

병원성 *Escherichia coli* O157:H7의 특이 항체 생산을 위한 Lipopolysaccharide 분리 및 정제

최학선¹ · 신영민² · 정숙현³ · 박영민⁴ · 안원근^{5*}

¹조선대학교 단백질소재센터, ²부산지방식품의약품안전청 시험분석실
³동서대학교 식품생명공학과, ⁴부산대학교 의과대학 미생물학교실
⁵경북대학교 생물학과

Isolation and Purification of Lipopolysaccharide Derived from *Escherichia coli* O157:H7 for the Specific Antibody Production

Hack-Sun Choi¹, Yeong-Min Sin², Sook-Hyun Chung³,
Young-Min Park⁴ and Won Gun An^{5*}

¹Research Center for Proteineous Materials, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

²Test & Analytical Laboratory, Busan Regional Food & Drug Administration, Busan 608-829, Korea

³Dept. of Food Biotechnology, Dongseo University, Busan 616-716, Korea

⁴Dept. of Microbiology & Immunology, College of Medicine, Pusan National University,
Busan 602-739, Korea

⁵Dept. of Biology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Escherichia coli O157:H7 cause hemorrhagic colitis and the extraintestinal complication of hemolytic-uremic syndrome, with their higher incidence occurring in children. Lipopolysaccharide (LPS) of *E. coli* O157:H7 is very important to make IgG anti-LPS with bactericidal activity. To identify the characteristic of *E. coli* O157:H7, we isolated 60 MDa plasmid and amplified *stx* genes of shiga-like toxin (Stx) 1, 2 of *E. coli* O157:H7 by polymerase chain reaction (PCR) method. Using the simple purification method which contained phenol extract, ethanol precipitation and gel filtration steps, the LPS of *E. coli* O157:H7 was isolated and purified. Finally, we confirmed the purity of LPS through SDS-PAGE and silver nitrate staining.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, lipopolysaccharide (LPS), shiga-like toxin (Stx), silver nitrate staining

서 론

대장균 O157:H7이 사람의 감염원으로 처음 인식된 것은 1982년이었고(1), 이후로 전 세계적으로 이 질병이 인식되게 되었다. 장관출혈성대장균(enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC) O157:H7은 출혈성대장염(hemorrhagic colitis, HC)의 원인 균으로서 *Shigella dysenteriae* type 1이 생산하는 shiga 독소와 동일하거나 유사한 독소를 생성하며, 감염증에서 임상적으로 중요한 합병증으로 용혈성 요독증후군(hemolytic uremic syndrome; HUS), 혈전성 혈소판 감소성 자반병(thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) 및 뇌증 등을 동반한다(2). *E. coli* O157:H7은 가장 흔한 EHEC이며, 감염 경로는 소가 이 세균의 자연숙주로서 감염은 이 세균을 가지고 있는 소의 분변에 오염되거나 부적절하게 요리된 소고기를 섭취함으로써 이루어진다. EHEC는 1982년에 미국에서

햄버거 식중독 사례를 계기로 알려졌다(3). 이 식중독 사건에서 대장균 O157:H7이 분리된 후, 구미를 중심으로 집단발생 사례가 자주 보고되고 있으며(4), 1996년 일본에서는 1만여 명의 환자가 발생하여 세계적으로 큰 관심을 불러일으켰다(5). 국내에서도 매년 이 감염증이 큰 사회문제가 되고 있다(6). 이 균은 주요 임상 증상이 출혈성대장염이므로 EHEC라고 명명되었으며 또한 vero 세포에 세포독성을 나타내는 vero toxin이 주요한 병원인자이므로 본 균을 verocytotoxin-producing *E. coli* 라고도 부른다(7).

대장균 O157:H7 및 이에 의한 치명적인 감염증에 대한 연구는 전 세계적으로 매우 활발하게 진행되고 있으나 대부분의 경우는 환자 혈청에서 EHEC의 균체 O항원(lipopolysaccharide, LPS)에 대한 항체와 항 Stx항체 검출(8)에 집중되어 연구되어지고 있다. 또한 대장균 O157:H7의 LPS에 대한 연구는 많이 되어 있지만, 이들의 분리 및 정제하는 방법이

*Corresponding author. E-mail: wgan@knu.ac.kr
Phone: 82-53-950-5353, Fax: 82-53-953-3066

어렵고 소요시간이 오래 걸리는 문제점이 있다(9). 따라서, 본 실험에서는 LPS 분리 및 정제 방법을 개선하고, 정제 시간을 단축하여 효과적인 LPS 분리 및 정제를 위해 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 대장균은 일본 Kyoto 대학 Mitsuki Nishibuchi 교수로부터 분양 받은 Stx(Stx1+ 및 Stx2+) 양성 *E. coli* O157:H7 EDL933을 실험에 사용하였으며, 사용한 시약은 특급을 사용하여 실험하였다.

대장균 O157:H7의 배양

대장균 O157:H7를 lactose agar plate에서 순수 분리하여, 분리된 균 한 백급이를 전 배양 배지(tryptic soy broth: TSB, 10 mL)에 액체 배양하고, 배양액 1 mL를 15 L 배지가 들어있는 jar fermentor (Bioengineering Co., USA)에 옮겨 37°C에서 20시간 배양하였다(산소농도는 10%이하로 유지하였음). 사용된 배지는 glucose(1%)과 MgSO₄(10mM)를 첨가한 tryptic soy broth를 여과 멸균(pore size, 0.20 µm; Millipore Co., USA)하여 사용하였다.

Plasmid의 확인

대장균으로부터의 plasmid는 alkaline lysis 방법(10)으로 분리하였다. 세균 배양액 1 mL를 microcentrifuge tube에 넣고 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 침전물을 용액 I (50 mM 포도당과 10 mM EDTA가 들어 있는 25 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0))을 넣고 잘 현탁하여, 용액 II (0.2 N NaOH와 1% SDS 혼합액)에 현탁액을 첨가하고 이곳에 용액 III (5 M potassium acetate 60 mL, acetic acid 11.5 mL, 증류수 28.5 mL)을 첨가한 후 혼합, 얼음 속에서 5분간 방치하였다. 혼합액을 4°C에서 5분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 얻었고, 상층액의 2배에 해당하는 ethanol을 가한 후 12,000 rpm에서 5분간 4°C에서 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 70% ethanol을 가하였다. 원심분리하여 상등액을 제거한 후 65°C에서 5분간 침전물을 건조시켰다. 건조된 pellet에 pancreatic RNase(20 µg/mL) 50 µL와 TE buffer 50 µL를 가하여 침전물을 녹인 후 실험에 사용하였다. 분리된 핵산 시료 10 µL에 loading dye 2 µL을 첨가하여 0.5X TAE buffer로 만든 1% agarose gel에 loading한 다음 전기영동(50 volt)하여 plasmid를 확인하였다.

Polymerase chain reaction을 이용한 shiga-like toxin (Stx) 유전자 증폭

Stx 1에 특이적인 primer Stx 1a(5'-GAAGAGTCCGT-GGGATTACG-3')와, Stx 1b(5'-AGCGATGCAGCTATT-AATAA-3'), Stx 2에 특이적인 primer Stx 2a(5'-TTAACACACCCACGGCAGT-3')와 Stx 2b(5'-GCTCTGGA-

TGCATCTCTGGT-3')를 사용하여 Stx1, 2 유전자를 PCR (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer Co., USA)법으로 증폭하였다(11). PCR조건은 95°C에서 10분간 방치하여 최초의 변성을 일어나게 한 후, 95°C에서 30초간 변성시키고(denaturation), 60°C에서 30초간 유전자를 결합시키며(annealing), 72°C에서 30초간 증폭반응(extension)이 일어나도록 하는 것을 1회로 하여, 35회 반응시켰다.

LPS 분리 및 정제

배양된 대장균액을 원심분리(10,000 rpm, 10분; Hanil Co., Korea)하여 얻어진 균체 20 g(wet weight)을 saline으로 세척하고 원심 분리하였다. 침전물을 65°C로 열탕한 증류수 100 mL와 phenol 100 mL를 첨가하여 65°C로 15분간 현탁하였다. 이 용액을 4°C에서 15분간 방치하고 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 수층을 회수하고, 다시 65°C로 열탕한 증류수 100 mL와 phenol 100 mL를 첨가하여 위와 동일한 방법으로 실험을 실시하여 수층을 회수하였다. 회수한 용액 200 mL를 멸균수로 16시간 투석하였다. 추출된 용액의 DNA와 RNA를 제거하기 위해 DNase 100 mg과 RNase 100 mg을 첨가하여 37°C에서 4시간 반응하고, 이 용액에 10 mM sodium acetate, 2mM CaCl₂, ethanol 25% 농도로 첨가하여 4°C에서 1시간 방치하여 12,000 rpm으로 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 그리고 ethanol 최종농도를 70%로 하여 4°C에서 4시간 방치하여 12,000 rpm으로 원심 분리하여 침전물을 회수하였다. 회수된 침전물을 멸균수에 녹여 멸균수로 16시간 투석하여 LPS용액을 얻었으며, 회수된 용액을 동결 건조하여 파우더로 만들어 다음 실험의 시료로 사용하였다(Fig. 1).

겔여과 크로마토그래피

동결 건조된 LPS를 20 mM 이미다졸 완충액(10 mM NaCl, pH 7.0)에 녹여 Bio-Gel A수지가 충전된 칼럼(4×60 cm)에 loading 하여 겔여과(flow rate, 20 mL/hr; fraction volume, 5 mL)를 하고, 용출된 용액은 anthron assay로 당을 분석하였다. 진한 황산에 녹인 0.2% anthron시약 1.5 mL를 정제한 LPS용액 1 mL에 첨가하여 10분간 가열하고 냉각시킨 후 630

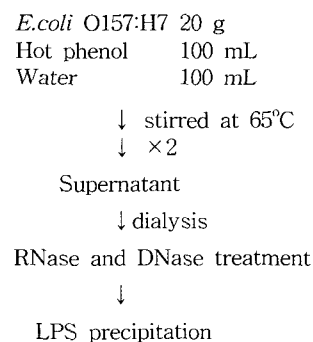


Fig. 1. Flowchart of innovated isolation and purification protocol for LPS from *E. coli* O157:H7.

nm에 흡수스펙트럼을 측정하여 당을 정량하였다(12).

LPS 전기영동 및 염색

물에 녹인 LPS용액을 SDS-PAGE loading 용액으로 섞어서 100°C에서 10분간 열탕하여 SDS-PAGE(15% gel)를 실시하였다. 전기 영동한 LPS 겔을 40% ethanol, 5% acetic acid에 16시간 담구어 고정시킨 다음 LPS를 산화시키기 위해 0.7% periodic acid(40% ethanol, 5% acetic acid 포함)에 5분간 고정시키고 증류수 500 mL로 15분간 3회 세척하였다. 증류수를 버리고 신선한 염색액 150 mL(2 mL ammonium hydroxide, 28ml NaOH(0.1 N), 5 mL Silver Nitrate(20%), 그리고 115 mL H₂O)를 첨가하여 10분간 70 rpm으로 진탕시켜 염색하였다(13).

결 과

대장균 O157:H7의 60 Mda plamid의 분리 및 확인

대장균 O157:H7은 일반 비병원성 대장균과 달리 60 Mda plamid를 보유하고 있다고 알려져 있다(14). 본 실험에서도 병원성 대장균 O157:H7의 플라스미드를 분리하여 60 Mda plamid의 존재 여부를 확인한 결과, 몇개의 플라스미드가 발견되었고 shiga toxin을 생산할 수 있는 대표적인 60 Mda plamid를 확인할 수 있었다(15,16)(Fig. 2).

대장균 O157:H7의 shiga-like toxin(Stx) 유전자 확인

Shiga-like toxin(Stx) 1, 2 유전자의 존재를 확인하기 위해서 PCT법을 사용하였다. 그 결과 *Hae III*를 molecular size marker로 하여 Stx1, Stx2에 해당하는 346 bp와 130 bp를 검출하였고, 병원성을 나타내는 대장균임을 확인하였다(Fig. 3).

대장균 O157:H7의 LPS 분리 및 정제

Johnson과 Perry의 방법(9)을 변형하여 사용하였으며, 기존의 방법에 비해서 시간과 효율을 증대시켰다. 정제한 LPS 용액을 이미다졸 완충용액에 희석하여 겔여과 컬럼에 loading하여 anthron assay를 통하여 16번 분획과 22번 분획 사

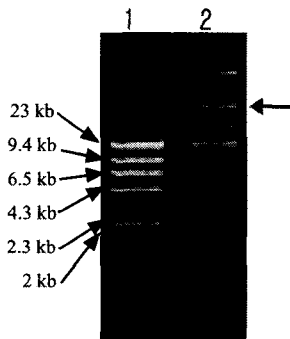


Fig. 2. Photography of *E. coli* O157:H7 plamid. Line 1: phage λ DNA digested with *Hind*III (molecular size marker; 23 kb, 9.4 kb, 6.5 kb, 4.3 kb, 2.3 kb, 2 kb). Line 2: 60 Mda plamid of *E. coli* O157:H7 is indicated by the arrow.

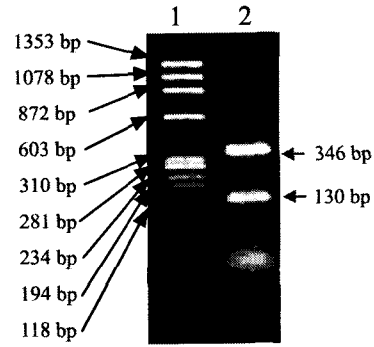


Fig. 3. Amplification products obtained by Multiplex PCR of *E. coli* analyzed by agarose (2.0%) gel electrophoresis. The expected 130 bp and 346 bp PCR products are shown. Line 1: φX 174 *Hae*III digested (molecular size marker; 1353 k, 1078 k, 872 k, 603 k, 310 k, 281 k, 234 k, 194 k, 118 k), Line 2: *E. coli* O157:H7. Stx 1 primer: Stx 1a (5'-GAAGAGTCCGTGGGATT-ACG-3') and Stx 1b (5'-AGCGATGCAGCTATTAATAA-3'), Stx 2 primer: Stx 2a (5'-TTAACCACACCCACGGCAGT-3') and Stx 2b (5'-GCTCTGGATGCATCTCTGGT-3').

이를 모아서 동결 건조하여 정제하였다(Fig. 4).

SDS-PAGE을 이용한 LPS 정제 확인

분리 정제된 LPS를 확인하기 위하여 Tsai가 실험한 방법(13)을 이용하여 산화된 LPS를 silver nitrate로 염색하여 확인하였다. Johnson과 Perry(9)에 의한 방법과 비교하여 새로운 방법으로 분리 정제한 LPS를 10, 20, 40 μg씩 loading하여 비교한 결과, 불순물이 없고 다량의 정제 LPS를 분리할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

대장균 O157:H7은 사람 특히 소아나 면역능이 저하된 노약자에게서 용혈성 대장염이나 용혈성 요독 증후군을 일으켜 사망에 이르게 하는 치명적인 세균이다. 본 연구는 대장균

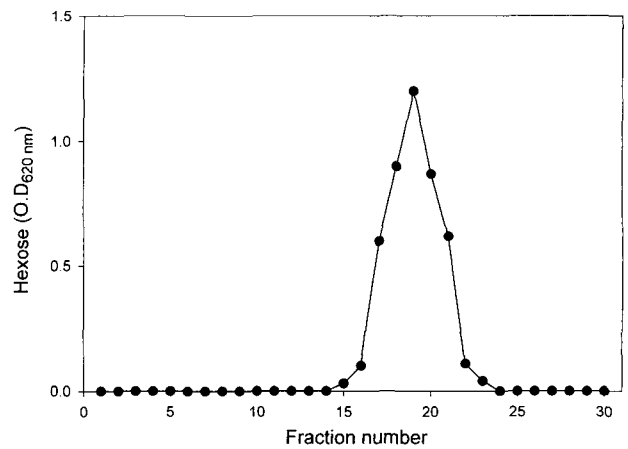


Fig. 4. Gel filtration column chromatogram of *E. coli* O157:H7 LPS.

Fractions (fraction volume, 5 mL) were assayed for hexose by anthrone assay.

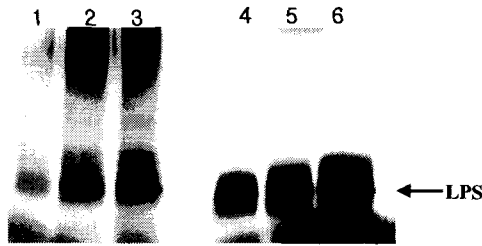


Fig. 5. Silver-stained SDS-15% polyacrylamide gel of *E. coli* O157:H7.

Lane 1~3: LPS purified by Johnson and Perry method (9), Lane 4~6: LPS purified by developed method: LPS at 10, 20, and 40 µg, respectively. LPS is indicated by the arrow.

O157:H7에 대한 백신 생산을 위해 순수한 lipopolysaccharide 분리, 정제를 위한 실험을 실시하였다. 분양된 대장균 O157:H7은 60 MDa plasmid를 분리하여 확인하였고, 대장균 O157:H7의 병원성과 밀접한 관계가 있는 shiga-like toxin(Stx)의 존재 유무를 파악하기 위해서 특이 primers를 이용하여 유전자 증폭 실험을 실시하였다. 그 결과 shiga-like toxin(Stx) 1, 2 유전자 단편이 증폭되었다(346 bp와 130 bp). 그리고 앞으로 만들 Stx 항체의 근거자료로서 활용할 수 있으리라 사료되어진다. 대장균 O157:H7이 생성하는 Stx는 shiga 독소와 유사한 독소로 shiga toxin family에 속하며(17,18), Stx는 Stx 1과 Stx 2의 2종류가 보고되었다(14,15). Stx 1은 *Shigella*균이 생성하는 shiga 독소와 동일하고 Stx 2는 Stx 1과 아미노산 레벨에서 약 50~60%의 상동성이 있다. Stx의 수용체(receptor)로는 장관 상피세포 표면에 존재하는 Gb3 (glycolipid glo-botriaosyl ceramide: Gal α 1-4 Gal β 1-4 Glucose-ceramide)와 Gb4(GalNAc β 1-3 Gal α 1-4 Gal β 1-4 Glucose-ceramide)가 알려져 있다(19). Stx에 의해 장관상피세포에 존재하는 Gb3에 결합하고 장관상피세포를 사멸시켜 수분 대사에 이상을 초래하여 설사증을 일으키며, 특히 Stx가 모세혈관에 작용하여 혈관세포 장애를 일으킬 때에는 혈변을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 Stx의 직접적인 표적은 신장의 혈관내피세포일 것으로 생각되고 있으며, vero 세포의 칼슘 증가를 통하여 MAP kinase 활성도를 증가시킨다는 보고도 있다(20).

기존의 대장균 O157:H7의 LPS 분리 및 정제 방법(9)은 시간 및 분리과정의 번잡성으로 인하여 보편적인 실험 방법으로 사용하기가 힘든 상태이다. 특히 한번 분리하고 확인하는데 오랜 시간이 소요되는 문제점이 발생한다. 이런 문제점을 개선하기 위해 질소 고정세균의 LPS 분리 방법에 사용했던 방법(21,22)과 LPS 침전 방법(23)을 개량하여 48시간만에 정제할 수 있는 방법을 개발하였다. 추출 방법은 다음과 같이 실시하였다. 대장균을 폐놀로 추출하고, 추출된 수층을 회수하여, 이곳에 DNase 및 RNase를 처리하여 핵산을 제거하고, 염과 에탄올을 처리하여 LPS를 분리하였다. 대부분의 LPS 정제실험 중 겔여과는 필수과정이며, 염 및 기타 불순물제거에 효과적인 정제과정이라 생각되어지고 있다(24-26).

정제 확인을 위해 분리된 LPS를 증류수로 녹여 겔 여과하여 정제하였고, 정제된 LPS의 순도를 확인하기 위해 SDS-PAGE와 silver nitrate 염색을 하였다. 그 결과 항원으로 사용할 수 있는 purity가 높은 LPS를 충분히 확보할 수 있었다. 따라서 이상과 같이 개발된 방법은 기존의 방법과 달리 간단하고 소요시간이 적으며, 효율적인 대장균 LPS 분리 정제 방법이라 사료되어진다.

요 약

대장균 O157:H7의 백신 생산을 위해서 purity가 높은 lipopolysaccharide 분리, 정제를 위한 실험을 실시하였다. 대장균 O157:H7 균주를 확인하기 위해서 shiga toxin을 생산할 수 있는 60 MDa plasmid를 분리하였고, PCR법에 의해 *E. coli* O157:H7 shiga-like toxin(Stx) 1, 2의 stx gene을 증폭하여 *E. coli* O157:H7의 특징(130 bp, 346 bp)을 확인하였다. *E. coli* O157:H7 LPS의 분리 정제는 폐놀추출, 에탄올 분획 및 gel filtration의 간단한 방법을 사용하였다. 마지막으로 SDS-PAGE와 silver nitrate 염색을 이용하여 LPS의 purity를 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2001-000-00108-0)지원으로 수행되었습니다.

문 헌

1. Johnson WM, Liar H, Bezanson GS. 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* 1: 76-80.
2. Morrison DM. 1985. Colony biopsy in verotoxin-induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Am J Clin Pathol* 86: 108-112.
3. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308: 681-685.
4. Chart H, Rowe B, van der Kar N, Monneas LA. 1991. Serological identification of *Escherichia coli* O157 as a cause of haemolytic uremic syndrome in Netherlands. *Lancet* 337: 437-440.
5. 日本國立豫防衛生研究所. 1996. 腸管出血性大腸菌 O157:H7의集團發生. 病原微生物檢出情報 17: 180-190.
6. Kim BU, Okuda J, Matsumoto C, Morigaki T, Asai N, Watanabe H, Nishibuchi M. 1998. Isolation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain producing shiga toxin 1 but shiga toxin 2 from a patient with hemolytic uremic syndrome in Korea. *FEMS Microb Lett* 166: 43-48.
7. O'Brien AD, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB. 1983. *Escherichia coli* O157:H7 stains associated with hemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like cytotoxin. *Lancet* 1: 702-706.
8. Cohen D, Gron MS, Block C, Rouch C, Ofek L. 1988. Serum

- antibodies to lipopolysaccharide and natural immunity to shigellosis in an Israeli military population. *J Infect Dis* 157: 1068-1071.
9. Johnson KG, Perry MB. 1976. Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides. *Can J Microbiol* 22: 29-34.
 10. Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
 11. Wang G, Clark CG, Rodgers FG. 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40: 3613-3613.
 12. Smith RJ, BeMiller JN. 1964. Starch. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic press Inc, New York. Vol IV, p 91-98.
 13. Tsai CM, Frasch CE. 1982. A sensitive silver stain for detection lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 119: 115-119.
 14. Ostroff SM, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM. 1989. Toxin genotype and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis* 160: 994-998.
 15. Tzipori S, Karch H, Wachsmuth KI, Robins-Browne RM, O'Brien AD, Lior H, Cohen ML, Smithers J, Levine MM. 1987. Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 55: 3117-3125.
 16. Vuddhakul V, Patararungrong N, Pungrasamee P, Jitsurong S, Morigaki T, Asai N, Nishibuchi M. 2000. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 from retail beef and bovine feces in Thailand. *FEMS Microbio Letters* 182: 343-347.
 17. Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, Holmes RK, O'Brien ADJ. 1998. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol* 170: 4223-4230.
 18. Pradel N, Leroy-Setrin S, Joly B, Livrelli V. 2002. Genomic subtraction to identify and characterize sequences of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl Environ Microbiol* 68: 2316-2325.
 19. Lingwood CA, Law H, Richardson S, Petric M, Brunton JL, DeGrandis S, Karmali M. 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin *in vitro*. *J Biol Chem* 262: 8834-8839.
 20. Keda M, Gunji Y, Yamasaki S, Takeda Y. 2000. Shiga toxin activates p38 MAP kinase through cellular Ca²⁺ increase in vero cells. *FEBS Letters* 485: 94-98.
 21. Carrion M, Bhat UR, Reuhs B, Carlson RW. 1990. Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 172: 1725-1731.
 22. Carlson RW, Lee RP. 1983. A comparison of the surface polysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* 128C53 sm^{rif} with surface polysaccharides from its exo¹ mutant¹. *Plant Physiol* 71: 223-228.
 23. Carlson RW. 1984. Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *J Bacteriol* 158: 1012-1017.
 24. Carlson R, Sanders RE, Napoli C, Albersheim P. 1978. Host-symbiont interactions: purification and partial characterization of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *Plant Physiol* 62: 912-917.
 25. Song SC, Lin L. 1998. Characterization from *Rhizobium fredii*: Cytostructure, lipopolysaccharides, and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. *Bot Bull Acad Sin* 39: 261-267.
 26. Song SC, Lin LP. 1999. The transition of *Rhizobium fredii* lipopolysaccharides induced by soybean root exudation. *Bot Bull Acad Sin* 40: 73-78.

(2003년 7월 22일 접수; 2003년 11월 6일 채택)