

재조합 Shigatoxin 2e 유전자의 발현단백 생산 및 독소의 수용체 결합 친화성 확인

동분연 · 김상현¹ · 김영일² · 조현호³ · 이우원⁴ · 김곤섭⁵ · 강호조⁵ · 김용환^{5*}

녹십자백신연구소

¹캐나다 구엘프대학교 수의과대학

²수의과학검역원 부산지소

³수의과학검역원 서울지소

⁴부산시 보건환경 연구원

⁵경상대학교 수의과대학 생명과학연구소

(게재승인: 2004년 4월 17일)

Production of expressed protein from cloned Shigatoxin 2e gene and Receptor Binding Affinity of the toxin

Bun-youn Dong, Sang-Hyun Kim¹, Yeong-Il Kim², Hyun-Ho Cho³, Woo-won Lee⁴,
Kon-Sup Kim⁵, Ho-Jo Kang⁵, and Yong-Hwan Kim^{5*}

Korea Green Cross Co., Yongin 449-799, Koera

¹Department of Pathobiology, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G, 2W1

²National Veterinary Research and Quarantine Service, Busan 602-833, Korea

³National Veterinary Research and Quarantine Service, Seoul 157-032, Korea

⁴Pusan Institute of Health and Environment, Busan 613-806, Korea

⁵College of Veterinary Medicine, Research Institute of Life Science,

Kyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Accepted: April 17, 2004)

Abstract : This study was designed to determine optimal condition for expression of cloned Shigatoxin2e(Stx2e) gene from transformed *E. coli* PED18, to compare the cytotoxicity titer between cloned Stx2e and Stx2e from original strain, and to confirm of receptor binding affinity of Stx2e for use of development of receptor binding ELISA to detect of Stx2e. The optimum composition of medium for expression of Stx2e gene in *E. coli* host-vector system was defined as the medium containing 0.5% glucose and 0.5 mM IPTG. The cytotoxicity titer of expressed Stx2e for Vero cell was 1000 fold higher than that of Stx2e from original strain AY93258. The binding affinity of Stx2e to receptor globotetraosyl ceramide(Gb₄) was confirmed by immunoblotting.

Key words : Shigatoxin 2e gene, expression, cytotoxicity, globotetraosyl ceramide, receptor binding ELISA

서 론

돼지의 부종병은 Shigatoxin 2e(Stx2e)를 생산하는 *Escherichia coli*에 의하여 유발되며 주요 혈청형은

O138:K81, O139:K82, O141:K85으로 알려져 있다 [8, 10, 22].

Stx2e의 유전자는 bacteriophage에서 유래하는 Stx1 및 Stx2와는 달리 염색체 DNA에 존재하는 것으로 알려져

이 논문은 2000년 경상남도 생명공학 산업화 연구비(20000483)에 의하여 수행되었음.

*Corresponding author: Yong-Hwan Kim

College of Veterinary Medicine, Gyeong Sang National University, Jinju 660-701, Korea
[Tel: +82-55-751-5820, Fax: +82-55-751-5803, E-mail: yho157@nongae.gsnu.ac.kr]

있다 [9, 12, 23]. Weinstein 등 [23]과 Gyles 등 [12]이 부종병 감염돼지에서 분리한 대장균으로부터 유전자를 클로닝하여 Stx2e 유전자의 염기서열을 보고하였으며, 최근 Franke 등 [5]이 건강한 돼지에서 분리한 O-101 균주로부터 Stx2e variant gene을 보고한 바 있다.

국내에서도 김 등 [3]이 분리주인 AY93258균의 Stx2e 유전자에 대한 염기서열을 보고한 바 있으며, Weinstein 등 [23]의 결과와 비교하여 A subunit의 핵산과 아미노산의 동질성은 각각 100%로 나타났고, B subunit에서 핵산과 아미노산의 동질성은 각각 99.6%, 98.8% 였다. Weinstein 등 [23]과 Gyles 등[12]의 균주와 김 등 [3]의 균주에서 Stx B subunit의 아미노산 조성의 차이는 8번째 아미노산인 isoleucine이 threonine으로 치환된 것으로 밝혀졌으며, 이러한 결과는 진화과정에서 재조합이나 한 염기의 치환에 기인한 것으로 보고하였다 [12].

동물의 세포막 성분의 일종인 glycosphingolipid(GSL) 중에서 globotriosyl ceramide(Gb₃)와 globotetraosyl ceramide(Gb₄)는 Stx를 비롯한 독소와 일부 균체성분의 세포수용체로 작용한다 [6]. Stx1과 Stx2는 Gal.α 1-4 Gal disacchride 성분의 종말기를 가지는 Gb₃과 특이적으로 결합하며 [14], Stx2e는 Gb₃ 말단에 N-acetylglucosamine이 부가된 Gb₄와 친화성이 높은 것으로 알려져 있다 [13, 15, 21].

Stx는 세포독성이 강하여 임상재료에서 미량의 독소를 신속하게 검출할 수 있는 방법이 필요하다. Basta 등 [5]은 lyso-Gb₃를 수용체로 하여 미량의 Stx1을 검출하기 위한 receptor-binding ELISA(RELISA)법을, 김과 Lingwood 등 [2]은 liposome Gb₃을 이용하여 Stx2 검출을 위한 RELISA 법을 제시하였다.

본 실험에서는 부종병의 신속진단 및 예방대책에 대한 방법을 확립하기 위하여 국내에서 분리한 대장균에서 cloning한 Stx2e 유전자를 형질전환하여 발현 최적조건을 규명하고, 생산된 Stx2e의 Gb₄에 대한 친화성을 확인하여 미량의 독소를 검출하기 위한 RELISA법을 개발하는 데 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

재조합 플라스미드 pED18의 형질전환 및 확인

부종병 감염 돼지에서 분리한 대장균 AY93258(O139)의 Stx2e 유전자를 김 등 [3]이 PCR로 증폭하여 pUC18에 cloning한 재조합 플라스미드 pED18을 발현시키기 위하여 DH5αF'IQ cell에 형질전환(PED18) 하였다. 형질전환균 PED18을 0.1M isopropyl thiogalactoside(IPTG) 100 μl와 X-gal (20 mg/ml) 20 μl를 도말한 Amp-LB agar (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl,

ampicillin 100 μg/ml, 1.5% agar) plate에 도말하고 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 무색의 colony를 선별하여 Amp-LB broth에 배양한 후 alkaline-lysis의 방법으로 plasmid를 분리하고 제한효소 BamH I과 Hind III (Promega)로 절단하여 Stx2e 유전자의 존재유무를 확인하였다.

발현 플라스미드 pED18의 최적 발현조건

형질전환균 PED18로부터 Stx2e 유전자의 최적 발현조건을 유도하기 위하여 Amp-LB broth(100 μg/ml Ampicillin첨가)에 glucose를 0-1.2%까지 각 농도별로 첨가한 배지에, Amp-LB broth에 37°C 18시간 배양한 PED18 균액을 각 배지에 1% 용량씩 접종하여 37°C에서 진탕배양하였다. 균의 농도가 660 nm에서 흡광도가 약 0.7이 되었을 때 lac promotor의 유도물질인 IPTG를, 최종 농도가 각각 0-4 mM까지 함유되게 첨가하여 Amp-LB broth에서 37°C, 3시간 배양한 후 원심 분리하여 균을 수집하였다.

발현 단백질의 세포독성검사

Gentry와 Dalrymple의 방법 [11]을 준용하여 실시하였다. 즉 1.4×10⁴ vero cell을 96 well microplate에 각 well당 100 μl씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 분압에서 배양한 후 세포 배양배지로 10배 계단 희석한 toxin을 100 μl씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 분압 하에서 3일간 배양하면서 매일 cytopathic effects를 현미경으로 관찰하였으며, 배양 3일 후 세포를 50% 사멸시키는(CD₅₀) 시료의 가장 높은 희석배수를 end point로 하여 Stx2e 활성의 정도를 결정하였다. CD₅₀의 판정법은 Mary 등 [17]의 방법에 따라 배양한 plate를 조심스럽게 진탕하여 사멸한 세포와 배양액을 제거하고, 2% formalin을 첨가한 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 μl를 사용하여 용출시키고, 용출액 100 μl를 0.9 ml의 PBS로 희석하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 독소를 첨가하지 않은 대조균의 흡광도와 대비하여 CD₅₀을 정하였다.

Stx2e의 추출 및 정제

(1) Stx2e의 추출

본 실험에서 알려진 pED18의 발현 최적조건에 따라 형질전환균 PED18을 glucose가 0.5% 함유되게 첨가한 1L×3의 Amp-LB broth에 접종 배양하여 균의 생육이 660 nm에서 흡광도가 0.7이 될 때까지 배양하였다. Lac pomotor 인 IPTG를 배지의 0.5 mM 수준으로 첨가하여

3-4시간 배양 후 침전시키고 균을 수집하였다. 침전된 균체는 200 ml의 PBS 용액을 가하여 현탁시키고, proteinase inhibitor로 작용하는 phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF)와 polymyxin B sulfate를 첨가한 후, ultrasonicator(Sonic and Materials)에서 100 W에 3분간 파쇄하였다. 4°C에서 9,000×g로 세포 잔해물을 원심 분리하여 침전시킨 후, 독소를 함유한 상층액에 30% 및 70%의 황산암모늄을 차례로 가하고 4°C에서 1,000×g로 원심분리하여 독소를 침전 회수하였다. 회수한 독소 pellet에 15 ml의 인산 완충액을 가하여 용해하고 10,000 MW cut off dialysis tube(Millipore)에 넣어 4L 인산 완충액으로 투석하였다.

(2) Stx2e의 정제

Macreod와 Gyles [15]의 방법에 따라 2종류의 column을 사용하여 정제하였다.

① Anion-exchange (A-E) column chromatography

DEAE separeose CL-6B(Pharmacia) 50 ml로 충전한 column을 0.1M Tris-HCl(pH 6.5)로 평형화시킨 다음 인산 완충액으로 투석한 crude독소를 loading하여, 0-0.6M의 NaCl 농도구배로 용출시키면서 3 ml 씩의 분획을 취하였으며, 각각의 분획에 대한 세포독성을 검사하여 10⁴CD₅₀/ml 이상의 독성을 나타내는 분획을 수집하여 투석하고 Amicon filter로 농축하였다.

② Chromatofocussing (CF)

Polybuffer exchange 94(Pharmacia) 57 ml을 충전한 column을 0.025M histidine-HCl 완충액(pH 6.2)으로 평형화시킨 다음 A-E column에서 수집 농축한 시료를 loading하여 pH 6.0-4.0까지 pH 농도구배로 용출시키면서 3 ml 씩의 분획을 취하였다. 각 분획에 대한 세포독성을 검사하여 10⁴CD₅₀/ml 이상의 세포독성을 나타내는 분획을 수집하여 투석한 다음 Amicon filter로 농축하고 단백질을 정량(BCA protein assay kit, Pierce) 하였다.

③ SDS-PAGE

각 정제 단계의 독소에 sample buffer (0.125M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)를 동량으로 가하여 100°C에서 3분간 끓인 후 1분간 얼음에 보존하면서 전기영동 재료로 사용하였다. SDS-PAGE는 12.5% polyacrylamide gel plate 각 well에 20 µl (10 µg of protein/20 µl) sample을 넣고 20 mA에서 2시간 전기영동한 다음 0.1% coomassie brilliant blue로 염색하고 탈색한 후 molecular marker와 비교하여 분자량을 추정하였다.

Stx2e에 대한 항독소 생산

Macreod와 Gyles 등 [15]의 방법에 따라 형질전환 균 PED18을 배양 집균하여 파쇄하고, polymyxin B sulfate를 가하여 crude toxin을 추출하였다. Crude toxin에 0.11% glutaraldehyde를 가하여 만든 변성독소(mg/1 ml PBS)에 동량의 freund complete adjuvant(Difco)를 가하여 유화하였다. 혼합액 1 ml을 3개월령의 New Zealand white rabbit의 배부에 피내 접종한 후, 2주 간격으로 adjuvant를 첨가하지 않은 변성독소 1 ml을 정맥주사하여 추가면역시켰다. 4번째 추가면역을 접종하고 2주 후에 채혈, 혈청을 분리하여 ELISA법으로 혈청의 역가를 검정하였다.

Stx2e의 세포 수용체에 대한 친화성 확인

(1) Immunoblotting

Boyd와 Lingwood 등 [6]의 방법에 따라 돼지의 장기에서 순수 분리한 Gb₄를 TLC plate에 전개하고 1% gelatin 용액을 가하여 37°C 배양기에서 하룻밤 정치하면서 blocking하였다. TLC plate를 증류수로 세척하고 정제한 독소를 가하여 60분간 진탕 배양하고 PBS로 세척한 다음 1:1000 희석액의 polyclonal antitoxin을 가하여 60분간 진탕 배양하였다. TLC plate를 PBS로 세척한 후 1:2000 희석액의 peroxidase-conjuated goat anti-rabbit IgG (Sigma)를 가하여 90분간 oval shaker를 사용하여 반응시켰다. TLC plate를 PBS로 세척한 후 4-chloro-1-naphthol (3 mg/ml in methanol)용액과 30% H₂O₂ 용액을 가하여 15분간 반응시킨 다음 0.2M H₂SO₄로 반응을 정지시키고 plate를 건조시켜 receptor와 toxin과의 반응유무를 판독하였다.

결 과

제조합 플라스미드 pED18의 형질전환 및 확인

분리균의 Stx2e 유전자를 cloning한 제조합 플라스미드 pED18을 발현시키기 위하여 대장균 DH5αF'IQ cell에 형질전환 하였다. 형질전환균 PED18을 배양하여 플라스미드를 분리한 다음, 제한효소 BamHI과 Hind III로 절단하여 Stx2e 유전자를 확인한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 1.4 kb의 Stx2e 유전자와 2.7 kb의 pUC18 vector를 확인할 수 있었다.

형질전환된 Stx2e gene의 최적 발현조건

Stx2e의 유전자에 대한 발현 plasmid인 pED18을 효율적으로 발현시키기 위하여 배지 조건을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 형질전환균 PED18을 lac promotor의 억제물질인 포도당과 발현 유도물질인 IPTG를 각각 0.5%

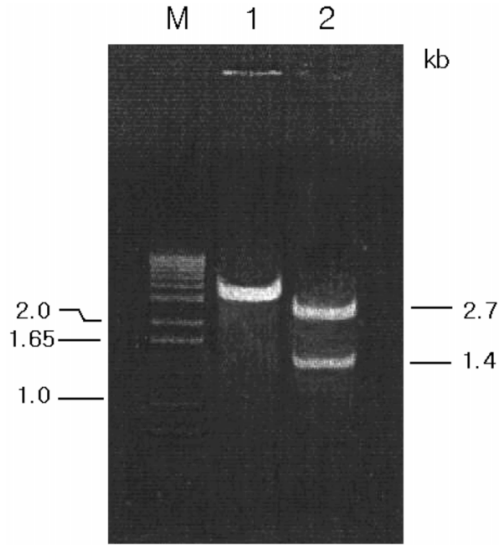


Fig. 1. Agarose gel(1.0%) electrophoresis patterns of cloned Stx2e gene in transformed pED18. [Marker : 1 kb plus ladder (Gibco BRL), Lane 1 : pED18 digested BamHI, Lane 2 : pED18 digested BamHI and HindIII].

및 0.5 mM의 농도로 첨가한 LB 배지에 배양하였을 때 가장 높은 세포독성(10^6 CD₅₀/ml)을 나타내었다.

분리균과 재조합 균주의 세포독성비교

분리균 AY93258주와 재조합 균주인 PED18로부터 발현된 Stx2e의 세포독성을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 분리균 AY93258은 LB broth에, 재조합 균주는 앞에서 서술한 최적배지 조건에 배양하였을 때, 분리균의 생성 독소는 10^3 CD₅₀/ml을, 재조합 균주에서 생산한 독소는 10^6 CD₅₀/ml을 나타내어 재조합 균주 PED18에서 생산한

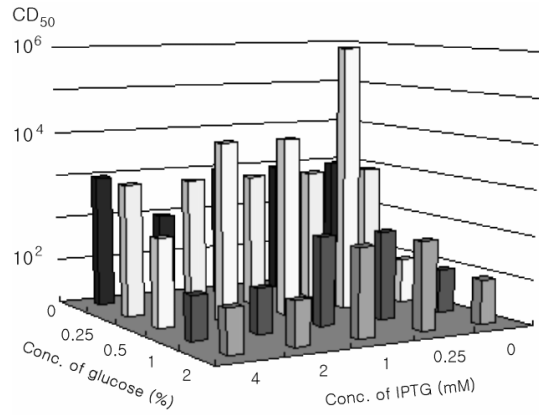


Fig. 2. Comparison of optimal condition of basal medium (LB broth) for expression of Stx2e gene from transformed *E. coli*.

독소가 분리균인 AY93258에서 생산한 독소 보다 1000 배 더 높은 세포독성을 보였다.

Stx2e의 추출 및 정제

Crude toxin을 A-E 및 CF column을 통하여 단계별로 정제한 것을 SDS-PAGE에 전개하여 염색한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같다. Crude toxin에서는 약 7.7 - 175 kD까지의 다양한 단백질 분획이 검출되었고, A-E column을 통하여 정제한 것은 독소 단백질 이외의 일부 분획이 검출되어 상당히 정제되었음을 알 수 있었다. CF column의 정제 산물에서는 toxin의 A subunit(32 kD) 및 B subunit(7.7 kD)를 일부 정제할 수 있었다.

Stx2e에 대한 항독소의 생산

형질전환균 PED18로부터 일부 정제한 독소를 3개월령의 New Zealand white rabbit에 접종하여 2주 간격으로

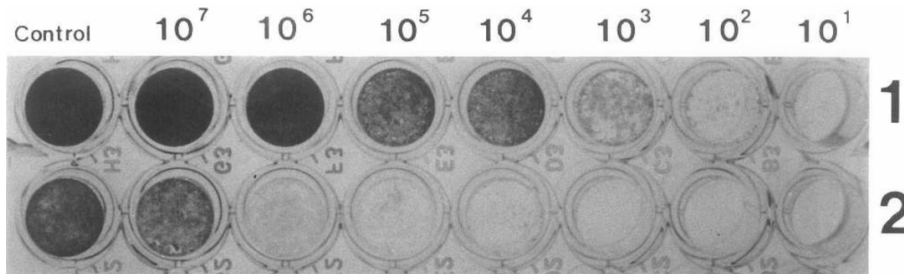


Fig. 3. Comparison of cytotoxicity between wild type Stx2e and expressed Stx2e. [Row 1 : Stx2e from original strain AY93258, Row 2 : Stx2e expressed from pED18].

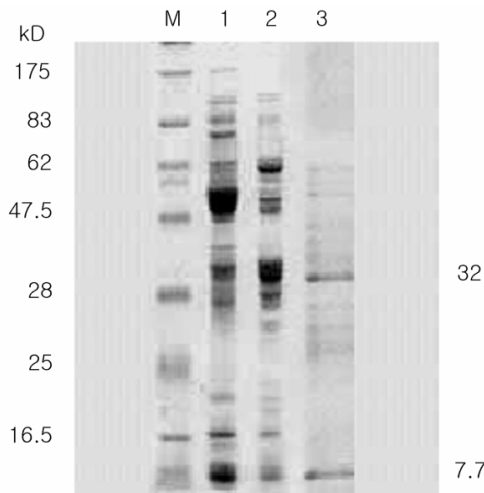


Fig. 4. SDS-PAGE pattern of purified protein of toxin from PED18 stained with coomassie blue. [Maker : Protein marker, broad range. (NEB), Lane 1 : Crude toxin of PED18 after dialysis, Lane 2 : Collect fraction after anion-exchange column, Lane 3 : Collect fraction after chromatofocussing].



Fig. 5. The Affinity of Stx2e for Gb₄ by immunoblotting.

로 4번 추가 집중하였다. 2주 후에 혈액을 취하여 혈청을 분리하고 ELISA법으로 검사한 결과 항체 역가가 1:7,000-1:14,000으로 나타났다.

Stx2e 독소와 수용체 Gb₄와의 친화성 확인

돼지의 장기에서 추출한 Gb₄를 TLC에 전개하고 Stx2e를 결합시킨 다음, Stx2e에 대한 항독소와 goat anti-rabbit peroxidase conjugate를 차례로 가하여 반응시켰다. Plate에 기질 용액을 가하여 발색한 결과 수용체 Gb₄는 Stx2e와 강한 친화성을 나타내었다.

고 찰

Shigatoxemia로 인하여 야기되는 돼지의 부종병은 Stx2e을 생산하는 대장균의 감염에 의하여 이유 자돈에서 빈번하게 발생하며, 피하조직의 부종, 운동실조, 경련, 마비와 같은 신경증상을 나타낸다 [16, 18, 19]. 부종병의 이병율은 높지 않은 편이나, 감염 자돈은 대부분이 위축돈이 되거나 폐사율이 높아 경제적으로 상당한 피해를 주는 질병중의 하나이다.

본 병의 원인인 Shiga 독소는 독성이 강하여 심한 조직손상을 유발하므로 임상재료에서 미량독소를 신속하게 검출할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

본 실험에서는 질병의 신속진단 방법을 모색하기 위한 수단의 일환으로 Stx2e의 최적발현 조건을 규명하고, 수용체 Gb₄에 대한 Stx2e의 친화성을 확인하고자 하였다.

Stx2e 유전자를 발현시키기 위하여 제조합 유전자 pED18을 대장균 DH5αF'IQ에 형질전환 하였다. 형질 전환균을 배양 집균하여 plasmid를 분리하고 제한효소 BamH I과 Hind III로 절단하여 확인한 결과 김 등 [3]이 보고한 1.4 kb의 Stx2e gene을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 균을 배양 집균하고 독소를 추출하여 세포독성을 비교한 결과, 분리균은 10³CD₅₀/ml을, 형질전환균은 10⁶CD₅₀/ml의 세포독성을 나타내어 형질전환균의 생성독소가 분리균에 비하여 1000배 더 높은 세포독성을 나타내었다. 이러한 결과는 Stx gene을 cloning하고 형질전환하여 분리균의 독소와 형질 전환균 독소의 세포독성을 비교한 여러 연구자들의 성적 [4, 12, 23]과 유사하였다.

Stx2e 유전자의 발현 최적조건을 규명하기 위하여 형질 전환균 PED18을 기초배지에 glucose와 lactose promotor 유발물질인 IPTG를 농도별로 첨가 배양하여 독소를 추출한 다음 세포독성을 비교 분석하였다(Fig. 3). 0.5%의 glucose와 0.5 mM IPTG를 첨가한 배지에 PED18을 배양 추출한 경우 세포독성이 10⁶CD/ml로서 실험군 중에서 가장 높은 세포독성을 나타내어 최적 발현 조건임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 차 등 [4]이 Stx2 유전자의 최적 발현조건을 조사한 성적과 유사하였다.

생성된 독소가 세포 외로 방출되는 Stx1 및 Stx2와는 달리 Stx2e의 경우에는 거의 90% 이상의 독소가 periplasmic space에 결합되어 있다. 독소를 유리시키기 위하여 polymyxin B sulfate를 첨가하여 균체를 파쇄하고 포화 황산암모늄 용액으로 침전한 경우 다량의 crude toxin을 얻을 수 있다고 하였다 [7, 20].

본 실험에서도 효과적으로 독소를 다량 생산하기 위하여 형질전환균 PED18을 Stx2e 발현 최적조건으로 확인된 배지에 배양하여 균체를 수집하고, polymyxin B sulfate를 가하여 파쇄한 다음 30%와 70% 황산 암모늄에 단계적으로 침전시켜 crude toxin을 수집하였다. 수집한 독소를 인산 완충액으로 투석하고 Amicon filter에 농축한 다음 A-E column과 CF column을 통하여 정제한 것을 SDS-PAGE에 전개하여 확인한 결과 crude toxin에서는 다양한 분자량의 단백질 분획이 검출되었다. 그러나 A-E column의 정제산물은 독소 단백질 외의 일부 분획이 검출되었고, CF column의 산물에서는 32 kd의 A

subunit와 7.7 kd의 B subunit 분획을 거의 순수하게 분리할 수 있어 여러 연구자들의 Stx 정제 결과 [15, 22]와 유사한 성적을 나타내었다.

돼지의 장기에서 분리한 Gb₄를 TLC plate에 전개하여 immunoblotting법으로 VT2e에 대한 친화성을 확인한 결과(Fig. 5) Gb₄에 높은 친화성을 나타낸 것은 김과 Lingwood [2]와 김 등 [1]이 Stx2에 대한 receptor의 친화성을 확인한 결과와 일치하였다.

참고문헌

1. 김용환, 차인호, 조현호, 김상현, 진형근, 김영일, 김도. Verocytotoxin 생성 대장균의 분포 및 Receptor를 이용한 RELISA법의 개발. II. Verotoxin의 검출을 위한 Receptor Binding Enzyme-linked Immunosorbent Assay(RELISA)에 관하여. 한국수의공중보건학회지. 1996, **20**, 55-63.
2. 김용환, Lingwood, C. A. Verotoxin 생성 대장균의 병원성에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지. 1992, **16**, 215-221.
3. 김종희, 차인호, 김용환. 부종병감염 돼지 유래 대장균 O139로부터 Verotoxin-E 유전자의 클로닝한 염기서열 분석. 한국수의공중보건학회지. 1997, **21**, 281-288.
4. 차인호, 김용환. 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. 대한수의사회지. 1996, **36**, 379-387.
5. Basta, M., Karmali, M. A. and Lingwood, C. A. Sensitive receptor specified enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* verotoxin. J. Clin. Microbiol. 1989, **27**, 1617-1622.
6. Boyd, B. and Lingwood, C. A. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. Nephron. 1989, **51**, 207-210.
7. Cerny, G. and Teuber, M. Differential release of periplasmic versus cytoplasmic proteins from *Escherichia coli* by polymyxin B. Arch. Microbiol. 1971, **179**, 166-179.
8. Frank, M. A., Jorsal S. E., Ahrens, P., Tensen, N. E. and Meyling A. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. J. Clin. Microbiol. 1997, **35**, 20-24.
9. Franke, S., Harmsen, D., Caeprioli, A., Pierard, D., Wieler, L. H. and Carch, H. Clonal relatedness of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O-101 strains of human and porcine origin. J. Clin. Microbiol. 1995, **33**, 3174-3178.
10. Frydendahl, K. Prevalence of serogroups and virulence in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. Vet. Microbiol. 2002, **85**, 169-182.
11. Gentry, M. K. and Dalrymple, J. M. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for shiga toxin. J. Clin. Microbiol. 1980, **12**, 361-366.
12. Gyles, C. I. DeGrandis, S. A., Mackenzie, C. and Brunton, C. J. Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining Verocytotoxin production in a porcine edema disease isolates of *E. coli*. Microbiol. Pathogen. 1988, **5**, 419-426.
13. Ling, H., Pannus, N. S., Boodhoo, A., Armstrong, G. D., Clark, C. G., Brun, J. L. and Read, R. J. A mutant shiga-like toxin IIe bound to its receptor Gb(3) structure of a group II shiga-like toxin with altered bind specificity. Structure Fold Des. 2000, **8**, 253-264.
14. Lingwood, C. A. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. Trends in Microbiol. 1996, **4**, 147-152.
15. Macleod, D. L. and Gyles, C. L. Purification and characterization of an *Escherichia coli* shiga-like Toxin II variant. Infect. Immun. 1990, **58**, 1232-1239.
16. MacLeod, D. L., Gyles, C. L. and Wilcock, B. P. reproduction of edema disease of swine with purified shiga-like toxin II variant. Vet. Pathol. 1991, **28**, 66-73.
17. Mary, G. K. and Joel, M. D. Microtiter cytotoxicity assay for shigella toxin. J. Clin. Microbiol. 1982, **12**, 362-367.
18. Methiapun, S., Pohlenz, J. F. L. and Bertschinger, H. U. Ultrastructure of the intestinal mucosa in pigs experimentally in oculated with an edema disease-producing strain of *Escherichia coli* (O139:K12:H1). Vet. Pathol. 1984, **21**, 516-520.
19. Moxley, R. A. Edema disease. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 2000, **16**, 175-185.
20. Petric, H. M., Karmali, M. A., Richardson, S. and Cheung, R. Purification and biological properties of *Escherichia coli* verocytotoxin. FEMS. Microbiol. Lett. 1987, **41**, 63-68.
21. Samuel, J. E., Perera, L. P., Ward, S., O'Brien, A. D., Ginsburg, V. and Krivan, H. C. Comparison of the glycolipid receptor specificities of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. Infect. Immun. 1990, **58**, 611-618.
22. Silva, A. S., Valadares, G. F., Penatti, M. P. A., Brito, B. G. and Leit, D. S. *Escherichia coli* strains from edema disease : O serogroups and genes for shiga toxin,

- enterotoxin, and F18 fimbriae. *Vet. Microbiol.* 2001, **80**, 227-233.
23. **Weinstein, D. L., Jackson, M. P., Samuel, J. E., Holmes, R. K. and O'Brien, A. D.** Cloning and sequencing of a shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* 1988, **170**, 4223-4230.