

螢光抗體反應에 의한 *Aspergillus* spp.의 分類에 關한 研究

文 希 柱 · 金 承 坤

서울保健專門學校 臨床病理科

李 培 威

建國大學校 應用微生物研究所

Studies on the Classification of *Aspergillus* spp. by Fluorence Antibody Reaction

Hi Joo Moon and Sung Kon Kim

Dept. of Clinical Pathology, Seoul Health Junior College

Bae Ham Lee

Institute of Applied Microbiology, Kon-Kuk University

Abstract : Author investigated fluorence antibody reaction for the antigenic relationships between *Asp. niger* group, *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus* which was indicated as follows:

1. It was concluded that there are complete differences in the antigenic properties each other because it has not cross reaction, therefore identification of strains will be simpley classified.
2. A complete cross reaction between *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus* in the *Asp. flavus* groups existed, accordingly this reaction could not identified the strain and classified between *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus*.
3. This experiment also followed with the separated each strains from the origin(Meju, Nuruk, ATCC, NRRL), but there no differences.

From the above results, this method could be classified between *Asp. flavus* group and *Asp. niger* group in the genus *Aspergillus*, but classification of *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus* should hardely conclude with this method.

緒 論

이 試驗에서 利用한 螢光抗體 反應法은 예민성과 特異性이 높아 免疫學, 組織學, 細菌學, virus學分野에 應用될 수 있다는 것이 美國免疫學會에서 Coons (1950)에 의해 指適되었다.

그 後 많은 學者들이 이 方法을 應用하는데 努力하여 왔으며 特히 Cater(1959) 등은 細菌의 特殊染色을 試圖하였으며 Goldman(1959)는 *Toxoplasma*를 Moody

(1958, 1959)는 *Pasteurella*와 Streptococci를 grouping 하는데 應用하였고 Joseph(1962) 등은 *Brucella*菌을 分離同定하는데 利用하였다.

우리 나라에서도 金(1970) 朴(1969, 1970, 1971) 및 安(1971) 權(1972) 등은 疥癬, 日本뇌염, 우역 檢出에 利用하였고 또 丹毒 *Brucella* 診斷에 利用하였다.

著者들은 *Aspergillus* spp.의 分類에 이 方法을 利用하여 다음과 같은 結果를 얻었으므로 그 成績을 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

建國大學校 應用微生物 研究所에서 蒐集한 메주, 누룩, 곡자를 材料로 하여 分離한 菌株 가운데서 *Aspergillus*屬에 屬하는 菌株들을 Raper 및 Fennell等 (1965)의 分類方法에 따라 同定된 *Asp. flavus* 3株, *Asp. parasiticus* 1株 *Asp. niger* 1株 合計 5株를 使用하였다(Table 1).

Table 1. Tested strains and their sources

Strain No.	Name of strain	Origin
A-9	<i>Asp. flavus</i>	Meju
A-107	<i>Asp. flavus</i>	Nuruk
A-120	<i>Asp. parasiticus</i>	NRRL-465
A-124	<i>Asp. flavus</i>	ATCC-15517
A-79	<i>Asp. niger</i>	NRRL-3112

2. 實驗方法

(1) 菌培養

使用 培養基는 Sabouraud培地를 使用하였고 250ml 삼각 flask에 100ml程度의 위 液體培地를 넣고 完全히 滅菌한 다음 菌의 spore를 接種하여 30°C±1에서 培養을 한 結果 A-9 A-107 A-120 A-124의 菌株들은 60時間 A-19의 菌株는 48時間만에 spore形成을 볼 수 있었으므로 모든 strain은 spore가 形成되기 前인 40時間만에 菌糸體를 採取하여 生理的 食鹽水에 3回 反復하여 水洗하여 使用하였다.

(2) 抗原製造

水洗된 菌糸體의 덩어리를 37°C±1에서 24時間동안 乾燥한 다음 phosphate buffer solution(pH7.2, P.B.S)에 20%(w/v)되게 混合한 後 French cell pressur에 넣어 1100 P.S.I.G에서 20分間씩 3回 反復하여 細胞를 破壞한 後 前記 P.B.S로 4:1 희석하여 試料로 使用하였다.

(3) 免疫方法

體重 1.8~2.0kg의 健康한 白色 토끼를 選定하여 위에서 製造한 whole antigen에 同量의 freund complete adjuvant(F.C.A)와 混合한 後 토끼의 大腿부 筋肉內에 2週間隔으로 每回 1.5cc씩 2回 注射하였다. 最終日 9日 後에 部分採血하여 gel precipitation test (G.P.T)(Ouchterlong 1958, Parlett 1965)에서 充分

한 抗體의 形成을 認定한 後 全體採血하여 血清을 分離한 다음 -20°C에 保存하면서 使用하였다.

(4) Antiglobulin製造

(토끼 globulin에 대한 antiglobulin製造)

正常 토끼의 血清을 50% ammonium sulfate 抽出法 (Goldman 1960)에 의하여 globulin을 抽出했으며 適當量의 토끼 globulin에 同量의 F.C.A와 混合 調製하여 調製液 10cc를 山羊의 筋肉에 接種하고 2週後에 同一量을 追加接種한 後 9日後에 部分採血하여 G.P.T (1958, 1965)에 의하여 高度의 抗體價를 認定한 後 全體採血하고 血清을 分離하여 -20°C에 保存하면서 使用하였다.

(5) r-globulin製造

위의 antiglobulin을 ammonium sulfate方法 (Goldman, 1960)에 準하여 r-globulin을 分劃한 後 少量의 P.B.S.에 녹여 透析하여 ammonium sulfate成分을 完全히 除去하고 免疫電氣泳動法 (Gray 1969)으로 Rabbit IgG Fraction에 대한 抗體를 保有하고 있음을 確認하였고 protein의 含量을 Spectrophotometer(O.D.=280m/ν)로 測定하여 cc당 20mg이 되게 P.B.S.로 稀釋하여 使用하였다.

(6) Antiglobulin . F.I.T.C. labelling.

Ammonium sulfate 法(Ouchterlony 1958, Parlett 1965)에 依하여 globulin을 分劃한 後 Nairn法(1968)에 準하여 F.I.T.C(wako chemical)를 labelling하였으며 未結合色素를 除去하기 위해 Sephadex G25 chromatography를 行하고 非特異 結合因子를 除去하기 위하여 D.E.A.E. cellulose 여과 製한 後 tissue powder (T.P)로 吸着(Stevenson 1969, Mohanty 1970)시킨 後 conjugate의 染色 價를 測定한 바 Table 2에서 보는 바와 같이 40배 정도였다.

이것을 -20°C에 保存 試驗에 使用하였다.

(7) 染色

① 標本作成 및 固定

菌糸體를 slide glass에 도말하여 標本을 作成하고 acetone으로 3分間 固定하여 使用하였다.

② 染色

固定이 끝난 標本에 토끼 血清으로 充滿시켜 37°C에서 40~60分間 反應한 後 P.B.S.(pH 7.2, 0.01M)로 充分히 洗滌한 後 다시 conjugate로 充滿시켜 37°C에서 40~60分間 染色한 後 P.B.S.(pH 7.2 0.01M)로 充分히 洗滌한 後 50% 구리세링 P.B.S로 滴下시켜 cover glass로 包埋하여 檢鏡하였다.

(8) 檢鏡

螢光顯微鏡은 Tiyoda F.A microscope FM-200A를

Table 2. Measurement of staining for conjugate

표본별	serum	FA희석배수							
		1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
A-9	positive	4+	4+	4+	2+	±	—	—	
	negative	—	—	—	—	—	—	—	
A-107	positive	4+	4+	4+	2+	±	—	—	
	negative	—	—	—	—	—	—	—	
A-120	positive	4+	4+	4+	2+	±	—	—	
	negative	—	—	—	—	—	—	—	
A-124	positive	4+	4+	4+	2+	±	—	—	
	negative	—	—	—	—	—	—	—	

사용하였으며 filter system은 E₂BV excitator Filter와 NO₃(yellow) absorption filter로, BV excitation system을 사용하였고 Extachrom A.S.A. 64(daylight) kodak film으로 촬영하였다.

實驗成績

1. Strain A-9의 菌絲體에 對한 各 strain의 反應結果

메주에서 分離한 *Asp. flavus* 抗原에 메주에서 分離한 *Asp. flavus*, 누룩에서 分離한 *Asp. flavus*, ATCC에서 分讓받은 *Asp. flavus*, NRRL에서 分讓 받은 *Asp. parasiticus* 抗體사이에는 서로 完全한 交叉反應의 成立이 認定되었다(Fig. 1-a).

2. Strain A-107 菌絲體에 對한 各 strain의 反應結果

누룩에서 分離된 *Asp. flavus* 抗原에 누룩에서 分離한 *Asp. flavus*, 메주에서 分離한 *Asp. flavus*, ATCC에서 分讓받은 *Asp. flavus*, NRRL에서 分讓 받은 *Asp. parasiticus*의 抗體사이에도 서로 完全한 交叉反應의 成立이 認定되었다(Fig. 1-b).

3. Strain A-120의 菌絲體에 對한 各 strain의 反應結果

美國 NRRL에서 分讓받은 *Asp. parasiticus* 抗原에 同抗體와 ATCC에서 分讓받은 *Asp. flavus* 메주에서 分離한 *Asp. flavus*, 누룩에서 分離한 *Asp. flavus*의 抗體사이에도 서로 完全한 交叉反應의 成立이 認定되었다(Fig. 1-c).

4. Strain A.124의 菌絲體에 對한 各 strain의 反應

ATCC에서 分讓받은 *Asp. flavus*, 의 抗原에 同抗體, 美國 NRRL에서 分讓받은 *Asp. parasiticus* 메주에서 分離한 *Asp. flavus*, 누룩에서 分離한 *Asp. flavus*의 抗體사이에도 서로 完全한 交叉反應의 成立이 認定되었다(Fig. 1-d)

5. Strain A-79 菌絲體에 對한 各 strain의 反應結果

美國 NRRL에서 分讓받은 *Asp. niger*의 抗原에 對한 同研究所에서 分讓받은 *Asp. parasiticus* ATCC에서 分讓받은 *Asp. flavus*메주 및 누룩에서 分離된 FrI: *The* 抗體사이에는 서로 完全한交叉反應의 成立이 認定되지 않았다(Fig. 1-e).



Fig.1-a: positive

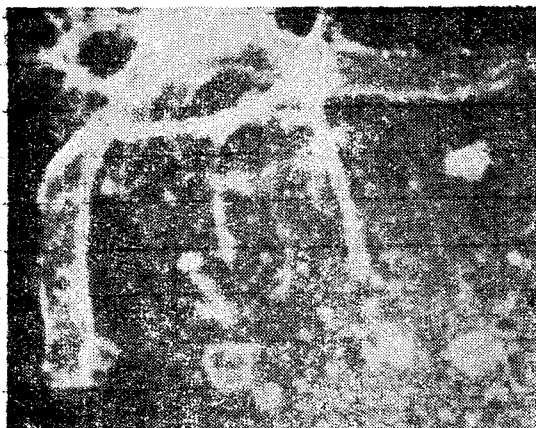


Fig.1—b: positive

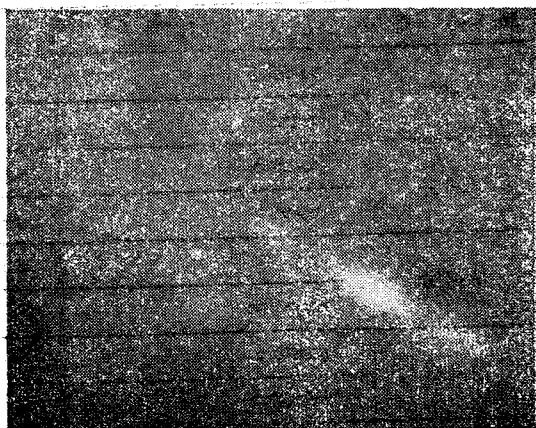


Fig.1—e: negative



Fig.1—c: positive

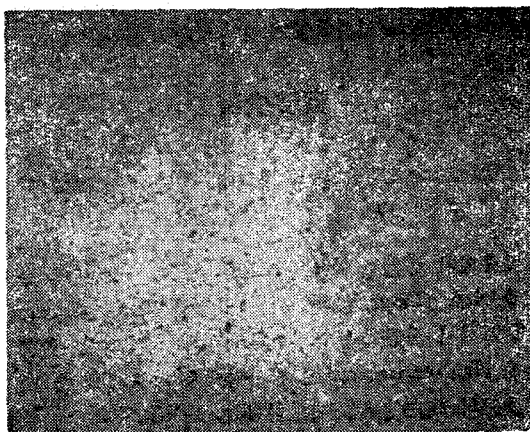


Fig.1—f: control

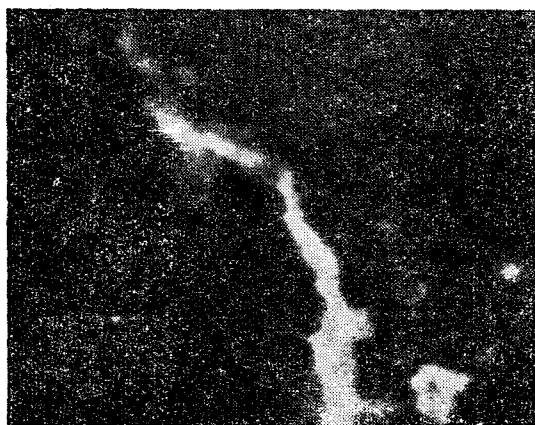


Fig.1—d: positive

Fig. 1 The reaction of each antibody for various antigen

本實驗에서의 綜合的인 結果는 다음 Table 3과 같다.

Table 3. Cross reaction of each strain

antibody	antigen					
	A-9	A-107	A-120	A-124	A-19	control
A-9	+	+	+	+	-	-
A-107	+	+	+	+	-	-
A-120	+	+	+	+	-	-
A-124	+	+	+	+	-	-
control	-	-	-	-	-	-

考 察

지금까지 *Aspergillus* spp의 分類은 key는 (Stevenson 1969) sterigmata의 配列 및 크기 conidium의 크기, 색깔, 모양, Colony前面的 색깔 및 發育狀態, conidial head의 모양 Conidophore의 길이 및 表面모양 vesicle의 크기 및 培地 內에서 菌絲體 색깔 등의 形態의인 成狀과 亞窒酸鹽의 同化能 (Frisohbier 1941), α - 및 β -amylase와 maltase의 活性(北原覺雄 1950), kojic acid의 生産能(Iizuka 1965), arylsulfatase의 活性 培地の 水素 ion濃度 變化(李培成 1968) 등의 生理學的인 特性等으로 分類되었다.

이 實驗에서 利用한 菌株들은 위 方法에 依해 *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus*, *Asp. niger*로 分類된 것이다.

이 中에서 *Asp. flavus* group과 *Asp. niger* group 사이에는 여러가지 形態의인 性狀과 生理的인 特性等으로 뚜렷한 差異點이 있어 分類가 용이하나 *Asp. flavus* group內의 *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus* 사이에는 몇 가지 形態의인 性狀을 除外하고는 큰 差異點이 없어 分類에 상당한 어려움이 있는 것으로 生覺되어 細菌學 分野에서 많이 利用되고 있는 螢光抗體 反應法을 應用한 結果 여기서도 實驗成績에서 보노바와 같이 group間的 分類인 *Asp. flavus* group과 *Asp. niger* group의 分類는 용이하나 group內의 即 *Asp. flavus*와 *Asp. parasiticus*分類는 이 方法 으로는 어려운 것으로 生覺된다.

結 果

建國大學校 應用微生物 研究所에서 蒐集한 *Aspergillus* spp가운데 메주에서 分離한 *Asp. flavus* 1株, ATCC로 부터 分讓받은 *Asp. flavus* 1株, 美國 NRRL *Asp. parasiticus* 1株, *Asp. niger* 1株를 使用하여 이들의 差異點을 螢光抗體 反應을 應用하여 實驗한 結果.

① *Asp. flavus* group과 *Asp. niger* group의 사이에는 이 實驗에서 交叉反應이 없으므로 이들의 抗原性은 서로 完全한 差異가 있다고 볼 수 있으며 따라서 쉽게 區別할 수 있었다.

② *Asp. flavus* group의 *Asp. flavus*와 *Asp. parasiticus*의 사이에는 이 實驗에서 完全한 交叉反應이 成立되므로 이들을 共通抗原性을 가졌다고 볼 수 있으며 따라서 *Asp. flavus*와 *Asp. parasiticus*의 사

이는 이 反應으로 區別할 수 없었다.

③ 各 菌體가 分離된 origin(메주, ATCC, 누룩, NRRL)의 種類에도 이 實驗에서는 아무런 差異가 없었다.

위와 같은 結果를 간추려 볼 때 *Aspergillus* spp中 *Asp. flavus* group과 *Asp. niger* group의 사이는 이 反應으로 分類가 가능하나 같은 group內에서 species 間에서는 即 *Asp. flavus*와 *Asp. parasiticus*의 사이에서는 反應으로 分類가 어려운 것으로 生覺된다.

이 논문의 요지는 한국미생물학회 17회 학술발표회에 발표된 것이다.

References

- Coons, A.H. and M.R. Kaplan(1950): Localization of antigen in tissue cells. 2. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exptl. Med.*, **91**: 1-13.
- Coons, A.H., E.H. Leduc and J.M. Connolly. (1955). Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.*, **101**: 49-59.
- Carter, L.H., and J.H. Liese.(1959): Specific staining of various bacteria with a single fluorescent antiglobulin. *J. Bacteriol.*, **76**: 152-154.
- Goldman M.(1959): Staining Toxoplasma gondii with fluorescein labelled antibody II. A new serologic test for antibodies to Toxoplasma based upon inhibition of specific staining. *J. Exp. Med.*, **105**: 557-573.
- Moody M.D. and C.C. Winter.(1959): Rapid identification of pasteurized pasteurized pestis in tissue impression smears. *J. Infectious Diseases.*, **104**: 288-294.
- Moddy M.D., E.C. Ellis and E. Upoyke.(1958). staining bacterial smears with fluorescent antibody VIII. Grouping Streptococci in dried smears with fluorescent antibody. *J. Bacteriol.*, **75**: 553-560.
- Joseph Z. Biegeleisen, J.R. Bradshaw and Maxd. Moddy(1962): Demonstration of Brucella anti-

- bodies in human serum. *J. Immunol.*, 88 : 109—112.
- Kim S.J. and B.J.Kang.(1970): Detection of hog Cholera virus from the artificially infected pigs by fluorescent antibody technique and E.N.D method. *The Research Reports of the Office of Rural Development* 13 : 53—58.
- 박동권, 김두희(1969): 螢光抗體法을 이용한 돼지콜레라 豫防藥 감정에 관한 研究. 家畜衛生 研究所 試驗研究 報告書., 470—477.
- 박동권, 정병탁, 정운익(1971): 螢光抗體法을 이용한 家畜 전염병 진단에 관한 研究. 家畜衛生 研究所 試驗 報告書., 131—146.
- 박동권, 박정문, 박순용, 정운익(1970): 螢光 抗體法을 이용한 家畜傳染病 진단에 관한 研究, 家畜 衛生 研究所 試驗報告書., 67—70.
- 안수환, 이영옥(1972): 간접 螢光抗體法에 의 한 우역, 돼지콜레라 및 일본뇌염 virus의 檢出 家畜衛生 研究所 試驗研究 報告書., 75—85.
- 권경만, 김봉환, 윤용덕(1972): 螢光抗體法을 利 用한 돈單毒 Brucella 진단에 관한 研究. 家畜 衛生 研究所 試驗 報告書., 68—74.
- Ouchterlong, O.(1958): Diffusion-in-gel meth- ods for immunological analysis. *Progr. Alle- rgy*, 5 : 1.
- Parlett R.C. and Youmans G.P.(1965): Anti- genic relationships between Mycobacteria as determined by agar precipitation techniques. *Amer. Rev. Tuberc & Pulmon. Dis.* 73 : 637.
- Goldman M.(1960): Fluorescent antibody methods. Academic Press.
- Gray G.D', M.M.Mickelsin and J.A.Crim (1969): The demonstration of two r-globulin subclasses in the goat. *Immuno chemistry Pergamon Press.*, 6 : 641—644.
- Mairn R.C.(1968): Standardization in immu- nofluorescence. *clin. Exp. Immunol.* 3 : 465 —476.
- Stevenson R.C.(1969): Immunofluorescence studies of Parainfluenza virus in the lungs of lambs. *J. Comp.*, 79 : 483—491.
- Mohanty G.C. and G.E.Cottral.(1970): Immu- no fluorescent detection of foot and mouth disease virus in the esophageal-pharyngeal fluids of inoculated cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 31 : 7—18.
- Raper K.B. and D.I.Fennell(1965): The genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkine Co. Baltimore.
- Frischbier and Richtesteiger(1941): Bildung Von Oxalsäure durch *Aspergillus niger* in Brat und der Streuz. *Veterinark.*, 53 : 391.
- 北原覺雄 久留島通俊(1950): 絲狀菌類のデスタ ーゼ組成に關する研究. *農工學誌*, 28—101.
- Iizuka H. and J.Sugiyama(1965): On three new *Aspergilli* isolated from Kuro-Koji of Ryuku islands and Kagoshima, Japan., *Jap. Bot.* 40 : 230.
- 李培威, 金尙材, 李浩源(1968): 韓國產 *Aspe- rgillus*에 對한 分類學的 研究. 韓國微生物學會誌., 6 : 6—10.