

Salmonella pullorum lipopolysaccharide의 acridine orange에 의한 O-side chain 길이의 변화

김종배·김태우·이원용·양세환
연세대학교 보건과학대학 임상병리학과
(1992년 9월 25일 접수)

Acridine orange-induced changes in the O-side chain lengths of lipopolysaccharides of *Salmonella pullorum*

Jong-bae Kim, Tae-ue Kim, Won-yong Lee, Se-whan Yang
Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University
(Received Sep 25, 1992)

Abstract : The morphological heterogeneity of lipopolysaccharides (LPSs) and variation in the O-side chain lengths of LPSs of *Salmonella pullorum*, which was serially subcultured on the brain heart infusion agar containing 100 µg/ml of acridine orange, was analyzed in Sephadex G-50 column chromatography and silver-stained polyacrylamide gels. The biochemical differences in LPS W and LPS A0150 were identified. Increases in the contents of O-polysaccharides of LPS A0150 than those of LPS W were reflected in the profiles of chromatography and silver-stained polyacrylamide gels. In summary, LPS molecules of *S pullorum* A0150 appeared to be enriched in the molecules with long O-polysaccharide chains than those of LPS W.

Key words : *S pullorum*, lipopolysaccharide, O-side chain, acridine orange.

서 론

Gram음성 세균의 lipopolysaccharide(LPS)는 lipid A, core polysaccharide 및 O-specific repeat unit의 세부분으로 구성되어 있다.¹ 이 중에서도 O-specific repeat unit를 구성하는 당류에 따라 세균의 O 항원성이 좌우되며², 이들의 숫자에 따라 O-specific side chain 길이가 좌우됨으로써 Gram음성 세균의 LPS chemotype은 20개 이상의 O-repeat unit를 보유한 smooth type LPS로부터 core polysaccharide의 일부분만을 보유하고 있으며 O-repeat unit가 결여된 형태의 Re type LPS까지 다양한 변화를 보인다.³

닭을 비롯한 가금류에서 추백리(pullorum disease)를 유발하는 *Salmonella pullorum*은 사람의 장티푸스를 유발

하는 *S typhi*와 O항원성이 유사하여 O group D에 속하는 세균으로서 닭의 추백리 감염과 이에 따른 면역현상에 관한 연구결과는 수의학적인 측면에서 뿐만 아니라 장티푸스의 감염 및 면역현상에 대한 병인론을 연구하는데도 유용하게 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

저자는 추백리 감염이 확인된 닭으로부터 분리한 야외분리주인 *S pullorum* W를 계대배양하는 과정에서 acridine orange를 준치사량의 농도로 첨가한 배지에서 장기간 계대배양한 세균주의 세포벽 변화⁴ 및 이들 세균으로부터 추출한 LPS의 제반성상^{5,6}이 변화하였음을 보고한 바 있다.

본 실험에서는 acridine orange 함유배지에서 장기간 계대배양하여 얻은 *S pullorum* A0150의 균주의 LPS와 대조균주인 *S pullorum* W의 LPS의 구조적인 변화에 따

른 polysaccharide 부분의 조성과 O-side chain의 heterogeneity를 Sephadex G-50 chromatography와 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 확인하였다.

재료 및 방법

S pullorum 세균의 acridine orange 처리 : *S pullorum* W strain을 100 µg/ml의 농도로 첨가한 brain heart infusion agar (BHIA, Difco) 평판 배지에 도말 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 증식한 집락 중 단일 집락을 선택하여 동일한 배지에 150대를 계대배양함으로써⁴ ~⁶ *S pullorum* A0150 균주를 얻었다.

Lipopolysaccharide(LPS)의 추출 및 정제 : yeast extract를 0.5%가 되도록 첨가한 brain heart infusion (BHI, Difco)에 A0150과 W를 접종하고 37°C에서 배양한 다음 원심분리하여 집균한 후 동결건조한 세균체를 LPS를 추출에 이용하였다. LPS의 추출 및 정제는 hot aqueous phenol 방법⁷에 준하여 실시하였다.

분리 LPS의 화학적 정량 : LPS의 화학적 조성을 비교하기 위하여 각 LPS를 구성하고 있는 polysaccharide를 정량분석 하였다. Glucose 함량은 glucose oxidase (아산제약)를 이용하여 정량하였으며 rhamnose는 cysteine-sulfuric acid 방법⁸으로 정량분석하였다. 한편 2-keto-3-deoxyoctonic acid(KDO)는 thiobarbitulic acid 비색법⁹으로, hexosamine은 Morgan-Elson 비색법¹⁰으로, total carbohydrate는 phenol-sulfuric acid 방법¹¹으로 정량하였다.

LPS의 부분 가수분해 및 크로마토그래피 : 분리한 각각의 LPS W와 LPS A0150를 1% acetic acid로 부분 가수분해(partial hydrolysis)한 후 얻은 각각의 polysaccharide 부분을 동결건조하였다. 이것을 pyridine-acetate buffer 용액(pH 5.4, 4ml pyridine + 10ml acetic acid in distilled water to 1000ml)에 용해하여 Sephadex G-50(Pharmacia) column (1.5cm × 45cm)에서 크로마토그래피를 실시하였다.¹² 시료는 동일한 완충액을 이용하여 6ml/hr.의 비율로 용출시킨 후 2ml씩 분획한 다음 각 분획에 함유된 carbohydrate량을 phenol-sulfuric acid 방법¹¹으로 정량하였다.

LPS의 전기영동 : 분리한 각각의 LPS를 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)하였다. 전기영동은 4M urea를 첨가한 15% polyacrylamide slab gel(100 × 100 × 0.4mm)을 이용하여 실시하였으며 전기영동 후 silver stain¹³하여 관찰하였다.

결 과

LPS O-polysaccharide 구성 당류의 조성 변화 : 각각의 LPS를 구성하고 있는 당류의 조성을 확인하기 위하여 1% acetic acid로 부분 가수분해하여 얻은 O-polysaccharide 부분의 조성을 화학적인 방법으로 정량분석하였다. Acridine orange 함유배지에서 장기간 계대배양된 세균으로부터 추출한 LPS A0150의 O-polysaccharide는 대조세균으로부터 추출한 LPS W의 O-polysaccharide에 비하여 O repeat unit를 구성하는 glucose, rhamnose 등의 함량이 증가한 반면 core polysaccharide를 구성하고 있는 KDO와 glucosamine의 함량은 감소한 것으로 나타났다(Table 1).

Table 1. Percent compositions of O polysaccharides from *S pullorum* lipopolysaccharide W and lipopolysaccharide A0150

Components	LPS W	LPS A0150
Total hexoses	23.8	33.9
glucose	8.8	9.9
galactose	8.3	9.6
rhamnose	6.7	14.4
KDO*	3.8	2.2
Glucosamine	4.3	3.0

* KDO : 2-keto-3-deoxyoctonic acid.

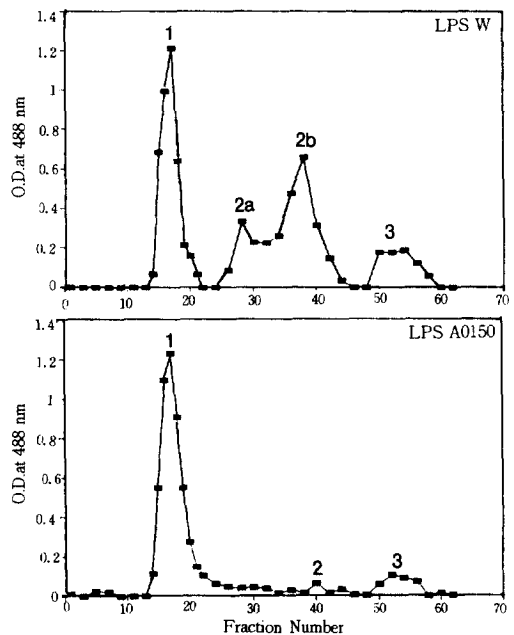


Fig 1. Sephadex G-50 separation of the O polysaccharide of mild acid hydrolysis of lipopolysaccharide W and lipopolysaccharide A0150.

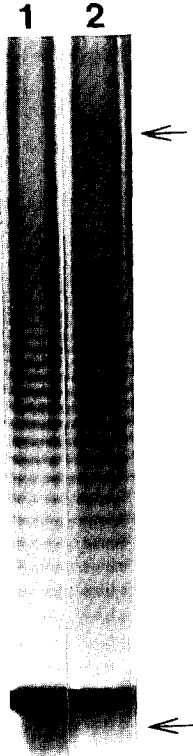


Fig 2. Lipopolysaccharide A0150 extracted from *S pullorum* A0150 and LPS W extracted from *S pullorum* W were applied to the 15% SDS-polyacrylamide gel. Gel was stained by the method of silver stain. Lane 1 and 2 contained 10 μ g of LPS W and LPS A0150, respectively. In above gel, arrows are used to identify the portion of Ra chemotype of LPS and diffusely stained very long O repeat units (probable chainlength between 30 and 40).

Sephadex G-50 column chromatography : 분리한 각각의 LPS W와 LPS A0150의 O polysaccharide 부분을 Sephadex G-50 column에서 분획한 다음 각 분획에 함유된 carbohydrate량을 정량하였다. 두 종류의 O-polysaccharide는 크게 3분획으로 분리되어 chromatography에 의한 분리상이 유사하였지만 LPS W O-polysaccharide의 경우 분획 2가 두개의 peak로 분리된 반면 (peak 2a 및 2b, Fig 1) LPS A0150 O-polysaccharide는 2a에 해당하는 peak는 관찰되지 않았다.

한편 O polysaccharide 분획 1과 분획 2의 구성비율은 각 LPS별로 차이를 보여 LPS W의 경우 분획 1 : 분획 2의 비율이 55.1 : 44.9%로 나타났으나 LPS A0150의 경우에는 99.7% : 2.3%로 나타나 acridine orange 함유 배지에서 장기간 배양함에 따라 LPS를 구성하고 있는

polysaccharide 성분의 변화를 확인할 수 있었다.

SDS-PAGE에 의한 LPS 분리상 : 각 LPS를 전기영동하여 silver stain한 결과 LPS W는 Ra chemotype LPS의 비율이 높은 반면 O repeat unit의 숫자가 많은 S chemotype LPS는 많지 않은 것으로 확인 되었다. 이에 비하여 LPS A0150는 LPS W에 비하여 Ra chemotype LPS의 비율이 낮고, O repeat unit의 숫자가 많은 S chemotype LPS의 비율이 높은 것으로 나타났다 (Fig 2 화살표 부분 참조). 이와같은 결과로부터 acridine orange 함유 배지에서 *S pullorum* 세균을 장기간 계대배양함에 따라 LPS의 O repeat unit의 길이가 변화하는 것을 알 수 있었다.

고 찰

Gram음성 세균의 세포외막(outer membrane)에 분포하고 있는 LPS는 투과장벽(permeability barrier)으로서 중요한 역할을 담당하고 있는 것^{14,15}으로 알려지고 있으므로 frameshift mutagen인 acridine orange를 함유한 배지에서 장기간 계대배양하여 얻은 *S pullorum* 균주의 LPS는 제반 특성이 변화할 가능성이 매우 높다. 이와 관련하여 저자는 acridine orange를 함유한 배지에서 장기간 계대배양하여 얻은 *S pullorum* 균주로부터 추출한 LPS의 계태아에 대한 독성⁵, 물리화학적인 성상⁶의 변화를 보고한 바 있다. 그러나 이전의 보고에서는 각 LPS의 화학적인 조성의 차이만을 조사하였기에 본 실험에서는 LPS의 O-side chain을 구성하는 polysaccharide 부분을 정제하여 LPS의 구조적인 변화에 따른 polysaccharide 부분의 조성과 O-side chain의 heterogeneity를 확인하기 위하여 Sephadex G-50 chromatography와 SDS-PAGE를 실시하였다.

LPS A0150의 O-polysaccharide 화학조성은 LPS W의 O-polysaccharide에 비하여 O repeat unit를 구성하는 glucose, rhamnose 등의 함량이 증가한 반면 core polysaccharide를 구성하고 있는 KDO와 glucosamine의 함량은 감소한 것으로 나타나 (Table 1), acridine orange 배지에서 장기간 계대배양한 *S pullorum*의 LPS는 대조세균의 LPS에 비하여 O-side chain 길이가 증가한 것을 짐작할 수 있었다.

이와같은 결과를 물리적인 방법으로 확인하기 위하여 Sephadex G-50 chromatography와 SDS-PAGE를 이용하여 실험한 결과 Sephadex G-50 column에서 각각의 O-polysaccharide는 크게 3분획으로 분리되어 chromatography에 의한 분리상이 다른 Gram음성 세균 LPS의 chromatography 분리상과 일치하였으나^{12,16}, LPS W의

경우에는 분획 2a에 해당하는 부분이 다른 보고에서는 확인되지 않아 다소 차이가 있었다. 본 실험에서 얻어진 분획 1은 smooth LPS의 O-polysaccharide, 분획 2는 Ra chemotype LPS의 O-polysaccharide, 분획 3은 2-keto-3-deoxyoctonic acid(KDO) 분획에 해당한다.¹⁷ 이러한 결과로부터 LPS W와 LPS A0150는 O-side chain의 길이가 다양한 LPS가 혼합되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, SDS-PAGE에 의한 LPS 분리상도 LPS W는 Ra chemotype LPS의 비율이 높은 반면 O repeat unit의 숫자가 많은 S chemotype LPS의 비율은 높지 않은 것으로 확인되어(Fig 2) 두가지 실험의 결과가 일치되었다.

한편 smooth O-polysaccharide 구성비율은 LPS W의 경우 55.1%인 반면 LPS A0150의 경우에는 99.7%로 나타나 acridine orange 함유 배지에서 *S pullorum*을 장기간 계대배양함에 따라 Ra chemotype LPS의 구성비율이 감소한 반면 smooth LPS 구성비율이 높아진 것을 알 수 있었다. 이와같은 결과는 acridine orange 함유배지에서 지속적으로 계대배양하는 과정에서 세균의 투과장벽으로 작용하는 LPS의 O-side chain 길이를 길게 변화시켜 세포질 내로 acridine orange가 투과되는 것을 억제하는 것과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 보면 *S pullorum* 세균이 보유한 LPS의 O-polysaccharide 부분은 동일한 균주에서도 O-side chain의 길이가 다양하게 분포하는 이질적인 형태를 나타내고 있으며, acridine orange 함유배지에서 지속적으로 계대배양한 균주의 LPS는 대조세균에 비하여 O-side chain 길이가 긴 LPS의 분포율이 높은 것으로 결론을 내릴 수가 있다.

결 론

Acridine orange 함유배지에서 장기간 계대배양하여 얻은 *S pullorum* A0150 균주의 LPS와 대조균주인 *S pullorum* W LPS로부터 정제한 polysaccharide 부분의 조성과 O-side chain의 heterogeneity를 Sephadex G-50 chromatography와 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. LPS W에 비하여 LPS A0150는 O repeat unit를 구성하는 glucose, rhamnose 등의 함량이 증가한 반면 core polysaccharide를 구성하고 있는 KDO와 glucosamine의 함량은 감소하였다. 한편 은염색한 polyacrylamide gel에서 LPS A0150는 LPS W에 비하여 Ra chemotype LPS의 비율이 감소한 반면 O repeat unit의 숫자가 많은 S chemotype LPS의 비율은 증가한 것으로 확인되었으며 이것은 Sephadex G-50 chromatography에서 smooth che-

motype LPS가 주로 분리된 것과 일치하는 결과였다. 이상의 결과로부터 *S pullorum*을 acridine orange 함유배지에서 장기간 계대배양할 경우 O-side chain의 길이가 긴 LPS의 비율이 증가하는 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Boman HG, Monner DA. Characterization of lipopolysaccharides from *Escherichia coli* K-12 mutants. *J Bacteriol* 1975 ; 121 : 455~464.
2. Wilkinson RG, Gemski P, Stocker BAD. Non-smooth mutants of *Salmonella typhimurium* : Differentiation by phage sensitivity and genetic mapping. *J Gen Microbiol* 1972 ; 70 : 527~554.
3. Smit J, Kamio Y, Nikaido H. Outer membrane of *Salmonella typhimurium* : Chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants. *J Bacteriol* 1975 ; 124 : 942~958.
4. 김종배, 마점술. Acridine orange에 의한 *Salmonella pullorum*의 세포벽 변화. 대한수의학회지 1985 ; 25 : 149~153.
5. 마점술, 김종배. *Salmonella pullorum*균의 acridine orange에 의한 lipopolysaccharide 독성변화에 관한 연구. 서울대학교 수의대 논문집 1984 ; 9 : 41~50.
6. 김종배, 마점술. Acridine orange에 의한 *Salmonella pullorum* Lipopolysaccharide의 정상변화. 서울대학교 수의대 논문집 1986 ; 11 : 67~81.
7. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenolwater and further applications of the procedure. *Methods Carbohydrate Chem* 1965 ; 5 : 83~91.
8. Wright BG, Rebers PA. Procedure for determining heptose and hexose in lipopolysaccharides. Modification of cystein-sulfuric acid method. *Anal Biochem* 1972 ; 49 : 307~309.
9. Osborn MJ. Studies on the gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963 ; 50 : 499~506.
10. Elson LA, Morgan WTJ. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem J* 1933 ; 27 : 1824~1828.
11. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956 ; 28 : 350~356.
12. Perry MB, Daoust V, Diena BB, et al. The lipopol-

- ysaccharides of *Neisseria gonorrhoeae* colony types 1 and 4. *Can J Biochem* 1975 ; 53 : 623~629.
13. Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982 ; 119 : 115~119.
 14. Coleman WG Jr, Leive L. Two mutations which affect the barrier function of the *Escherichia coli* K-12 outer membrane. *J Bacteriol* 1979 ; 139 : 899~910.
 15. Buxton RS, Drury LS, Curtis CAM. Dye sensitivity correlated with envelope protein changes in dye (*sfr* A) mutants of *Escherichia coli* K12 defective in the expression of the sex factor F. *J Gen Microbiol* 1983 ; 129 : 3363~3370.
 16. Kiefer W, Schmidt G, Jann B, et al. Genetic transfer of *Salmonella* O antigens to *Escherichia coli* O8. *J Gen Microbiol* 1976 ; 92 : 311~324.
 17. Germanier R, Fürer E. Characteristics of the attenuated oral vaccine strain *S typhi* Ty 21a. *Develop Biol Standard* 1983 ; 53 : 3~7.
-