

Bacillus thuringiensis serovar *kurstaki* 돌연변이균주의 편모항원의 변이성

이형환¹·이영주¹·이희무²

¹건국대학교 생물학과, ²안동대학교 생물학과

Immunological Variations of Flagella Antigens in *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* Temperature-sensitive Mutants

Lee, Hyung-Hoan, Young-Chu Lee and Hee-Moo Lee

Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133, Korea

The flagella antigenic variation of nine *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* temperature-sensitive mutants grown at the permissive temperature (30°C) was detected by a serological agglutination between H-antigen and antiserum. The flagella antigens were injected to rabbits to prepared their antisera, and then their homologous and heterologous titers of the antisera were measured. The homologous titers were ranged from 1:6,400 to 1:12,800, but the heterologous titers were very low. The H-antigen of the wild type strain was not agglutinated to 4 heterologous antisera, ts-U23 not to 7, ts-U31 not 5, ts-U32 not to 4, ts-U33 not to 7, ts-U71 not to 4, ts-U73 not to 6, ts-U74 not to 6, ts-U91 not to 4 and ts-U603 not to 4 antisera.

Bacillus thuringiensis serovar *kurstaki*는 그람염색반응에 양성인 간균이고, 아포를 형성하며, 곤충의 유충을 치사시키는 단백질성 내독소를 생산하는 특성을 지니고 있는 것이 보고되었고(1, 6, 7), *B. thuringiensis*의 분류는 편모항원을 이용한 혈청학적 분류법을 이용하고 있다(2). *B. thuringiensis*의 유용성을 더욱 개발하기 위하여 유전학적인 연구가 필요한데, Lee와 Lee(3)는 *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 균주의 감온성 돌연변이균주를 분리하였고, Kim 등(4)은 이들에 대한 특성을 일부밖에는 보고하지 않았다.

본 연구에서는 Lee와 Lee(3)가 분리한 감온성 돌연변이균주중에 9개의 돌연변이균주의 편모항원성의 변이를 허용온도(permissive temperature)인 30°C에서 조사하였다.

본 연구에서는 *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 3ab 정상형 균주와 Table 1에 있는 감온성 돌연변이균주를 사용하였다(3).

항원 및 항혈청의 제조

*B. thuringiensis*의 편모(H)항원과 항혈청의 제조는 de Barjac 방법(5)을 수정하여 실시했다.

B. thuringiensis 편모의 운동성을 높이기 위해 반고체배지에 Craigie tube(30×70 mm)을 꽂고 주사침을 사용하여 초자관 표면에 균을 집중시키고, 30°C에서 배양한 후 초자관을 통해 초자관밖의 배지 표면위로 자란 것을 선택하여 액체배지에 제대하고, 5~6시간 배양한 다음 여기에 배양액과 동량의 0.6% formalin 처리된 생리식염수를 가했다. 이를 4°C에서 하루 방치한 다음 4°C에서 5,000×g로 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 0.3% formalin 처리된 생리식염수로 2번 세척한 후 McFarland standard No. 2(530 nm에서 O. D.는 0.6)에 맞춰면역용 항원으로 사용했으며 응집시험용 항원은 McFarland No. 1(O. D. 530 0.3)으로 부유시켜 사용했다.

토끼면역은 4일 간격으로 항원을 0.5 ml, 2 ml 증

Key words: *Bacillus thuringiensis*, flagella antigen, ts mutants.

Table 1. Homologous and heterologous titers^a between flagella H antigens and antisera of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* temperature-sensitive mutants.

| Mutants ^b | Unabsorbed Antisera | | | | | | | | | |
|----------------------|---------------------|-------|----------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 5 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1 wild type | 12,800 ^c | 1,600 | — ^d | 1,600 | 800 | 1,600 | — | — | 800 | — |
| 2 ts-U23 | | 6,400 | — | 1,600 | — | — | — | — | 800 | — |
| 3 ts-U31 | | | 6,400 | 3,200 | — | — | — | 800 | 800 | 800 |
| 4 ts-U32 | | | | 12,800 | — | 400 | — | — | — | 400 |
| 5 ts-U33 | | | | | 6,400 | — | 1,600 | — | — | — |
| 6 ts-U71 | | | | | | 6,400 | 200 | — | 6,400 | 600 |
| 7 ts-U73 | | | | | | | 3,200 | 800 | — | — |
| 8 ts-U74 | | | | | | | | 6,400 | — | 400 |
| 9 ts-U91 | | | | | | | | | 6,400 | 1,600 |
| 10 ts-U603 | | | | | | | | | | 12,800 |

a. Tube titrations incubated at 50°C for 1h. b. Formalinized antigens. c. Reciprocal titer. d. (—): negative, < 200

가시켜 5차례에 걸쳐 토끼 귀의 정맥에 주사했으며, 마지막 면역일로부터 일주일 후에 심장에서 채혈했다. 그 혈액을 멸균된 시험관(50×20 mm)에 사면으로 담아 37°C 수조에 1시간 방치 후 주사침으로 시험관 가장자리를 분리한 다음 4°C에서 12시간 배양하여 혈청을 분리했다. 완전히 분리된 혈청은 1:10,000이 되게 merthiolate를 가해 미세여과지(0.02 μm, Gelman Co.)로 여과하여 2 ml씩 분주해 70°C에 보관하였고, 일부는 0.5 ml씩 마개있는 튜브(13×100 mm)에 분주하여 동결건조시켰다.

사용한 실험동물

국립보건원에서 분양받은 건강한 Newzealand white rabbit(2.5~2.7 kg)을 온도 21±3°C, 습도 50±5% 조건인 상태에서 실험용 고품사료 및 채소를 먹이로 40일간 사육했다.

H항원 응집반응시험

H항혈청을 생리식염수로 1:5되게 희석한 후 2배씩 계단희석한 0.5 ml 항혈청에 시험용 항원을 0.5 ml가해 50°C수조에서 1시간 반응시켜 면상반응을 관찰하여 H항원 응집가를 측정하였다.

균주간의 편모항원항체

응집반응 결과: 허용온도(30°C)에서 증식한 감온성 돌연변이균주의 편모 H항원에 대한 동질 및 이질 항혈청과의 응집반응 결과는 Table 1에 제시됐다. 이 표에서 보는 바와 같이 9균주의 각 H항원의 각 면역혈청에 대한 응집역가는 1:6,400에서 1:12,

800이었으며, 각 H항원에 대한 이질 항혈청에 대한 응집역가는 정상형 균주의 H항원은 ts-U23, ts-U32와 ts-U71에는 1:1,600의 응집역가를, ts-U33과 ts-U91에는 1:800의 응집역가를 나타낸 반면, ts-U31, ts-U73, ts-U74와 ts-U603에는 응집이 되지 않았다. ts-U23 항원은 자기 항혈청에서 1:6,400의 응집역가를 나타내었고, ts-U32에는 1:600 그리고 ts-U91에는 1:800의 응집역가를 나타내었고, 나머지는 응집되지 않았다.

ts-U31 항원은 자기 항혈청에는 1:6,400의 응집역가를 나타내었으나, ts-U32 항혈청에는 1:3,200의 응집역가를, ts-U74, ts-U91과 ts-U603 항혈청에는 1:800의 응집역가를 나타냈다.

ts-U32는 자기 항혈청에는 1:12,800의 응집역가를 나타냈으나, ts-U71과 ts-U603 항혈청에는 1:400이었다.

ts-U33은 자기 항혈청에서 응집역가가 1:6,400을 나타냈으나, ts-U73 항혈청에는 1:1,600이었다.

ts-U71 항원은 자기 항혈청과 ts-U94 항혈청에는 응집역가가 1:6,400을 나타냈으나, ts-U21 항혈청에는 1:1,600의 응집역가를, ts-U73에는 1:200, 그리고 ts-U603에는 1:800을 나타냈고 나머지는 반응이 없었다.

ts-U73 항원은 자기 항혈청에는 1:3,200의 응집역가를 나타냈으나, ts-U74 항혈청에는 1:200의 응집역가를 나타냈다. ts-U74 항원은 자기 항혈청에는 1:6,400의 응집역가를 나타내었으나, ts-U31에는 1:800, ts-U603 항혈청에는 1:400이었으며 나머지는 반응이 없었다. ts-U91 항원은 자기 항혈청에

는 1 : 6,400의 응집역가를 나타내었으나, ts-U603 항혈청에는 1 : 1,600이었고, 나머지 항혈청에는 반응이 없었다.

ts-603 항원은 자기 항혈청에서 응집역가는 1 : 12,800이나 ts-U31에는 1 : 800, 그리고 ts-U32 항혈청에는 1 : 400이었고, 나머지는 반응이 없었다.

ts-U31, ts-U73, ts-U74와 ts-U603 H항원은 정상형 균주의 항혈청과 응집반응이 없었다.

B. thuringiensis serovar *kurstaki* 3ab 감온성 돌연변이균주의 편모(H)항원의 변이를 조사한 결과를 요약하면 다음과 같다. 즉, 항원항체의 응집역가는 자기 항혈청에는 모두 강하게 반응하여 1 : 6,400에서 1 : 12,800의 응집역가를 나타냈으나, 타항원에는 응집역가가 매우 낮았다. 정상균의 H항원은 4개의 타항혈청에는 반응이 없었다. ts-U23 항원은 6개의 다른 항혈청과 응집반응이 일어나지 않았고, ts-U31 H항원은 5개의 타항혈청과, ts-U32 항원은 4개의 타항혈청과, ts-U33은 7개의 타항혈청과, ts-U71은 4개의 타항혈청과, ts-U73은 6개의 타항혈청과, ts-U74 항원은 6개의 타항혈청과, ts-U91은 4개의 타항혈청과 그리고 ts-U603은 4개의 타항혈청과 응집반응이 없었다.

참고문헌

1. Kurstaki, E.: Microbial and viral pesticides, Marcel Dekker Inc., N.Y., p.91-108 (1982).
2. de Barjac, H., and A. Bonnefoi: *Entomophaga* **7**, 5 (1962).
3. Lee, H.H., and H.K. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 233 (1983).
4. Kim, Y.K., K.H. Yoo, H.H. Lee, and H.W. Lee: *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 203 (1985).
5. de Barjac, H.: Identification of H-serotype of *Bacillus thuringiensis*. In microbial control of pests and plant diseases 1970-1980, ed. by H.D. Burges, Academic Press, London, (1982).
6. Lee, H.H., K.H. Yoo, and S.Y. Kim: *Hanguk J. Genetic Engineering*, Kon Kuk University, Seoul, **1**, 29 (1984).
7. Lee, H.H., T.S. Kang, and K.H. Yoo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 315 (1985).

(Received November 24, 1988)