

## 2차원 전기영동법을 이용한 *Brucella abortus* 세포외막 특이단백질의 분석

김병수 · 김선희 · 김종석\* · 백병걸\*\*

군산전문대 임상병리과  
전북의대생화학교실\* · 전북대학교수의학과\*\*  
(1998년 2월 10일 접수)

### Analysis of outer membrane proteins of *Brucella abortus* using two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

Byung-su Kim, Sun-hee Kim, Jong-suk Kim\*, Byeong-kirl Baek\*\*

Department of Clinical Pathology, Kunsan Junior College  
Department of Biochemistry, Medical School, Chonbuk National University\*  
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University\*\*

(Received Feb 10, 1998)

**Abstract** : Outer membrane proteins(OMPs) of *Brucella abortus* 1119-3 strain were extracted by Triton X-100 treatment, and fractionated by DEAE-cellulose column chromatography and Sephacryl S-300 column chromatography. The antigenic proteins in these fractions were identified by Western blot analysis. In Western blot analysis, a single band(38kDa) was observed in the DEAE fractions from 36th fraction to 38th fraction against sera of cattle infected with *B abortus*. And other fractions have several bands. However, the Sephacryl S-300 fractions exhibited a total of 3 peaks of proteins with a broad range from about 30 to 116kDa.

In order to characterize further, the extracted OMPs and the DEAE fractions were analyzed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2-DE) and Western blot using serum from naturally infected cattle with *Brucella* spp. The 2-DE immunoblots of DEAE fraction showed immunoreactive spots more than twenty two. The major protein spots have ranging from about 32 to 47kDa. The pI values of the spots were detected from pH 4.7 to 5.4. Among the major protein spots, the 38kDa protein which is a specific antigen, located at the point of approximately a pI 4.8.

**Key words** : *Brucella abortus*, OMPs, column chromatography, two dimensional electrophoresis.

---

이 논문은 1996년도 학술진흥재단 자유공모(전문대과제)에 의하여 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Byung-su Kim, Department of Clinical Pathology, Kunsan Junior College, Kunsan, Republic of Korea.

## 서 론

브루셀라균은 비교적 폭넓은 숙주범위를 가지는 병원균으로 소, 양, 돼지 등에 일차감염된 후 사람에게 감염을 일으키는 인수공통전염병이다. 즉, 브루셀라균은 가축에서 요로생식계에 증식하므로 유산 및 불임증을 포함한 생식기계에 주로 질환을 유발하며, 사람에서는 피부상처나 오염식품 등을 통해 감염이 되며 산발성 발열을 특징으로 하는 인수공통전염병을 유발한다<sup>10-14</sup>.

국내에서 brucellosis는 모든 젖소를 대상으로 결핵검사와 함께 정기검진을 실시, 양성우는 막대한 경제적 손실을 감수하면서 도태시키므로 질병의 확산을 막고자 노력하고 있는 실정이다<sup>12</sup>. 이의 진단에는 표준시험관 응집반응(STA), 신속평판 응집반응(RSA), rose bengal test, MRT(milk ring test), coombs test, CFT(complement fixation test) 등의 혈청학적 진단법이 활용되고 있다. 이들 혈청학적 진단에 이용되는 각종 항원들은 균 종류 및 항원의 조제방법에 따라 항원성이 다양하며, 타 세균들과 교차반응이 성립되므로 최근 국내에서는 Western blot법을 이용하여 특이항원 단백질을 확인한 연구<sup>3,4</sup>와 ELISA법의 개발을 비롯한 각종 혈청학적 진단법의 비교시험에 관한 보고<sup>15-9</sup>가 다수 있다. 그러나 2-dimensional electrophoresis (2-DE)법 등을 이용한 *Brucella* 특이항원의 분석과 항원의 정제 및 동정에 관한 보고는 아직 접할 수 없다.

국내에서 Brucellosis의 진단을 위해서 MRT 방법에 의한 일차검색후 TAT 법으로 확정하는 것이 공인진단법으로 활용<sup>2,5,7,9</sup>되고 있으며, 제주도 등의 상재지역에서는 보체결합반응법(CFT)이 추가 활용되고 있다. 대부분의 질병진단에 이용되는 각종 혈청학적 검사법의 특이도와 민감도는 질병진단시 가장 필수적인 요건이므로 진단항원의 준비시에 특별한 주의와 관심이 요청되고 있다. 따라서 본 연구자 등은 국내 brucellosis의 진단에 필요한 특이항원의 분리, 정제 및 동정의 필요성을 갖게 되었으며 이에 *B abortus* 1119-3에 대한 세포외막 항원을 Triton X-100과 Sarkosyl 등을 이용하여 추출한 뒤 Sephacryl S-300 column chromatography와 DEAE-cellulose column chromatography법으로 특이항원을 부분 정제하였다. 정제된 각 분획은 Western blot 법에 의하여 그 특이성을 확인하였으며, 항원의 성상을 더 상세히 구명코자 2-DE를 한 후 자연감염된 브루셀라병 양성혈청을 이용하여

Western blot하였던 바 *B abortus* 특이항원으로 인정되는 항원의 분자량과 isoelectric point(pI) 위치를 동정할 수 있었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**공시 브루셀라 균주 및 배양** : 실험에 사용한 *Brucella abortus* 1119-3은 전북대학교 수의과대학으로부터 분양받아 *Brucella* broth(Difco Co.)에 3일간 배양하여 항원조제에 사용하였다. 한편 *Yersinia enterocolitica* O:9는 nutrient broth(Difco Co.)에 3일간 증균배양 후 본 연구에 사용하였다.

**OMP 항원준비** : 상기 방법에 의해 배양된 균체를 Tris buffered saline, pH 7.4(TBS)로 배지성분이 완전히 제거될 때까지 수차례 원심세척(5,000g/20min)하였으며 침전된 균체물질은 Moriyon *et al*<sup>16</sup>의 방법을 보완하여 0.4% Triton X-100(Merck Co.), 0.4% Sarkosyl(N-lauroylsarcosine, Sigma Co.) 등의 계면활성제를 이용하여 막단백질을 분리한 후 100,000g로 1시간 고속원심분리(Beckman Co.)하여 상층액을 OMP 항원으로 사용하였다.

**항혈청의 준비** : 항혈청의 준비를 위해서는 브루셀라병 양성으로 판정된 자연감염된 소의 혈청과 가토에 *B abortus* 1119-3균을  $2 \times 10^9$  cell로 조정하여 Freund's adjuvant(Difco Co.)와 동량 혼합한 후 1ml씩 5곳에 나누어 피하접종하는 방법으로 2주 간격으로 2차에 걸쳐 면역을 유발시키고 추가 면역접종후 2주체에 혈청을 분리하여 항혈청으로 사용하였다.

한편 *Yersinia enterocolitica* 균에 대한 항혈청을 얻고자 한우 송아지에 상기와 같은 방법으로 면역을 유발하여 항혈청을 준비하였다.

**항원의 추출 및 정제** : *B abortus* 1119-3 OMP 항원은 Triton X-100과 Sarkosyl 등의 계면활성제를 이용하여 추출한 항원을 Moriyon *et al*<sup>18</sup>과 Zygmunt *et al*<sup>19</sup>의 방법을 수정 보완하여 Sephacryl S-300 column(1.5 x 80cm) chromatography와 DEAE-cellulose column(2.5 x 7cm) chromatography하여 균체외막 추출단백질을 부분 정제하였다. 즉, Sephacryl S-300 column chromatography는 0.4% Sarkosyl 추출항원(10.24mg/ml) 5ml를 column의 상층부에 증점시킨 뒤 10mM Tris-HCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM EDTA, 0.1M NaCl, 0.1M PMSF, pH 7.4(이하 elution buffer)로 filtration gel을 평형시킨 후 충분히 세척하고 14ml/hr의 유

속으로 elution buffer로 용출시켜 5ml씩 각 분획을 모아 spectrophotometer(Beckman Co.)로 280nm에서 Optical Density (OD)를 측정함으로써 분리단백질의 peak를 확인하였으며, 항원특이성 반응이 높은 분획은 Western blot법으로 확인하였다.

DEAE-cellulose column chromatography는 DEAE-cellulose (Sigma Co)를 column에 충전시키고 10mM Tris buffer pH 7.4 (starting buffer)로 평형시킨 후 Triton X-100 추출항원 (6.97mg/ml) 10ml를 상층부에 중첩시킨 뒤 starting buffer로 용출시켜 충분히 세척하고, binding된 물질은 0~0.5M KCl linear gradient buffer(200ml)로 20ml/hr의 유속으로 elution시켜 각 4ml씩 분획을 모아 각 fraction은 280nm에서 흡광도를 측정하여 peak 위치를 확인한 뒤 Western blot하여 항원 특이성 반응이 좋은 분획을 확인하였다.

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) : *Brucella*의 OMP 추출항원의 경우는 sample buffer(0.125M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)와 동량을 혼합하였고, DEAE-cellulose와 Sephacryl S-300 column chromatography을 이용하여 부분 정제한 항원의 경우는 X4 sample buffer에 1:4 비율로 혼합하여 100℃에서 3분간 끓인 후 10% gel에 7μl씩 loading 하고 stacking gel에서는 60 volt로 전기영동하였고, separating gel에서는 180volt로 1시간정도 전기영동하였다. 전기영동후 Gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250 staining 용액에 염색후 탈색하여 low molecular weight marker(Bio-Rad Co.)와 비교하여 분자량을 계산하였다.

Western blot : 전기영동하여 분리한 항원은 상기 방법에 의해 준비한 항혈청을 이용하여 Western blot을 실시하였다. 즉, 전기영동한 gel은 Nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell Co.)에 60volt로 1시간 transfer 시키고, 막을 gel로부터 분리후 2% BSA가 함유된 0.2% Tween 20 Tris buffered saline(pH 7.4, TTBS)에서 1주야 정치(4℃)하여 blocking 하였다. 반응 항혈청은 0.05% TTBS에 200배 희석하여 2시간 반응후 0.1% TTBS로 10분/3회 세척하였다. Conjugate로는 phosphatase labeled affinity purified anti-bovine goat IgG(KPL Co.)를 3,000배 희석하여 2시간 반응시키고 0.1% TTBS로 10분씩 3회 세척하였다. 기질용액은 BCIP : NBT : 0.1M Tris buffer를 각기 1:1:10 비율로 혼합하여 발색시켰다.

Two-Dimensional Electrophoresis(2-DE) : *Brucella* 균

의 OMP 추출항원의 단백질의 특성을 분석 검출하고자 이차원 전기영동을 O'Farrell의 방법<sup>22</sup>을 활용하여 실시하였다. 즉, Isoelectric focusing gel [30% polyacrylamide 1.33ml, 10% NP-40 2ml, 2% Ampholines(pH 3.5-9.5, Pharmacia Co.) 2.47ml, 10% ammonium persulfate 10ul, TEMED 7ul]을 준비하여 glass tube(Bio-Rad Co.)에 최대한 기포발생없이 충전하였다. 항원은 lysis buffer(9.5M urea, 2% NP-40, 2% 2-ME, 2% ampholines)에 2시간 반응시키고, 0.02M NaOH를 upper tank에 0.01M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 low tank에 각각 넣고 기포를 제거한 뒤 항원물질을 주입하고 500volts에서 10시간 통전하여 일차원 분리후 tygon tube가 연결된 주사기로 gel을 조심스럽게 glass tube에서 분리하였다. Isoelectric focusing gel은 SDS sample buffer에서 1시간 평형시킨 다음, 수직 전기영동장치(Bio-Rad Co.)에서 200volt로 1시간 이차원 전기영동을 수행하였다. 전기영동후 젤은 NC membrane에 electrotransfer하여 Western blot후 특이반응 spot을 확인하였다. 한편 각 pI의 위치는 표준 marker(Sigma Co.)와 비교하여 측정하였다.

## 결 과

항원의 추출 및 정제 : *B abortus* 1119-3 항원을 Triton X-100과 Sarkosyl 등의 계면활성제로 추출한 항원을 DEAE-cellulose column chromatography한 결과 Fig 1과 같은 profile을 확인하였으며, Sephacryl S-300 column chromatography을 한 fraction은 Fig 2에서와 같이 2개의 peak를 확인할 수 있었다. DEAE-cellulose column chromatography하여 얻은 분획중에서 특이항원 항체 반응위치를 확인하고자 각 분획을 전기영동후 Western blot하였던 바 36(144ml)과 38(152ml)번째의 분획물질에서 38kDa가 강한 반응을 나타내므로서 이 물질이 브루셀라 특이항원으로 생각되었다(Fig 3). 한편 각각의 분획을 F(4~80ml), M(84~200ml) 그리고 L(204ml~320ml) 부분으로 모아 반응대를 비교하였던 바 3개 부분 모두 37~60kDa 단백질이 broad하게 반응된 반면, 항*Yersinia* 혈청과의 반응에서는 20kDa를 중심으로 몇개의 band 위치에서만 반응이 확인되었다(Fig 4).

Sephacryl S-300 column chromatography을 한 fraction은 Fig 2에서와 같이 2개의 peak를 확인할 수 있었고 이를 Western blot 하여 특이항원의 위치를 구분하고자 하였으나 Fig 5에서 처럼 30~116kDa 위치에서 broad한 반응대

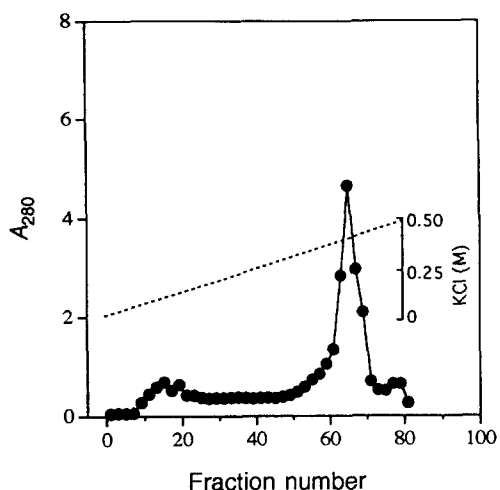


Fig 1. Ion exchange column chromatography of extracted outer membrane proteins from *Brucella abortus*. The proteins were layered on the column(2.6x6.5cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.4). The bound proteins were eluted using a linear KCl gradient(0.0-0.5M) in a total volume of 200ml with a flow rate of 40ml/hrs. The fractions of 4ml were collected. Gel : DEAE cellulose, Column : 2.5x7cm, flow rate : 20ml/hr, elution : linear gradient of 0-500mM KCl in starting buffer.

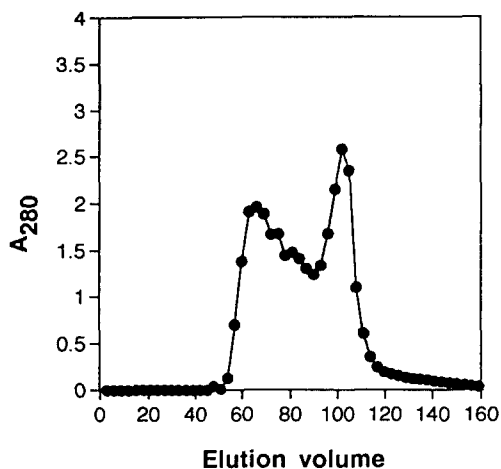


Fig 2. Gel filtration chromatography of extracted outer membrane proteins from *Brucella abortus*. The proteins were layered on the column(1.5x80cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). The column was eluted using the same buffer with a flow rate of 14ml/hrs. The fraction of 5ml were collected. Gel : Sephacryl S-300, Column : 1.5x80cm, flow rate : 10ml/hr, elution buffer : 10mM Tris-HCl, 1mM  $MgCl_2$ , 0.5mM EDTA, 0.1M NaCl, 0.1M PMSF, 0.4% Sarkosyl(pH 7.4).

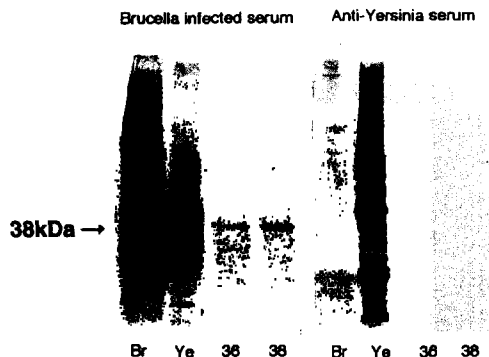


Fig 3. Western blot analysis of *B abortus* (Br), *Y enterocolitica* (Ye) and DEAE fraction(36, 38) with *B abortus* naturally infected bovine serum and cattle antiserum to *Y enterocolitica*.

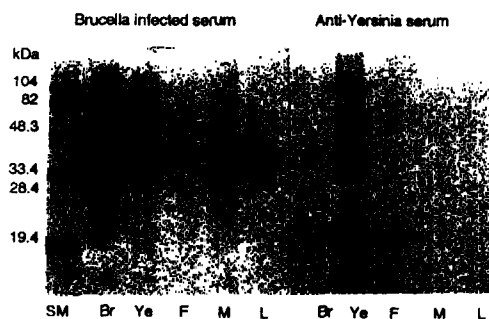


Fig 4. Western blot analysis of *B abortus*, *Y enterocolitica* and DEAE pooling fraction(extracted OMP from *B abortus*) with *B abortus* naturally infected bovine serum and cattle antiserum to *Y enterocolitica*.

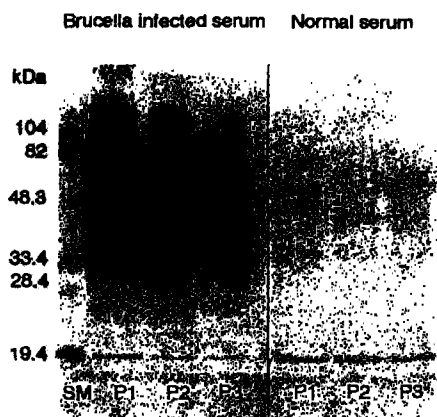


Fig 5. Western blot analysis with *Brucella* infected serum and Normal serum to pooled peak of Sephacryl fraction of *Brucella abortus* 1119-3 antigen extracted with Triton X-100. SM : standard MW marker, P1 : peak 1, P2 : peak, 2, P3 : peak3.

가 관찰되었다.

따라서 *B abortus* 1119-3 특이항원으로 인정할 수 있었던 것은 DEAE-cellulose column chromatography에 의해 분리된 38kDa 물질로 사료되었으며, 13, 20, 41, 49 및 72kDa 물질은 *Yersinia* 와 반응되는 주된 공통항원임을 인정할 수 있었다.

Two-dimensional gel electrophoresis : SDS-PAGE와 Western blot법에 의해 *B abortus* 1119-3 특이항원으로 인정된 단백질의 성상을 좀더 상세히 구명하고자 OMP 조항원(Fig 6A)과 Ion-exchange chromatography에 의해 분리한 1~20번째의 분획을 모아 centricon으로 7배 농축(Fig 6B)한 sample을 단백질량이 100 $\mu$ g이 되도록 조정하여 capillary tube에 만들어진 isoelectric focusing gel의 상부에 30 $\mu$ l씩 apply 하고 pI 별로 1차 분리후 이를 10% gel에 SDS-PAGE 하여 Western blot을 하였던 바 crude OMP인 경우 pI 3.5~7.0 및 분자량 25~82kDa의 위치에서 수많

은 반응물질이 광범위하게 나타났으며, 특히 pH 5.9 이하인 acid쪽에 주요 반응단백질이 몰려서 관찰되었다. 한편 DEAE fraction에서는 특히 pI 5.1의 17kDa 위치에 1개의 spot, 28kDa와 pI 5.2~6.5 위치에 3개의 spots 그리고 대부분 주요 spots은 4.7~5.4 위치와 분자량 32~47kDa 사이에서 대략 22개의 특이반응 spots이 확인되었다. 특히 pI 위치 4.8 근처와 분자량 38kDa 물질이 Fig 3의 Western blot 결과에서 보인 특이항원성 반응물질일 것으로 사료되었다(Fig 6).

## 고 찰

Brucellosis는 소, 산양, 염소 등에 널리 분포되어 있는 인수공통전염병으로서 사람에게 있어서는 피부염, 관절염, 무기력 등을 야기시킨다<sup>12,13,22</sup>. 이 질병은 동물과 동물 사이에 전파되므로 전 무리의 소에서 적극적으로 신속 검진이 요구되는 질병이다. 본 질병의 진단은 주로 세균학적 그리고 혈청학적인 방법으로 이루어지고 있으나<sup>6, 9,11,25</sup>, 전자의 경우 병원체를 직접 배양하여 검출하는 것이지만 브루셀라속의 균들이 주로 숙주의 세포내에서 증식하므로 그 분리가 용이하지 않는 것이 문제점이다. 따라서 현재 본 질병의 진단은 대부분 혈청학적인 진단법에 의존되고 있지만 혈청중의 차단항체 및 교차응집소의 존재로 위양성 및 위음성 결과를 초래하는 경우가 많다<sup>26-28</sup>. 이런 문제점 등으로 인해 그동안 ELISA법의 개발 등을 포함한 항원성 구명에 대하여 많은 연구가 수행된 바 있다<sup>6,17-19,29-31</sup>. 특히 항원의 특이성은 진단항원의 성상에 따라서 각기 다른 응집반응 결과를 나타내므로써 비록 어떤 *Brucella* 균종에 감염되어 있을 경우에도 이를 진단하지 못하는 경우가 있을 수 있다<sup>30</sup>. 따라서 최근에는 PCR(Polymerase Chain Reaction)법을 활용한 분자생물학적 진단방법에 관심이 커지고 있다<sup>32-34</sup>. 그러나 PCR법은 시간과 고가의 시약 및 장비가 요구되는 단점 때문에 앞으로 특이성과 민감성이 우수한 항원이 정제되어 활용된다면 응집, 용혈 및 효소표지반응 등을 활용한 새로운 진단법의 개발이 가능할 것이다.

*Brucella* 균의 숙주내 침입시 숙주의 면역반응은 주로 균체 표면항원에 관련되므로 대부분의 연구가 OMPs와 R-LPS에 대한 특성을 구명하는데 집중되어 왔다<sup>17-19,28, 29</sup>. 한편 장내 그람음성균에 대한 주요 OMPs 항원에 대한 연구보고는 상당히 많이 이루어져있는 반면, *Brucella*

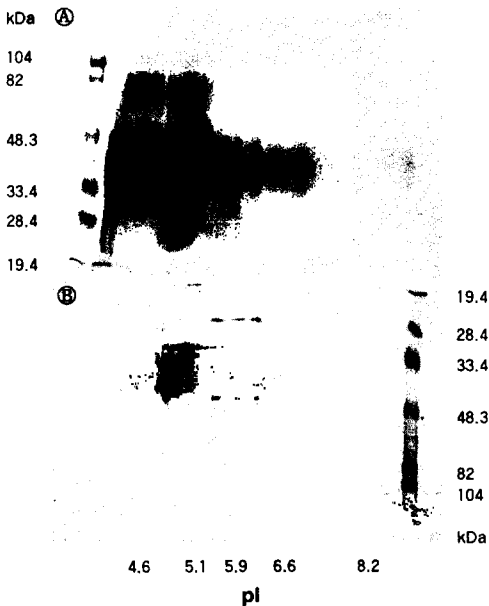


Fig 6. Outer membrane proteins(100 $\mu$ g) and DEAE fraction (100 $\mu$ g) of *Brucella abortus* 1119-3 separated by I-PG-Dalt(1st dimension, I-PG 3.5-9.3; 2nd dimension, SDS-PAGE, T=100%), and electroblotted onto NC membrane, and then Western blot analysis with rabbit antiserum to *B abortus* 1119-3. 2-DE map is oriented with the acidic pH to the left, basic pH to the right.

A : Crude OMP sample, B : DEAE fraction(1-20), kDa : prestained MW marker proteins.

spp의 OMPs에 대한 연구는 상대적으로 적다. Dubray와 Bezar<sup>35</sup>은 *B abortus* 균을 lysozyme으로 처리한 peptidoglycan sacculi에서 37, 25 그리고 15kDa의 물질을 분리 보고하였고, Verstrete *et al*<sup>36</sup>은 43, 41 및 30kDa의 물질을 Zwittergent 314으로 추출후 ion-exchange chromatography 하여 분리 보고한 바 있다.

본 연구에서는 *B abortus* 1119-3으로부터 특이 항원물질을 확인, 분리하고자 Triton X-100과 Sarkosyl을 사용하여 균체 외막단백질을 추출한 뒤 gel filtration과 ion-exchange chromatography 법을 이용하여 항원을 분획하였고, 이 분획물질을 Western blot 법으로 그 반응성을 확인하였던 바 Sephacryl S-300 column chromatography한 분획에서는 crude 항원과 유사하게 30~116kDa 물질이 3개의 peak 모두에서 강한 반응을 나타내므로 특이항원의 분리에 부적합하였다(Fig 5). 그러나 DEAE-cellulose column chromatography의 경우는 144ml(36번째 분획)과 152ml(38번째 분획)에 해당하는 분획물질에 대한 Western blot 결과, 38kDa에서만 특히 강한 반응을 나타내므로 이 물질이 *B abortus*에 대한 특이항원으로 사료되었으며(Fig 3), 분획을 3개로 모아 *B abortus* 1119-3 항혈청과 반응시킨 뒤 그 반응대를 비교하였던 바 Fig 4에서 처럼 38kDa 물질을 중심으로 60kDa까지 광범위하게 항원항체의 반응대가 관찰되었다. 이러한 결과는 백 등<sup>3</sup>의 *B abortus* 항원에 대한 자연감염 양성혈청과의 반응에서 나타난 band 물질과 큰 차이는 없었지만 본 예에서 특이반응대를 관찰할 수 있었던 것은 계면활성제를 이용하여 OMP 항원을 추출한 뒤 column chromatography 법으로 항원을 부분정제했기 때문일 것이다.

또한 *B abortus* 특이항원으로 인정할 수 있었던 38kDa 물질은 *B abortus*의 peptidoglycan 관련 단백질로서 Moriyon과 Berman<sup>16</sup> 그리고 Lugtenberg *et al*<sup>37</sup>이 보고한 것과 같은 성질의 peptidoglycan일 것으로 사료되었다. 한편 Teixeria-Gomez *et al*<sup>38</sup>은 *Brucella* spp의 특이항원을 구명하기 위하여 단크론 항체를 이용하여 2-DE와 면역블롯을 하였던 바, *B melitensis*가 *B abortus*와 상동성을 보인 단백질로 GroEL(heat shock protein)을 보고하였으며, 이 물질의 N-terminal sequence은 AAKDVKFGRT, 분자량은 57kDa 그리고 pI는 5.1~5.2으로 확인한 바 있다. 본 연구에서는 *B abortus*의 특이항원으로 인정되는 38kDa의 pI 값을 확인하였던 바 pH 4.8이었고, 다른 주요 항원항체 반응을 보인 것으로는 17kDa와 pI 5.1 위치의 1개의 spot,

28kDa 및 pI 5.2~6.5 위치에서 3개의 spots 그리고 나머지 대부분 주요 spots은 4.7~5.4 위치와 분자량 32~47kD 사이에서 대략 22개의 특이반응 spots이 집중되어 나타나므로 본 연구의 결과는 Teixeria-Gomez *et al*<sup>38</sup>이 보고한 예와 비교했을 때 pI 값은 거의 일치했으나 분자량이 다르게 관찰되고 있었는데, 이는 항원처리 방법 및 SDS-PAGE의 조건이 다르기 때문일 것으로 사료되었다. 한편 *B ovis*와 *B melitensis*에 대한 2-DE 양상은 대부분 상호 유사하였으며, *B melitensis*는 56kDa(pI 5.0~5.12), 22kDa(pI 5.7), 21kDa(pI 6.09) 그리고 11kDa(pI 5.35)였으며, *B ovis*는 33kDa(pI 6.25), 32kDa(pI 5.84) 그리고 11kDa(pI 5.84)에서만 각기 차이를 보이는 것으로 보고하였다<sup>38</sup>. 이런 결과는 전기영동조건의 차이, IEF sample buffer에서의 항원 단백질의 불용성, 세균의 증식과중증 활성능 등의 차이 때문일 것이다. 그러나 2-DE는 기술상 resolution과 sensitivity가 좋기 때문에 *Listeria*<sup>39</sup>, *Chlamydia trachomatis*<sup>40</sup> 그리고 *Haemophilus influenzae*<sup>41</sup> 등의 세균에 대한 항원특성을 동정분리하는데 그동안 많이 사용되어 왔다.

본 연구에서도 column chromatography 법으로 항원을 1차 분리하여 그 성상을 Western blot법으로 구명한 뒤, 면역반응성이 좋은 분획물질의 특성을 2-dimensional electrophoresis 법으로 확인하고자 하였다. 즉, Fig 4의 F lane(1~20번째의 분획)의 물질을 농축하여 이차원 분리한 후 면역블롯을 하였던 바 pI 4.7~5.4 위치의 분자량 32~47kD에서 22개 정도의 특이반응 물질이 확인되었으며(Fig 6), pI 위치 4.8 근처의 분자량 38kDa 물질은 *B abortus* 1119-3에 대한 특이항원으로 인정되었는데 이는 DEAE fraction의 Western blot 결과(Fig 3)와 일치하였다. 이 물질은 향후 N-terminal amino acid sequence를 확인하여 항원의 특이성을 동정하고 synthetic peptide를 제조한 뒤 진단항원으로서의 사용가능성에 대한 연구가 더 필요하다.

## 결론

Brucellosis의 정확한 진단은 국민보건의 안전과 양축농가의 경제적 피해를 최소화 할 수 있어 중요시 되고 있다. 우리나라에서 brucellosis의 진단액 제조시 공시균주로 사용되고 있는 *B abortus* 1119-3균의 세포외막 단백질의 특이성을 구명하고자 *Brucella* 균체를 Triton X-

100으로 처리한 조항원과 분획항원을 Western blot 및 2차원 전기영동법 등을 활용하여 분석하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *B abortus* 1119-3 세포외막 추출항원을 DEAE-cellulose column chromatography 하여 특이항원 분획을 Western blot 법으로 확인해본 바, 36부터 38번째의 분획(144ml~152 ml)에서 38kDa 물질이 유일하게 확인되었다. 그러나 Sephacryl S-300 column chromatography한 항원은 30~116 kDa 물질이 광범위하게 관찰되어 특이항원의 분리에 적합하지 못하였다.

2. DEAE-cellulose column chromatography한 분획을 모아 2-dimensional electrophoresis 후 Western blot하였던 바 22개의 spots이 관찰되었으며, 이들은 대부분 pI 4.7~5.4와 분자량 32~47kDa 사이에 위치하였다. 특히 *B abortus* 1119-3의 분획항원의 Western blot에서 항원, 항체반응이 강하게 일어났던 38kDa 물질의 pI 값은 pH 4.8이었다.

## 참 고 문 헌

1. 김종만, 유종찬, 박정문, 현관중, 마점술. 브루셀라 양성우에서 분리한 브루셀라균의 성장과 혈청학적 진단법 비교. 농시논문집(가축위생), 30:1-6, 1988.
2. 농림수산부 예규. 제160호. 결핵병 및 브루셀라병 방역실시요령중 개정. 1991.
3. 백병걸, 이준화, 진찬문. Western blot 방법에 의한 소 Brucellosis의 특성 분석. 한국수의공중보건학회지, 21:107-115, 1997.
4. 임윤규, 양기천, 이경갑, 박진홍, 이두식, 박용호, 강승원, 목지원, 이영순. SDS처리한 브루셀라 항원과 *Yersinia enterocolitica* O:9주의 혈청학적 교차반응 연구. 대한수의학회지, 35:143-148, 1995.
5. 백병걸, 허진, Matsuda Kiku. Complement Fixation Test 이용한 Brucellosis 진단. 한국수의공중보건학회지, 21:395-402, 1997.
6. 임윤규, 이두식, 박진홍, 양기천, 김승호, 김공식, 현관중, 김우택, 이영순. 축우 브루셀라병의 ELISA 진단법에 관한 연구. 대한수의학회지, 33:131-135, 1993.
7. 안수환, 김금화, 박용호, 김동성. 브루셀라병과 *Yersinia enterocolitica* 감염의 혈청학적 감별진단에 관한 연구. 농시보고(축산가축), 24:106-111, 1982.
8. 정석찬, 김종만, 박정문, 안수환. 브루셀라균에 대한 단크론성 항체생산. 농시논문집, 31:19-23, 1989.
9. 김금화, 안수환, 박용호, 김동성. 브루셀라병 검색에 사용되는 여러가지 혈청진단법의 비교연구. 대한수의학회지, 22:149-153, 1982.
10. Beran GW, Steele JH. Handbook of zoonosis. section A. CRC press Inc, 9-39, 1992.
11. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. Hagens and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals. Comstock Publishing Associate, 135-152, 1988.
12. Ariza J, Servitje O, Pallares R, Fernandez VP, Rufi G, Peyri J, Gudiol F. Characteristic cutaneous lesions in patients with brucellosis. Arch Dermatol, 125:380-383, 1989.
13. Berger TG, Guill MA, Goette DK. Cutaneous lesions in brucellosis. Arch Dermatol, 117:40-42, 1981.
14. Salate RA, Ravdin JA. Brucella species, in principles and practice of infectious disease. 2nd ed, 1293-1290, 1985.
15. 대한미생물학회편. 의학미생물학, 여문자. 541, 1991.
16. Moriyon I, Berman DT. Effect of nonionic, ionic and dipolar ionic detergents and EDTA on the Brucella cell envelope. J Bacteriol, 152:822-828, 1982.
17. Berman DT, Wilson BL, Moreno E, Angus RD, Jones LM. Characterization of Brucella abortus soluble antigen employed in immunoassay. J Clin Microbiol, 11:355-362, 1980.
18. Moriyon I, Berman DT. Isolation, purification and partial characterization of Brucella abortus matrix protein. Infect Immun, 39:394-402, 1983.
19. Zygmunt MS, Gilbert FB, Dubray G. Purification, characterization and seroactivity of a 20-kilodalton Brucella protein antigen. J Clin Microbiol, 30:2662-2667, 1992.
20. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Bio Chem, 250:4007-4021, 1975.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem,

- 72:248-254, 1976.
22. Young EJ. Human brucellosis. *Rev Infect Dis* , 5:821, 1983.
  23. Yinnon AM, Morali GA, Goren A, Rudensky B, Isaacsohn M, Michel J, Hershiko C. Effect of age and duration of disease on the clinical manifestations of brucellosis. *Isr J Med Sci* , 29:11-16, 1993.
  24. Zimmerman S, Gillikin SA, Sofat N, Bartholomew WR, Amsterdam D. Case report and seeded blood culture study of *Brucella bacteremia* . *J Clin Microbiol* , 28:2139-2141, 1990.
  25. Mayfield JE, Bantle JA, Ewalt DR, Meador VP, Tabatabal LB. Detection of *Brucella* cells and cell components. In: Animal Brucellosis. Boca Ration: Chemical Rubber Corporation, 1988.
  26. 손준용, 이길웅, 유재창, 박만석. Zoonosis 브루셀라증에 관한 연구. 국립보건원보, 23:281-295, 1986.
  27. Deley J, Mannheim W, Segers P, Lievens A, Denin M, Vanhoucke M, Gillis M. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. *Internat J Sys Bacteriol* , 37:35-42, 1987.
  28. Dubray G, Limet J. Evidence of heterogeneity of lipopolysaccharides among *Brucella* biobars in relation of A and M specificities. *Ann Inst Pasteur Microbiol* , 138:27-37, 1987.
  29. Cloeckart A, Kerkhofs P, Limet JN. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: Immunoblot analysis and competitive enzyme-linked Immunosorbent using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* , 30:3168-3174, 1992.
  30. Sarvamangala JN, Devi Polt SS, Boctor FN, Peter JB. Serological evaluation of brucellosis: Importance of species in antigen preparation. *J Infect Dis* , 156:658-661, 1987.
  31. Vizcaino N, Fernandez-Lago L. A rapid and sensitive method for the identification of *Brucella* species with a monoclonal antibody. *Res Microbiol* , 143:513-518, 1992.
  32. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Trop Med and Hyg* , 95:271-275, 1992.
  33. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* , 69: 216-227, 1990.
  34. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Stich RW. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* starins by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol* , 174:7778-7783, 1992.
  35. Dubray G, Bezard G. Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. *Ann Rech Vet* , 11:367-373, 1980.
  36. Verstreat DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, Winter AJ. Outer membrane proteins of *Brucella abortus* : Isolation and characterization. *Infect Immunit* , 35:979-989, 1982.
  37. Lugtenberg B, Brostein H, VanSelm N, PeterR. Peptidoglycan-associated outer membrane proteins in gram negative bacteria. *Biochem Biophys Acta* , 465: 571-578, 1977.
  38. Teixeira-Gomes AP, Cloeckart A, Bezard G, Dubray G, Zygmunt MS. Mapping and identification of *Brucella melitensis* proteins by two dimensional electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis* , 18: 156-162, 1997.
  39. Gormon T, Phan-Thanh L. Identification and clasification of Listeria by two-dimensional protein mapping. *Res Microbiolol* , 146:143-154, 1995.
  40. Bini L, Sanchez-Campillo M, Santucci A, Magi B, Marzocchi B, Comanducci M, Pallini V. Mapping of *Chlamydia trachomatis* proteins by immobiline-polyacrylamide two-dimensional electrophoresis: spot identification by N-terminal sequencing and immunoblotting. *Electrophoresis* , 17:185-190, 1996.
  41. Cash P, Argo E, Bruce KD. Characterization of *Haemophilus influenza* proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* , 16:135-148, 1995.