

## *Edwardsiella tarda*에 대한 계란난황항체의 분리와 정제

김영대 · 오명주 · 정태성\* · 정성주†

여수대학교 수산생명의학과, \*경상대학교 수의학과

## Isolation and Purification of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin against *Edwardsiella tarda*

Young-Dae Kim, Myung-Joo Oh, Tae-Sung Jung\* and Sung-Ju Jung†

Department of Aqualife medicine, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

\*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

The present study compared purification methods of hen egg yolk immunoglobulin (IgY) from the hen immunized with *Edwardsiella tarda*. The purification of anti-*E. tarda* IgY was performed by four different methods, polyethylene glycol (PEG), chloroform polyethylene glycol (Chloroform-PEG), ammonium sulfate and purification kit. Purified IgY had heavy chain of 64 kDa and light chain of 27 kDa size. IgY purified from the hen immunized with *E. tarda* showed higher ELISA values and agglutination titers than those with IgY purified from the non-immunized hen as a negative control. In addition, purified IgY recognized similar *E. tarda* proteins to those with anti-*E. tarda* rabbit serum by western blotting. Purified IgY had an agglutination titer of 1:512 by PEG method and ammonium sulfate method, and 1:128 by chloroform-PEG method and purification kit. Moreover, PEG method was the most rapid method among the four different IgY purification methods. These results indicate that PEG method is effective purification method maintaining biological activity of the IgY.

**Key words :** *Edwardsiella tarda*, IgY, Purification method, Recognized antigen, Agglutination

*E. tarda*는 전 세계적으로 다양하게 양식되는 해산어류와 담수어류에서 에드워드병을 유발하는 원인균으로 (Kusuda *et al.*, 1993), 우리나라의 주요 양식어종인 뱀장어와 넙치에서 그 피해가 연중 발생하고 있다. 에드워드병에 걸린 뱀장어는 지느러미와 복부가 붉게 변하고 신장, 간, 비장과 심장에 농양과 궤양 병소가 형성되는 특징을 보인다. 넙치의 경우 체색흑화, 복부팽만, 탈장 등의 증상이 나타나며, 종묘 생산장에서부터 양성장애 이르기까지 거의 모든 크기의 연령군에 감염된다. 이 질병은 항생제와 화학요법제의 처리로 치료되고 있지만 내성균의 출현으로 그 문제점이 커지고 있다 (Aoki *et al.*, 1977). 또한

다양한 백신에 대한 몇몇 연구는 성공을 거두었지만 실용적 가치가 낮았기 때문에 에드워드병에 대한 효과적인 치료 방법은 여전히 요구되고 있다.

세균으로 면역된 닭은 세균에 대한 특이 항체를 생산하게 되고 이 항체는 산란중인 닭의 혈액으로부터 많은 양이 난황으로 활발하게 전이된다. 한 개의 계란 난황은 200 mg 이상의 면역 글로블린을 포함하며 (Jensenius *et al.*, 1981), 산란중인 닭은 같은 기간동안 토끼의 항체보다 더 많은 난황 항체를 생산하고 (Rose *et al.*, 1974) 사육에 드는 비용도 닭이 더 저렴하다 (Polson *et al.*, 1980). 또한, 한 마리의 산란계에서 1개월 당

†Corresponding Author : Sung-Ju Jung, Tel : 061-659-3175,  
Fax : 061-659-3175, E-mail : sungju@yosu.ac.kr

약 500 mL의 토끼 항혈청에 상당하는 계란난황 항체 (IgY)가 얻어진다 (Jensenius *et al.*, 1981). 그러므로 난황 항체는 특이 항체를 대량으로 생산하는 저렴한 방법일 것이다.

이러한 IgY는 수동면역의 형태로 질병의 치료와 예방에 이용되고 있다. 이 항체는 사람의 설사를 유발하는 rotavirus (Yolken *et al.*, 1988), 위염과 위궤양의 원인이 되는 *Helicobacter pylori* (Shin *et al.*, 2002), 토끼 (O'Farrelly *et al.*, 1992)와 돼지에서 *Escherichia coli* 감염 (Hoblet *et al.*, 1986; Yokoyama *et al.*, 1992; Imberechts *et al.*, 1997)등 인간과 가축병의 치료제로서 효과를 나타내었다. 또한, 뱀장어에서 *E. tarda* (Gutierrez *et al.*, 1993; Hatta *et al.*, 1993)와 무지개송어에서 *Yersinia ruckeri* (Lee *et al.*, 2000)에 대한 IgY의 경구투여를 실시하였으며, 모두 병원 세균에 대

한 수동면역 효과를 나타내었다. 이러한 연구들은 IgY가 어병 세균에 대한 대책으로도 사용될 수 있다는 가능성을 시사해주고 있다.

IgY를 어류질병에 응용을 위해서는 병원체에 대해 항체의 높은 활성을 유지한 항체를 대량으로 정제할 수 있는 방법의 검토가 필요하다. 그러므로 본 연구에서는 *E. tarda*에 대한 IgY를 생산하고 몇 가지 분리방법을 통해 효과적으로 항체를 정제하고자 하였다. 또한, 정제된 항체 단백질의 특성을 연구하여, 이 항체의 넉치 에드워드병 예방에 대한 가능성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

*E. tarda*는 1987년에서 2002년까지 여수, 하동,

**Table 1.** Origins of *Edwardsiella tarda* strains isolated from various fishes, and agglutination titers against anti-*E. tarda* YSF-9805 rabbit serum

No	Strain	Titer	Date	Host	Location
1	YSF-8705	1024	1987. May	Flounder	Yosu
2	YSF-9805	1024	1998. May	Flounder	Yosu
3	HH-1	512	2000. Aug.	Flounder	Hadong
4	F001109	1024	2000. Oct.	Flounder	Wando
5	F010418	1024	2001. Apr.	Flounder	Wando
6	C010329-kd1	16	2001. Apr.	Rockfish	Wando
7	ESSS00101	1024	2000. Oct.	Puffer	Tongyoung
8	ESSK00101	1024	2000. Oct.	Eel	Sunchun
9	E001227-F	1024	2000. Dec.	Eel	Goksung
10	E001227	256	2000. Dec.	Eel	Goksung
11	ESSS00101	512	2001. Jan.	Eel	Sunchun
12	E010126-F	512	2001. Jan.	Eel	Sunchun
13	E010221	- <sup>a)</sup>	2001. Feb.	Eel	Sunchun
14	E010320-F2	-	2001. Mar.	Eel	Sunchun
15	E010813	-	2002. Jan.	Eel	Youngkwang
16	E020113	-	2002. Jan.	Eel	Youngkwang
17	E020202	1024	2002. Feb.	Eel	Youngkwang
18	E020202L	512	2002. Feb.	Eel	Youngkwang

<sup>a)</sup>agglutination titers below 10.

완도, 순천, 곡성, 영광에서 양식되고 있던 넙치, 조피볼락, 복어와 뱀장어에서 분리된 18 strain을 준비하였다 (Table 1). 모든 균주에 대해 anti-*E. tarda* YSF-9805 토끼 혈청으로 응집항체를 평가하였으며, 넙치에서 분리된 YSF-8705, YSF-9805, HH-1, F001109와 F010418는 API20E kit (BioMerieux sa, France)로 동정하였다.

### Formalin-killed cell (FKC)의 제작

*E. tarda* YSF-8705는 Brain heart infusion broth (Difco, USA)로 25°C에서 20시간 동안 배양하였다. 배양액은 24시간 동안 0.3% 포르말린으로 불활화하였고 원심분리하여 수집하였다 (10000 ×g, 10분). *E. tarda* formalin-killed cell (FKC)은 생리식염수 (0.12M phosphate, 0.04M NaCl, pH7.2)로 3번 수세한 후 균은 -80°C에 저장하였다.

### 면역

닭은 양계장에서 직접 사육되고 있는 30주된 Hyline종을 선택하여 2주 간격으로 총 5회 다리에 근육 주사하여 면역하였다. 1차 면역은 0.5 mL의 *E. tarda* FKC ( $1 \times 10^9$  cell/mL)와 같은 양의 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA)를 유화하여 닭 2마리에 각각 1 mL씩 접종하였다. 추가 접종은 FKC와 Freund's incomplete adjuvant를 유화하여 2주 간격으로 3회 접종하였으며 마지막 5차 접종은 *E. tarda* FKC을 같은 양의 생리식염수와 희석하여 1 mL씩 접종하였다. 계란은 3차 면역 후 다음날부터 매일 수집하여 날짜를 기록한 후 4°C에 보관하였다.

토끼 (New Zealand White, 암컷, 2kg) 면역은 0.5 mL의 *E. tarda* YSF-9805 FKC ( $1 \times 10^9$  cell/mL)를 같은 양의 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA)를 유화하여 2마리의 토끼에 피하주사 하였다. 추가 접종은 Freund's incomplete adjuvant (Sigma, USA)로 유화하여 첫 번째 면역과 같은 방법으로 접종하였고, 마지막 접종은  $1 \times$

$10^9$  cell/mL의 FKC 0.5 mL에 0.5 mL의 생리식염수를 더하여 1 mL씩 피하 주사하였다. 접종은 2주 간격으로 실시하였으며, 마지막 접종 후 4일째에 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다.

### IgY의 정제

마지막 면역 후 6일째에 얻어진 계란 3개의 난황 (42g)을 혼합하여 같은 양이 포함되도록 3개의 시험관에 나누었다. 3개의 샘플은 각각 polyethylene glycol법(PEG법), chloroform polyethylene glycol법 (Chloroform-PEG법), ammonium sulfate법을 이용하여 정제하였고, IgY 정제 kit (Promega, USA)를 이용한 정제는 같은 양의 난황으로 따로 실시하였다. 정제된 난황항체는 단백질 정량 kit (Sigma diagnostics, INC., USA)를 사용하여 정량하였다. PEG법은 한 개의 난황에서 118.5mg, chloroform-PEG법은 155mg, ammonium sulfate법은 115mg이 산출되었으며, 생리식염수로 적당히 희석하여 약 110mg/egg yolk로 맞춘 후 ELISA와 응집 실험에 이용하였다.

### Polyethylene glycol 법에 따른 분리와 정제

PEG법은 Polson *et al.* (1980)이 기술한 방법에 따라 실시하였다. 계란난황은 생리식염수와 1:3으로 희석하여 최종농도가 3.5%(w/v)가 되도록 PEG8000 (Sigma, USA)을 첨가한 후 원심분리 (10000 ×g, 10분, 4°C)하였다. 상층액은 지방층의 제거를 위해 거즈로 여과하였고 최종농도가 12%(w/v)가 되도록 PEG를 첨가하여 같은 방법으로 원심분리 하였다. 침전물은 생리식염수 5 mL에 재 부유시켰다.

### Chloroform-PEG 법에 따른 분리와 정제

Chloroform-PEG법은 Polson (1990)이 기술한 방법에 따라 실시하였다. 계란난황은 생리식염수와 1:3으로 희석한 후 같은 양의 chloroform (Sigma, USA)을 첨가하여 원심분리 (1000 ×g, 30분, 4°C)하였다. 상층액은 최종농도가

12%(w/v)가 되도록 PEG를 첨가한 후 실온에서 30분 동안 방치하고 같은 방법으로 원심분리하였다. 침전물은 생리식염수 5 mL에 재 부유시켜 -20°C에 저장하였다.

#### Ammonium sulfate 법에 따른 분리과 정제

Ammonium sulfate법은 Akita *et al.* (1992)가 기술한 방법에 따라 난황을 증류수와 1:6으로 희석한 후 원심분리 (10000×g, 25분, 실온)하였다. 상층액은 최종 농도가 19%(w/v)가 되도록 ammonium sulfate를 첨가하였고 실온에서 2시간 동안 방치한 후 같은 방법으로 원심분리하였다. 침전물은 생리식염수 5 mL에 재 부유시켜 -20°C에 저장하였다.

#### Kit 사용에 따른 분리과 정제

정제 kit는 Easy egg extract IgY precipitation kit (Promega, USA)를 사용하였으며, 그 protocol에 따라 실시하였다. 요약하면, 계란난황과 precipitation solution A를 1:3으로 희석하고 원심분리 (10000×g, 10분, 4°C)하였다. 상층액은 지방층의 제거를 위해서 거즈로 여과 한 후 precipitation B solution에 3:1로 희석하여 같은 방법으로 원심분리하였다. 침전물은 생리식염수 5 mL에 재 부유시켜 -20°C에 저장하였다.

#### 전기영동

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 10% acrylamide gel을 사용하여 Laemmli (1970)의 방법에 따라 실시하였다. 위에서 기술한 4가지 방법으로 난황 단백질을 정제한 다음 정제한 단백질을 10 µL와 5 µL씩 25mA에서 45분 동안 전기영동 하였다. 겔은 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma, USA)로 염색하였다.

#### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

항원 (YSF-8705, FKC,  $1 \times 10^6$  cell/mL)을 coat-

ing buffer (15mM sodium carbonate, 35mM sodium bicarbonate, 2.5mM sodium azide)에 100배 희석하여 96 well polystyrene plates에 각각 100 µL씩 분주하고 30분 동안 실온에서 배양하였다. 0.05% Tween20이 포함된 생리식염수 (PBS-Tween20)로 3분 동안 3번 수세하였고, 10%의 skim milk를 100 µL씩 넣어 20분 동안 실온에 배양하였다. PBS-Tween20으로 3분 동안 2번 수세하였다. 각각의 정제방법으로 정제한 anti-*E. tarda* IgY 50 µL를 2배씩 연속적으로 희석하였고, 실온에서 1시간동안 배양하였다. PBS-Tween20으로 3분 동안 3번 수세하였고 peroxidase conjugated anti-chicken 토끼혈청 (Sigma, USA)을 3000배 희석하여 각 well에 100 µL씩 분주하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. PBS-Tween20으로 3분 동안 3번 수세하였고 ELISA 발색액 (0.02M Citric acid, 0.05M Phosphate, 3.7mM O-phenylene diamine, 0.04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 각 well에 100 µL씩 분주하여 5분 동안 발색하였다. 각 well에 1M의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50 µL씩 넣은 후 ELISA plate reader (spectra max 340, molecular devices, USA)로 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 응집항체가

응집항체는 96wells에 생리식염수를 25 µL씩 넣고 계란 난황 한 개당 110mg의 IgY가 포함된 항체 25 µL를 well에 넣고 연속적으로 2배씩 희석한 후 *E. tarda* (FKC,  $1 \times 10^6$  cell/mL)를 각각의 well에 25 µL씩 넣었고 24시간동안 4°C에서 반응시킨 후 응집가를 평가하였다.

#### Western blot

*E. tarda* YSF-8705를 전기영동한 후 겔은 transblot 장치 (Pharmacia Biotech, USA)를 이용하여 45분 동안 70V로 nitrocellulose 막에 전이시켰다. 막은 10% skim milk로 20분 동안 처리하였고 PBS-Tween20으로 3번 수세하였다. 막은 anti-*E. tarda* IgY와 anti-*E. tarda* 토끼혈청에 각각

2시간동안 반응시켰고 PBS-Tween20으로 3번 수세하였다. anti-*E. tarda* IgY와 반응시킨 막은 peroxidase conjugated anti-chicken 토끼혈청을 2차 항체로 하여 1시간 동안 반응시켰고, 막은 PBS-Tween20으로 3번 수세하였고 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt/nitroblue tetrazolium chloride (Oxford biomedical research, INC.)을 기질로 하여 발색하였다. 한편, anti-*E. tarda* 토끼혈청으로 반응시킨 막은 AP20 kit(Oxford biomedical research, INC., USA)를 사용하여 발색시켰다.

### 결 과

#### 응집반응에 의한 실험균주 선택

난황항체 제작에 사용할 균주를 선택하기 위한 응집시험에서 넙치유래의 5균주, 복어유래의 1균주, 조피볼락 유래의 1균주와 뱀장어 유래의 11균주의 총 18균주 중 뱀장어 유래의 4균주를 제외한 14균주가 응집반응을 보였다 (Table 1). 응집반응을 나타낸 균주 중 넙치유래의 YSF-8705를 IgY 제작을 위해 선택하였다.

#### 균의 동정

넙치에서 분리된 YSF-8705, YSF-9805, HH-1, F001109와 F010418 균주는 API20E kit 시험에서 같은 성상을 나타내었으며 *E. tarda* (97.7%)로 동정되었다 (Table 2).

#### 전기영동

정제된 IgY는 64 kDa의 heavy chain과 27 kDa의 light chain을 가진 것을 확인하였다 (Fig. 1). 이는 PEG법 (Fig. 1A), chloroform-PEG법 (Fig. 1B), ammonium sulfate법 (Fig. 1C) 그리고 정제 kit를 사용한 정제법 모두에서 같은 결과를 나타내었다. 그러나 ammonium sulfate법의 경우는 38 kDa의  $\beta$ -livetini가 진하게 검출되었다.

**Table 2.** Identification of *E. tarda* isolated from olive flounder by API20E kit

characteristics	standard profile of <i>E. tarda</i>	five flounder strains
ONPG <sup>1)</sup>	-	-
ADH <sup>2)</sup>	-	-
LDC <sup>3)</sup>	+	+
ODC <sup>4)</sup>	+	+
CIT <sup>5)</sup>	-	+
H <sub>2</sub> S <sup>6)</sup>	+	+
URE <sup>7)</sup>	-	-
TDA <sup>8)</sup>	-	+
IND <sup>9)</sup>	+	+
VP <sup>10)</sup>	-	-
GEL <sup>11)</sup>	-	-
GLU <sup>12)</sup>	+	+
MAN <sup>13)</sup>	-	-
INO <sup>14)</sup>	-	-
SOR <sup>15)</sup>	-	-
RHA <sup>16)</sup>	-	-
SAC <sup>17)</sup>	-	-
MEL <sup>18)</sup>	-	-
AMY <sup>19)</sup>	-	-
ARA <sup>20)</sup>	-	-
OX <sup>21)</sup>	-	-
NO <sub>2</sub> <sup>22)</sup>	+	+
N <sub>2</sub> <sup>23)</sup>	-	-
MOB <sup>24)</sup>	+	+
McC <sup>25)</sup>	+	+
OF-O <sup>26)</sup>	+	+
OF-F <sup>27)</sup>	+	+

1) $\beta$ -galactosidase, 2)arginine dihydrolase, 3)lysine decarboxylase, 4)ornithine decarboxylase, 5)citrate utilization, 6)H<sub>2</sub>S production, 7)urease production, 8)tryptophan deaminase, 9)indole production, 10)Voges Proskauer reaction, 11)gelatin hydrolysis, 12)acid from glucose, 13)acid from mannitol, 14)acid from inositol, 15)acid from sorbitol, 16)acid from rhamnose, 17)acid from sucrose, 18)acid from melibiose, 19)acid from amygdalin, 20)acid from arabinose, 21)oxidase production, 22)NO<sub>2</sub> production, 23)reduction to N<sub>2</sub> gas, 24)motility, 25)grow to MacConkey medium, 26)fermentation of glucose, 27)oxidation of glucose. +and - correspond to >80% and <20% of positive results, respectively.

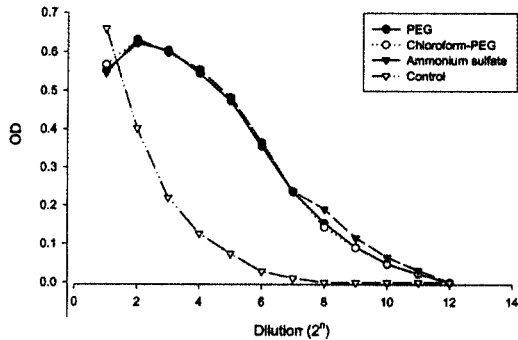


Fig. 2. ELISA value of egg-yolk antibody (IgY) by different purification methods.

### ELISA 항체가

면역되지 않은 계란에서 정제한 IgY에 비해 면역된 계란으로부터 얻은 IgY는 *E. tarda* YSF-8705에 대해 높은 항체를 나타내었다 (Fig. 2). 그러나 정제방법에 따른 차이는 확인할 수 없었다.

### 응집항체가

Table 3은 4가지 다른 방법으로 정제된 IgY의 응집항체를 보여주고 있다. PEG법과 ammonium sulfate법에 의해 정제된 IgY는 1:512로 같은

Table 3. Agglutination titers of *E. tarda* YSF-8705 strain against anti-*E. tarda* YSF-8705 IgY purified with 4 different methods

Purification assay	Agglutination titer	control <sup>a)</sup>
PEG	512	<16
Chloroform-PEG	128	- <sup>b)</sup>
Ammonium sulfate	512	-
Purification Kit	128	-

<sup>a)</sup>IgY obtained from non-immunized egg yolk,

<sup>b)</sup>not tested.

응집항체를 보였으며, 정제 kit와 chloroform-PEG법에 의해 정제된 IgY는 1:128을 나타내었다. 비록 응집항체에서의 차이가 확연하게 나타나지는 않았으나 응집 정도에 있어서 chloroform-PEG법은 다른 분리법에 비해 1:32의 희석 배수부터 매우 약한 응집을 나타내었다. 면역되지 않은 계란에서 정제한 항체는 그 항체가 16을 넘지 않았다.

### Western blot

PEG법에 의해 정제된 IgY를 선택하여 항원

의 인식부위에 있어서 토끼항체와의 비교를 위해 western blot을 실시하였다. *E. tarda* YSF-8705를 전기영동한 결과 다양한 band를 확인할 수 있었으며 (Fig. 3A), 정제된 IgY는 토끼 항체와 유사한 항원 단백질을 인식하였다 (Fig. 3B). 특히, 60 kDa과 *E. tarda*의 주요 외막 단백질인 37 kDa을 강하게 인식하였다.

## 고 찰

IgY는 낮은 분자량을 가지는 조류의 혈청 면역글로블린으로 포유동물의 IgG와 유사하지만 기능적인 형태에서는 많은 차이를 보이고 있다고 보고되고 있다 (Larsson *et al.*, 1993). 이 보고에 따르면 IgY 항체에 의한 면역복합체는 보체를 활성화 시키지 않기 때문에 면역 치료에 보다 안정적인 물질이다. 이러한 근거를 바탕으로 계란난황의 IgY는 포유동물에서 수동면역의 형태로 장을 경유하여 발생하는 세균성 질병이나 바이러스성 질병의 치료제로서 많은 연구가 되고 있다.

*E. tarda*는 몇몇 어종을 포함하는 다양한 동물에 대해 병원성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 (Austin *et al.*, 1993), 특히 담수어류인 뱀장어 (Hoshina, 1962; Wakabayashi *et al.*, 1973a, b)와 해산어류인 넙치 (Yasunaga *et al.*, 1982; Nakatsugawa, 1983; Kodama *et al.*, 1987)에서 경제적 손실의 원인 병원체이다. Park *et al.* (1983)과 Minagawa *et al.* (1983)은 건강한 뱀장어와 그 환경수에서 분리된 *E. tarda* 균주 중에 몇몇 다른 혈청형이 있다는 것을 보고하였으며, 이 균주들에는 독성이 없거나 약한 것들도 포함되었다. 반면에 Mamnur Rashid *et al.* (1994)과 Kanai *et al.* (1988)은 넙치와 그 환경수에서 분리된 *E. tarda*는 혈청학적, 병인학적 특징이 같은 균주라고 보고하였다. 또한, Mamnur Rashid *et al.* (1994)은 다른 지역의 질병에 걸린 넙치에서 *E. tarda* 28 균주를 분리하였으며, 모든 strain은 토끼 항체에 대한 응집 항체가가 320-1280으로 뱀장어

에서 독성을 나타내는 type A와 동일하다는 것을 보고하였다. 이는 *E. tarda*의 하나의 serotype만이 양식 넙치에 에드워드병을 일으킨다는 것을 나타낸다. 본 연구에서 사용된 넙치 유래의 *E. tarda*는 모두 512이상의 응집항체를 나타내었으며, 넙치 유래의 균주들은 모두 동일한 혈청형에 속하고, 이 혈청형이 우리나라에 보편적으로 분포하고 있는 것으로 생각되었다. 본 연구에서는 그중 YSF-8705를 선택하여 실험에 사용하였다.

본 연구에서 정제 kit를 제외한 3가지 정제법은 모두 유사한 양의 난황단백질을 회수하였으며 응집항체가 역시 유사하게 나타났다. 그러나 chloroform-PEG법은 비록 응집항체가가 128을 나타내었으나 응집정도에 있어서 다른 분리법에 비해 매우 약한 반응을 나타내었다. Polson (1990)의 보고에 따르면 PEG법에 비해 chloroform-PEG법은 IgY의 정제에 있어서 약 2배 이상의 응집항체가와 회수율을 가진다고 기술하였다. 이는 본 연구에서의 결과와 많은 차이를 나타내고 있으나, 항체의 정제 과정은 온도나 시간 등의 많은 환경적인 요소, 면역된 닭의 종류, 면역방법과 면역성 등에 따라 다양한 결과가 나타날 수 있다는 것을 고려하여야 한다. 또한, chloroform에 의한 IgY의 변성 역시 배제할 수 없는 원인으로 사료된다.

Akita *et al.* (1992)은 계란난황과 증류수 (pH5.0)를 1:6으로 희석하여 최소 2시간 이상 반응시켜 얻어진 수용액층에서 93~96%를 회수하였으며, 염침전, 한외여과와 알코올 침전 이후 최종적으로 겔 여과를 실시하여 IgY를 얻었다. 본 연구에서는 이 방법들 가운데 ammonium sulfate를 이용한 염침전법을 실시하였다. Ammonium sulfate법은 비록 PEG법과 유사한 응집항체가를 나타내었지만, 비교적 오랜 정제시간을 요구하였으며, 정제 후 많은 황색색소가 포함되어 있었다. 또한 SDS-PAGE의 결과 PEG법과 chloroform-PEG법에서는 보이지 않던 38 kDa의 단백질이 진하게 검출되어 순도에 있어서도 다

른 정제법보다도 떨어지는 것을 알 수 있었다. 이 38 kDa의 단백질은  $\beta$ -livetin으로 난황의 수용액층에 존재하는  $\alpha_2$ -glycoprotein 성분이다 (Hatta *et al.*, 1990).

Deignan *et al.* (2000)은 현재의 연구와 유사하게 IgY의 정제를 위해 3가지 다른 침전법 즉, sodium sulphate 침전법, ammonium sulphate 침전법과 12% PEG 침전법을 비교 분석하였다. 이 보고에 따르면 12% PEG에 의한 침전법이 다른 방법에 비해 가장 많은 단백질을 산출하였으며, 이는 현재의 연구와 유사한 결과를 나타낸 것으로서 PEG법이 IgY를 빠르고 깨끗하게 정제할 수 있을 뿐만 아니라 비용에 있어서도 저렴하고 편리한 방법임을 증명하고 있다.

이전에 실시된 계란난황항체의 수동면역을 통한 어류 적용 연구는 뱀장어의 *E. tarda* (Gutierrez *et al.*, 1993), 무지개송어의 *Y. ruckeri* (Lee *et al.*, 2000)에서 보고되었다. Gutierrez *et al.* (1993)의 보고에 따르면 정제된 IgY가 뱀장어의 소화액에 안정적이었으며, 경구로 공급된 400mg의 IgY는 약  $10^5$  CFU/fish로 접종된 *E. tarda*를 24 시간 안에 제거하였다. 또한 손상된 장을 경유하여 간과 신장으로 확산되는 *E. tarda*의 침투를 억제하여 폐사율을 감소시켰다. 이 연구에서 사용된 IgY의 농도는 0.93mg/mL였으며, 응집항체가는 1:128이었다. Lee *et al.* (2000)은 위산에 대한 안정성을 위해 IgY를 encapsulation하였으며 경구로 투여된 50mg의 IgY는  $10^6$  CFU/mL로 침지된 *Y. ruckeri*에 의한 폐사를 감소시켰다고 보고 하였으며 이때 IgY의 농도는 10mg/mL였으며, 응집항체가는 1:32였다. 수동 면역에 의한 어류 질병의 치료에 있어서 항체의 응집항체가는 중요하게 작용될 수 있다. 본 연구에서 정제된 22mg/mL의 IgY는 그 응집가가 512로 이전의 보고에서(Gutierrez *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2000)보다 높았다. 그러므로 본 연구에서 정제된 IgY는 넙치의 에드워드병에 대한 수동면역 연구에 있어서 보다 효과적인 결과를 보일 것으로 예상된다. 현재는 IgY를 이용한 넙치의 에드워드병

의 예방효과를 연구하고 있으며, encapsulation 등의 IgY의 효과를 증가시키는 방법을 검토중이다.

## 요 약

*Edwardsiella tarda*로 면역한 닭의 난황항체(IgY) 정제 방법을 비교하였다. Anti-*E. tarda* IgY의 정제는 PEG법, chloroform-PEG법, ammonium sulfate법과 정제 kit를 사용한 4가지 다른 방법으로 실시하였다. 정제된 IgY는 64 kDa의 heavy chain과 27 kDa의 light chain을 나타내었다. *E. tarda*로 면역된 IgY는 면역되지 않은 대조 IgY 보다 높은 ELISA가와 응집항체가를 나타내었으며, 정제된 IgY는 western blotting에서 anti-*E. tarda* 토끼혈청과 유사한 *E. tarda* 단백질을 인식하였다. PEG법과 ammonium sulfate법에 의해 정제된 IgY는 응집항체가가 1:512, chloroform-PEG법과 정제 kit에 의해 정제된 IgY는 1:128을 나타내었으며, PEG법이 IgY를 정제하기 위한 가장 빠른 방법이었다. 이 연구의 결과로 PEG법이 IgY의 생물학적 활성을 유지함과 더불어 신속하고 효과적인 정제방법임을 알 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 한국학술진흥재단 연구비 (KRF 2001-041-H00007)에 의하여 지원되었음

## 참 고 문 헌

- Akita, E.M. and Nakai, S. : Immunoglobulins from egg yolk : isolation and purification. *J. Food Sci.*, 57 : 629-633, 1992.
- Aoki, T., Arai, T. and Egusa, S. : Detection of R plasmids in naturally occurring fish pathogenic bacteria, *Edwardsiella tarda*. *Microbiol. Immunol.*, 21 : 77-83, 1977.
- Austin, B. and Austin D.A. : Enterobacteriaceae



- representatives. In "Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish", 2nd ed., Ellis Horwood Ltd., Chichester, pp. 188-226, 1993.
- Deignan, T., Kelly, J., Alwan, A. and O'farrelly, C. : Comparative Analysis of methods of purification of egg yolk immunoglobulin. Food Agri. Immunol., 12 : 77-85, 2000.
- Gutierrez, M.A., Miyazaki, T., Hatta, H. and Kim, M. : Protective properties of egg yolk IgY containing anti-*Edwardsiella tarda* antibody against paracolo disease in the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. J. Fish Dis., 16 : 113-122, 1993.
- Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. : A novel isolation method for hen egg yolk antibody, 'IgY'. Agri. Biol. Chem., 54 : 2531-2535, 1990.
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., Yamamoto, T. and Ebina, T. : Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzyme. Biosci., Biotechnol., Biochem., 57 : 1077-1081, 1993.
- Hoblet, K.H., Kohler, E.M., Saif, L.J., Theil, K.W. and Ingalls, W.L. : Study of porcine post-weaning diarrhea involving K88(-) hemolytic *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res., 47 : 1910-1912, 1986.
- Hoshina, T. : Studies on red disease of eels. J. Tokyo Univ. Fish., Spec. Rep., 6 : 1-104, 1962. (In Japanese)
- Imberechts, H., Deprez, P., Van Driessche, E. and Pohl, P. : Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E.coli* by experimentally infected pigs. Vet. microbiol., 54 : 329-41, 1997.
- Jensenius, J.C., Andersen, I., Hau, J., Crone, M. and Koch, C. : Egg:conveniently packaged antibodies, methods for purification of yolk IgG. J. Immunol. Methods, 46 : 63-68, 1981.
- Kanai, K., Tawaki, S. and Uchida, Y. : An ecological study of *Edwardsiella tarda* in flounder farm. Fish Pathol., 23 : 41-47. 1988.
- Kodama, H., Murai, T., Nakanishi, Y., Yamamoto, F., Mikami, T. and Izawa, H. : Bacterial infection which produces high mortality in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Hokkaido. Jpn. J. Vet. Res., 35 : 227-234, 1987.
- Kusuda, R. and Salati, F. : Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. Ann. Rev. Fish Dis., 3 : 69-85, 1993.
- Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227 : 680-685, 1970.
- Larsson, A., Barlöw, R.M., Lindahl, T.L. and Forsberg, P.O. : Chicken IgG: utilizing the evolutionary advantage. Poultry Science, 72 : 1807-1812, 1993.
- Lee, S.B., Yoshinori M. and Roselynn, M.W. : Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. J. Agri. Food Chem., 48 : 110-115, 2000.
- Mamnur Rashid, M., Mekuchi, T., Nakai, T. and Muroga, K. : A serological study on *Edwardsiella tarda* strains isolated from diseased Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Pathol., 29 : 227, 1994.
- Minagawa, T., Nakai, T. and Muroga, K. : *Edwardsiella tarda* in eel culture environment. Fish Pathol., 17 : 243-250, 1983.
- Nakatsugawa, T. : *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. Fish Pathol., 18 : 99-101, 1983.

- O'Farrelly, C., Branton, D. and Wanke, C.A. : Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. *Infect. Immun.*, 60 : 2593-2597, 1992.
- Park, S.I., Wakabayashi, H. and Watanabe, Y. : Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. *Fish Pathol.*, 18 : 85-89, 1983.
- Polson, A., Von Wechmar, M.B. and Van Regenmortel, M.V.H. : Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Invest.*, 9 : 475-493, 1980.
- Polson, A. : Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest.*, 19 : 253-258, 1990.
- Rose, M.E., Orlans, E. and Buttress, N. : Immunoglobulin classes in hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.*, 4 : 521-523, 1974.
- Shin, J.H., Yang M.R., Nam, S.W., Kim, J.T., Myung, N.H., Bang, W.G. and Roe, I.H. : Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9 : 1061-1066, 2002.
- Wakabayashi, H. and Egusa, S. : Seasonal changes of bacterial infections among pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Fish Pathol.*, 8 : 91-97, 1973a.
- Wakabayashi, H. and Egusa, S. : *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum Anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 39 : 931-936, 1973b.
- Yasunaga, N., Ogawa, S. and Hatai, K. : Characteristics of the fish pathogen *Edwardsiella* isolated from several species of cultured marine fishes. *Bull. Nagasaki Prefect. Ins. Fish.*, 8 : 57-65, 1982. (In Japanese)
- Yolken, R.H., Leister, Wee S.B., Miskuff, R. and Vonderiecht, S. : Antibodies to rotaviruses in chickens eggs: a potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics*, 81 : 291-295, 1988.
- Yokoyama, H., Peralta, R.C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori Y. and Kodama, Y. : Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect. Immun.*, 60 : 998-1007, 1992.

---

Manuscript Received : December 19, 2003

Revision Accepted : February 15, 2004

Responsible Editorial Member : Joon-Ki Chung  
(Pukyong Univ.)