

탄저균의 Random Amplified Polymorphic DNA-PCR 분석

김성주 · 박경현 · 김형태 · 조기승 · 김기천 · 최영길¹ · 박승환² · 이남택³ · 채영규*
한양대학교 생화학 및 분자생물학과, ¹한양대학교 생물학과, ²생명공학연구원, ³육군사관학교 화학과

탄저균의 분자적 다양성 분석은 다양한 DNA 표지의 부족으로 쉬운 일이 아니어서, 본 연구에서는 random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR을 이용하여 *Bacillus* 속으로부터 탄저균을 구별할 수 있는 새로운 DNA 표지를 개발하고자 하였다. RAPD-PCR을 이용한 분석은 다양한 *Bacillus* 종으로부터 탄저균을 동정할 수 있었으며, 아울러 *Bacillus* 종 사이에서 확실한 유전적인 변이를 확인할 수 있었다. 이러한 분석은 간단, 신속하고, 그리고 정확하게 탄저균을 진단하는데 활용할 수 있다고 본다.

Key words □ *Bacillus anthracis*, RAPD, PCR, DNA marker

탄저(anthrax)는 탄저균(*Bacillus anthracis*)의 감염에 의한 가축 뿐만 아니라 사람에서도 발병하는 인수공통 전염병이다(27). 탄저를 일으키는 원인인 탄저 독소는 방어항원(protective antigen), 부종독소(edema toxin), 치사독소(lethal toxin) 및 poly-D-glutamic acid 헤파막 등으로 구성되어 있다(29). 탄저독소(anthrax toxin)로 총칭되는 독소구성 단백질은 방어항원(pag 유전자 산물, 83 kDa: PA), 부종요소(cya 유전자 산물, 89 kDa: EF), 그리고 치사요소(lef 유전자 산물, 90 kDa: LF)로 구성되어 있다. 이들 각각은 독성을 나타내지 못하나, LF는 PA와 결합하여 mitogen-activated protein kinase의 단백질 분해 활성을 억제하는 억제제(11) 역할을 수행하여 치사독소를 형성하며(9), EF는 calcium-calmodulin 의존성 adenylate cyclase의 한 종류로 PA와 결합하여 피부수종을 일으키는 부종독소를 형성한다(18,32).

탄저균은 형태학적 그리고 DNA의 유사성에 근거하여 *Bacillus cereus*에 속해 있는 *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. 그리고 *Bacillus mycoides* 등과 유사성이 높다(8,11,12,19). DNA 분석 결과 탄저균은 AT가 풍부한 계통과 유사성에 있어 *B. cereus*, *B. mycoides*, 그리고 *B. thuringiensis*와 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 있다(11).

탄저균의 진단 및 동정에는 오랫동안 여러 가지 방법이 사용되고 있다(26). 즉, 탄저병 독소 생성 및 실험동물에 대한 병원성에 관한 특성(21), 생리생화학적 특성(2,20) 및 혈청학적 특성(13, 23,24) 등이 이용되고 있다. 국내의 경우 최 등(4-6)과 조 등(2,3)이 형태학적인 특성이나 균체 항원에 대한 면역혈청 또는 단클론항체를 이용하여 탄저균의 동정 연구를 수행하였다.

분자생물학 기법이 발전하면서, 단순한 동정, 분류뿐만 아니라 진화적인 유전관계 연구에 분자생물학적인 방법들이 많이 이용되고 있다. 즉, G-C% 함량, direct sequencing, restriction frag-

ment length polymorphism(RFLP), rRNA sequencing, random amplified polymorphic DNA(RAPD) 등이 있다. 그 중 PCR(polymerase chain reaction)과 병행한 RAPD는 많은 미생물에서 균주들의 동정을 위하여 효과적으로 사용되어져 왔으며, 분류학과 발생학적 관점에서 효과적인 방법으로 사용되어 왔다. RAPD 방법은 8~10 bp의 짧은 random primer를 사용하여 PCR을 실시한 후, 그 DNA 단편들을 진단용 DNA 표지로 사용할 수 있고(31), 적은 양의 주형 DNA로도 효과적 분석이 가능하고, 많은 시료를 분석할 수 있어 경제적이며, 염기서열을 알기 전에 유전적 다양성을 분석할 수 있다(24). Daffonchio 등(10)은 *B. cereus* group에 특징적인 DNA marker를 이용한 RAPD가 탄저균의 진단에 사용될 수 있다고 했다.

본 연구에서는 여러 *Bacillus* 종과 탄저균주들 간의 분자생물학적인 분석과 탄저균들의 유전형의 차이를 RAPD-PCR을 이용하여 규명하였다.

재료 및 방법

세균 및 배양 조건

탄저균은 수의과학검역원(VRI, RDA, Korea)에서 보존하고 있는 Sterne 균주의 6종 및 *Bacillus* 속 11 균주(Table 1)를 사용하였으며, 일반적인 탄저균의 배양조건은 조 등(2,3)이 사용한 방법에 따라 brain heart infusion(BHI, Difco Co.) broth와 한천평판 배지에 접종하고 37°C에서 18~20시간 진탕(100 rpm) 또는 정체 배양하였다.

Genomic DNA의 추출

시험균과 대조균의 염색체 DNA 분리는 Hunter(14)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 보존 균주를 10 ml의 BHI 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 100 ml의 BHI액체배지에서 대수기 말기까지 키운 후 약 5 g 정도의 균체에 10

*To whom correspondence should be addressed.

Tel : 031-400-5513, Fax : 031-406-6316

E-mail : ygchai@email.hanyang.ac.kr

Table 1. Strains of *B. anthracis* and *Bacillus* species used in this study

Strain	Source
<i>Bacillus anthracis</i>	NVRI
<i>B. anthracis</i> (Hongsung)	NVRI
<i>B. anthracis</i> (Kyunjoo)	NVRI
<i>B. anthracis</i> ATCC14578	NVRI
<i>B. anthracis</i> ATCC14185	NVRI
<i>B. anthracis</i> pasteur No.1 ATCC6602	NVRI
<i>B. anthracis</i> Stern 34F2	NVRI
<i>B. anthracis</i> pasteur No.2 Army	NVRI
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	NVRI
<i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC23350	IMSNU
<i>B. licheniformis</i> ATCC27811	IMSNU
<i>B. brevis</i> IMSNU12063	IMSNU
<i>B. cereus</i> ATCC11778	IMSNU
<i>B. megaterium</i> ATCC14581	IMSNU
<i>B. pacificus</i> ATCC25089	IMSNU
<i>B. pumilus</i> JCM2508	IMSNU
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC12980	IMSNU
<i>B. thuringiensis</i> ATCC10792	IMSNU
<i>B. validus</i> ATCC43897	IMSNU

NVRI: National Veterinary Research Institute, RDA, Korea.

IMSNU: Culture Collection Center Institute of Microbiology Seoul National University.

mg의 lysozyme을 포함한 10 ml의 TE를 넣고 용균이 완전히 될 때까지 30°C에서 처리하였다. 용균된 용액에 1 ml의 20% SDS를 넣은 후 서서히 혼합한 다음 1.5 ml의 5 M NaCl과 10 ml의 페놀을 넣고 20분 동안 상온에서 서서히 흔들어 준 후, 3,500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 동량의 클로르포름을 넣고 10분 동안 서서히 흔들어 준 다음, 상층액을 멸균된 100 ml의 비커에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 넣었다. 이를 상온에서 5분 정도 방치한 후, 두 층 사이에 형성된 염색체 DNA를 감아 올렸다. 얻어진 DNA를 소량의 TE에 녹인 다음 RNase (20 µg/ml)을 넣고 50°C에서 1시간 반응시키고 protease K (100 µg/ml), NaCl (100 mM)과 SDS (0.4%)을 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 위의 페놀 처리 이후 과정부터 TE로 녹이는 과정까지 반복한 다음, 260 nm의 흡광도로 DNA 농도를 정량하였다.

RAPD-PCR

PCR의 조성은 전체양 50 µl에 3 mM MgCl₂, 200 µM의 deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 각 PCR primer, 1 unit의 Taq DNA polymerase (Promega), 그리고 약 10 ng의 genomic DNA를 사용하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분 동안 denaturation한 후, 94°C에서 15초간 denaturation, 40°C에서 30초간 annealing, 그리고 72°C에서 60초간 extension

과정으로 30 cycle을 수행하였고, 72°C에서 8분간 final extension을 한 후 15°C에서 보관하였다. 실험에 사용된 10 bp oligonucleotide primer (BAR3; 5'-GCGATCCCCA-3', BAR5; 5'-AACGCGCAAC-3')는 GenoTech에서 구입하여 사용하였다.

PCR 산물의 확인은 Tris-acetate (TAE) buffer를 사용하여 1.5% 또는 2.0% agarose gel 전기영동을 한 후 관찰하였다.

클로닝 (Cloning)

홍성에서 분리된 탄저균의 RAPD-PCR 결과로 얻어진 약 530 bp 크기의 DNA 절편을 Qiagen DNA elution system II (Qiagen Co.)로 추출한 후, pGEM-T easy vector system (Promega)을 사용하여 클로닝 (pRAPD11)하였다. 즉, DNA 절편과 클로닝 vector (50 ng/µl)를 1대 3의 비율로 혼합하여, T4 DNA ligase 30 Weiss Units을 첨가한 후에 14°C에서 4시간 이상 반응시켰다. 반응물을 대장균 DH5α에 형질전환시켜, X-gal 800 µg과 ampicillin 600 µg을 포함하는 LB 평판배지에 배양하여 백색 클론이 형성된 균주를 선별하였다.

염기서열 결정 및 분석

홍성에서 분리한 탄저균의 DNA 절편을 pGEM-T easy vector에 클로닝한 후, 염기서열분석을 하였다. 염기서열은 (주) 바이오 넥스에 의뢰하여 분석하였고, 얻어진 염기서열은 BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)을 사용하여 이미 알려진 염기서열과 비교 분석하였다.

Southern blotting 분석

Southern blotting에 사용한 DNA probe는 홍성에서 분리한 탄저균의 528 bp의 단편을 Qiaquick gel extraction kit (Qiagen)를 이용하여 1% agarose gel로부터 추출하고 ECL direct nucleic acid labelling and detection system (Amersham, UK)을 이용하여 표식화 하였다.

Southern blotting 분석은 시험용 균주와 대조균 균주로부터 위의 방법으로 genomic DNA를 추출한 후 5 µg DNA를 5 U의 BclI (BMS Co, Germany)으로 5시간 동안 절단한 후, 얻어진 DNA 절편을 0.8% (wt/vol) agarose gel에 100 V로 90분간 TAE 완충용액(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) 내에서 전기영동을 하였다.

전기영동에의 전개된 DNA 절편을 젤상에서 변성시키고, Nitrocellulose (NC) membrane (Bio-Rad Co.)에 옮긴 후 UV-crosslinker (Bio-Rad Co.)를 이용하여 NC membrane에 고정화시켰다.

혼성화 완충액(ECL kit, Amersham, UK)에 42°C에서 전혼성화 시킨 후 표식화된 DNA 탐침을 첨가하여 8시간 동안 혼성화 결합을 실시하였다. 혼성화를 한 NC membrane을 1차 반응액(0.5X SSC, 0.4% [wt/vol] SDS)에 10분 동안 55°C에서 세척한 후, 2차 반응액(2X SSC)으로 실온에서 2회 세척하였다. 세척한 NC membrane을 detection solution (ECL kit, Amersham, UK)에 반응시킨 후, 암실에서 NC membrane 위에 X-ray 필름을 올려 놓고 1시간 동안 노출시킨 후 현상하였다.

결과 및 고찰

탄저는 토양병 중의 하나이지만 이 질병을 일으키는 탄저균의 유전적 변화, 환경적 요인 등 가장 기본적인 전염병학적, 생태학적으로 아직 밝혀지지 않는 점이 많이 있다(27). 따라서 탄저균 주들의 유전형의 차이를 밝혀내는 것은 발병학적, 전염병학적, 탄저균의 변이, 그리고 생물지리학적인 연구에 적용할 수 있다(17,26).

시험균주로 6종의 탄저균주, 대조균주로 11종의 *Bacillus* 균주에 BAR3 primer를 이용한 RAPD-PCR을 행한 후, 분획 양상을 본 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 시험균주 중 *B. cereus*에 속해 있는 균주 중에서 *B. weihenstephanensis* sp. nov. 그리고 *B. mycoides* 등은 구입하지 못하여 비교할 수 없었다. 홍성과 경주에서 발견된 균주를 포함한 탄저균은 약 2.4, 1.3, 0.95, 0.5, 그리고 0.22 kbp의 뚜렷한 5개의 분획이 나타나는 양상을 보였다(Fig. 1. lane 2-8). 대조균주인 11종의 *Bacillus*는 각각 독특한 분획 양상을 보임으로써, 모두 탄저균과는 다른 양상을 나타내 탄저균과 구분되었다(Fig. 1. lane 9-19).

BAR5 primer를 이용한 RAPD-PCR의 결과(Fig. 2)에 의하면, 탄저균은 약 1.6, 1.4, 1.3, 1.05, 0.85, 0.65, 0.53, 0.4, 및 0.25 kbp의 분획 양상을 나타내어 다른 *Bacillus* 종과 확연히 구분되었으며, 탄저균 내에서도 서로 다른 유전형의 차이(genotype)가 나타났다. 즉, 경주주에서는 약 560 bp의 단분획을, 홍성주에서는 약 530 bp의 단분획을 나타내 국내에서 발견된 탄저균은 서로 다른 분획 양상을 보였으며, 다른 5종의 탄저균과 *B. anthracis* ATCC14185는 나머지 탄저균과 다른 양상을 보였다.

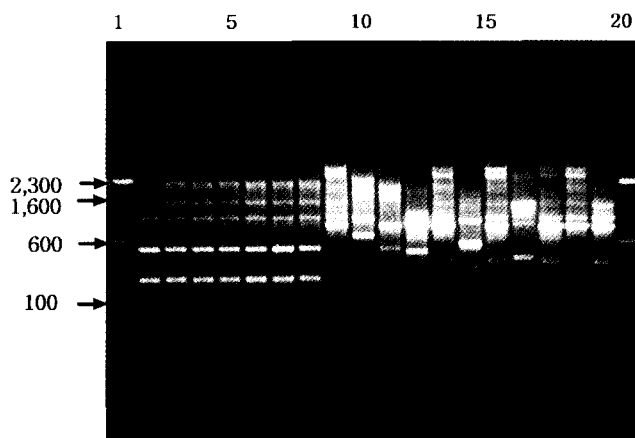


Fig. 1. RAPD-PCR of *Bacillus* strains performed with BAR3 primer. RAPD-PCR products were separated on a 1.5% agarose gel in TAE buffer. Lane 1, 20, 100 bp DNA ladder maker; lane 2-19, *B. anthracis* (Hongseung), *B. anthracis* (Kyungjoo), *B. anthracis* ATCC14578, *B. anthracis* ATCC14185, *B. anthracis* pasteur No. 3 ATCC6602, *B. anthracis* Stern 34F2, *B. anthracis* pasteur No. 2 Army, *B. subtilis* ATCC6633, *B. amyloliquefaciens* ATCC23350, *B. licheniformis* ATCC27811, *B. brevis* IMSNU12063, *B. cereus* ATCC11778, *B. megaterium* ATCC14581, *B. paciticus* ATCC25089, *B. pumilus* JCM2508, *B. stearothermophilus* ATCC12980, *B. thuringiensis* ATCC10792, and *B. validus* ATCC43897.

Andersen 등(7)은 *vrroA*의 12 nucleotide variable number tandemly repeated sequence (VNTR)에서 특이분획을 발견하였고, Jackson 등(15)도 탄저균 염색체의 *vrroA* locus의 sequence를 이용한 시발체를 사용하여 탄저균과 다른 *Bacillus* 종과의 DNA 절편의 다양성을 관찰하였다. Keim 등(16)도 탄저균의 특이분획을 관찰하기 위하여 AFLP markers를 이용한 실험을 수행하여 약 30 개의 분획을 관찰하였다. 그러나 AFLP에 의한 방법은 빠르고, 상대적으로 간단한 분석을 제공하며, 동일종간 그리고 다른 미생물종과의 계통발생학적인 정보를 용이하게 제공할 수 있지만(16), 특이 분획이 일어난 특정 좌위 또는 유전자를 확인하기에는 어려운 단점을 가지고 있다(30).

본 연구에서는 RAPD-PCR을 이용하여 여러 *Bacillus* 종 사이에서 탄저균의 분자생물학적인 동정과 탄저균 사이에서의 유전형의 차이를 구별할 수 있는 방법들을 적용하여 실험을 실시하였다. 그 결과 BAR5 primer를 이용하여 RAPD-PCR을 행한 후, 나타난 분획 양상에 의하여, 홍성과 경주에서 분리된 탄저균주는 서로 유전형의 차이가 있음을 나타냈다(Fig. 3). 경주에서 분리된 탄저균은 *B. anthracis* ATCC14578과 동일한 분획 양상을 나타냈고, 이는 김 등(1)이 경주에서 분리된 탄저균의 전균체 단백질 시험 및 동물 병원성 시험을 위해 대조 균주로 사용한 *B. anthracis* ATCC14578과 동일한 양상 및 병원력을 보인다고 보고한 것과 일치하였다. 한편, 홍성에서 분리된 균주는 *B. anthracis* ATCC14185 주와 같은 분획 양상을 나타냈다. 홍성에서 분리된 탄저균의 RAPD에서 얻어진 528 bp 단분획의 염기서열 분석 결과(자료생략)는, 알려진 염기서열과 유사하지 않은 결

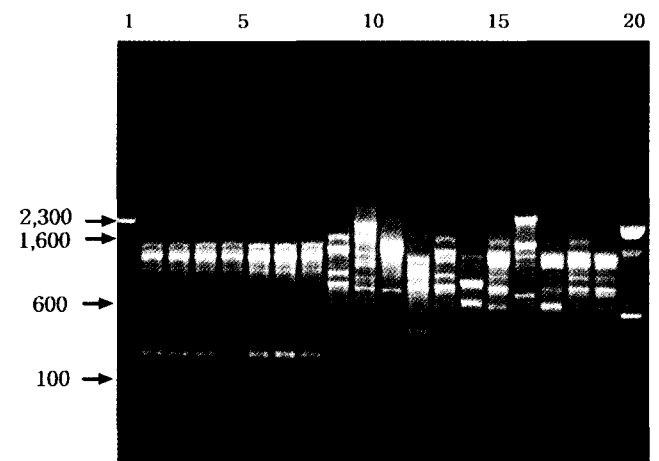


Fig. 2. RAPD-PCR of *Bacillus* strains performed with BAR5 primer. RAPD-PCR products were separated on a 1.5% agarose gel in TAE buffer. Lane 1, 20, 100 bp DNA ladder maker; lane 2-19, *B. anthracis* (Hongseung), *B. anthracis* (Kyungjoo), *B. anthracis* ATCC14578, *B. anthracis* ATCC14185, *B. anthracis* pasteur No. 3 ATCC6602, *B. anthracis* Stern 34F2, *B. anthracis* pasteur No. 2 Army, *B. subtilis* ATCC6633, *B. amyloliquefaciens* ATCC23350, *B. licheniformis* ATCC27811, *B. brevis* IMSNU12063, *B. cereus* ATCC11778, *B. megaterium* ATCC14581, *B. paciticus* ATCC25089, *B. pumilus* JCM2508, *B. stearothermophilus* ATCC-12980, *B. thuringiensis* ATCC10792, and *B. validus* ATCC43897.

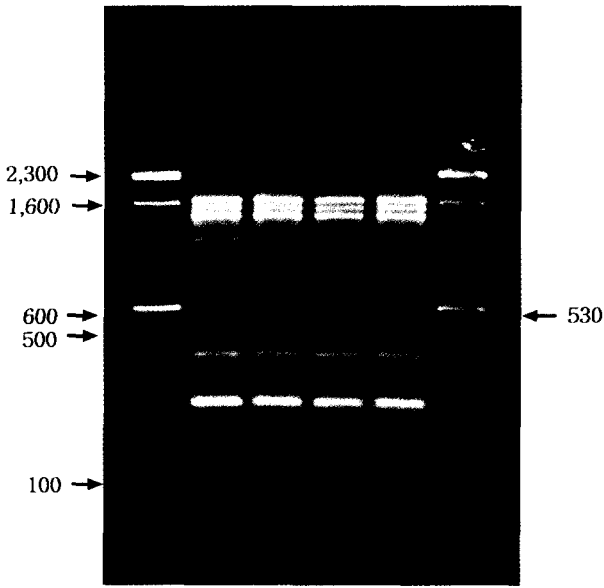


Fig. 3. RAPD-PCR with BAR5 of *Bacillus anthracis* electrophoresed on a 2.0% agarose gel in TAE buffer. Lane 1, 100 bp DNA ladder marker; lane 2-5, *B. anthracis* (Hongsung), *B. anthracis* (Kyungjoo), *B. anthracis* ATCC14578, and *B. anthracis* ATCC14185.

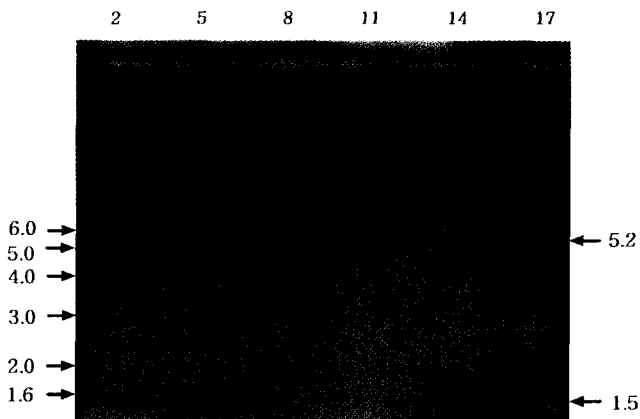


Fig. 4. Hybridization of the 528 bp RAPD-PCR product from *B. anthracis* isolated in Hongsung to *BclI* digested genomic DNA from *Bacillus* species. Lane 1, 1 kbp DNA ladder maker; lane 2-18, *B. anthracis* (Hongsung), *B. anthracis* (Kyungjoo), *B. anthracis* ATCC14578, *B. anthracis* ATCC14185, *B. anthracis* Pasteur No. 3 ATCC6602, *B. anthracis* Stern 34F2, *B. anthracis* Pasteur No. 2 Army, *B. subtilis* ATCC6633, *B. amyloliquefaciens* ATCC23350, *B. licheniformis* ATCC27811, *B. brevis* IMSNU12063, *B. cereus* ATCC11778, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. pasteurii* ATCC25089, *B. pumilus* JCM2508, *B. stearothermophilus* ATCC12980, and *B. thuringiensis* ATCC10792.

과를 보였고 또한 BLAST 프로그램을 사용하여 기존에 밝혀진 염기서열과 비교 분석하였을 경우에도 일치하는 것이 없어서, 탄저균만의 독특한 염기서열로 인정되었다(NCBI GenBank accession no. AF360859). 이를 확인하기 위하여 얻어진 단분획을 이용하여 Southern blotting 분석을 실시한 결과(Fig. 4), 탄저균들은 모두 약 5.2, 그리고 1.5 kbp의 분획을 나타냈다. 이 단편의

클로닝에 의한 완전한 염기서열을 분석이 가능할 것으로 생각하며, 이를 이용할 경우 Ba813과(22) 같은 탄저균 검색을 위한 DNA탐침으로의 활용 및 단백질의 구조, 기능 등의 연구에 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 보여진다.

감사의 글

본 연구의 일부는 국과연 연구비(TECD-407-001128)에 의하여 수행되었으며 이에 깊은 감사의 뜻을 올립니다.

참고문헌

1. 김호훈, 신영학, 강연호, 유천권, 박미선, 김동진. 1994. 탄저균의 세균학적 성장 및 역학 적 특성에 관한 연구. 국립보건원보. 31, 36-47.
2. 조성근, 박정문, 최영길, 채영규. 1996a. 생화학 및 혈청학적인 기술에 의한 한국에서 분리된 탄저균의 특성. 대한미생물학회지. 31, 415-422.
3. 조성근, 박정문, 권준현, 최영길, 채영규. 1996b. 탄저균 galactose-N-acetylglucosamine 다당류에 대한 단일클론 항체의 생성 및 특성. 대한미생물학회지. 31, 405-414.
4. 최철순, 이정화, 정상인, 양용태. 1992. 배지표면 및 하면의 거대집락형태에 의한 탄저균 약독백신 주 Pasteur No. 2-Arm 및 Stern 34-F2의 기타 유사 *Bacillus* species로부터의 감별. 대한미생물학회지. 27, 333-343.
5. 최철순, 박정훈, 정상인, 양용태. 1992. 탄저균의 협막형 및 비협막형 균주의 전균체항원에 대한 면역혈청을 이용한 Ouchterlony 면역확산시험에 의한 탄저균 및 유사탄저균의 균종동정과 균주감별. 대한미생물학회지. 27, 407-417.
6. 최철순, 장호근, 강 석, 김기정, 정상인, 양용태, 박정문, 권준현. 1994. 단클론 항체를 이용한 탄저균(*Bacillus anthracis*)의 동정. 대한미생물학회지. 29, 535-545.
7. Andersen, G.L., J.M. Simchock, and K.H. Wilson. 1996. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J. Bacteriol.* 178, 377-384.
8. Ash, C. and M.D. Collins. 1992. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequence of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 73, 75-80.
9. Bragg, T.S. and D.L. Robertson. 1989. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. *Gene.* 81, 45-54.
10. Daffonchio, D. S. Borin, G. Frova, R. Gallo, E. Mori, R. Fani, and C. Sorlini. 1999. A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1298-1303.
11. Drobniewski, F.A. 1993. *Bacillus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 324-338.
12. Gordon, R.E., W.C. Haynes, and C.H.N., Pang. 1973. The genus *Bacillus*. U.S. Department of Agricultural Handbook no. 427. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
13. Graham, K. K. Keller, J.W.Jr. Ezzell, and R. Doyle. 1984. Enzyme linked lectinosorbent assay (ELISA) for detecting *Bacillus anthracis*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3, 210-212.
14. Hunter, I.A. 1985. Gene cloning in Streptomyces. In Glover D.M. (ed.), DNA Cloning. Vol. II. p. 19-44, IRL Press Ltd. England.
15. Jackson, P.J., E.A. Walthers, and A.S. Kalif. 1997. Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrrA* from different

- Bacillus anthracis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1400-1405.
16. Keim, P., A. Kalif, and J. Schupp. 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J. Bacteriol.* 179, 818-824.
 17. Keim, P., A.M. Klevytska, L.B. Price, J.M. Schupp, G. Zinser, K.L. Smith, M.E. Huger-Jones, R. OKinaka, K.K. Hill, and P.J. Jackson. 1999. Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. *J. Appl. Microbiol.* 87, 215-217.
 18. Labruyere, E., M. Mock, D. Ladant, S. Michelson, A.M. Gilles, B. Laoide, and O. Barzu. 1990. Characterization of ATP and calmodulin-binding properties of a truncated form of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase. *Biochemistry.* 29, 4922-4928.
 19. Lechner, S., R. Mayr, K.P. Francis, B.M. Pruss, T. Kaplan, E. Wiessner-Gunkel, G.S. Stewart, and S. Scherer. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 4, 1373-1382.
 20. Little, S.F. and G.B. Knudson. 1986. Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. *Infect Immun.* 52, 509-512.
 21. Parry, J.M., P.C.B. Turnbull, and J.R. Gibson. 1983. Differential tests for distinguishing *B. anthracis* from *B. cereus* (and *B. thuringiensis*). In: Carruthers GB (ed.), *A Colour Atlas of Bacillus Species*. 59-112, Wolfe medical Publications Ltd., London.
 22. Patra, G., P. Sylvestre, V. Ramisse, J. Therasse, and J.L. Guesdon. 1996. Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 15, 223-231.
 23. Phillips, R.W. and J.W. Jr. Ezzell. 1989. Identification of *Bacillus anthracis* by polyclonal antibodies against extracted vegetative cell antigens. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 419-432.
 24. Phillips, A.P. and K.L. Martin. 1988. Investigation of spore surface antigens in the genus *Bacillus* by the use of polyclonal antibodies in immunofluorescent tests. *J. Appl. Bacteriol.* 64, 47-55.
 25. Quillet, T. and K.A. Seifert. 1993. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology.* 83, 1003-1007
 26. Smith, K.L., V. de Vos, H.B. Bryden, M.E. Huger-Joinds, A. Klevytska, L.B. Price, P. Keim, and D.T. Scholl. 1999. Mesoscale ecology of anthrax in southern Africa: a pilot study of diversity and clustering. *J. Appl. Microbiol.* 87, 204-207.
 27. Turnbull, P.C., R. Bohm, O. Cosivi, M. Doganay, M.E. Huger-Jones, D.D. Joshi, M.K. Lalitha, and V. de Vos. 1998. Guidelines for the surveillance and control of anthrax in Human and Animals. WHO/EMC/ZDI 3rd Ed.
 28. Turnbull, P.C.B. 1999. Anthrax. In: Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 8th ed. 365-379. Arnold, London.
 29. Uchida I., J.M. Hornung, C.B. Thorne, K.R. Klimpel, and S.H. Leppla. 1993. Cloning and characterization of a gene whose product is a trans-activator of anthrax toxin synthesis. *J. Bacteriol.* 175, 5329-5338.
 30. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, M. Vander, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4424.
 31. Williams, J.G., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* 218, 704-40.
 32. Xia, Z.G. and D.R. Storm. 1990. A-type ATP binding consensus sequences are critical for the catalytic activity of the calmodulin-sensitive adenyl cyclase from *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* 265, 6517-6520.

(Received January 27, 2001/Accepted March 12, 2001)

ABSTRACT : Random Amplified Polymorphic DNA-PCR Analysis for Identification of *Bacillus anthracis*

Seong-Joo Kim, Gyeong-Hyun Park, Hyung-Tai Kim, Key-Sung Cho, Jee-Cheon Kim, Yong-Keel Choi¹, Seung-Hwan Park², Nam-Taek Lee³, and Young-Gyu Chai^{*}(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hanyang University, 1271, Sa-1 Dong, Ansan 425-791, ¹Department of Biology, Hanyang University, Haengdang -dong, Sungdong-gu, Seoul, 133-791, ²KRIBB, Yusonggu, Taejeon 305-600, ³Department of Chemistry, Korea Military Academy, Seoul 139-799, Korea)

Molecular typing of *Bacillus anthracis* has been extremely difficult due to the lack of polymorphic DNA markers. Aiming to develop a DNA marker specific for *Bacillus anthracis* and to be able to discriminate this species from *Bacillus* genus, we applied the random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR. We have identified *B. anthracis* from various *Bacillus* species. The analysis performed by RAPD clearly demonstrated substantial genetic variations among *Bacillus* species. This type of analysis is an easy, quick and highly discriminatory technique that may help in diagnosis of anthrax.