

KHT5 마커를 사용한 *Bacillus cereus* 그룹에서 *Bacillus anthracis*의 구별

김형태 · 김성주 · 채영규*
한양대학교 생화학 및 분자생물학과

탄저균은 그람양성 아포형성세균으로 탄저를 일으키는 원인균이다. *Bacillus cereus* 그룹에 속하는 22종을 포함하여 *Bacillus* 속의 29종에서 탄저균을 검출할 수 있는 DNA 마커를 개발하고 이를 이용하여 *B. cereus* 그룹에서 탄저균만을 구분하였다. 한국산 탄저균 경주로부터 709 bp 마커(KHT5)를 확보하였다. KHT5 분절로부터 얻어진 internal primer set의 PCR 산물은 *B. cereus* 그룹의 다른 종으로부터 탄저균만을 구별하였다.

Key words □ *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* group, identification, *Bacillus anthracis* specific marker, RAPD-PCR

탄저(anthrax)는 탄저균(*Bacillus anthracis*)의 감염에 의하여 비장의 증대와 피하점막의 부종 및 출혈을 특징으로 하는 전염병으로 가축뿐만 아니라 사람에서도 발병하는 인수공통 질병이다(16). 탄저균은 형태학적 그리고 DNA의 유사성에 근거하여, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*와 함께 *Bacillus cereus* 그룹에 속한다(9,19). 이들을 각기 다른 표현형과 병원성 경로를 가지는데, 탄저균은 탄저(anthrax)를 유발시킬 수 있는 독소 플라스미드를 가지며(2,24), *B. cereus*는 식중독을 일으키는 독소 플라스미드를 가지고 있다(14). *B. thuringiensis* 독소 플라스미드는 곤충의 유충에 치명적인 세포 내부 크리스탈 독성 단백질을 생성한다. 탄저균을 비롯한 이들 세균들은 아포를 형성하기 때문에 주어진 환경 스트레스에 저항성을 갖고 있다(24).

이런 각각의 다른 표현형과는 달리 *B. cereus* 그룹에 속하는 균들은 동일한 G+C 함량(31~34 mol%; 9)과 거의 차이가 없는 리보솜 DNA 염기서열(6)을 가지고 있어 동정하기가 쉽지 않다(8,11,25). 더욱이, 탄저균이 생물무기화 되면서 신속한 탐색에 필요한 적절한 바이오 마커가 필요하게 되었다. 지난 1996년에 개발된 탄저의 바이오 마커로는 BA813이 있고(21,22), Jackson 등(15)이 개발한 variable-number tandem repeats (VNTRs)가 있으나, 이들 마커들은 1997년 프랑스에서 발생한 탄저균의 genotyping 결정에 실패하였거나(15,21), *B. cereus*도 같이 탐색하였다(21). 또한, 기존의 전통적인 생리화학적(4), 혈청학적 방법(5,24) 이외에도, DNA에 기초한 방법들인 polymerase chain reaction (PCR; 2), restriction fragment length polymorphism (RFLP; 11), amplified fragment length polymorphism (AFLP; 17,18) 등이 있으나, 이러한 방법들은 *Bacillus* 속 그룹 세균과 탄저 분리군 사이의 구별 및 기타 유사군과의 계통분류를 위한 것으로 탄저균만을 동정하는데 명확한 한계를 가진다(19).

몇몇 생물에서 종-특이 바이오 마커를 random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) fingerprinting 기술로 확보한 이후로, RAPD-PCR 방법은 많은 미생물 균주들의 동정과 분류학적 관점에서 효과적인 방법으로 사용되고 있다(7,12,13). RAPD-PCR 방법은 8~10 bp의 짧은 random primer를 사용하여 PCR을 실시한 후, PCR 산물의 분획 양상과 그 각각의 DNA 단편들로 균주를 구별한다. 또한 적은 양의 주형 DNA로도 효과적인 분석이 가능하며, 많은 시료를 분석할 수 있고, 대상 미생물의 전체 염기서열 정보가 제공되지 않더라도 분자유전학적 다양성을 분석할 수 있다. Andersen 등(5)은 PCR을 이용하여 *vrrA*의 open reading frame (ORF) 안에서 탄저균을 구별할 수 있는 특이 분획을 발견하였고, Nilsson(20) 등은 *B. cereus*의 동정에 RAPD-PCR을 사용하였다.

본 연구에서는 탄저균 7 종과 함께 *B. cereus* 그룹에 속하는 14 종의 균주 등을 사용하여 RAPD-PCR 실험을 수행하였고, 얻어진 RAPD-PCR 산물을 이용하여 탄저균 동정에 필요한 유전적 인 마커를 확보하였다.

재료 및 방법

세균 및 배양조건

탄저균은 보존하고 있는 Sterne 균주 외 6 종, *B. cereus* 그룹에 속하는 14 균주(Table 1) 등을 사용하였으며, 일반적인 탄저균의 배양조건은 김 등(1,2)이 사용한 방법에 따라 brain heart infusion (BHI; Difco, Detroit, USA) 액체배지와 한천평판 배지에 접종하고 37°C에서 18~20 시간 진탕(100 rpm) 또는 정제 배양하였다.

Genomic DNA의 추출

탄저균 및 *B. cereus* 그룹에 속하는 균들의 염색체 DNA 분리는 김 등(1)이 사용한 방법을 따랐다. 즉, 보존 균주를 5 ml의

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-31-400-5513, Fax: +82-31-406-6316
E-mail: ygchai@hanyang.ac.kr

Table 1. Bacterial strains used in this study

No	Strains
1.	<i>Bacillus anthracis</i> Kyungjoo pXO1 ⁺ , pXO2 ⁺
2.	<i>Bacillus anthracis</i> Hongsung pXO1 ⁺ , pXO2 ⁺
3.	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 pXO1 ⁺ , pXO2 ⁺
4.	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14185 pXO1 ⁺ , pXO2 ⁻
5.	<i>Bacillus anthracis</i> Pasteur NO2 pXO1 ⁻ , pXO2 ⁺
6.	<i>Bacillus anthracis</i> Sterne, 34F2 pXO1 ⁺ , pXO2 ⁻
7.	<i>Bacillus anthracis</i> Bongchon pXO1 ⁻ , pXO2 ⁺
8.	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
9.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23350
10.	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 27811
11.	<i>Bacillus brevis</i> IMSNU12063
12.	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581
13.	<i>Bacillus pacificus</i> ATCC 25089
14.	<i>Bacillus pumilus</i> JCM2508
15.	<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980
16.	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1661
17.	<i>Bacillus cereus</i> KCCM 11204
18.	<i>Bacillus cereus</i> KCCM 11341
19.	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1092
20.	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1014
21.	<i>Bacillus cereus</i> KCCM 11773
22.	<i>Bacillus cereus</i> KCCM 12142
23.	<i>Bacillus thuringiensis</i> KCTC 1509
24.	<i>Bacillus thuringiensis</i> KCTC 7452
25.	<i>Bacillus thuringiensis</i> KCCM 40030
26.	<i>Bacillus thuringiensis</i> KCTC 1507
27.	<i>Bacillus thuringiensis</i> KCCM 11613
28.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> KCCM 11429
29.	<i>Bacillus mycoides</i> KCCM 40260

BHI 배지에 접종하여 37°C에서 12 시간 동안 배양한 후, 50 ml의 BHI 액체배지에서 대수기 말기까지 키운 후 약 2.5 g 정도의 균체에 5 mg의 lysozyme을 포함한 5 ml의 Tris-EDTA (TE) buffer를 넣고 용균이 완전히 될 때까지 37°C에서 처리하였다. 용균된 용액에 0.5 ml의 20% SDS를 넣은 후 서서히 혼합한 다음 0.75 ml의 5 M NaCl과 5 ml의 페놀을 넣고 20 분 동안 상온에서 서서히 흔들어 주었다. 본 샘플을 169×g에서 10 분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 동량의 클로르포름을 넣고 10분 동안 서서히 흔들어 준 다음, 상층액을 멸균된 100 ml의 비이커에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 이를 상온에서 5 분 방치한 후, 두 층 사이에 형성된 염색체 DNA를 얻었다. 얻어진 DNA를 소량의 TE에 녹인 다음 RNase (20 g/ml)을 넣고 50°C에서 1 시간 반응시키고 protease K (100 g/ml), NaCl (100 mM)과 SDS (0.4%)을 넣고 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 위의

페놀 처리 이후 과정에서 TE로 녹이는 과정까지 반복한 다음, 260 nm의 흡광도로 DNA 농도를 정량하였다

RAPD-PCR

PCR의 조성은 전체 부피 50 µl에 3 mM MgCl₂, 200 µM의 deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 µM의 각 primer(BAJ1: 5'-GCG ATC CCC A-3', BAJ2: 5'-AAC GCG CAA C-3', BAN1: 5'-TGC TCT GCC C-3', BAN3: 5'-GGG ACG TTG G-3', BAN4: 5'-AGG GGT CTT G-3', BAN5: 5'-GCG GTT GAG G-3), 1 unit의 *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, USA), 그리고 약 10 ng의 genomic DNA를 주형으로 사용하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5 분 동안 denaturation한 후, 94°C에서 15 초간 denaturation, 40°C에서 30 초간 annealing, 그리고 72°C에서 60 초간 extension 과정으로 30 cycle을 수행하였고, 72°C에서 8 분간 final extension을 한 후 15°C에서 보관하였다. 실험에 사용된 10 bp oligonucleotide primer들은 김 등(1)이 고안하였고, GenoTech (Daejun, Korea)에서 제조하여 사용하였다. PCR 산물의 확인은 Tris-acetate (TAE) buffer를 사용하여 1.5% 또는 2.0% agarose gel 전기영동을 한 후 관찰하였다.

RAPD-PCR 산물의 클로닝 및 염기서열

B. cereus 그룹에 속하는 미생물들의 RAPD-PCR 수행 산물에서 탄저균에서만 존재하는 전기영동 밴드를 취하여 염기서열을 결정하였다. 특히, BAN3 primer (5'-gaa acg ggt g-3')로 얻어진 709 bp RAPD-PCR 산물을 Seakem GTG agarose gel (FMC)에서 전기영동한 후 (1× Tris-acetate-EDTA or 1× Tris-borate-EDTA running buffer), Qiaquick purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 정제하였다. 이것을 pGEM-T vector에 클로닝한 후, fluorescein dye-deoxy terminator-labeled oligonucleotide primers를 사용하는 Sequencing kit와 ABI Prism 3100 sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 얻어진 DNA sequences는 sequencing analysis software (Perkin-Elmer, Foster City, USA)와 BLAST 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)을 이용하여 분석하였다.

Bacillus anthracis-특이 PCR primer의 고안 및 탄저균 마커의 확보

BAN3 random primer를 이용하여 얻은 RAPD-PCR product 중 709 bp에서 얻은 탄저균 특이 염기서열에서 primer set을 고안 및 제작하였다. PCR은 각각의 PCR mixture (100 µl)에 100 ng의 DNA 주형, 200 µM의 dNTP, 1.5 mM Mg²⁺, 각각 100 pmole의 탄저균 특이 primer set (forward primer: 5'-tac tca ctc tca aaa aga gc-3', reverse primer: 5'-aga agg tca ata gat gta gg-3'), 및 2.5 unit의 *Taq* DNA polymerase를 첨가하여 사용하였다. PCR 조건은 initial denaturation step으로 94°C에서 5 분간 둔 다음, 1 분간 94°C에서 denaturation, 1 분간 62°C에서 annealing, 1 분간 72°C에서 primer extension으로 30 사이클 반응시켰다.



Fig. 1. RAPD-PCR fingerprinting of *Bacillus cereus* group strains performed with the random primer. PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel at 2.5 V/cm. Lanes 1 and 21, 100 bp ladder; lanes 2 through 8, *Bacillus anthracis*, Kyungjoo, Hongsung, ATCC 14578, ATCC 14185, Pasteur No2, Sterne, 34F2, and Bongchon, respectively; lanes 9 through 15, *Bacillus cereus* KCTC 1661, *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Bacillus cereus* KCCM 11341, *Bacillus cereus* KCTC 1092, *Bacillus cereus* KCTC 1014, *Bacillus cereus* KCCM 11773, *Bacillus cereus* KCCM 12142, respectively; lanes 16 through 21, *Bacillus thuringiensis* KCTC 1509, *Bacillus thuringiensis* KCTC 7452, *Bacillus thuringiensis* KCCM 40030, *Bacillus thuringiensis* KCTC 1507, *Bacillus thuringiensis* KCCM 11613, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* KCCM 11429, respectively; lane 22, *Bacillus mycoides* KCCM 40260.



Fig. 2. PCR result of *B. anthracis* and *B. cereus* group strains performed with the internal primer set. PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel at 2.5 V/cm. M, 100 bp ladder; lanes 1 through 7, *Bacillus anthracis*, Kyungjoo, Hongsung, ATCC 14578, ATCC 14185, Pasteur No2, Sterne, 34F2, and Bongchon. Respectively; lanes 8 through 14 *Bacillus cereus* KCTC 1661, *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Bacillus cereus* KCCM 11341, *Bacillus cereus* KCTC 1092, *Bacillus cereus* KCTC 1014, *Bacillus cereus* KCCM 11773, *Bacillus cereus* KCCM 12142, respectively; lanes 15 through 20, *Bacillus thuringiensis* KCTC 1509, *Bacillus thuringiensis* KCTC 7452, *Bacillus thuringiensis* KCCM 40030, *Bacillus thuringiensis* KCTC 1507, *Bacillus thuringiensis* KCCM 11613, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* KCCM 11429, respectively; lane 21, *Bacillus mycoides* KCCM 40260.

결과 및 고찰

탄저는 토양병 중의 하나이지만 이 질병을 일으키는 탄저균의 유전적 변화, 환경적 요인 등 가장 기본적인 전염병학적 병인이나 생태학적인 기전은 아직 확실하게 밝혀지지 않고 있다(24). 따라서 탄저균의 바이오 마커를 확보하는 것은 그와 유사한 *B. cereus* 그룹에 속해 있는 세균에서 신속하게 정확하게 탄저균을 동정할 수 있는 기회를 제공하여 줄 수 있다(1,18,23).

본 실험에서 사용한 실험균주로 7종의 탄저균주, 대조균주로 *B. cereus* 그룹에 속하는 *B. cereus* 7 종, *B. thuringiensis*에 속하는 6 종, 및 1 종의 *B. mycoides*를 비롯하여 8 종의 *Bacillus* 속 에 속하는 균들을 사용하였다(Table 1). *B. cereus* 그룹 세균에 속해 있는 균주 중에서 *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. 등은 확보하지 못하여 비교할 수 없었다. RAPD-PCR primer를 사용하여, PCR을 행한 후 나타난 밴드의 양상을 Fig. 1에 나타내었다. 각각의 RAPD-PCR 결과 모두 각각 독특한 분획양상을 보임으로서, 모두 탄저균과는 다른 양상을 나타내 탄저균과 구분되었다. 특히, RAPD-PCR을 사용하여 얻어진 탄저균만의 특이 분획은 탄저 특이 마커 개발에 이용할 수 있다는 점에서 더 큰 의

의가 있다.

현재 바이오 마커를 이용한 탄저균의 동정 방법은 그 사용에 한계를 가지고 있다. Patra 등(22)이 탄저균의 염색체에서 개발하여 한동안 널리 사용되었던 BA813은 일부 *B. cereus* 그룹 세균에서도 false-positive 결과(21)가 나왔다. Keim 등(17)도 탄저균의 특이분획을 관찰하기 위하여 AFLP markers를 이용한 실험을 수행하여 약 30 개의 분획을 관찰하였다. 그러나 AFLP에 의한 방법은 빠르고, 상대적으로 간단한 분석을 제공하며, 동일 종의 균주간 그리고 다른 미생물 종과의 계통발생학적인 정보를 용이하게 제공할 수 있지만, 특이 분획이 일어난 특정 좌위 또는 유전자들을 확인하기에는 어려운 단점을 가지고 있다. 또한 Daffonchio 등(10)의 RAPD-PCR을 응용한 RFLP 방법은 RAPD-PCR이 탄저의 동정에 이용될 수 있다는 사실을 보였으나, RAPD-PCR 산물 자체는 *B. cereus* 그룹 세균 모두에 대하여 동일한 분획양상을 가지고 있으며 탄저균만을 구분하기 위해서는 제한효소인 *AluI*의 처리 과정이 있어야 한다. 즉, RAPD-PCR 방법만으로는 *B. cereus* 그룹 세균의 구별이 불가능하다는 단점을 가지고 있다.

본 연구에서 수행한 RAPD-PCR은 이러한 *B. cereus* 그룹에

속한 세균의 분자학적 동일성으로 오는 문제를 해결하고자 하였다. 즉, RAPD-PCR 산물 자체가 탄저균의 동정에 이용될 수도 있겠지만, RAPD-PCR에서 얻어진 산물에서 internal PCR을 수행하여 얻어진 바이오 마커를 이용하여 *Bacillus* 종 사이에서 탄저균의 분자생물학적 차이를 구별할 수 있었다(7,13).

BAN3 primer를 사용하여 얻어진 709 bp의 RAPD-PCR 산물(KHT5)에서 internal PCR primer set를 고안하였고, internal PCR primer set를 사용하여 얻어진 PCR 산물은 Fig. 2에 나타나 있다. 탄저균의 RAPD-PCR 산물에서 얻어진 709 bp DNA 분획의 염기서열 분석 결과(RAPD-PCR KHT5에 대한 염기서열 정보는 NCBI GenBank에 접근번호 AF360750에 있다)는, 탄저균의 chromosomal DNA에 속하는 것으로 보이며, NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하여 기존에 밝혀진 염기서열과 비교 분석하였을 경우에 일치하는 부분이 없어 탄저균만의 독특한 염기서열로 추정되며, 탄저균만을 신속 진단하는데 필요한 바이오 마커로 될 수 있음을 제시하였다. 특히, internal PCR primer set를 사용하여 얻어진 448 bp의 전기영동 결과는 BA813을 사용하여 나온 결과(22) 보다 훨씬 나은 것으로 판단되며, 이 마커는 탄저균의 신속한 동정에 이용 될 수 있을 것으로 보인다.

감사의 말

본 연구는 한양대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었다.

참고문헌

1. 김성주, 박경현, 김형태, 조기승, 김지천, 최영길, 박승환, 이남택, 채영규. 2001a. 탄저균의 random amplified polymorphic DNA-PCR 분석. *한국미생물학회지* 37, 56-60.
2. 김성주, 조기승, 최영길, 채영규. 2001b. 탄저균 *pagA* 유전자의 분자적 다양성. *한국미생물학회지* 37, 49-55.
3. 조성근, 박정문, 권준현, 최영길, 채영규. 1996a. 탄저균 galactose-N-acetylglucosamine 다당류에 대한 단일클론 항체의 생성 및 특성. *대한미생물학회지* 31, 405-414.
4. 조성근, 박정문, 최영길, 채영규. 1996b. 생화학 및 혈청학적인 기술에 의한 한국에서 분리된 탄저균의 특성. *대한미생물학회지* 31, 415-422.
5. 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.
6. Ash, C. and M.D. Collins. 1992. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 94, 75-80.
7. Bazzicalupo, M. and R. Fani. 1995. The use of RAPD for generating specific DNA probes for microorganisms. In J. P. Clapp (ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 50. S-Species Diagnostic Protocols: PCR and Other Nucleic Acids Methods. Humana Press Inc., Totowa, N.J.
8. Carlson, C.R., D. Caugant, and A.-B. Kolsto. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1719-1725.
9. Claus, D., and R.C.W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL, pp. 1105-1139. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
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. Daffonchio, D., S. Borin, A. Consolandi, D. Mora, P. Manachini, and C. Sorlini. 1998. 16S-23S rRNA internal transcribed spacers as molecular markers for the species of the 16S rRNA group I of the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 229-236.
12. Fancelli, S., M. Castaldini, M.T. Ceccherini, C. Di Serio, R. Fani, E. Gallori, M. Marangolo, N. Miclaus, and M. Bazzicalupo. 1998. Use of RAPD markers for the detection of *Azospirillum* strains in soil microcosms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 221-225.
13. Fani, R., G. Damiani, C. Di Serio, E. Gallori, A. Grifoni, and M. Bazzicalupo. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. *Mol. Ecol.* 2, 243-250.
14. Ghelardi E., F. Celandroni, S. Salvetti, C. Barsotti, A. Baggiani, and S. Senesi. 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 129-134.
15. Jackson, P.J., E.A. Walters, A.S. Kalif, K.L. Richmond, D.M. Adair, K.K. Hill, C.R. Kuske, G.L. Andersen, K.H. Wilson, M.E. Hugh-Jones, and P. Keim. 1997. Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1400-1405.
16. Mock, M., and A. Fouet. 2001. *Anthrax. Annu. Rev. Microbiol.* 55, 647-671.
17. Keim, P., A. Kalif, and J. Schupp. 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* detected by amplified fragment length polymorphism marker. *J. Bacteriol.* 179, 818-824.
18. Keim, P., A.M. Klevytska, L.B. Price, J.M. Schupp, G. Zinser, K.L. Smith, M.E. Hulse-Jones, R. Okinaka, K.K. Hill, and P.J. Jackson. 1999. Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. *J. Appl. Microbiol.* 87, 215-217.
19. Kolsto, A.B., D. Lereclus, and M. Mock. 2002. Genome structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 264, 95-108.
20. Nilsson, J., B. Svensson, K. Ekelund, and A. Christiansson. 1998. A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Let. Appl. Microbiol.* 27, 168-172.
21. Patra, G., J. Vaissaire, M. Weber-Levy, C. Le Doujet, and M. Mock. 1998. Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3412-3414.
22. Patra, G., P. Sylvestre, V. Ramisse, J. Thrasse, 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. Smith, K.L., V. de Vos, H.B. Bryden, M.E. Hulse-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.
24. Turnbull, P.C., R. Bohm, I.O. Cosiv, M. Doganay, M.E. Hugh-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.
25. Turnbull, P.C., R.A. Hutson, M.J. Ward, M.N. Jones, C.P. Quinn,

N.J. Finnie, C.J. Duggleby, J.M. Kramer, and J. Melling. 1992. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 21-28.

(Received January 29, 2003/Accepted March 11, 2003)

ABSTRACT: Discrimination of *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* Group Using KHT5 Marker
Kim, Hyung-Tae, Seong-Joo Kim, and Young-Gyu Chai* (Department of Biochemistry and
Molecular Biology, Hanyang University, Ansan, Kyongki-do 425-791, Korea)

Bacillus anthracis is a gram-positive spore-forming bacterium that causes the disease anthrax. In order to develop a DNA marker specific for *Bacillus anthracis* and to discriminate this species from *Bacillus cereus* group, we applied the randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR technique to a collection of 29 strains of the genus *Bacillus*, including 22 species of the *B. cereus* group. A 709-bp RAPD marker (KHT5) specific for *B. anthracis* was obtained from *B. anthracis* BAK. The PCR product of internal primer set from the KHT5 fragment distinguished *B. anthracis* from the other species of the *B. cereus* group.