

薄層 크로마토그래피 (Thin-layer chromatography)에 依한 抗酸菌의 脂肪質을 利用한 分類

I. 標準菌株에 對하여

延世大學校 醫科大學 微生物學教室

高春明 · 金聖光 · 崔大卿 · 邊于斐

=Abstract=

Thin-layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification

I. Reference strains

Choon-Myung Koh, Sung-Kwang Kim, Tae-Kyung Choi
and Woo-Sup Pyun

Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine

This study was carried out for the classification of mycobacteria using the thin-layer chromatography of mycobacterial lipids.

Results as follows:

Of the 12 strains of mycobacteria, the two spots on chromatography were three strains of mycobacteria (BCG, *M. tuberculosis* (H₃₇J) and *M. ulcerans*) and three spots on chromatography were two strains of mycobacteria (*M. kansasii* and *M. balnei*).

The method of thin-layer chromatography of mycobacterial lipids was considered to capable for the use of classification of mycobacteria.

I. 緒 論

1882年 Robert Koch에 依하여 結核菌이 發見된 以來, 여러 學者들에 依하여 이에 對한 여러가지 染色法 및 培養法 研究(Willis 및 Cummings, 1952)가 進行되 었으며, 宿主에 따라 人型(Koch, 1882), 牛型(Smith, 1896) 및 鳥型 結核菌(Straus 및 Gamaleia, 1891)으로 나뉘어져 分類되어 왔으며, 이를 定型 結核菌이라 불 렸다.

그 뒤, Pinner (1935)는 白色 海獺에서 非病原性 人 體起因 抗酸菌을 發見하고 이를 非定型 抗酸菌(aty-

pical mycobacteria)라 命名하였으며, Runyon(1959)는 成長速度 및 着色反應으로서 4群으로 나뉘고 그 뒤 溫度, 集落의 形態, 藥劑에 對한 感受性, 生化學的 反應 등이 이들 菌株을 分類하는데 基準이 될 수 있다고 發表하였다.

Konno(1956), Runyon等(1959) 그리고 Kubica(1964) 등은 niacin, Kubica 및 Pool (1960), Kubica等(1966)은 catalase, Wayne(1961), Wayne等(1964)은 tween 80, Murohashi等(1965)은 phage를 利用하여, Toda等(1960)은 urease로서 抗酸菌의 分類를 行한 바 있 다.

이외에 Marks 및 Szulga等(1965), Szulga等(1966)

그리고 Marks 等(1971)은 抗酸菌의 脂肪質을 分析하므
로서 分類를 試圖, opportunistic mycobacteria 의 一
種인 mycobacterium avium, mycobacterium intracellu-
lare 및 mycobacterium scrofulaceum 等을 分類하여 種
은 結果를 얻었다고 主張하였다.

이에 著者 等도 抗酸菌 脂肪質을 分析하여 抗酸菌의
分類를 우선 標準菌株를 對象으로 實施하였던 바 그
結果를 얻을 수 있었기에 여기 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

A. 實驗材料

1. 實驗菌株 :

本 實驗에 使用된 菌株는 本 教室에서 保管 繼代하
여 오는 *M. tuberculosis* var. *hominis* (H₃₇Rv), *M.*
tuberculosis var. *avium*, *M. tuberculosis* var. *bovis*,
M. smegmatis, *M. balnei*, *M. phlei*, *M. kansasii*, *M.*
fortuitum, *M. ulcerans*, *M. tuberculosis* (H₃₇J) 各
1株 및 BCG 各 2株로서 總 12株를 使用하였다.

2. 實驗에 使用한 培地 및 試藥 :

本 實驗에 使用한 培地는 Ogawa 卵 斜面培地 및
Sauton's protein free 液體培地*였으며 試藥으로서는
市販 一級試藥을 使用하였다.

*Sauton's protein free 液體培地

Asparagine	4.0 gm	Ferric ammonium	
KH ₂ PO ₄	0.5 gm	citrate	0.05 gm
Citric acid	2.0 gm	Glycerin	60.0 gm
MgSO ₄	0.5 gm	D. Water	1,000 ml

B. 實驗方法

1. 脂肪質 抽出方法 :

Ogawa 卵 斜面培地에서 繼代 保管하여 오던 實驗菌
株를 Sauton's protein free 液體培地에 接種 4週間 靜
置 培養한 후 速沈하여 菌株를 모아 냉동건조기를 使
用 菌體를 건조하였다.

건조한 菌體에 다시 di-ethyl ether : ethanol : water
의 含量의 比가 17 : 17 : 6되게 製造한 脂肪質 溶出液
을 一定한 量을 加하여 室溫에서 一晝夜 放置하므로써
菌體內의 脂肪質을 抽出하였다.

2. 脂肪質의 分析方法 :

크로마토板(chromato plate)의 製造는 Merck silica
gel G 를 使用하여 20×20 cm 크로마토板에 0.25 μ 두
께로 塗布한 후 100°C에서 30分間 건조시킨 다음,

acetone 으로서 洗滌, 100°C에서 재차 건조시켰으며,
最終적으로 120°C에서 30分 동안 處理, 活性化(activa-
tion)하였다.

展開溶液의 製造는 n-propanol : n-butanol : water :
ammonia 의 含量比가 57 : 20 : 20 : 3의 比率로 製造하
였으며, 이 展開溶液으로 抽出한 各 株의 脂肪質을 展
開시킨 후 展開된 크로마토板을 다시 100°C에서 30分
間 건조시킨 다음 60% H₂SO₄(V/V) : 0.1% orcinol
液의 比가 2 : 1의 量으로 混合한 溶液을 크로마토板에
살포하고 이를 120°~150°C에 處理하여 呈色反應을
나타내게 하였다.

이상 處理에 依하여 나타난 着色 spot 는 그 位置를
確認하고 이를 基準으로 薄層 크로마토그래피에서의
Rf 值를 決定하였다.

III. 實驗成績

本 實驗成績을 보면, 薄層 크로마토그래피에 나타
난 呈色 spot 의 色은 靑色 spot 이었으며, 1個의 spot 를
나타내는 菌株는 總 12株中 7株이었고 *M. kansasii* 및 *M.*
balnei 는 各 3個의 spot, BCG 와 *M. tuberculosis*(H₃₇J)
및 *M. ulcerans* 는 各 2個의 spot 를 나타내었다.

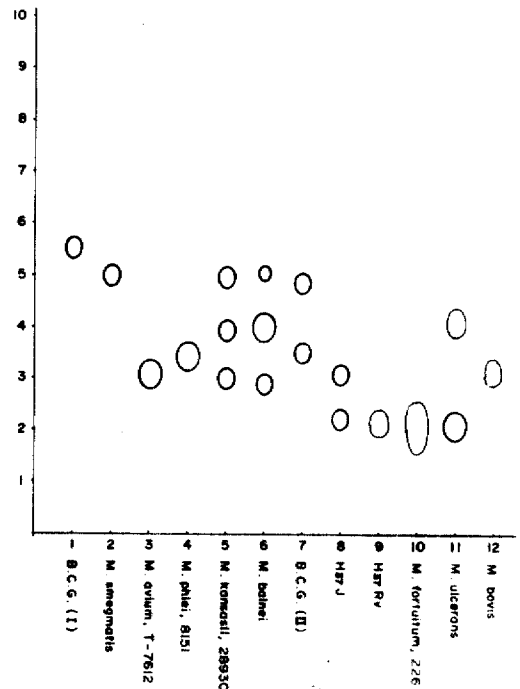


Fig. 1. Records of chromatographs of various species of mycobacterium

또한 薄層크로마토그래피에서의 Rf 値를 比較하여 보면, *M. kansasii* 및 *M. balnei* 와 *M. tuberculosis* (H₃₇Rv) 및 *M. fortuitum* 은 서로 Rf 値가 비슷하였으나 spot 의 크기와 형태가 달라 上記 菌株들은 서로 區別이 可能하였다.

各各 1個의 spot 만을 나타낸 7株를 比較하였을 때도 Rf 値의 값이 모두 다른 값을 나타내고 있으므로 이들 간에 Rf 値에 의한 區別의 畧란은 역시 볼 수 없었다(圖表).

V. 考 按

Robert Koch 에 의하여 結核菌이 發見되고 이들 菌株의 宿主에 對한 反應에 따라 人型, 牛型 및 鳥型 結核菌으로 나누고 이를 定型 結核菌이라 부른 以來, Pinner (1935)에 의하여 非定型 抗酸菌이 發見되고, 이를 다시 Runyon (1959)은 成長速度 및 着色反應, 溫度, 集落의 形態, 藥劑에 對한 感受性 및 生化學的 反應別로 4群으로 나누어 photochromogen, scotochromogen, nonphotochromogen 및 rapid grower 라 불렀으며 現在도 불리워지고 있다고 하겠다.

抗酸菌의 分類에 있어서 定型 抗酸菌과 非定型 抗酸菌의 分類는 Konno 等(1956), Runyon 等(1959) 그리고 Kubica 等(1964)은 niacin 을 利用하여 niacin test 의 陽性인 菌株는 *M. tuberculosis* 로 陰性인 菌株는 其他 菌株라 하고, 이 陰性의 菌株도 各各의 特性으로 細分이 可能하다고 하였으며, Kubica 및 Pool (1960) 그리고 Kubica 等(1966)은 catalase test 로서 Murahashi 等(1965)은 phage 의 感受性으로서 結核菌을 分類하였고 Toda 等(1960)은 urease test 로서 손쉽게 抗酸菌의 分類가 可能하다고 發表하였다.

한편, Corper 및 Uyei (1930), Kubica 및 Jones (1964), Vestal 및 Kubica (1966), 그리고 Dubos 및 Middlebrook (1947)는 培地上에서의 成長特性과 生化學的 反應으로서 分類를 行하였으며, Segal (1965) 그리고 Schaefer (1965)는 면역학적인 知識을 도입, 抗原分析을 利用하여 分類하였다고 主張하였다.

Marks 및 Szulga (1965), Szulga 等(1966) 그리고 Marks 및 Jenkins(1971)은 opportunistic mycobacteria 의 數種을 使用하여 이들의 細胞內 脂肪質을 抽出, 이를 薄層 크로마토그래피方法을 利用하여 이들 菌株가 含有하고 있는 그들 特異脂肪質을 分析하므로써 分類를 試圖하여 各各의 特異한 脂肪質을 觀察할 수 있었고 分類에 도움이 될 수 있다고 主張하였는데, 이는 본

實驗結果 역시 各種 實驗菌株가 各各의 特異한 脂肪質을 含有하고 있어 이에 依한 分類가 可能하였다는 點은 他 研究者들의 報告와 一致하는 點이라 하겠다.

그러나, 본 實驗을 綜合하여 볼 때, 본 實驗에 使用된 菌株는 모두 標準菌株로서 未分類菌株와 比較 實驗을 實施할 수 없었다는 點과 薄層크로마토그래피를 실시할 경우, 어느 程度는 外界의 여러가지 要因에 對하여 서로 다른 反應을 나타낼 수 있다는 點 等을 고려하여 볼 때, 每 實驗時마다 세심한 조심이 必要하다고 생각되며 이는 좀더 未分類 抗酸菌과의 比較 實驗이 實施되어야 될 것으로 思慮된다.

V. 結 論

本 教室에서 繼代 保管하여 오는 標準菌株 12株를 使用하여 細胞質內 脂肪質을 利用한 薄層크로마토그래피에 依한 菌株의 分類를 試圖하여 보았던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 實驗菌株 總 12株의 薄層크로마토그래피에 나타난 紫色反應은 靑色으로 나타났다.
2. 이들 總 12株中 7株는 1個의 spot 만을 나타내었으며, *M. kansasii* 및 *M. balnei* 는 3個의 spot, BCG 와 *M. tuberculosis* (H₃₇J) 및 *M. ulcerans* 는 2個의 spot 를 나타내었다.
3. 1個의 spot 를 나타낸 7個의 菌株도 Rf 値의 差로 인하여 서로 特異한 spot 를 나타내었다.
4. 抗酸菌 脂肪質을 利用한 抗酸菌의 分類는 各種 菌株를 分類하는데 도움을 줄 수 있다고 思慮된다.

REFERENCES

- Corper, H.J. and Uyei, N.: *Oxalic acid as a reagent for isolating tubercle bacilli and a study of the growth of acidfast nonpathogens on different medium with their reactions of chemical reagents.* *J. Lab. Clin. Med.*, 15, 348, 1930.
- Dubos, R.J. and Middlebrook, G.: *Media for tubercle bacilli.* *Am. Rev. Tuberc.*, 56, 334, 1947.
- Jones, W.D. and Kubica, G.P.: *The use of MacConkey's agar for differential typing of Mycobacterium fortuitum.* *Am. J. Med. Technol.*, 30, 187, 1964.
- Karlson, A.G. and Carr, D.T.: *Tuberculosis caused by Mycobacterium bovis.* *Ann. Intern. Med.*,

73, 979, 1970.

- Konno, K.: *New chemical method to differentiate human type tubercle bacilli from other mycobacteria.* *Science*, 124, 985, 1956.
- Kubica, G.P., Jones, W.D., Abbott, V.D., Beam, R.E., Kilburn, J.O., and Cater, J.C.: *Differential identification of mycobacteria.* *Am. Rev. Resp. Dis.*, 94, 400, 1966.
- Kubica, G. P. and Pool, G.L.: *Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli.* *Am. Rev. Resp. Dis.*, 81, 387, 1960.
- Marks, J. and Jenkin, P.A.: *Thin-layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification.* *Tuberc.*, 52, 219, 1971.
- Marks, J., Jenkins, P.A. and Schaefer, W.B.: *Identification and incidence of a third type of Mycobacterium avium.* *Tuberc.*, 50, 394, 1969.
- Marks, J. and Szulga, T.: *Thin-layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification.* *Tuberc.*, 46, 400, 1965.
- Murohashi, R., Kondo, E. and Yoshida, K.: *The role of lipids in acid-fastness in mycobacteria.* *Am. Rev. Resp. Dis.*, 99, 794, 1969.
- Pinner, M.: *Atypical acid-fast microorganisms.* *Am. Rev. Tuberc.*, 32, 424, 1935.
- Runyon, E.H.: *Anonymous mycobacteria in pulmonary diseases.* *Med. Clin. North Amer.*, 43, 272, 1959.
- Runyon, E.H., Selin, M.J. and Harris, H.W.: *Distinguishing mycobacteria by the niacin test.* *Am. Rev. Tuberc. Pul. Dis.*, 79, 663, 1959.
- Schaefer, W.B.: *Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination.* *Am. Rev. Resp. Dis.*, 92, 85, 1965.
- Segal, W.: *Comparative studies of in vivo and in vitro grown Mycobacterium tuberculosis.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 118, 214, 1965.
- Smith, T.: *Mycobacterium bovis: Cited from Joklik and Smith Zinsser Microbiology, 15th ed., Appleton Century Crofts, 1972.*
- Strous and Gamaleia: *Myobacterium avium: Cited from Joklik and Smith Zinsser Microbiology, 15th ed., Appleton Century Crofts, 1972.*
- Szulga, T., Jenkins, P.A. and Marks, J.: *Thin-layer chromatography of mycobacterial lipid as an aid to classification.* *Tuberc.*, 47, 130, 1966.
- Toda, T., Hagihara, Y. and Takeya, K.: *A simple urease test for the classification of mycobacteria.* *Am. Rev. Resp. Dis.*, 83, 757, 1960.
- Vestal, A.L. and Kubica, G.P.: *Differential colonial characteristics of mycobacteria on middlebrook and cohn 7H10 agar base medium.* *Am. Rev. Resp. Dis.*, 94, 247, 1966.
- Wayne, L.G.: *Recognition of Mycobacterium by means of the three-day phenolphthalein sulfatase test.* *Am. J. Clin. Path.*, 28, 565, 1961.
- Wayne, L.G., Doubek, J.R. and Russell, R.L.: *Classification and identification of mycobacteria.* *Am. Rev. Resp. Dis.*, 90, 588, 1964.