

FPLC 에 의한 *Staphylococcal* Enterotoxin A 와 C 의 동시분리

이정희 · 김종배 · 신현길
건국대학교 축산가공학과

Simultaneous Purification of Enterotoxin A and C by Fast Protein Liquid Chromatography

Jung-Hee Lee, Jong-Bae Kim and Heuyn-Kil Shin
Department of Animal Product Science, Konkuk University, Seoul

Abstract

A new method developed for simultaneous purification of enterotoxin A and C from *Staphylococcus aureus* strain L 350/1 consisted of chromatography on carboxymethyl (CM)-cellulose using a buffer of variable pH, gel filtration on Ultro gel, and fast protein liquid chromatography(FPLC) using a buffer of variable pH. The enterotoxin A and C were purified by three steps: batchwise adsorption from culture supernatant on Amberlite CG-50; chromatography on CM-cellulose using a buffer of constant pH and molarity; and gel filtration on Sephadex G-75. The purified enterotoxin appeared homogeneous by gel diffusion and polyacrylamide gel electrophoresis. Upon treatment with CM-cellulose using an elution of variable pH, enterotoxin A and C were so close that they were not separated completely. After elution from gels, the enterotoxins appeared as a single peak at the same position. Gel filtration gave a reaction of complete identity to enterotoxin A and C in Ouchterlony immunodiffusion. In FPLC using a CM-cellulose, enterotoxin A and C were simultaneously separated at pH 8.6 and 6.8. When each fraction was performed to gel immunodiffusion, at peak of enterotoxin A and C were not detected each other. In a method of elution by pH-gradient was to be more efficient as a simultaneous separation method in terms of speed, yields and simplicity. The purified toxin A and C were identical to type A and C reference enterotoxin on both disc electrophoresis and Ouchterlony gel diffusion.

Key words: enterotoxin, simultaneous purification, fast protein liquid chromatography

서 론

*Staphylococcus aureus*로부터 생성되는 enterotoxin은 현재 알려진 종류만도 A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, 그리고 F 등 8가지에 이르며, 이 외에도 더 많은 toxin의 type이 존재하리라 본다⁽¹⁾. 이 중에서 한 균주로부터 두 종류의 각기 다른 toxin의 type을 동시에 생성하는 것도 있다⁽²⁻⁴⁾. 한 균주로부터 동시에 생성되는 toxin은 대부분 toxin A와 C를 생성하는데 아직 2종류 이상을 생성하는 균주는 알려져 있지 않다^(5,6).

*Staphylococcus aureus*의 생성물인 toxin A는 enterotoxin 중 가장 독성이 강하며(ED₅₀=0.01~0.1 μg/Kg), 식품내에서 많이 생성되어 식중독의 원인이

된다⁽⁵⁾. Toxin C는 독성에 있어서는 toxin A에 비해 다소 약하나 역시 식품에서 흔히 생성되는 종류이다⁽⁷⁾. 그러나 이 두 종류의 toxin은 면역학적 반응 및 화학적 특징, 즉, 분자량, isoelectric point(pI), 아미노산 배열등이 완전히 다르나 열에 대하여는 두 종류 모두 내성이 있어 가열처리 후에도 그 독성을 쉽게 잃지 않는다^(3,5,8).

최근 toxin에 대한 항체와 toxin 사이의 면역학적 교차반응을 실험하는 과정에서 정제도 97% 이상의 순수한 toxin이 diffusion test 시 enterotoxin A와 C의 항체 모두에 precipitation band를 형성한다는 사실이 밝혀짐으로서 *Staphylococcus aureus* 균주중에 두 종류의 toxin을 동시에 생성하는 균주가 있다는 것이 알려졌다^(9,10). 이 두 종류의 혼합된 toxin은 분리·정제시 각각으로 분리되지 않으며, 현재까지 이 두 종류의 toxin을 동시에 분리해낸 연구는 없다^(9,11).

따라서 본 연구는 한 균주로부터 동시에 생성되는 두

Corresponding author: Heuyn-Kil Shin, Department of animal products science, Konkuk University, 93-1 Mojin-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-701

종류의 toxin을 동시에 분리·정제함으로써 이러한 균주와 toxin의 생성기작에 관한 연구에 기초자료를 얻기 위하여 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

균주

Enterotoxin A와 C를 동시에 생성하는 균주는 독일 연방정부 육연연구소로부터 공급받은 *Staphylococcus aureus* L350/1을 사용하였다.

Toxin 생산배지 및 조건

Toxin 생산을 위하여 사용한 배지는 3% protein hydrolysate powder(Mead Johnson, Norway), 3% NZ-amine(type NAK, Sheffield Co, U.S.A.), 0.0005% thiamine과 0.001% niacin을 혼합하여 제조하였고 pH는 7.0으로 조절하였다⁽¹²⁾. 균 접종후 rotary shaker(TGRI-D Iwashiyama bio-Sci Co., Japan)에서 235rpm으로 37°C에서 24시간 진탕 배양하였다.

Toxin의 분리를 위한 시료 전처리과정 및 정제과정

Toxin의 분리를 위한 시료의 전처리 과정은 그림 1과 같다. 90% 이상의 순수한 toxin을 정제하기 위하여 이온교환수지와 gel filtration을 실시하였다⁽⁶⁻⁸⁾.

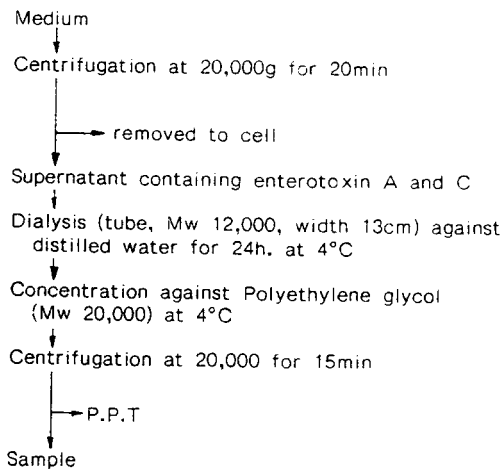


Fig. 1. Schematic diagram showing the preparation of enterotoxin A and C from medium.

배지로부터 toxin A와 C를 간편하고 빠르게 분리하기 위하여 농축액에 0.05M phosphate buffer(이하 PB, pH 6.4)를 2배로 희석하고 H_3PO_4 로서 pH를 6.4로 조정후 1M HCl, 증류수, 1M NaOH로 활성화시킨 amberlite 수지와 혼합, 1시간 교반하였으며 10분간 정제후 상등액을 버리고 남은 수지를 증류수로서 2~3번 수세한 후 0.5M phosphate buffered saline(PBS), pH 6.8을 첨가하여 10분간 교반하고 상등액을 취하여 50ml로 투석·농축하였다⁽¹³⁾.

이 농축액을 H_3PO_4 로서 pH 5.7로 조정하고 0.01M PB로 평형화시킨 carboxymethyl(CM) 수지를 충전시킨 column(2.2×40cm)에 주입하였다. 농축액을 수지에 완전히 잠기게 하여 1시간 방치후 stepwise 용출법(0.01M-0.2M PB, pH 6.0)으로 용출하였으며 용출속도는 분당 2ml로 tube당 5ml씩 채집하여 280nm에서 흡광도를 측정하였고 이 toxin을 모아 3ml로 농축하였다.

Sephadex G-75는 0.01M PBS(pH 6.8)에 넣고 30분간 교반시킨 다음 4°C에서 48시간 수화하고 탈기시켜 column(2×100cm)에 충전하였다. CM-column에서 분리된 농축액을 0.01M PBS에 충분히 투석하고 3ml로 농축하여 column에 주입하였으며 용출속도는 시간당 12~15ml로 하였고 tube당 3ml씩 모아 흡광도를 측정하였다. Sephacryl S-300과 Ultro gel도 동일한 방법으로 처리, 사용하였다.

Carboxymethyl(CM)-cellulose와 Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC)에 의한 분리

CM-column의 전처리는 앞에 언급한 사항과 동일하며 용출은 pH-gradient 용출법(pH 5~10)을 사용하였다.

FPLC의 column은 gel-column(2×30cm, Glas Pac, 300 SW, LKB, Sweden)과 CM-column(2×10cm, LKB, Sweden)을 사용하였고 gel 용출 buffer는 0.1M PBS(pH 7.0), 그리고 CM-column의 용출 buffer는 toxin A와 C의 pI가 각각 6.8, 8.6이라는 점에 착안하여^(4,5) pH-gradient(pH 5~10)와 pH-stepwise법(pH 10, 8.6, 7.8, 7.2, 6.8, 5)으로 실시하였다.

항체생산을 위한 면역화주사

항체생산을 위한 방법은 전보⁽¹²⁾와 같다.

Toxin 판정을 위한 Immunodiffusion test

CM-column 과 FPLC 에 의해 분리된 소량의 toxin 을 판정하기 위하여 실시한 microslide gel diffusion test^(12,14,15)는 precoating 된 micro-slide 위에 1.2% agarose 를 부어서 제조하였고 항원과 항체를 분주하여 37°C의 incubator 에서 48시간 반응시켰으며 반응이 끝난후 남아있는 비반응 단백질을 제거한 후 염색하여 확인하였다.

결과 및 고찰

Amberlite CG-50과 CM-column 에 의한 분리물을 gel filtration 한 결과 모두 하나의 분획만을 보였다. 이중 가장 분리도가 우수한 Ultro gel 의 분획을 조사한 결과 약 97%의 정제도를 가진 toxin A 와 C 가 함께 분리되었다는 것이 확인되었다.

CM-column 과 FPLC(gel-column)에 의한 동시분리

CM-column 을 pH-gradient 용출법으로 용출했을 때의 분획 양상은 그림 2에 나타내었다. 그림에서와 같이 서로 겹치는 두개의 분획이 나타났지만, 두개의 분획이 거의 분리되지 않았다. 첫번째 분획을 조사한 결과 toxin A 가 많이 함유되어 있었으나 toxin C도 함유되어 있었고 toxin C의 분획인 두번째 분획도 다량의 toxin A 를

검출할 수 있었다.

따라서 이 CM-column 용출법으로는 일부는 상호분리가 가능하나 완전한 분리는 불가능 하였고 특히 toxin C는 전체 분획에 걸쳐 검출되었기 때문에 두번째 나타난 toxin C의 분획에서는 toxin의 손실이 심하였다. 이것은 enterotoxin 과 수지와와의 결합력이 지속적으로 가해지는 용출속도와 pH의 변화에 의해 약해짐으로서 용출되는 것으로 생각된다. 분리도를 좋게 하기 위하여 큰 column 을 사용할 수 있으나 이 실험에 이용된 column 보다 더 큰 column 을 사용할 경우 그림 2의 분획양상과 유사한 결과를 보여 주었는데 이것은 용출속도가 느려져 column 내에서 toxin의 확산을 초래하였기 때문인 것으로 생각된다. Ultro gel에서 분리되었던 toxin A와 C를 농축하여 시료로 사용한 FPLC(gel-column)의 결과는 그림 3과 같다. 그림 3중 A와 B는 각각 enterotoxin A와 C의 Standard 물질이고 C는 toxin A와 C가 혼합된 시료의 분획양상인데 모두 13분대에 나타났으며 toxin A와 C는 전혀 분리되지 않았음을 보여준다. 따라서 toxin A와 C를 상호 분리하기에는 이 실험에 사용된 column으로는 불가능 하였다. Immunodiffusion test 결과 13분대에 나타난 분획(C)에 toxin A와 C 모두 함유된 것으로 확인되었고, 뒤에 나타난 작은 분획은 불순물이다. FPLC의 gel column으로 toxin A와 C를 상호 분리하기 위해서는 이 실험에 사용된 column 보다 훨씬 큰 column 을 사용해야 만이 상호분리가 가능할 것으로 생각된다.

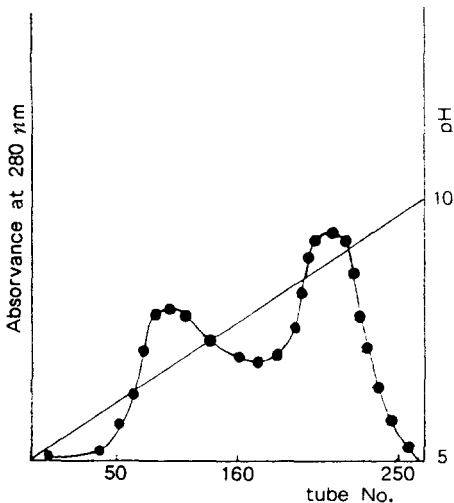


Fig. 2. CM-cellulose column chromatography of *Staphylococcal enterotoxin A* and C after purification on Sephadex G-75 and eluted by pH-gracient. The range of pH was 5-10.

FPLC(CM-column)에 의한 상호분리

Enterotoxin A의 pI는 6.8이며 C의 pI는 8.6이라는 점을 이용하여 pH-stepwise 와 pH-gradient 법으로 용출하였다.

그림 4는 CM-column 을 pH-gradient 법으로 용출했을 때의 분획양상을 보여준다. 첫번째 분획이 나타난 점은 pH가 8.6 부근이며 두번째 분획이 나타난 곳의 pH는 6.8이고 그전에 나타난 작은 분획들은 확인할 수 없는 불순물이다. Immunodiffusion test 결과 첫번째 분획이 toxin A이고 두번째 분획이 toxin C이며, toxin A의 분획에서는 전혀 C를 검출하지 못했고 마찬가지로 toxin C의 분획에서도 A를 검출하지 못하였으므로 이를 통해서 toxin A와 C가 완전히 분리되었음을 알 수 있었다.

그림 5는 CM-column 을 pH-stepwise 법으로 용출했을 때의 결과이다. A는 pH 10에서의 용출 결과인데

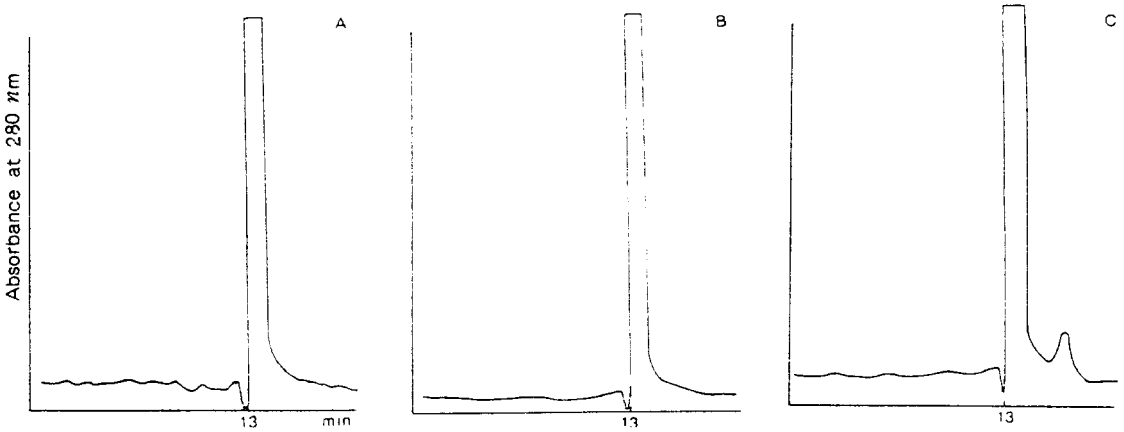


Fig. 3. Gel filtration of enterotoxin A and C on FPLC. A, standard as a enterotoxin A; B, standard as a enterotoxin C; C, with fractions containing of enterotoxin A and C. Flow rate was $1\text{ml}/\text{min}$ and chart speed was $5\text{mm}/\text{min}$. Injection volume was $100\mu\text{l}$.

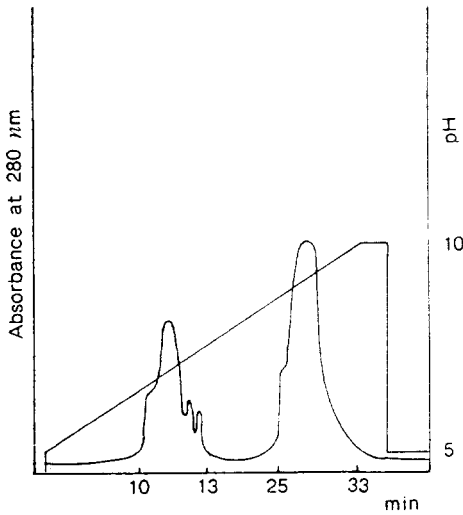


Fig. 4. CM-column chromatography of FPLC from enterotoxin A and C by elution with pH-gradient. Flow rate was $0.5\text{ml}/\text{min}$ and chart speed was $5\text{mm}/\text{min}$. pH range was 5-10.

거의 아무것도 용출되지 않았고 gradient 용출법에서 나타난 약간의 불순물이 용출되었으나 pH 8.6으로 용출시킨 B의 경우 pH 10에서 볼 수 없었던 커다란 분획이 나타났다. 그러나 pH가 떨어지면서 뒤의 분획이 커지기

시작하고(D), pH 6.8로 용출할 때 8분대에 나타난 분획은 최고점을 이루고 있다. pH가 5로 바뀐 F의 경우 pH 10에서와 같이 거의 아무런 분획도 나타나지 않았다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 pH 8.6으로 용출시킴으로써 나타난 4분대의 분획은 toxin C이며(B), pH 6.8로 용출시켜 8분대에 나타난 분획은 toxin A임을(E) 알 수 있다. 이것은 Immunodiffusion test 결과에 의해서도 확인되었다.

CM-column을 사용한 FPLC는 stepwise나 gradient의 어떤 용출법을 사용해도 toxin A와 C는 완전히 분리될 수 있었다.

요 약

본 실험은 *Staphylococcus aureus*의 한 균주로부터 A와 C, 두 종류의 toxin이 동시에 생성될 때 이들의 동시분리를 위하여 각종 분리방법을 연구하였다. 혼합된 toxin A와 C는 CM-column chromatography를 이용하여 pH-gradient법으로 용출했을 때 2개의 분획이 나타났으나 서로 완전히 분리되지 않아 다량의 서로 다른 toxin이 함유되어 있었고 Sephadex G-75, Sephacryl S-300, 그리고 ultro gel을 사용한 gel filtration에서는 하나의 분획을 나타내 상호분리가 불가능 하였으며 정제도와 분리도에서 가장 뛰어난 gel column을 이용한 FPLC도 toxin A와 C를 상호분리할 수 없었다. 그러

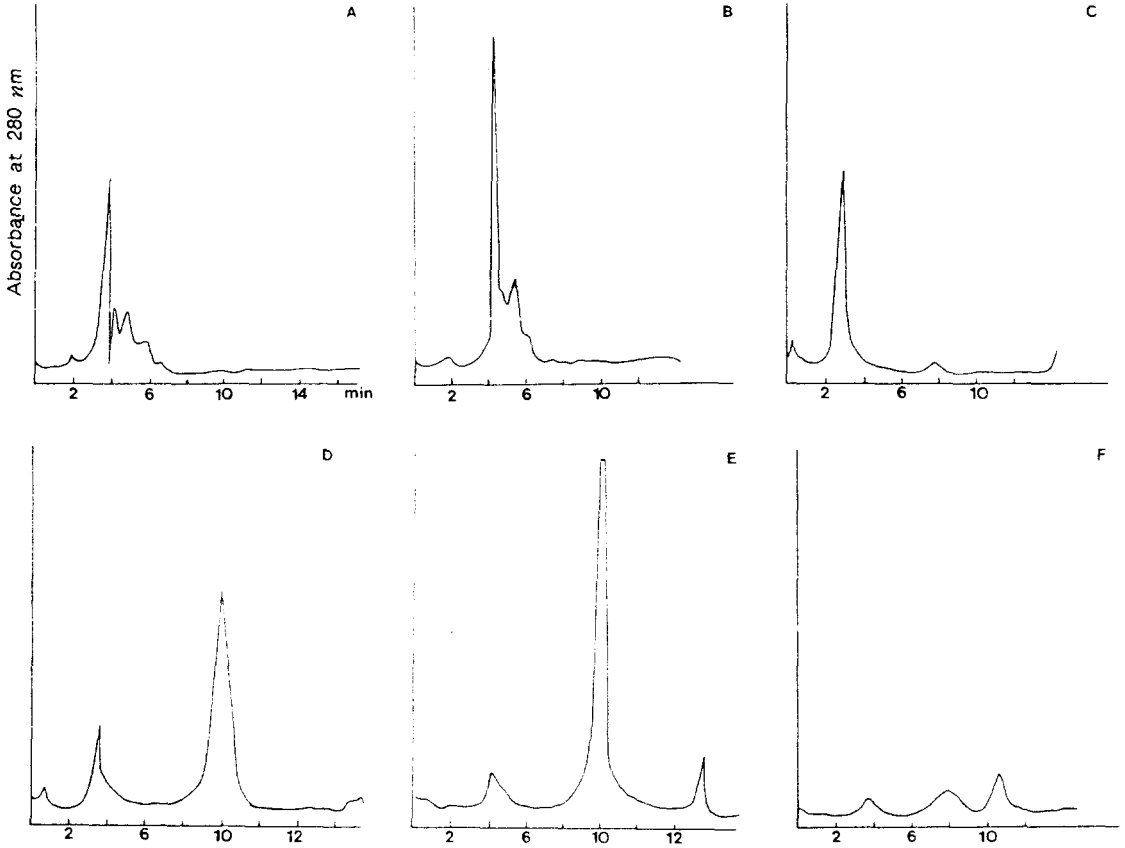


Fig. 5. Elution patterns of enterotoxin A and C by FPLC with CM-column and eluted by pH-sepwise. The pH were 10(A), 8.6(B), 7.8(C), 7.2(D), 6.8(E), and 5.0(F). Flow rate was 0.5ml/min and chart speed was 5mm/min. AUFS was 0.2/1.0

나 CM-column을 이용한 FPLC에서는 enterotoxin A는 pH 6.8에서 그리고 enterotoxin C는 pH 8.6에서 각각 분리되었으며, immunodiffusion test 결과 enterotoxin A의 분획에서는 toxin C가 전혀 검출되지 않았고 enterotoxin C의 분획에서도 toxin A가 검출되지 않았다. 용출방법에 있어서는 CM-column을 이용한 FPLC에서 pH-stepwise 법이나 pH-gradient 법으로 enterotoxin A와 C type을 쉽게 동시에 분리할 수 있었다.

문 헌

1. Bergdoll, M.S., Crass, B.A., Reiser, F.F. and Robbins,

R.N. : A new staphylococcal enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *staphylococcus aureus* isolates. *Lancet*, 1071(1981)
 2. Riemann, H., Lee, W.H. and Genigeorgis, C. : Control of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in semi-preserved meat products. *J. Milk Food Technol.*, 35, 514(1972)
 3. Minor, T.E. and Marth, E.H. : *Staphylococcus aureus* & staphylococcal food intoxications. a review. *J. Milk Food Technol.*, 35, 228(1972)
 4. Minor, T.E. and Marth, E.H. : *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. II. Enterotoxins and epidemiology. *J. Milk Food Technol.*, 35, 21(1972)

5. Bergdoll, M.S., Huang, I-Y. and Schantz, E.J. : Chemistry of enterotoxins. *J. Agr. Food Chem.*, **22**, 9(1974)
6. Melconian, A.K., Flandrois, J-P. and Fleurette, J. : Modified method for production and purification of SEB. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1140(1983)
7. Robern, H., Stavric, S. and Dickie, N. : The application of QAE-sephadex for the purification of two staphylococcal enterotoxins. 1. Purification of enterotoxin C₂. *Biochim. Biophys. Acta*, **393**, 134(1975)
8. Reiser, R.F., Robbins, R.N., KHOE, G.P. and Bergdoll, M.S. : Purification and some physicochemical properties of toxic shock toxin. *Biochemistry*, **22**, 3907(1983)
9. Chang, P-C. and Dickie, A. : Fractionation of SEB by IEF. *Biochem. Biophys. Acta*, **236**, 367(1970)
10. Noleto, A.L.S., Malburg, L.M. and Bergdoll M.S. : production of staphylococcal enterotoxin in mixed cultures. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2271(1987)
11. Tompson, N.E., Esperanza, G.L. and Bergdoll, M.S. : Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme linked immunosorbent assays and radioimmunoassays. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 865(1986)
12. 신현길·이정희·서선우 : Staphylococcal enterotoxin 의 생성조건, 건대 축산경영연구소 논문집, 제 12집 (1987)
13. Schantz, E.J., Roessler, W.G. and Woodburn, M.J. : Purification and some chemical and physical properties of SEA. *Biochemistry*, **11**, 360(1972)
14. Meyer, R.F. and Palmieri, M.J. : Single radial immunodiffusion method for screening staphylococcal isolates for enterotoxin. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 1080(1980)
15. Bennett, R.W. and Mc Clure, F. : Collaborative study of the serological identification of staphylococcal enterotoxins by the microslide gel double diffusion test. *J. A.O.A.C.*, **59**, 594(1976)

(1988년 9월 7일 접수)