

동물분변에서 *Escherichia coli* O157:H7의 분리 및 이들 균이 생산하는 Verotoxin-2의 생물화학적 특성

II. 동물분변에서 분리한 *Escherichia coli* O157:H7으로부터 Verotoxin-2의 정제 및 특성

차 인 호 · 김 용 환*

부산시보건환경연구원
경상대학교 동물면역연구소*
(1995년 12월 15일접수)

Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from animal feces and biochemical characteristics of Verotoxin-2 produced by these strains

II. Purification and characterization of Verotoxin-2 Produced by *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from animal feces

In-ho Cha, Yong-hwan Kim*

Pusan Institute of Health and Environment,
College of Veterinary Kyeongsang National University*
(Received Dec 15, 1995)

Abstract : The objects of the present study were to establish the method of purification, subunit dissociation of verotoxin-2 (VT2) produced by *Escherichia coli* O157:H7, and to investigate the characteristics of purified verotoxin-2 such as molecular weight and composition of amino acid.

The results were summarized as follows ;

Verotoxin-2 was extracted by addition of polymyxin B sulfate into bacterial cell lysate prepared from *Escherichia coli* O157:H7(KSC109). As an initial step, the bacterial cell lysate was precipitated with 30% saturated ammonium sulfate. The precipitated crude toxin was then subjected to anion-exchange, chromatofocusing and cation-exchange chromatography. Using this scheme, we obtained highly purified toxin with a specific activity of 1.1×10^9 CD₅₀/mg. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) for purified VT2 showed two protein bands. The upper band, approximately 32 Kd, was supposed as A subunit and the lower band, approximately 7.7 Kd, was supposed as B subunit. When the toxin was separated in the subunit-dissociating solution, two peaks emerged with retention

times of 15 and 28 min by HPLC. These peaks represented A subunit and B subunit, respectively. The amino acid composition of purified VT2 were made up in order of glutamic acid, histamine, asparaginic acid, histidine, lysine, alanine and leucine etc. The largest amount among the amino acid composing VT2 was methionine.

Key words : Verotoxin, purification, *E coli* O157.

서 론

Verotoxin(VT) 생산 대장균은 설사병의 중요한 원인으로 작용하며^{1,2}, 사람에게 출혈성 결장염(Hemorrhagic colitis)^{3,4} 및 급성 신장장애, 혈소판감소증, 소혈관성 빈혈 등을 증상으로하는 가칭 용혈성 뇨독증후군(Hemolytic Uremic Syndrome)⁵ 등을 유발하여 근년에 많은 문제가 되고 있다.

VT를 생산하는 대장균으로는 43종의 혈청형이 알려져 있으며⁶ 이들 중 혈청형 O157:H7은 분리되는 VT 생산 대장균의 절반이상으로 검출된다^{1,3}.

VT는 병원성 대장균에 의하여 생산되는 cytotoxin으로서 *Shigella dysenteriae* type I이 생산하는 Shiga toxin과 구조 및 기능이⁷ 유사하여 Shiga-like toxin(SLT)이라고도 하며^{8,9} 1977년 Konowalchuk 등⁶에 의하여 verotoxin 이라고 명명되었다.

현재까지 알려진 VT의 종류는 VT-1, VT-2 및 VTE 등 3종류가 알려져 있으며^{6,10} VT-1은 Shiga toxin의 항혈청에 중화되지만^{9,11} VT-2와 VTE는 Shiga toxin의 항혈청에 중화되지 않는 것으로 밝혀져 있다^{12,13}. 또한 VT-2와 VTE의 항혈청은 서로의 항혈청에 교차반응을 나타내기 때문에 생물학적 활성으로 이들을 구분하고 있다.

VT는 분자량이 32 Kd인 A subunit 하나와 분자량 7.7 Kd인 다섯개의 B subunit로 이루어져 있다¹⁴. 이들중 A subunit는 세포내 단백질 합성을 억제하고 B subunit는 toxin과 receptor와의 특이적인 결합에 관여하는 것으로 알려져 있으며^{2,15} 특히 A subunit는 단백질 분해효소에 의하여 분자량 27 Kd의 A1과 5 Kd의 A2 polypeptide로 나누어지는 것으로 알려져 있다^{2,16}. 또한 A1의 절단부가 유리되어 있을 경우에는 완전한 독소보다 작용이 더 증가하는 것으로 밝혀져 있고¹⁷ 이 A1 polypeptide는 A와B subunit를 서로 연결하는데 관여한다.

VT는 globotriosyl ceramide(Gb3) 및 globotetraosyl ceramide(Gb4)와 같은 glycosphingolipid에 특이적으로

결합하는 것으로 알려져 있으며¹⁸, 이들을 수용체로 응용한 많은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법이 개발되어 미량의 독소검출 및 진단에 이용되고 있다¹⁹.

Lingwood 등¹⁹은 VT-1을 검출하기 위하여 Gb3를 deacylation시켜 microplate에 고정할 수 있는 lyso-Gb3를 만들었으며, 김 등²⁰은 Gb3와 양이온성 물질인 phosphatidyl ethanolamine과의 리포솜을 형성시켜 verotoxin-2(VT-2) 및 VT-1을 미량분석할 수 있는 receptor binding enzyme-linked immunosorbent assay (RELISA)법을 개발한 바 있다.

이와같이 VT에 대한 항혈청 제조뿐만 아니라 미량의 독소검출 및 진단을 위하여는 기본적으로 순수하게 정제된 VT가 필요하며 이를 위하여 정립된 독소정제 방법이 절실히 요구되고 있다.

외국의 경우 VT에 대한 연구는 독소정제, 단클론성 항체제조, PCR을 이용한 VT 생산 대장균의 진단 및 유전자 재조합을 이용한 vaccine 생산가능성에 관한 연구 등이 활발하게 연구되고 있으나 국내에서는 아직까지 VT에 대한 연구가 미비한 실정이다.

본 연구에서는 소의 분변으로부터 분리한 *E coli* O157:H7의 균주가 생산하는 verotoxin의 정제방법을 확립하고 독소의 분자량 및 구성아미노산 등 VT-2의 여러가지 특성을 규명하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 세포주 : Verotoxin-2 생성균주는 소의 분변으로부터 분리 동정한 *E coli* O157:H7 (KSC109)을 독소의 분리 및 정제에 사용하였다. 세포독성 시험을 위한 세포주들은 국립보건원으로 부터 분양받은 Vero cell 및 HeLa cell을 사용하였고, 5% FBS(fetal bovine serum)와 100µg/ml의 gentamicin 및 100U/ml의 penicillin을 첨가한 minimal essential medium (MEM;Sigma)에 계대배

양하면서 공시하였다.

VT-2의 추출 : Head 등²¹의 방법에 따라 공시 균인 KSC109 strain을 0.2 μ g/ml의 mitomycin C를 첨가한 2 l \times 3의 Penassay broth에 접종 배양하고 3,000 \times g로 15분간 원심분리하여 침전된 균체를 200ml의 PBS(phosphate buffered saline)로 현탁시킨 후 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)와 polymyxin B sulfate를 첨가하여 French press 200 psi에서 세포를 파쇄하였다. 그 다음 4 $^{\circ}$ C에서 9,000 \times g로 세포잔해물을 원심분리하여 침전시킨 후 독소를 함유한 상층액에 30% 및 70%의 황산 암모늄을 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 \times g로 원심분리함으로써 독소를 침전시켰다. 침전물에 15ml의 인산완충액을 가하여 12,000 MW cutoff dialysis tube를 사용하여 4 l PBS로 투석하였다.

VT-2의 정제 : Downes 등⁸의 방법에 따라 Fig 1과 같이 3종류의 column을 사용하여 정제하였다.

1) Anion-exchange column chromatography(AE) : DEAE Sepharose CL-6B(Pharmacia Co.) 50ml로 충전한 column을 0.1 M Tris-HCl(pH 6.5)로 평형화시킨 다음 PBS로 투석한 crude toxin을 loading하여 NaCl gradient(0~0.6 M)로 용출시키면서 3ml씩의 분획을 취하였다. 각각의 분획에 대한 세포독성 활성을 검사하여 독성을 나타내는 분획을 수집하여 투석하고 Amicon filter로 농축하였다.

2) Chromatofocussing column chromatography(CF) : Polybuffer exchange94(Pharmacia Co.) 57ml을 충전한 column을 0.2 M histidine-HCl 완충액(pH6.2)으로 평형화시킨 다음 AE column에서 수집 농축한 시료를 loading하여 pH gradient(pH 6.4~4.0)로 용출시키면서 3ml 씩의 분획을 취하였다. 각 분획에 대한 세포독성 활성을 검사하여 독성을 나타내는 분획을 수집하여 투석하고 Amicon filter로 농축하였다.

3) Cation-exchange column chromatography(CE) : CM-Sepharose CL-6B(Pharmacia Co.) 25ml을 충전한 column을 0.2 M Citrate 완충액(pH 4.0)으로 평형화시킨 다음 CF column에서 수집 농축한 시료를 loading하여 NaCl gradient (0~0.6 M)로 용출시키면서 3ml 씩의 분획을 취하였다. 각 분획에 대하여 세포독성을 검사하고 활성이 있는 부분의 분획을 수집하여 투석 및 농축하였다.

세포독성 검사 : 정제단계별 세포독성 시험은 Karmali등²²의 방법에 따라 toxin을 0.22 μ m membrane filter로 여과한 여액 50 μ l를 10배 단계희석하여 96 well microplate에 단층배양한 Vero cell과 HeLa cell에 각각 접종하였다.

접종한 plate는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO² 조건으로 3일간 배양하면서 매일 cytopathic effects를 현미경으로 관찰하였으며, 배양 3일후 세포를 50% 사멸시키는(CD₅₀) 시료의 가장 높은 희석배수를 endpoint로 하여 VT-2 활성의 정도를 결정하였다. CD₅₀의 판정방법은 Mary 등²³의 방법에 따라 배양한 plate를 조심스럽게 진탕하여 사멸한 세포와 배양액을 제거하고, 2% formalin이 첨가된 0.067 M phosphate buffered saline(2% formalin-PBS, pH 7.2)으로 1분간 고정시킨 후, 0.13% crystal violet (5% ethanol-2% formalin-PBS)으로 20분간 염색하였다. 염색한 세포를 실온에서 건조시킨 후 50% ethanol 200 μ l로 용출시키고 용출액 100 μ l를 0.9ml의 PBS에 희석하여 spectrophotometer 595nm에서 흡광도를 측정하였으며, toxin 비첨가 대조군의 흡광도와 대비하여 CD₅₀을 정하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) : 각 정제과정에서 독소 활성부분의 분획을 수집하여 투석 및 농축하고 동량의 sample treatment 완충액[0.125 M Tris-Hcl(pH6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol]과 혼합하여 100 $^{\circ}$ C에서 4~10분동안 가열하였다. 변성된 toxin protein을 1 mm 두께의 20% SDS-polyacrylamide gel에 loading하였으며, Laemmli₂₄의 방법에 따라 전기영동하고 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후, 탈색시켜 protein band를 확인하였다.

Anion-exchange Chromatography

- Column 1.6 \times 25 cm
- Resin DEAE Sepharose CL-6B (Pharmacia)
- Equilibration buffer 0.1 M Tris-HCl (pH 6.5)
- Gradients 0.6 M NaCl

Chromatofocussing Chromatography

- Column 1.0×26 cm
- Resin Polybuffer exchange 94 (Pharmacia)
- Equilibration buffer 0.025 M Histidine-HCl (pH 6.2)
- Gradients Polybuffer 74 (Pharmacia, pH 6.4)

Cation-exchange Chromatography

- Column 1.0×30 cm
- Resin CM-Sepharose CL-6B (Pharmacia)
- Equilibration buffer 0.2 M Citrate buffer (pH 4.0)
- Gradients 0.6 M NaCl

Fig 1. Column system for purification of VT-2.

정제한 toxin의 아미노산 분석 : 공시균 KSC 109 strain으로부터 분리정제한 toxin의 polypeptide를 환류가수법²⁴으로 분해하여 아미노산 분석기(Pharmacia Co.)로 독소의 구성 아미노산을 분석하였다. 정제한 독소 1ml를 100ml의 환류 플라스크에 넣어 0.1% phenol을 포함하는 5.7 M HCl을 첨가하여 냉각관을 연결하고 110℃에서 24시간 환류하였다. 7.5 M NaOH 용액으로 pH를 중화시키고 0.02 N HCl로 양을 조정하여 아미노산 분석기에 10 μ l를 주입하여 분석하였다.

HPLC를 이용한 독소의 subunit 해리 : Head 등²¹의 방법에 따라 정제한 독소 1mg을 subunit 해리 완충액(6 M Urea, 0.1 M propionic acid, pH 4.0) 1ml를 혼합하여 4℃에서 1시간동안 정치한 후 동일 완충액으로 평형화시킨 TSK-G2000 SW HPLC gel filtration column에 주입하였다. 유속은 1.0ml/min로 조정하고 λ =280nm에서 peak를 측정하였다.

결 과

Verotoxin-2의 정제 : 0.1 M Tris-HCl(pH7.5) 완충액으로 투석한 crude toxin을 0~0.6 M NaCl 농도구배로 Anion-exchange(AE) column에서 정제한 결과는 Fig 2와 같이 0.2~0.3 M NaCl 농도 부분인 8번 분획에서 59번 분획까지 10⁴ CD₅₀/ml 이상의 세포독성을 나타내었고 14번 분획에서 26번 분획까지는 10¹⁰ CD₅₀/ml 이상의 높은 독성을 나타내었으며, 독성을 나타낸 이들 분획을 수집하여 SDS-PAGE 로 전기영동한 결과 많은 band가 관찰되었다.

AE column에서 수집한 toxin을 Amicon filter로 농축하고 약 250 volumes의 0.025 M Histidine-HCl(pH7.5) 완충액으로 투석한 후 pH 6.0~4.5의 농도구배로 Chromatofocussing(CF) column에서 정제한 결과는 Fig 3과 같이 pH 6.0~5.0 사이의 농도경사 부분인 38번 분획에서 71번 분획까지 10⁴ CD₅₀/ml 이상의 세포독성을 나타내었다. Toxin 분획을 수집하여 SDS-PAGE 로 전기영동한 결과 AE column에서 관찰되었던 band중 일부 band들이 제거되어 정제되고 있음을 확인할 수 있었다.

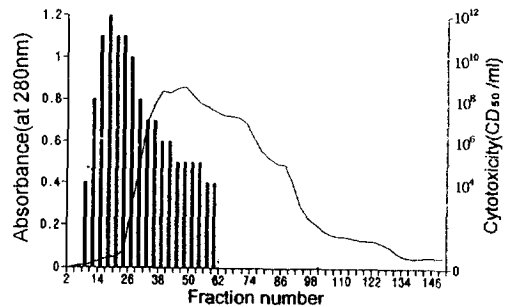


Fig 2. Representative anion-exchange (DEAE-sepharose) column elution profile and cytotoxicity of VT-2.

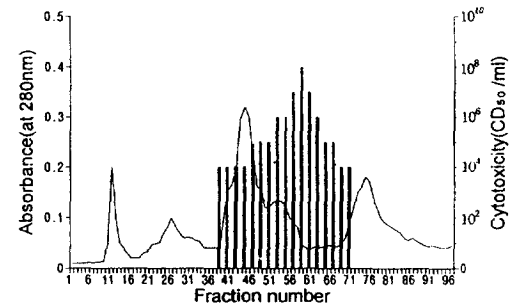


Fig 3. Representative chromatofocussing column elution profile and cytotoxicity of VT-2.

최종적으로 CF column에서 세포독성을 나타내는 분획을 수집하여 Amicon filter로 농축하고 약 200 volumes의 0.1 M Citrate 완충액(pH 5.0)으로 투석한 다음 0~0.6 M NaCl 농도구배로 Cation-exchange(CE) column에서 정제한 결과는 Fig 4와 같다. NaCl 0.2~0.5 M 농도의 마지막 peak 부분인 75번분획에서 111번 분획까지 104 CD₅₀/ml 이상의 세포독성을 나타내었으며 이 분획들을 SDS-PAGE 로 전기영동하여 Coomassie blue 로 확인한 결과 Fig 5와 같이 분자량 약 32 Kd의 A subunit band와 7.7 Kd의 B subunit를 관찰할 수 있었다.

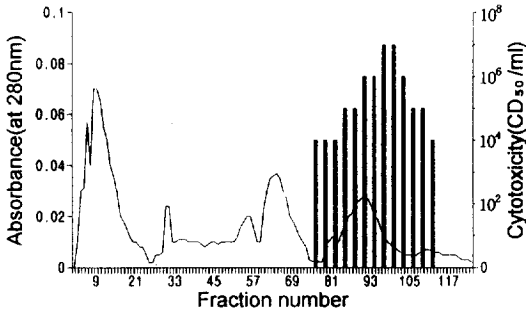


Fig 4. Representative cation-exchange (CM-sepharose) column elution profile and cytotoxicity of VT-2.

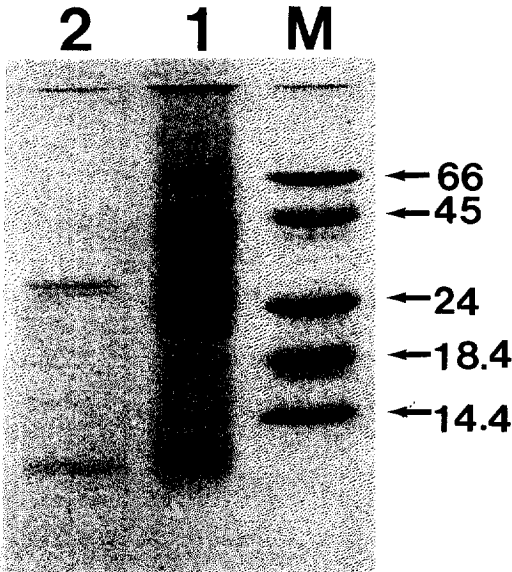


Fig 5. SDS-PAGE (20% gel) of purified VT-2 protein stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, crude VT-2; lane 2, purified VT-2; lane M, standards of molecular weight (from top to bottom); bovine albumine, egg albumin, trypsinogen, β -lactoglobulin and lysozyme.

각 정제단계별 회수율 및 세포독성은 Table 1과 같이 total activity와 total protein은 정제단계에 따라 점차 감소하여 CE column의 최종정제단계에서 각각 8.0×10^7 CD₅₀과 0.07mg이었으며, 최종정제에서의 specific activity는 1.1×10^9 CD₅₀/mg이었고 fold purification은 첫단계에 비하여 229 배로 정제되었다.

HPLC에서의 subunit 확인 : 공시균 *E coli* KSC 109 strain으로부터 정제한 VT-2를 해리용액으로 해리하여 TSK-G2000 SW HPLC gel filtration column으로 HPLC한 결과는 Fig 6과 같이 retention time 15분대에 A subunit가, 28분대에 B subunit가 해리되었다.

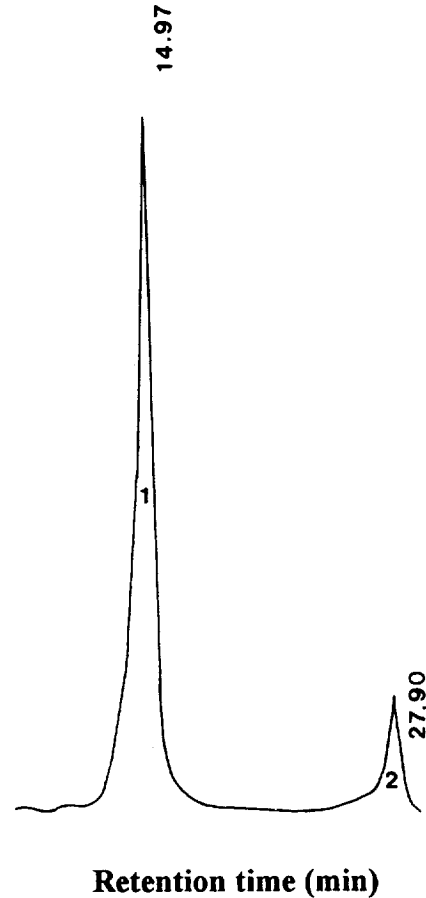


Fig 6. HPLC profiles of separated VT-2 subunits. Peak 1, A subunit; peak 2, B subunit.

정제한 독소의 구성아미노산 분석 : 정제한 VT-2의 polypeptide를 환류가수법으로 분해하여

Table 1. Yield and toxicity of VT-2 fractions purified from different sources

Fraction	Volume (ml)	Total cytotoxicity (CD ₅₀)	Total protein (mg)	Sp act (CD ₅₀ /mg)	Fold purification	Yield (%)
Bacterial cell lysate	72	7.2 × 10 ⁶	1,105	6.5 × 10 ⁶		100
Ammonium sulfate precipitate	51	5.1 × 10 ⁶	504	1.0 × 10 ⁶	1.5	70.8
Anion-exchange pool concentrate	23	2.3 × 10 ⁶	114	2.0 × 10 ⁶	2	31.9
Chromatofocusing pool concentrate	20	2.0 × 10 ⁶	38	5.2 × 10 ⁶	2.6	27
Cation-exchange concentrate	8	8.0 × 10 ⁷	0.07	1.1 × 10 ⁹	229	11

* : Specific activity.

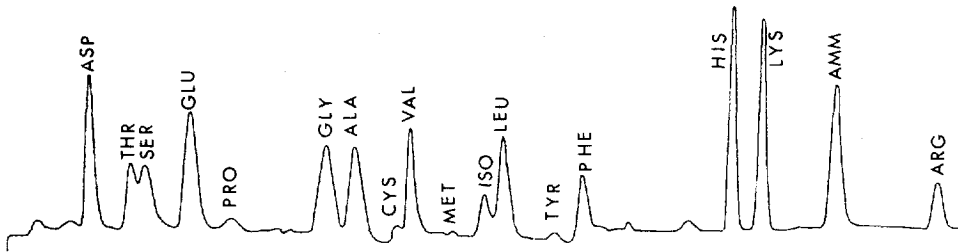


Fig 7. Analysed profiles of amino acids composition of purified VT-2 by Amino acid Analyzer.

Table 2. Composition of amino acid of purified VT-2

Amino acids	Composition of
Asparaginic acid(Asp)	7.776
Threonine(Thr)	4.096
Serine(Ser)	3.692
Glutamic acid(Glu)	10.341
Proline(Pro)	0.149
Glycine(Gly)	3.957
Alanine(Ala)	5.436
Cysteine(Cys)	0.280
Valine(Val)	4.987
Methionine(Met)	0.023
Isoleucine(Ile)	1.788
Leucine(Leu)	4.745
Tyrosine(Tyr)	0.736
Phenylalanine(Phe)	1.944
Histidine(His)	8.568
Lysine(Lys)	7.213
Ammonia(Amm)	1.724
Arginine(Arg)	4.145

아미노산 분석기로 분석한 결과는 Fig 7과 같이 18종류의 구성아미노산이 검출되었으며, 이들 아미노산의 함량은 glutamic acid가 가장 높고 histidine, asparaginic acid, lysine, alanine 및 leucine 등의 순으로 높은 함량을 나타내었으며, methionine이 가장 낮은 함량을 나타내었다(Table 2).

고 찰

Verotoxin 생산 대장균은 사람과 동물에서 여러가지 질병의 원인체로 작용하여 최근 중요시 되고 있는 병원체중의 하나이며, 이들 균이 생산하는 독소의 검출 및 진단법 개발을 위하여 각국에서 많은 연구가 수행되고 있다. 일반적으로 세균에 의하여 생산되는 독소의 검출 및 진단을 위하여는 기본적으로 정제된 독소가 필요하고 이를 위하여 정립된 독소의 정제방법이 요구된다.

본 연구에서는 이러한 목적으로 소의 분변재료에서 분리한 VT2 생산대장균(KSC109) 으로부터 3종류의 column을 이용하여 독소를 정제하였다. VT-2 생산 대장균을 배양집진하고 periplasmic space에 결합된 독소를 유리하기 위하여 polymyxin B sulfate를 가하여 배양하고 French press로 균체를 파쇄한 결과 Cerny 등²⁶의 성적과 동일하게 다량의 crude toxin을 얻을 수 있었다. 이는 Karmali 등²⁷이 polymyxin B를 가하여 유리한 toxin 추출물은 specific activity가 증가하며 Shiga toxin, VT-1, VT-2를 유리하는데 효과적이라고 한 결과와 일치하였다.

Petric 등²⁸은 polymyxin B sulfate를 처리한 toxin 추출물을 원심침전하여 세포잔해물을 제거하고 4℃에서

상층액에 ammonium sulfate를 가하여 40% 포화상태로 한 다음, 원심침전하여 다시 상층액에 60% 포화상태로 되게 ammonium sulfate를 가하고 원심침전하여 회수한 침전물을 toxin 정제에 사용하였으며, 40% 포화농도일 때 toxin의 약 5%가 침전하며, 60% 농도일 때 toxin의 90% 이상이 침전한다고 하였다. 또한 Lingwood 등²⁹은 toxin을 정제하기 위하여 ammonium sulfate의 농도를 30%와 70% 포화농도로 사용하였다. 본 실험에서도 toxin의 손실을 최소화하기 위하여 30%와 70%의 ammonium sulfate 포화농도로 사용하였다.

각각의 column에 따른 정제결과는 Downes¹²의 VT 정제결과와 유사하였고, 본 실험에서 정제된 VT-2의 A subunit와 B subunit의 분자량을 SDS-PAGE 로 전개하여 본 결과 각각 32 Kd와 7.7 Kd로 확인되어 MacLeod 등³⁰이 정제한 VTE 의 결과와 유사하였으며, Weinstein 등³¹의 A와 B subunit의 DNA 염기서열 분석에 의하여 추측한 분자량과 거의 일치하였다.

정제한 VT2의 A subunit 및 B subunit를 재확인하기 위하여 subunit 해리완충액으로 처리하고 gel filtration column을 이용한 HPLC로 확인한 결과 retention time 15분과 28분에 각각 peak가 검출되었다. 이러한 성적은 Head 등²¹이 VT-1과 VT-2의 hybrid toxin을 조합하기 위하여 VT-2의 subunit를 해리하여 HPLC로 확인한 결과 A subunit는 retention time 15분에, B subunit는 17분에 각각 단일 peak를 형성하였다고 보고한 성적과 유사하였다

VT-2의 구성아미노산에 대한 보고는 VT-2를 encoding하는 파이지 DNA의 염기서열을 결정하여 추측한 많은 보고가 있으나, toxin protein의 polypeptide를 직접 가수분해하여 구성아미노산을 밝힌 예는 흔하지 않다. 본 연구에서는 환류가수법으로 정제된 VT2를 분해하여 구성아미노산을 확인한 결과 glutamic acid의 함량이 가장 높고 methionine의 함량이 가장낮게 검출되었다.

한편 정제한 VT-2를 Brown 등²⁵의 방법에 따라 3개월령의 토끼에 접종한 결과 1차 접종후 7일째에 1:16, 14일째에 1:48의 중화항체를 나타내었으며, 2차 접종후 7일째에 1:224, 14일째에 1:640의 중화항체를 나타내었다. 3차 접종후 5일째에는 1:1,024의 중화항체를 나타내었고 12일째에 1:1,692의 항체를 나타내어 비교적 높은 항체가의 antitoxin을 생산할 수 있었

다. Lingwood 등¹⁹과 김 등²⁰이 verotoxin에 특이적으로 작용하는 receptor인 Gb3를 microplate에 고정할 수 있도록 개발한 receptor와 이러한 VT-2의 다항혈청을 이용할 경우 verotoxin-2 생산 대장균의 감염증에서 E LISA 또는 receptor를 이용한 RELISA(receptor binding enzyme-linked immunosorbent assay)법의 이용으로 미량의 독소를 신속하게 검출할 수 있을 것으로 생각된다.

저자 등³²은 부산지역의 설사환자 177명중 8.5%에서 verotoxin 생산 대장균을 분리보고하였던 바, 신속하고 정확한 진단방법을 정립하기 위하여는 단클론성 항체의 생산, VT에 특이적인 receptor의 분리를 비롯한 새로운 진단방법의 개발 등에 대한 연구가 시급한 것으로 사료된다.

결 론

Verotoxin 생산 대장균으로부터 독소정제 방법을 확립하기 위하여 국내분리균인 *Escherichia coli* O157:H7 (KSC109)으로부터 독소를 정제하였으며, 정제한 독소의 분자량, 구성아미노산 및 HPLC에서의 subunit를 해리한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *E. scherichia coli* KSC109 strain이 생산한 verotoxin-2를 anion-exchange, chromatofocusing 및 cation-exchange column chromatography의 사용으로 순수하게 정제할 수 있었다.
2. 정제한 독소를 SDS-PAGE 로 전기영동한 결과 분자량 약 32 Kd의 A subunit와 7.7 Kd 정도의 B subunit를 확인할 수 있었다.
3. 각 정제단계별 독소의 회수율은 anion-exchange column에서 31.9%, chromatofocusing column에서 27% 및 cation-exchange column에서 11%의 회수율을 나타내었고 이들 각 column에서의 specific cytotoxicity는 각각 2.0×10^6 , 5.2×10^6 및 1.1×10^9 의 독성을 나타내었다.
4. 정제된 독소의 subunit를 HPLC로 확인한 결과 A subunit는 retention time 15분에, B subunit는 retention time 28분에서 검출되었다.
5. 정제한 독소의 구성아미노산을 확인한 결과 glutamic acid, histidine, asparaginic acid, lysine, alanine 및 leucine 등의 순으로 높은 함량을 나타내었으며 methionine이 가장 낮은 함량을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Hockin JC, Lior H. Haemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Canada. *Can Dis Wkly Rep*, 13 : 203~204, 1987.
2. Pai CH, Ahmed N, Lior H, et al. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* : a two-years prospective study. *J Infect Dis*, 157 : 1054~1057, 1988.
3. Karmali MA, Petric M, Lom C. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 151 : 775~782, 1985.
4. Shanks PL. An unusual condition affecting the digestive organs of the pig. *Vet Rec*, 50 : 356~358, 1938.
5. Pai CH, Gordon R, Sims HV, et al. Sporadic causes of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Ann Int Med*, 101 : 738~742, 1984.
6. Konowalchuk J, Spiers IJ, Wavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 18 : 775~779, 1977.
7. Yutsudo T, Honda T, Miwatami T, et al. Characterization of purified Shiga toxin from *Shigella dysenteriae*. *Microbiol Immunol*, 30 : 1115~1127, 1986.
8. Downes FP, Barrett TJ, Green JH, et al. Affinity purification and characterization of shiga-like toxin II and production of toxin specific monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 56 : 1926~1933, 1988.
9. Huang A, DeGrandis S, Friesen J, et al. Cloning and expression of the genes specifying Shiga-like toxin production in *Escherichia coli* H19. *Infect Immun*, 166 : 375~379, 1986.
10. Konowalchuk J, Dickie N, Stavric S, et al. Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. *Infect Immun*, 20 : 575~577, 1978.
11. Strockbine NA, Jackson MP, Sung LM, et al. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type I. *J Bacteriol*, 170 : 1116~1122, 1988.
12. Downes FP, Barrett TJ, Green JH, et al. Affinity purification and characterization of Shiga-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 56 : 1926~1933, 1988.
13. Marques LRM, Peiris JS, Cryz SJ, et al. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol, Lett* 44 : 33~38, 1987.
14. O'Brien AD, LaVeck GD. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 40 : 675~683, 1983.
15. Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, et al. Site of action of a Vero toxin(VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on Eukaryotic ribosome. *Eur J Biochem*, 171 : 45~50, 1988.
16. Olsnes S, Eiklid K. Isolation and characterization of Shigella cytotoxin. *J Biol Chem*, 255 : 284~289, 1980.
17. Reisbig R, Olsnes S, Eiklid K. The cytotoxic activity of Shigella toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60s ribosomal subunit. *J Biol Chem*, 256 : 8739~8744, 1981.
18. Boyd B, Lingwood C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron*, 51 : 207~210, 1989.
19. Lingwood CA, Petric M, Brunton J, et al. Glycolipid receptor for verotoxin. *Abstract Presented at An International Symposium and Workshop on Verocytotoxin-producing Escherichia coli Infections*. Toronto, July, 12~15, 1987.
20. 김용환, Lingwood CA. Verotoxin 생산 대장균의 병원성에 관한 연구. 한국수의공중보건학회, 16 : 215~221, 1992.
21. Head SC, Petric M, Richardson S, et al. Purification and characterization of verotoxin 2. *FEMS Microbiol Lett*, 51 : 211~216, 1988.
22. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichiacoli*. *Clin Microbiol Rev*, 2 : 15~38, 1989.
23. Mary GK, Joel MD. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *J Clin Microbiol*,

- 12 : 361~366, 1980.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*, 227 : 680~685, 1970.
25. Brown JE, Griffin DE, Rothman SW, et al. Purification and biological characterization of Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1. *Infect Immun*, 27 : 1617~1622, 1982.
26. Cerny G, Teuber M. Differential release of periplasmic versus cytoplasmic proteins from *Escherichia coli* by polymyxin B. *Arch Microbiol*, 179 : 166~179, 1971.
27. Karmali MA, Petric M, Lom C, et al. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 151 : 775~782, 1985.
28. Petric M, Karmali MA, Richardson S, et al. Purification and biological properties of *Escherichia coli* verocytotoxin. *FEMS Microbiol Lett*, 41 : 63~68, 1987.
29. Lingwood CA, Lae H, Richardson S, Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin *in vitro*. *J Biol Chem*, 1987 ; 262 : 8834~8839.
30. MacLeod DL, Gyles CL, Wilcock BP. Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin II variant. *Vet Pathol*, 28 : 66~73, 1991.
31. Weinstein DL, Jacson MP, Samuel JE , et al. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol*, 170 : 4223~4230, 1988.
32. 차인호, 권혁동, 이채남 등. 설사환자로부터 분리한 설사유발 원인균의 분리 및 분포도에 대한 조사연구(부제:Verotoxin을 생산하는 병원성대장균의 분리 및 분포조사). 부산광역시 보건환경연구원보, 5 :13~28, 1944.
-