus*와 *S. coelicolor* 간의 비교적 강한 침강선 형성은 Williams 등(14)의 보고에서 두 종이 같은 군집에 속하므로 기대되었던 결과이다. 그러나 *S. lavendulae*의 항체에 대한 *S. viridochromogenes*와 *S. coelicolor*의 항원의 강한 침강선 형성은 예상할 수 없던 결과이다. *S. lavendulae*는 군집그룹 F에 속함으로써 군집그룹 A의 다른 종들과는 연관성이 약할 것으로 기대되었기 때문이다. 이 결과는 Ridell과 Williams (14)이 보고한 내용과는 상이하다. 이들은 4가지 균주에 대한 항혈청과 15가지 균주의 항원과의 침강선 수가 *Streptomyces* 종간의 유사성에 비례한다고 하였다. 이러한 차이는 실험에 사용된 항원이 서로 다르기 때문인 것으로 생각된다. 즉 Ridell과 Williams (7)은 항원으로써 수용성 세포 구성 성분을 전체를 사용한 반면 우리 실험에서는 세포막 또는 세포벽 성분을 비이온성 계면활성제인 Tween 20으로 용출한 것을 항원으로 사용하였다. 그 결과 나타난 침강선의 개수가 4개 이하로 Ridell과 Williams (7) 또는 Ridell 등(8)의 8-10개에 비해서 매우 낮다. 그러므로 이번 실험의 침강선 형성은 특이적으로 세포막이나 세포벽의 유사성에 기인한다고 생각되며 균주간의 전체적인 유사성을 반영하지 않는다고 볼 수 있다.

ELISA에 의한 균주간의 유사성 측정

3가지 균주 즉 *S. griseus*, *S. coelicolor*, *S. lavendulae*의 균사체 항원 용액을 2 mg protein/ml의 농도로부터 2배수로 희석하여, 1/100으로 희석된 각각의 항혈청과의 결합 정도를 ELISA로 측정된 결과 Fig. 2와 같은 곡선을 얻었다. 이때 *E. coli*로부터 얻은 항원과 각각의 항혈청과의 결합 정도를 대조군으로 하였다. 이 결과 항원 농도가 0.5 mg/ml일 때 흡광도가 0.5-1.0 사이 값을 나타내어 높은 신뢰성을 보이므로 이 농도의 항원 용액으로 다음의 ELISA를 수행하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 *S. griseus*에 대한 항혈청에 대하여 *S. coelicolor*의 항원이 33%의 결합능을 보여 두 균주간의 유사성이 다소 나타났다. *S. coelicolor*에 대한 항혈청에 대해서는 *S. griseus*의 항원이 31%의 결합능을 보여 역시 비슷한 정도의

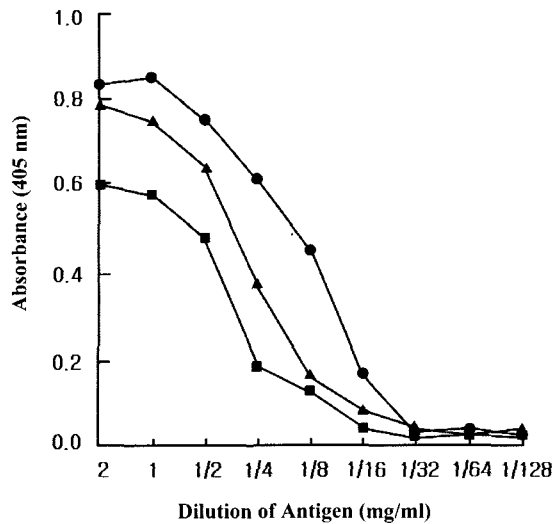


Fig. 2. Binding curves of antibody in antiserum (1/100 dilution) against corresponding antigen using ELISA. Each antiserum was incubated with serial 2-fold dilutions of corresponding antigen solution (2 mg protein/ml). ●—●, *S. griseus*; ▲—▲, *S. lavendulae*; ■—■, *S. coelicolor*

유사성이 나타났다. *S. lavendulae*에 대한 항혈청에 대해서는 *S. viridochromogenes*의 항원이 51%의 결합능을 보여 두 균주의 유사성이 *S. griseus*와 *S. coelicolor*사이의 관계보다 높은 연관성을 갖는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 Kirby와 Rybicki (4)의 보고와 비교하면 균주 사이에 전체적으로 낮은 유사도를 나타내고 있다는 점이다. 이는 위에서도 이미 언급한 바와 같이 우리 실험에서 사용된 항원이 세포막과 세포벽에 특이적 항원으로써 다른 균주와의 유사성이 매우 낮을 수 있다는 것을 보여준다고 하겠다. 같은 이유로 항원 항체 반응의 균주간의 유사성과 비례하지 않을 수 있는데 *S. viridochromogenes*의 항원에 대한 *S. lavendulae* 항혈청의 결합능이 *S. coelicolor*이나 *S. griseus*의 항원보다 높은 것으로 알 수 있다.

혈청학적으로 *Streptomyces* 균주들을 분류하더라도 대체적으로 수리분류의 결과와 일치하며 혈청학적 분류의 실험상의 번거로움 때문에 최근에는 잘 시도되지 않고 있다(1). 그러나 특정 균주의 포자에 대한 단일클론항체를 이용하면 토양 시료에서 특정 포자를 용이하게 회수할 수 있음이 보고되었다(15). 즉 항원 항체 반응은 분류학적 이용보다는 그 특이성을 이용한 활용 가치가 높을 것으로 기대된다. 예를 들면, 실험실 균주의 장기 보관에서 오염 여부를 판독하거나 균주의 퇴화 여부를 판정하는 방법으로 사용될 것이다.

이 논문에서 보는 바와 같이 *Streptomyces* 균주들의 외피 항원은 균주간의 친화성과 비례하지 않으며 이를 분류학에 이용하는 것은 적절치 않다. 그렇지만 항원의 높은 특이성은 균주의 생장과 분화의 단계별 기준으로써 사용될 수 있는 새로운 가능성을 제시하고 있다.

감사의 말

이 연구는 2005년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었습니다

참고문헌

- Anderson, A.S. and E.M.H. Wellington. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 797-814.
- Chater, J.K. 1998. Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiol.* 144, 1465-1478.
- Goodfellow, M. and D.E. Minnikin. 1985. Introduction to chemosystematics, p. 1-15. In Goodfellow, M. and D.E. Minnikin (ed.), *Chemical methods in bacterial systematics*. Academic Press, London, UK.
- Kirby, R. and E.P. Rybicki. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a mean of taxonomic analysis of *Streptomyces* and related organisms. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1891-1894.
- Poxton, I.R. and C.C. Blackwell. 1986. Isolation and identification of bacterial antigens. In D.M. Weir (ed), *Handbook of experimental immunology*, vol. 1, *Immunochemistry*, 4.1-4.22. Blackwell Scientific Publication, London, UK.
- Ridell, M. 1981. Immunodiffusion studies of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and *Rhodococcus* for taxonomic purpose, p. 235-241. In K. P. Schaal and G. Pulverer(ed.), *Actinomycetes*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany.
- Ridell, M. and S.T. Williams. 1983. Serotaxonomical analysis of some *Streptomyces* and related organisms. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2857-2861.
- Ridell, M., G. Wallerstrm, and S.T. Williams. 1986. Immunodiffusion analysis of phenetically defined strains of *Streptomyces*, *Streptoverticillium* and *Nocardioopsis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 8, 24-27.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative Description of Type cultures of *Streptomyces*. II. Species description from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18, 69-189.
- Sneath, P.H.A. 1981. The genus *Streptomyces*-a taxonomic enigma, p. 47-57. In K. P. Schaal and G. Pulverer (ed.), *Actinomycetes*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany
- Stackebrandt, E., W. Liesack, and D. Witt. 1992. Ribosomal RNA and rDNA sequence analysis. *Gene* 115, 255-260.
- Voller, A., D.E. Bidwell, and A. Bartlett. 1976. Enzyme-immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 53, 55-56.
- Voller, A., D.E. Bidwell, and A. Bartlett. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): A guide with abstracts of microplate applications, p. 1-125. Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, Virginia, USA
- Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath, and M.J. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1743-1813.
- Wipat, A., E.M.H. Wellington, and V.A. Saunders. 1994. Monoclonal antibodies for *Streptomyces lividans* and their use for immunomagnetic capture of spored from soil. *Microbiol.* 140, 2067-2076.

ABSTRACT : Serotaxonomical Analyses of Some *Streptomyces* Strains Using Antibodies against Cell Envelope

Sung-Kee Jo and Jae-heon Kim* (Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea)

The similarities among five strains of *Streptomyces* were measured by the serological methods. Antigens were prepared by dissolving cell envelope fractions in Tween 20 buffer and antisera were produced from the immunized rabbits. Immunodiffusion studies and ELISA results showed that the degree of antigen-antibody reaction was not exactly matched to the taxonomic distance; *i. e.* the strains of the cluster group A exhibited low level of cross-reactions each other, while relatively strong cross-reactions were observed between *Streptomyces lavendulae* of cluster group F and *Streptomyces viridochromogenes* of cluster group A.