

빙핵세균의 검출을 위한 특이적 항혈청 개발

이 웅 · 권미경 · 성기영 · 조백호 · 김기청*
전남대학교 응용식물학부

Development of a Specific Antibody for the Detection of Ice Nucleation-Active Bacteria

Ung Lee, Mi Kyung Kwon, Ki Young Seong, Baik Ho Cho and Ki Chung Kim*
Applied Plant Science Division, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Frost injury of crops is closely related to the epiphytic population dynamics of ice nucleation-active (INA) bacteria, and the injury can be reduced by decreasing the INA bacterial population. In order to predict the epiphytic population of INA bacteria on crops, a rapid and accurate detection method has to be developed. In the previous report, we produced some antibodies against INA proteins purified from the outer membrane of INA bacteria. However, it was difficult to produce the antibodies because the purification procedures of the INA proteins were complicated, and the final yield was too low. We designed a specific peptide from the N-terminal region of INA protein by computer analysis and synthesized the peptide *in vitro* in this experiment. The peptide sequence was Asp-Ser-Pro-Leu-Ser-Leu-His-Ala-Asp, that is corresponding to the highly conserved region in several INA proteins, with predicted beta turn, coiling, and hydrophilic region. A polyclonal anti-INA peptide antiserum produced specifically recognized INA bacteria as few as 10 colony-forming units (CFU) in the ELISA reactions and did not respond to other non-INA bacteria. Serological specificity of the anti-INA peptide antiserum will facilitate the forecasting of the INA bacterial population dynamics on crops.

Keywords : antibody, frost injury, ice nucleation-active bacteria, population dynamics.

빙핵세균은 우리나라와 같이 사계절이 뚜렷한 온대지방에서 작물에 늦서리 피해의 주요 원인으로 작용하고 있다 (Kim 등, 1989a, 1989b; 김 등, 1989; Kim 등, 1987; Lindow, 1983; 박 등, 1990). 빙핵세균에 의한 동해의 유발은 이들 세균의 서식밀도와 매우 높은 관련성을 가지고 있다. 이들 세균의 서식밀도가 잎 신선중 1g당 10^6 세포 이상일 경우 막대한 피해를 조장하였던 바 (Lindow, 1983), 자연상태에서 이들 빙핵세균의 서식밀도가 증가하여 기습적인 동해를 유발하는 것으로 추정되었다. 이는 빙핵세균의 발생동태를 종합적으로 점검하여 서식밀도를 낮추어 주면 빙핵세균으로 인한 동해의 피해를 최소화할 수 있는 가능성을 시사한다.

작물에 피해를 주고 있는 세균들의 발생동태를 파악하는 일은 다양한 방제전략을 세우기 위해 반드시 필요하며, 따라서 최근에는 이를 위한 많은 방법들이 개발되고 있다. 그중 중 특이성이 강한 선택배지를 이용하거나 특이적인 프라이머 (primer)를 이용한 PCR 검정방법이 주로 많이 사용되어 왔으나, 빙핵세균의 경우에는 다양한 속 및 종이 관여하므로 이들을 적용하기에는 한계가 있다. 한편, 빙핵활성을 직접 측정할 수 있는 micropipette method (Joisson 등, 1992)나 drop-freezing method (Lindow, 1983)는 세균 검출의 정확도는 매우 뛰어나지만 시간이 많이 소모되고 단클로니를 분리하여야 하기 때문에 서식밀도 파악을 위한 방법으로 사용하기에는 적합치 않다. 따라서 다분지형 항체 (polyclonal antibody)를 이용하여 서식밀도를 파악해 보기 위한 노력 (Lee 등, 1997)이 이루어 졌으나, 빙핵세균뿐만 아니라 체표에 서식하는 다른 종류의 부생균 및 비특이적인 세균이 함께 검출되어 그 정확성에 의문

* Corresponding author
Phone) +82-62-530-2071, Fax) +82-62-530-2079
E-mail) kckim@chonnam.chonnam.ac.kr

이 제기되었으며, 병핵활성 단백질이 막단백질이기에 때문에 순화된 단백질의 양이 극소량이고 단백질의 순화에서 항혈청의 조제에 이르기까지 많은 비용과 시간이 소요되는 단점이 지적되어 왔다.

병핵활성 단백질은 세포 외막에 존재하며 (Kim 등, 1989b; Kim 등, 1996; Lee 등, 1997; Lindow 등, 1989), 속이 다른 병핵세균간에도 매우 높은 아미노 말단의 상동성을 유지하였다 (Lee 등, 1997; Warren 등, 1986). 또한 지금까지 밝혀진 병핵활성 단백질들은 물분자 격자구조의 주형역할을 수행할 것으로 예상되는 octapeptide repetitive sequence(Ala-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-X-Thr)를 가지고 있었다 (Green and Warren, 1985). 한편, 병핵활성 단백질 유전자의 발현산물이 150~180kDa의 분자량을 가지고 있으나 (Kim 등, 1996; Wolber 등, 1986), 55kDa 정도의 아미노 말단 부위만으로도 병핵활성을 나타내기 때문에 (Kim 등, 1996), 이들 단백질의 아미노 말단 부위는 병핵활성에 매우 중요한 부분일 것으로 추정되었다 (Lee 등, 1997).

본 연구에서는, 속과 종을 달리하는 세균이 생산하는 여러 가지 병핵활성 단백질의 아미노말단 부위에 공통적인 펩타이드 (peptide)를 실험실에서 합성하여 이에 대한 항혈청을 조제하였다. 이 항혈청을 병핵활성이 인정된 여러 가지 병핵세균에 반응시켜 붉은색 특이적 검출의 가능여부를 확인하는 한편, 자연상태에서 신속하게 병핵세균의 발생밀도를 예측할 수 있는 적용 가능한 방법을 모색해 보고자 하였다.

재료 및 방법

병핵활성 단백질의 막 내부 미세구조 (membrane topology) 결정. 지금까지 보고된 병핵활성 단백질 유전자들 중, *Pseudomonas syringae*의 *inaV* (Schmid 등, 1997)와 *inaC* (Lindow 등, 1989), *Pseudomonas fluorescens*의 *inaW* (Schmid 등, 1997), *Xanthomonas campestris*의 *inaX* (Zhao and Orser, 1990), *Erwinia herbicola*의 *inaE* (Warren and Corroto, 1989) 및 *Erwinia uredovora*의 *inaU* (Michigamy 등, 1994)의 발현산물의 막 내부 미세구조를 glycosylation의 위치와 소수성 (hydrophobicity)에 의해 결정하였다. 이는 TMpred program (URL: <http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED-form.html>)에 의해 이루어졌다.

병핵활성 특이적 펩타이드 부위의 확정. 병핵활성 단백질들 간에 multiple region의 해석은 Genetic Computer Group package의 "DIAGON" program과 "CLUSTAL V" program (Higgins 등, 1992)을 이용하였다. 단백질들 간에 상동성이 높은 영역들을 대상으로 다시 "ANTIGENIC" program을 이용

하여 소수성이 높고 항혈청 결합이 용이한 항원부위 (antigenic site)를 선발하였다. 선발된 펩타이드의 3차원적 구조를 "SIMPA" program (Levin과 Garnier, 1987)으로 분석하여 휘어지거나 (turned) 혹은 꼬아져 있는 (coiled) 부위를 선발하였다. 즉, 병핵활성 단백질들 간에 상동성이 높은 부위로부터 소수성이 높아서 세포외막에 돌출되어 있을 것으로 예상되는 부위를 찾고, 그들 중 항원부위가 될 수 있는 영역을 2차 선발하였으며, 이들 중에서도 단백질의 2차 구조상 휘어지거나 꼬아져 있는 부위를 3차 선발하며, 병핵활성에 특이적일 것으로 여겨지는 펩타이드 부위를 확정하였다.

펩타이드의 합성 및 항체의 조제. 상기의 방법으로 확정된 펩타이드 부위에서 항혈청 조제를 위한 최소단위인 10개의 아미노산을 하나의 펩타이드로 하여 미국의 TANA Laboratories, Ltd. (3019 Linkwood dr., Houston, Texas 77025)의 David Ruan 박사에게 의뢰하여 펩타이드를 합성하였고 이에 대한 항혈청을 조제하였다. 이때 합성된 펩타이드에 대한 고도의 역가를 가진 항체를 유도하기 위해 KLH coupling을 하였고, 토끼에 2주 간격의 정맥주사를 8회 실시한 후 채혈하였다.

펩타이드 항체의 역가검정. 조제된 항혈청의 역가는 원액을 100,000배까지 희석한 다음 10ng의 합성 펩타이드를 항원으로 하여 ELISA방법에 의해 조사하였다.

ELISA 검정. 병핵세균을 비롯한 공시세균을 희석배수에 따라 microplate (Nunc Co.)에 50mM carbonate buffer (pH 9.6)를 이용하여 코팅 (coating)하였다. 코팅된 plate는 4°C에서 하룻밤 동안 정치한 다음, 수세액 (washing solution) (Kirkegaard & Perry Labs)으로 3회 세척하였다. Anti-INA 펩타이드 항체는 완충액 (Kirkegaard & Perry Labs)으로 희석하여 well에 100μl씩 분주한 다음, 상온에서 30분간 반응하였다. Microplate는 수세액으로 3회 세척한 다음, goat Anti-rabbit IgG conjugate (Sigma)를 0.5% Tween 20이 첨가된 PBS (pH 7.4) buffer (PBST)로 1:4,000이 되게 희석하여, well당 100μl씩 첨가한 후 상온에서 30분간 반응시켰다. 다시 microplate를 수세액으로 3회 세척하였고 goat Anti-rabbit IgG biotin conjugate (Sigma)를 PBST로 1:20,000이 되게 희석하여, well당 100μl씩 첨가한 후 상온에서 1시간 반응하였다. Microplate를 수세액으로 3회 세척한 다음, avidin-peroxidase conjugate를 PBST로 1:20,000이 되게 희석하여 well당 100μl씩 첨가한 후 상온에서 1시간 반응하였다. Phosphate-citrate buffer (pH 5.0)에 O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma)를 0.4mg/ml이 되게 녹인 후, 30% H₂O₂를 첨가하여 조제한 기질액을 광을 차단해 가면서 well당 100μl씩 첨가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 반응정지액으로 2.5M H₂SO₄를 well당 100μl씩 첨가한 즉시, ELISA reader의 495nm에서 OD값을 측정하였다. ELISA에서 양성반

응의 판단은 preimmune 토끼 혈청을 1차 항체로 사용한 (-) 대조구에 비해 2배 이상의 OD값을 기준으로 하였으며, (+) 대조구로서는 항원으로 합성 펩타이드 10ng을 사용하였고, 1차 항체로서 Anti-INA 펩타이드 항체를 1/100,000으로 희석하여 사용하였다.

Anti-INA 펩타이드 항체의 빙핵세균에 대한 특이성 검정. 국내에서 분리되어 동정된 *Pseudomonas*속 10종, *Erwinia*속 2종, *Xanthomonas*속 5종 및 *Serratia*속 1종의 빙핵활성 보유 여부와 펩타이드 항체에 대한 반응을 조사하였다. 빙핵활성은 micropipette 법(Makino, 1982)에 의해 측정하였으며 펩타이드 항체에 대한 반응은 ELISA에 의해 조사하였다.

빙핵세균의 펩타이드 항체에 대한 반응 조사. 빙핵활성이 확인된 빙핵세균들 중 국내 서식 밀도가 높고 빙핵활성이 확인된 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*와 빙핵활성이 없는 *Pseudomonas* spp.를 nutrient glycerol broth (nutrient broth 8g, 2.5% glycerol, distilled water 1 l)에서 현탁배양한 후 회수하

여 연속 희석하였다. 농도별로 nutrient agar glycerol 평판배지에 도말하여 $10^1 \sim 10^{10}$ cells/ml 농도로 희석배수를 조정된 다음, 희석배수에 따라 펩타이드 항체에 대한 반응을 ELISA에 의해 조사하였다. Anti-INA 펩타이드 항체는 완충액 (Kirkegaard & Perry Labs)을 이용해 1/8~1/1,024 (2배수씩 희석)까지 희석하여, 각 세균의 희석 농도별로 반응하였다.

결 과

빙핵활성 단백질의 막 내부 미세구조. 빙핵세균의 발생동태를 시기별로 신속하게 조사하기 위해서는 세균자체와 직접 반응할 수 있는 항혈청을 조제하여야 한다. 이러한 항체를 조제하기 위해서는 빙핵활성 단백질의 세포막내 집적 형태의 정확한 파악이 매우 중요하다. 따라서 세균의 세포 외막으로 돌출된 부위의 막단백질만이 직접 항혈청과 반응할 수 있기 때문에 이러한 부위를 찾아서 이에 특이적인 항체를 조제하고자 하였다. 또한 여러 가지 세균 속 및 종들이 빙핵활성을 보유하고 있기 때문에 모든 빙핵세균을 공통적으로 검출할 수 있는 막단백질의 특정 돌출부위를 찾으려 하였다. 이를 위하여 먼저 각종 빙핵세균이 생산하는 빙핵활성 단백질의 유사성을 조사하였다. 각종 빙핵활성 단백질들간에는 60-75% 이상의 상동성을 유지하였으며 TMpred program에 의해 분석된 소수성의 경향도 서로간에 매우 유사하였다(Fig. 1). 이 결과는 하나의 transmembrane domain이 카르복시 말단 부위에 존재함을 말해주며, glycosylation site가 membrane spanning region을 중심으로 아미노 말단 부위에 존재하기 때문에 (Lee 등, 1997), 빙핵활성 단백질의 아미노 말단이 세포외막으로 돌출되어 있을 것으로 예상되었다(Fig. 1).

빙핵활성 단백질 특이적 펩타이드의 선발. Computer search와 빙핵활성 단백질에 대한 결과를 종합하여 얻어진 막 내부 미세구조를 바탕으로 하여 아미노 말단으로부터 빙핵활성 단

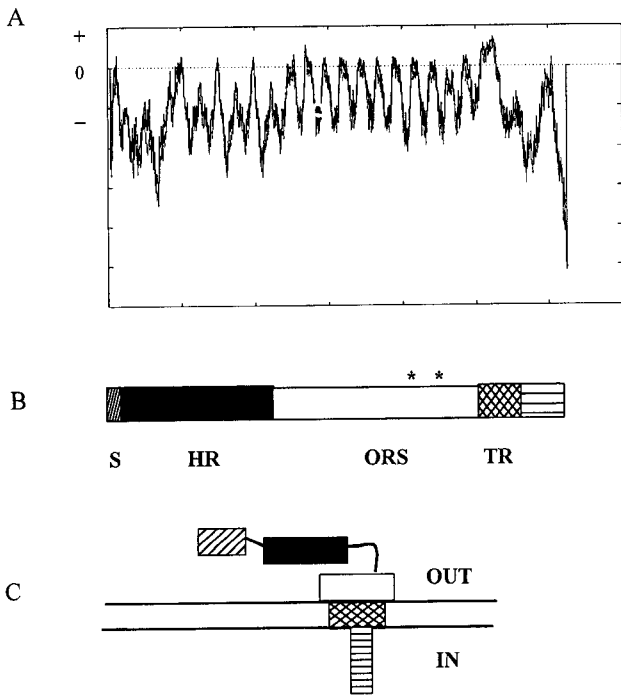


Fig 1. Deduced transmembrane organization of an ice nucleation-active protein. (A) A profile of the hydropathy plot of an INA protein, InaE, predicted by TMpred analysis. +, hydrophobic region; -, hydrophilic region. (B) Structural feature of the INA protein based on previous results and present hydropathy plot. A putative plasma membrane signal sequence (S: ▨), a hydrophilic region (HR: ■), an octapeptide repetitive sequence (ORS: □) and a transmembrane spanning region (TR: ▩) are shown. Asterisk marks denote the glycosylation site. (C) Deduced transmembrane topology of the INA protein embedded in the INA bacterial membrane.

InaE	GKGSDSPLSLHADARWVVAEV
InaX	GKGVGAHLSAHADARWVVCEV
InaV	GAGTSAFLSVHADARWKVCEV
InaW	GQGSSAQLSMHADAKWVVCEV
InaC	GAGTSAFLSVHADARWIVCEV
InaU	GKGSDSPLSLHADARWVVAEV

GxGxdspLSlHADAxWxVxEV

Fig 2. Alignment of the N-terminal amino acid sequences (from 60th to 81st) of several INA proteins. Antigenic sites are shown in bold-face and the sequence of synthetic peptide is underlined.

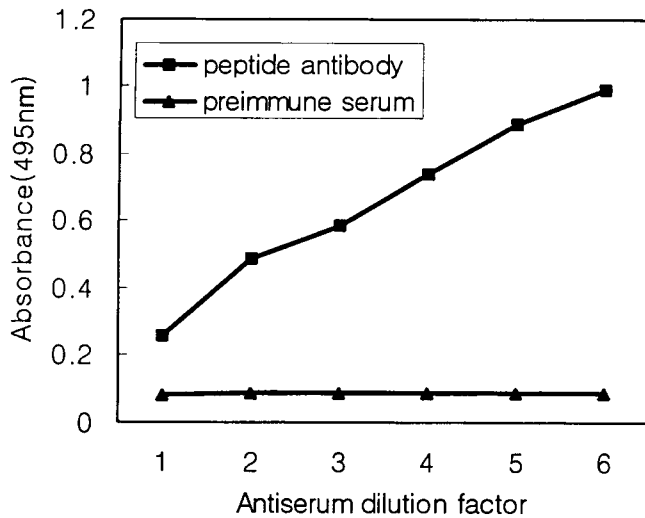


Fig 3. Titer of the anti-INA peptide antiserum estimated by ELISA. Antiserum dilution factor: 1; 1:100,000, 2; 1:30,000, 3; 1:10,000, 4; 1:3000, 5; 1:1000, 6; 1:300. Synthetic peptide (10ng/ml) was used as an antigen.

백질 간에 상동성이 높은 부위를 Genetic Computer Group package의 "DIAGON" program과 "CLUSTAL V" program을 이용하여 선발하였다. 선발된 부위의 대부분은 빙핵원으로서 주형 역할을 수행할 것으로 예상되는 octapeptide repetitive sequence(Green and Warren, 1985)가 주로 나타났으며, 그 외에 몇 가지 부위에서도 선발되었다. 하지만 이들을 대상으로

항혈청의 결합이 용이한 항원부위를 ANTIGENIC program으로 조사한 결과, 이들 중 아미노 말단으로부터 60번째 아미노산부터 80번째 아미노산 서열이 가장 높은 항원성을 가지는 것으로 예상되었다. 또한 이 부위는 전체 단백질 서열을 대상으로 한 3차원 구조 분석에서도 휘어지며 꼬아지는 부위로 추정되었으며, 특히 Leu-Ser-X-His-Ala-Asp-Ala 부위는 각 빙핵활성 단백질들간에도 매우 상동성이 높고 세포외막으로 돌출되어 있을 것으로 예상되어 항원성을 나타낼 수 있는 가장 적절한 부위로 추정되었다. 따라서 이 부위를 중심으로 펩타이드 항체 조제에 필요한 최소 길이인 10개의 아미노산(Asp-Ser-Pro-Leu-Ser-leu-His-Ala-Asp-Ala)을 최종적으로 선발하였고 (Fig. 2), 선발된 펩타이드의 합성 및 Anti-INA 펩타이드의 조제를 미국의 David Ruan 박사에게 의뢰하였다.

Anti-INA 펩타이드 항체의 역가. 합성 펩타이드에 대한 anti-INA 펩타이드 항체의 역가를 ELISA에 의해 검정한 결과 (Fig. 3), 1/100,000까지 매우 높은 역가를 유지하고 있었으며 항혈청의 총량은 100ml 정도였다. 또한 anti-INA 펩타이드 항체는 항혈청으로부터 IgG를 따로 분리하지 않고 직접 사용하였다.

빙핵세균에 대한 Anti-INA 펩타이드 항체의 특이성. 국내에서 분리되어 이화학적 동정이 완료된 각종 세균들의 단백질을 분리하고 빙핵활성을 micropipette 법으로 측정하여 빙핵활성 유무를 확인하고, anti-INA 펩타이드 항체가 빙핵활성을 보유한 세균들과 특이적으로 반응하는지의 여부를 ELISA

Table 1. Serological relationship between the anti-INA peptide antiserum and epiphytic bacteria

Bacteria	Relevant phenotype	Freezing temperature ^a (°C)	ELISA reaction
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	INA +	-5.8	++
<i>P. syringae</i> 23	INA +	-6.0	++
<i>P. syringae</i> 24	INA +	-5.5	++
<i>Erwinia herbicola</i> 47	INA +	-8.0	++
<i>Pseudomonas</i> 7	INA +	-7.9	++
Synthetic peptide	INA +	-10.7	++
<i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	INA -	-15.0 >	-
<i>Pseudomonas</i> 1	INA -	-15.0 >	-
<i>Pseudomonas</i> 2	INA -	-15.0 >	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	INA -	-15.0 >	-
<i>P. marginalis</i>	INA -	-15.0 >	-
<i>P. fluorescens</i>	INA -	-15.0 >	-
<i>Xanthomons campestris</i> pv. <i>campestris</i>	INA -	-15.0 >	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	INA -	-15.0 >	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	INA -	-15.0 >	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>pruni</i>	INA -	-15.0 >	-
KACC 126270	INA -	-15.0 >	-
<i>Serratia marcescens</i>	INA -	-15.0 >	-

^aMeasured by micropipette method.

Table 2. ELISA responses of the anti-INA peptide antiserum to the INA⁺ phenotype *P. syringae* pv *syringae* and an INA⁻ phenotype *Pseudomonas* sp.

Antibody dilutions	Concentration of antigen (cfu/ml)										
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	
1/8	++/- ^a	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-
1/16	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++/-	++/-	++/-
1/32	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
1/64	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
1/128	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
1/256	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
1/512	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
1/1024	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-

^aAbsorbance range at OD₄₉₅ of INA⁺ phenotype/INA⁻ phenotype : ++; 0.17-2.85, +; 0.12-0.169, -; <0.06.

에 의해 조사하였다 (Table 1). 그 결과, anti-INA 펩타이드 항체는 빙핵활성을 유지하고 있는 세균들과 정확히 반응하였으며, 빙핵활성이 없는 세균들과는 전혀 반응하지 않았다. 또한 빙핵활성의 정도가 낮더라도 빙핵활성을 유지하는 빙핵세균은 합성 펩타이드와 반응시킨 (+) 대조구와 비슷한 정도로 강한 반응을 나타내었다. 한편, 흥미롭게도 합성 펩타이드도 -10.7°C에서 동결시키므로 상당한 빙핵활성을 유지하고 있었다.

빙핵세균의 농도에 따른 펩타이드 항체의 검출 민감도. Anti-INA 펩타이드 항체의 빙핵세균에 대한 검출 민감도를 조사한 결과(Fig. 4), 1/8과 1/16의 항혈청으로 10¹~10¹⁰ cells/ml의 세균농도를 검출할 수 있었다. 1/32의 항혈청으로는 10⁴ cells 농도 이상의 항원을 검출할 수 있었다. 한편, 1/2의 항혈청 희석농도에서도 빙핵활성이 없는 세균과는 전혀 반응하지 않았다. 따라서 빙핵세균의 검출에 있어서 anti-INA 펩타이드 항체의 적정 희석 농도는 1/8 - 1/32이었으며 이때 빙핵세균의 검출량은 10 cells/ml에서 10⁴ cells/ml 정도였다. 하지만 이보다 빙핵세균의 농도가 높아지더라도 anti-INA 펩타이드 항체와의 반응에 따른 흡광도의 차이는 나타나지 않았다.

고 찰

자연상태에서 빙핵세균은 식물체표 서식 세균으로, 빙핵으로 작용하는 빙핵활성 단백질을 세포외막에 보유하고 있기 때문에 비교적 고온(-2°C ~ 2°C)에서도 동해를 유발하는 것으로 알려져 있다 (Kim 등, 1989a, 1989b; 김 등, 1989; Kim 등, 1987; Lindow, 1983; 박 등, 1990). 이러한 빙핵활성을 가진 세균은 *P. syringae*, *P. fluorescens* 및 *E. herbicola* 등 40 여종에 이르고, 이들의 서식밀도에 따라 동해 피해를 크게 가중시키기 때문에, 이를 피하기 위한 방제 대책으로는 속과 종을

달리한 여러 가지 빙핵세균들의 발생동태를 신속하고 정확하게 검정할 수 있는 방법의 모색이 필요하다.

다행히 빙핵활성 단백질은 세균 속과 종이 다르더라도 60-70% 정도의 매우 높은 상동성(Abe 등, 1989; Warren과 Corroto, 1989)을 유지하고 있고, 정제된 빙핵활성 단백질의 아미노 말단도 거의 같은 형태를 유지하였으며(Lee 등, 1997), 이들로 부터 제조된 항혈청 또한 서로간에 교차 반응하였기 때문에(Lee 등, 1997), 항혈청을 이용한 빙핵세균의 발생동태 파악이 다른 검정 방법에 비해 매우 효율적일 것으로 인식되어 왔다. 그러나 빙핵활성 단백질이 막단백질이기에 정제에 따른 비용과 노력이 많이 소요되고, 정제하여도 순수 정제된 양이 매우 소량에 불과하기 때문에 실용화하기에는 한계가 있었다(Kim 등, 1996). 한편, 유전자를 형질전환하여 빙핵활성 단백질의 과다발현이 이루어지기도 하였지만 분자량이 150kDa ~ 180kDa에 이르기 때문에 정제가 어렵고(Orser 등, 1985; Wolber 등, 1986) 잘 분해되어 특이적 항혈청의 조제에는 상당한 어려움이 있었다(Orser 등, 1985).

따라서 이러한 문제를 해결하기 위한 시도로 먼저 여러 가지 빙핵세균이 생산하는 빙핵활성 단백질들에서 세균세포 외막에 돌출되어 있을 것으로 여겨지는 펩타이드 부위들을 computer search에 의해 가시화 하였다(Fig. 1). Signal sequence의 존재(Lee 등, 1997), 소수성에 의한 빙핵활성 단백질의 막내 집적형태의 분석 및 특이성을 부여할 수 있는 유전자 정보(Abe 등, 1989; Lindoe 등, 1989; Michigami 등, 1994; Schmid 등, 1997; Warren과 Corroto, 1989; Warren 등, 1986; Zhao과 Orser, 1990)를 종합적으로 고려하여, 특이적 항혈청의 조제에 이용될 수 있는 수 개의 펩타이드 부위를 선정하였다. 이들 중에서 빙핵세균에 어떠한 처리를 하지 않고도 항혈청과 결합할 수 있는 부위를 최종적으로 선택하였다(Fig. 2). 선택된 부위의 펩타이드 서열을 *in vitro*에서 합성하여 이에 대한 항혈청을 조제하였다.

Anti-INA 펩타이드 항체는 빙핵세균에 대해 매우 특이적인 반응을 나타냈으며, 자연상태의 빙핵세균 서식밀도를 측정할 수 있을 정도로 민감하여 1×10^6 cells/ml까지 검출이 가능하였다 (Table 1, Fig. 4). 뿐만 아니라, 빙핵활성이 없는 세균과는 전혀 반응하지 않았다. 더욱이 2차 항체로 사용된 biotin-labelled conjugate와 avidin-peroxidase에 의한 검출방법과 같은 민감도가 뛰어난 방법에 의해서도 비특이적 반응은 일어나지 않았다. 이는 항혈청을 이용한 검정 방법에서 가장 문제가 되고 있는 비특이적 반응을 획기적으로 극복한 것으로서, 선택된 펩타이드의 단백질서열이 빙핵활성 단백질에만 특이적으로 반응하고 있음을 반증해 주고 있다. 하지만 식물의 체표에는 본 실험에서 사용된 세균 외에도 무수히 많은 세균이나 부생균들이 서식하고 있기 때문에 이들에 대한 반응의 특이성 여부를 계속 검토해 가야 할 것이다.

한편, 펩타이드의 분자량이 너무 작아 육안으로 식별이 가능한 항원항체반응을 유도하기 위해서는 다소 많은 양의 항혈청이 소요될 것으로 여겨지지만, 자연상태에서 빙핵세균이 동해를 유발하는 서식밀도가 신선중 1g 당 10^6 cells이기 때문에 이 항혈청을 이용하여 발생동태를 파악하는데는 아무런 문제가 없어 보인다. 그러나 항혈청의 특이성을 고려하여 최소한의 펩타이드만으로 항혈청을 조제하였기 때문인지 흡광도와 세균의 서식밀도에 대한 연관관계는 인정되지 않았다. 즉 세포외막에 빙핵활성 단백질의 집적부위는 매우 제한적이었으며(Kim 등, 1996), 이러한 빙핵활성 단백질 내에서도 일부 펩타이드만 선발되었기 때문에 항원항체의 결합율이 기본적으로 낮고 반응 정도가 흡광도로 표시되었기 때문에 큰 차이를 보이지 않은 것으로 추측된다. 따라서 저자들은 이 항혈청의 특이성을 그대로 유지하면서도 정량적으로 분석할 수 있는 방법을 모색하고 있으며, 이 문제는 실제 포장에서 항혈청의 적용 가능 여부와 함께 성패를 가름하는 매우 중요한 요인이 될 것으로 예상된다. 그럼에도 불구하고 펩타이드는 *in vitro*에서 무제한적으로 합성이 가능하고 항혈청도 비교적 쉽게 생산될 수 있기 때문에, 이 펩타이드는 빙핵세균에 특이적인 진단 kit의 개발에 많은 도움을 줄 것으로 기대된다. 동·식물에서는 펩타이드 항체가 많이 이용되고 있지만 식물 병원 미생물에서는 potyvirus에 대한 검정을 위해서 사용된 경우(Crescenzi 등, 1997; Joisson 등, 1992; Joisson 등, 1993; Ohshima 등, 1992)를 제외하고는 매우 제한적이었다. 앞으로 식물병원 미생물에 대한 유전정보의 축적과 분석 program의 발달로 인해 더욱 그 이용 범위가 넓어질 것으로 예상되며, 빙핵세균뿐만 아니라 식물병원 미생물의 조기 진단 및 발생 동태를 신속, 정확하게 예측하는데도 이용가치가 높을 것으로 예상된다.

요 약

농작물의 동해는 식물 체표 서식 빙핵세균의 서식밀도와 매우 관련이 깊기 때문에 이들 세균의 서식밀도를 낮추어 줌으로서 피해를 줄일 수 있다. 이는 빙핵세균의 발생동태를 신속, 정확히 예측하여야 가능하며 이의 파악을 위한 검정방법의 개발이 시급한 실정이다. 전보에서 우리는 빙핵세균의 세포외막으로부터 빙핵활성 단백질을 정제하여 항혈청을 조제하였으나 항원으로 사용되는 빙핵활성 막단백질의 정제가 까다로웠고 그 회수량이 극히 적어 실용화에는 어려움이 있었다. 본 연구에서는 컴퓨터 분석을 통해 속과 종이 다른 다양한 빙핵세균의 빙핵활성 단백질 아미노 말단에서, 상동성이 높고 외막에 돌출되어 있을 가능성이 높은 펩타이드 부위 (Asp-Ser-Pro-Leu-Ser-Leu-His-Ala-Asp)를 선정하였고, *in vitro*에서 이 펩타이드를 합성하여 이에 대한 항혈청을 조제하였다. 이 항혈청은 10 cfu/ml 의 빙핵세균과도 반응할 정도로 민감하였고 빙핵활성이 없는 공시 세균들과는 전혀 반응하지 않아 빙핵세균에만 특이적이었다. 본 실험에 의해 밝혀진 이 펩타이드는 *in vitro*에서 무제한적으로 합성이 가능하기 때문에 빙핵세균에 특이적인 진단 kit의 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Abe, K., Watabe, S., Emori, Y., Watanabe, M. and Arai, S. 1989. An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*. Sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required ice nucleation activity. *FEBS Lett.* 258:297-300.
- Crescenzi, A., d' Aquino, L., Nuzzaci, M., Ostuni, A., Bavoso, A., Comes, S., De Stradis, A. and Piazzolla, P. 1997. Production of strain specific antibodies against a synthetic polypeptide corresponding to the N-terminal region of the plum pox potyvirus coat protein. *J. Virol. Methods* 69:181-189.
- Green, R. L. and Warren, J. G. 1985. Physical and functional repetition in a bacterial ice gene. *Nature* 317:645-648.
- Higgins, D. G., Bleasby, A. J. and Fuchs, R. 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 8:189-191.
- Joisson, C., Dubs, M. C., Briand, J. P. and Van Regenmortel, M. H. 1992. Detection of potyviruses with antisera to synthetic peptides. *Res. Virol.* 143:167-178.
- Joisson, C., Kuster, F., Plaue, S. and Van Regenmortel, M. H. 1993. Antigenic analysis of bean pod mottle virus using linear and cyclized synthetic peptides. *Arch. Virol.* 128:299-317.
- Kim, K. C., Kim, Y. C. and Cho, B. H. 1989a. Antagonistic activity of an isolate of *Candida* species to ice-nucleation active *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology* 79:275-277.
- Kim, Y. C., Kim, K. C. and Cho, B. H. 1989b. Outer membrane proteins involved in ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae*. *Korean J. Plant Pathol.* 5:54-59.

- 金永哲, 金基淸, 趙白皓. 1989. *Erwinia herbicola*에 의한 벼內穎褐變病과 病原細菌의 氷核 活性. *한식병지* 5:72-79.
- Kim, Y. H., Kim, Y. C., Cho, B. H. and Kim, K. C. 1987. Ice-nucleation activity of *Pseudomonas syringae* isolated in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 3:180-186
- Kim, K. C., Lee, U., Song, D. U. and Cho, B. H. 1996. Purification and characterization of ice nucleation proteins from ice nucleation-active bacteria. *Korean J. Plant Pathol.* 9:172-179.
- Lee, U., Cho, B. H., Kim Y. S. and Kim, K. C. 1997. Serological characterization and subcellular localization of ice nucleation-active proteins produced by epiphytic bacteria. *Korean J. Plant Pathol.* 13:337-341.
- Levin, J. M. and Garnier, J. 1987. Improvement in a secondary structure prediction method based on a search for local sequence homologies and its use as a model building tool. *Biochem. Biophys. Acta.* 955:283-295.
- Lindow, S. E. 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21:680-685.
- Lindow, S. E., Lahue, E., Govindarajan, A. G., Panopulos, N. J. and Gies, D. 1989. Localization of ice nucleation activity and the ice C gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2:262-272.
- Makino, T. 1982. Micropipette method: A new technique for detecting ice nucleation activity of bacteria and its application. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 48:452-457.
- Michigami, Y., Watabe, S., Abe, K., Otabe, H. and Arai, S. 1994. Cloning and sequencing of an ice nucleation active gene of *Erwinia uredovora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:762-764.
- Ohshima, K., Nakaya, T., Inoue, A. K., Hataya, T., Hayashi, Y. and Shikata, E. 1992. Production and characteristics of strain common antibodies against a synthetic polypeptide corresponding to the C-terminal region of potato virus Y coat protein. *J. Virol. Methods* 40:265-273.
- Orser, C. S., Staskawicz, B. J., Panopaulos, N. J., Dahlbeck, D. and Lindow, S. E. 1985. Cloning and expression of bacteria ice nucleation genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164:359-366.
- 朴石奎, 宋東業, 金基淸. 1990. 胡麥, 매화나무, 배나무에서 分離한 *Pseudomonas fluorescens*의 氷核活性. *한식병지* 6:91-98.
- Schmid, D., Pridmore, D., Capitani, G., Battistutta, R., Neeser, J. F. and Jann, A. 1997. Molecular organisation of the ice nucleation protein *inaV* from *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett.* 414:590-594.
- Warren, G. J., and Corroto, L. 1989. The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas syringae*. *Gene* 85:239-242.
- Warren, G., Corotto, L. and Wolber, P. 1986. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Res.* 14:8047-8060.
- Wolber, P. K., Deininger, C. A., Southworth, M. W., Vandekerehove, J., Van Montague, M. and Warren, G. A. 1986. Identification and purification of a bacterial ice-nucleation protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7256-7260.
- Zhao, J. L. and Orser, C. S. 1990. Conserved repetition in the ice nucleation gene *inaX* from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Mol. Gen. Genet.* 223:163-166.