

## Liposome을 이용한 *Vibrio vulnificus*가 생산하는 용혈독소의 항혈청 제조법

김 영 만

동의대학교 식품영양학과

### Preparation of Antiserum against Hemolysin from *Vibrio vulnificus* using Hemolysin-bound Liposomes

Young-Man Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea

#### Abstract

To investigate hemolysin from *Vibrio vulnificus* in terms of protein chemistry and immunochemistry, the simple method to produce antiserum was developed as follows : Crude hemolysin from *Vibrio vulnificus* was mixed with cholesterol-phosphatidylcholine-liposome. Only hemolysin with molecular weight of 50kD was selectively bound to the liposome. Thus, without purification of crude hemolysin, liposome bound hemolysin was used as antigen to produce antiserum by injecting into back muscle of a rabbit. Resultant antiserum reacted only with hemolysin. Hemolysin of *Vibrio vulnificus* from patients and environment was formed single band in gel diffusion precipitation reaction with antiserum.

**Key words :** *Vibrio vulnificus*, hemolysin, liposome, antiserum

#### 서 론

Blake 등<sup>1,2</sup>은 *Vibrio* 폐혈증이 경구와 상처 감염의 두 가지 경로가 있다고 하였으며 일반적으로 경구 감염일 때는 24시간 이내에 발병하며 피부 병변을 수반하는 폐혈증을 일으키는 경우가 많고 발병 환자의 대부분이 기초질환 보유자(특히 간질환)라고 하였으며 상처 감염 일때는 경구 감염보다 경증이라고 하였다. 우리나라에서 이 균에 의하여 사망한 환자는 간질환, 당뇨병 등 소모성 질환을 앓고 있거나 그런 병력을 가지고 있었으며 음주벽이 심한 사람들이었다<sup>2,3)</sup>. 생선회를 많이 섭취하는 우리나라에서 이 균의 생육에 적합한 여름철에는 식품위생상 충분히 주의를 하지 않으면 안된다. 이 균의 연구는 아직 초보 단계이기 때문에 임상의 마셔도 *Vibrio* 폐혈증에 대한 인식이 충분하지 않은 실정

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방 대학육성)과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음

이다. 이 균에 감염된 환자는 조기에 적절한 항생제를 투여하면 쉽게 치료되지만 치료가 늦어지면 치명율이 높게 되므로 조기 진단이 매우 중요하다. 이 균에 감염을 받은 사람이나 동물에서 용혈독소에 대한 항체가 가상승한다는 보고<sup>4)</sup>가 있고, 이 균은 전부 용혈독소를 생산하고 있기 때문에 이 용혈독소는 *Vibrio* 폐혈증 진단에 유력한 지표가 된다고 생각한다. 그러나 용혈독소는 정제하기가 무척 어렵기 때문에 연구에 많은 어려움이 있다. 그러므로 *V. vulnificus*가 생산하는 용혈독소를 완전히 정제하지 않고 용혈독소의 항혈청을 간편하게 만드는 방법을 개발하여 *Vibrio* 폐혈증의 신속한 진단과 효율적인 치료를 하는데 필요한 자료를 제공하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 사용 균주

환자와 자연 환경에서 분리된 *V. vulnificus* 30여종을 선정하여 용혈활성을 조사하고, 그 중 용혈활성이

가장 높은 균을 선정하여 환자분리균은 *V. vulnificus* P10(P10), 환경분리균은 *V. vulnificus* E20(E20)이라 칭하고, P10보다 E20이 용혈독소의 생산이 강하여 주로 E20을 실험에 사용하였다.

### 조용혈독소의 조제

배지는 10배 농도의 heart infusion broth(Difco, Co., U.S.A.)를 조제하여 4°C에서 8배의 이온교환수에 16시간 투석을 하고 투석 외액의 염분이 1%가 되도록 식염을 첨가하여 만들었다(이하 이 배지를 HID라 함). 시험 균주를 HID에 16시간 배양 후 원심분리와 재현탁을 반복하여 균을 세정한 다음 처음 배양액과 같은 양의 HID에 다시 혼탁하여 종균으로 하였다. 이 종균액을 HID 1000ml에 대하여 1ml의 비율로 접종하고 37°C, 12~14시간, 1분당 100회전의 속도로서 진탕배양을 하였다. 이 배양액을 5,000×g, 20분간 원심분리한 다음 이 상청액에 ammonium sulfate를 50% 포화 상태가 되도록 첨가하여 4°C에서 하룻밤 염석하였다. 염석 후 5,000×g, 20분간 원심분리하여 단백질을 회수하였다. 이 단백질을 10mM glycine NaOH buffer(10mM GB), pH 9.8에 용해시켜 동일한 buffer에 하룻밤 투석시켰다. 이 투석액을 phenyl-sepharose CL-4B(Pharmacia, LKB, U.S.A.) column에 흡착시켰다. 이 column에 25%(v/v) ethylene glycol을 함유하는 10mM GB, pH 9.8로서 용출액이 280nm에서 자외선 흡수가 "0"이 될 때까지 세정하고 50%(v/v) ethylene glycol을 함유하는 2mM GB, pH 9.8로서 용출한 후 용혈활성이 존재하는 획분을 회수하여 조용혈독소로 정하고 각종 실험에 사용하였다.

### 용혈독소의 활성 측정

용혈독소 용액을 140mM NaCl 첨가 10mM tris(hydroxymethyl) aminomethane-HCl buffer(10mM TBS), pH 7.5로 10배 희석한 후 시험관 내에서 연속 3배 희석하였다. 이때 각 시험관 내의 액량을 1ml가 되도록 하였다. 순수 1ml를 넣은 시험관을 완전 용혈 control로 하고 10mM TBS를 넣은 시험관을 비용혈 control로 하였다. 용혈 반응은 단계 별로 희석된 용혈독소 용액에 1%(v/v)의 면양 적혈구 혼탁액 1ml를 가하고 37°C, 60분간 반응시켰다. 반응시킨 후에 1,000×g, 5분간 원심분리하고 상청액의 흡광도(540nm)를 측정하여 결정하였다. 완전 용혈 control의 50% 용혈도(540nm에서 완전 용혈 control의 흡광도 50%)를 나타내는 것을 1용혈단위(1HU)로 정의하고, 용혈독소가 1HU가 되도록

록 희석하여 그 희석 비율로 용혈활성을 표현하였다.

### 단백질의 정량 및 전기영동

단백질의 정량은 Lowry 등<sup>9</sup>의 방법에 준하였고, 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli 등<sup>10</sup>의 방법에 준하였으며 10% T gel 농도에서 행하였다. Gel의 염색은 silver staining법을 사용하였다.

### Liposome의 조제

Chloroform에 용해한 lecithin 8mg과 cholesterol 4mg을 혼합한 후 rotary vaccum evaporater를 이용하여 약 8시간을 진공 건조시켰다. 이것을 10mM TBS에 혼탁시켜 100,000×g, 30분간 원심분리하여 liposome을 세정하였다(3회). 조용혈독소를 세정된 liposome과 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 후 이 혼합액을 100,000×g, 30분간 원심분리하여 멀균 10mM TBS로 4회 세정하였다. 이 때 원심분리한 상청액의 단백질과 용혈활성을 측정하여 liposome에 흡착한 용혈독소의 양을 측정하였다. 이 liposome에 흡착한 용혈독소를 면역원으로 사용하였다.

### 면역법 및 항혈청의 채취

면역원(50~100μg protein/ml)을 complete adjuvant에 혼합하여 1주일 간격으로 토끼의 등근육에 4~5회 주사한 후 귀정맥으로부터 소량의 혈액을 채취하여 항체가를 측정 한 후 충분히 항체가가 상승한 것을 확인하고 토끼의 혈액을 전부 채취하여 실온에서 1시간 방치한 후 4°C에서 1일 밤 보관하였다. 이 혈액을 여과하여 56°C, 30분간 비동화 처리를 하고 이것을 항혈청으로 하였다.

### 항체가 측정

항혈청 0.5ml에 4HU/ml의 용혈독소 용액을 0.5ml 가하여 37°C, 20분간 처리한 후 1%(v/v)의 면양적 혈구 혼탁액을 1ml 가하여 37°C, 60분간 반응시켰다. 반응 후 각 시험관을 1,000×g, 5분간 원심분리하여 상청액을 540nm에 걸어서 흡광도로 용혈도를 측정하고 항체가는 용혈독소 2HU에 대하여 용혈을 50% 저해 할 때의 혈청 희석 비율로 표현하였다(AU).

### 항혈청의 용혈독소에 대한 특이성

조제된 항혈청의 용혈독소에 대한 특이성 확인은 gel diffusion test<sup>11</sup>로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 조용혈독소의 조제

*V. vulnificus* 배양상청액을 50% ammonium sulfate로 침전시켜서 염석한 단백질을 phenyl-sepharose column chromatography한 결과 이 용혈독소는 phenyl-sepharose column에 잘 흡착되었으며 25%(v/v) ethylene glycol을 첨가한 10mM GB에서 용출되지 않았으므로 이 buffer로 충분히 세정하였다. 50%(v/v) ethylene glycol을 첨가한 10mM GB에서는 잘 용출되었으므로 이 buffer로 용혈독소를 어느 정도 정제할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 만들어진 용혈독소를 전기영동한 결과는 Fig. 1과 같으며 분자량 50kD의 용혈독소 외에 몇 가지 단백질이 혼합되어 있는 것을 볼 수 있었다.

Ammonium sulfate로 농축한 조용혈독소는 불필요한 단백질이 너무 많아서 면역원을 조제하는데 방해 요인 이 되므로 hydrophobic column chromatography로 1차 정제하여 사용하는 것이 합리적이라고 사료된다.

### Liposome에 용혈독소의 선택적 결합

용혈활성이 가장 강한 균주인 E20의 1차 정제한 조용혈독소를 liposome과 반응시킨 후 원심분리법으로 4회 세정하여 전기영동한 결과는 Fig. 2와 같다. 1차 정제한 용혈독소는 분자량 50kD의 용혈독소와 몇 가지 단백질이 혼합되어 있는 것으로 나타났으며 이 용혈독소를 liposome에 반응시킨 것은 분자량 50kD의 단일 단백질로 나타난 것으로 볼 때, 이 용혈독소는 lipo-

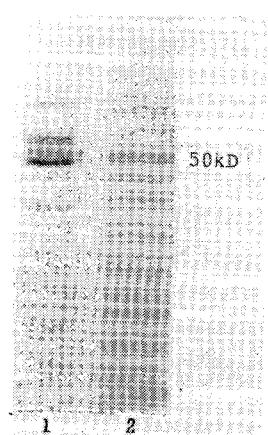


Fig. 1. SDS-PAGE of *Vibrio vulnificus* hemolysin.  
Hemolysin preparations obtained by hydrophobic column chromatography.  
Lane 1 : *V. vulnificus* P10  
Lane 2 : *V. vulnificus* E20

some에 선택적으로 결합되고 다른 단백질은 결합되지 않는다고 추정되었다. 이는 Yamanaka 등<sup>8</sup>의 결과와 같았다. 그러나 전기영동으로 확인한 결과가 단일 band로 나타났다고 하여 반드시 순수 정제되었다고 볼 수 없으므로 면역학적 방법으로 이를 확인하였다.

### Liposome을 이용한 항혈청 제조

Liposome같은 거대 입자는 생체 내에 투여되었을 때 신속하게 면역계의 표적이 될 것으로 예상된다. 따라서 용혈독소를 완전히 정제하지 않고 조용혈독소를 liposome에 결합시켜서 면역원으로 하면 용혈독소의 항혈청을 쉽게 만들 것이라고 추정되어 1차 정제한 용혈독소를 liposome 12mg과 반응시킨 결과 약 100μg의 단백질이 결합되었으며 이 때 100μg의 단백질에 대한 용혈활성은 9,000HU이었다. 이 liposome에 결합된 용혈독소를 단백질 양이 약 50μg, 용혈활성이 약 4,500 HU가 되도록 면역원을 조제하여 토끼의 귀정맥에 1주 일 간격으로 5~7회 투여하였으나 항체가가 상승하지 않아서 동일한 면역원을 토끼의 등근육에 1주일 간격으로 4~5회 투여한 결과 항혈청 1ml당 항체가가 800~1,200AU까지 상승하였다. Yamanaka 등<sup>8</sup>은 토끼의 귀정맥에 면역원을 투여하여 항혈청을 만들었다고 하였으나 반복하여 확인한 결과 등근육에 면역원을 주사하는 것이 효과적이었다. 항체가가 항혈청 1ml 당 800AU 이상 상승한 토끼의 혈액에서 채취한 항혈청을 희석하여 용혈독소가 결합한 liposome과 반응시킨 결과 응집 반응이 확실히 나타났다. 이와 같은 결과를

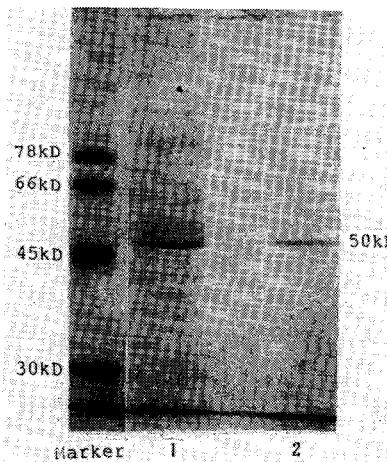


Fig. 2. SDS-PAGE of *Vibrio vulnificus* hemolysin.  
Lane 1 : crude hemolysin obtained by hydrophobic column chromatography  
Lane 2 : crude hemolysin (100μg) bound to liposomes

**Table 1. Agglutination of hemolysin-liposome with anti-hemolysin antiserum**

Antiserum dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Agglutination*	+++	+++	++	+	+, -

\*100μl of hemolysin-liposomes suspension and the serially diluted antiserum were mixed and incubated at 37°C for 6h

볼 때 이 혈청은 확실히 용혈독소를 인식하여 응집을 일으키는 것이 확인되었다 (Table 1).

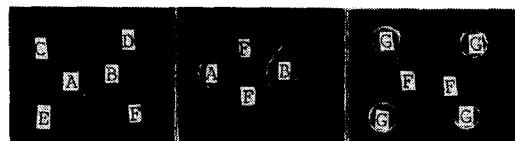
#### Gel내 침강 반응

Liposome에 분자량 50kD의 단백질만 결합하고 이 단백질이 용혈독소라는 것은 Fig. 2에서 알 수 있지만 이에 대한 더 정확한 검토가 필요하므로 liposome에 결합시킨 용혈독소를 면역원으로 하여 항혈청을 만들어서 확인한 결과는 Fig. 3과 같다.

#### 환자분리

균(P10)의 조용혈독소(A)와 환경분리균(E20)의 조용혈독소(B)로 만든 항혈청(C, D)과 두 균(P10, E20)의 조용혈독소를 liposome에 결합시킨 것을 면역원으로 하여 만든 항혈청(E, F)의 gel 내 침강 반응 결과를 보면 조용혈독소와 조용혈독소 항혈청 사이에 복수의 침강 선이 형성되었으나 조용혈독소와 조용혈독소를 liposome에 결합시킨 것을 면역원으로 하여 만든 항혈청 사이에는 단일 침강선이 형성되는 것으로 볼 때 liposome를 이용한 방법으로 얻은 용혈독소의 항혈청은 용혈독소에 대한 특이성이 높다고 평가 할 수 있다. 환경분리균(E20)의 조용혈독소를 liposome에 결합시켜 만든 항혈청(F)과 두 균(E20, P10)의 조용혈독소(A, B)에 대한 gel 내 침강 반응에서 단일 침강선이 형성되었으며 환경과 환자에서 분리된 몇 군주의 조용혈독소(G)에서도 같은 결과가 나타났다 (Fig. 3).

*V. vulnificus*의 감염을 받은 사람이나 동물의 혈청에서 항체가 상승한다는 보고가 있고<sup>4,9</sup>, 이 균의 대부분이 용혈독소를 생산하고<sup>10</sup> 있기 때문에 용혈독소는 이 균 검출에 중요한 지표가 될 수 있다고 사료된다. 그러므로 검출 감도에 대한 개량이 이루어진다면 용혈독소와 결합한 liposome을 환자의 혈청과 반응시켜서 신속한 진단을 할 수 있을 것으로 추정된다<sup>11</sup>. Liposome을 이용한 면역원의 조제는 비교적 간편하고(완전 정제가 필요없기 때문에) liposome이 adjuvant 효과가 있기 때문에 항체가 신속히 상승하는 잇점이 있으므로 용혈독소의 단백화학적, 면역화학적 연구 수행에 유익

**Fig. 3. Gel diffusion test of crude hemolysin and antiserum.**

- A : Crude hemolysin preparation (P10)
- B : Crude hemolysin preparation (E20)
- C : Antiserum obtained by the crude hemolysin (P10)
- D : Antiserum obtained by the crude hemolysin (E20)
- E : Antiserum obtained by the liposome immunization (P10)
- F : Antiserum obtained by the liposome immunization (E20)
- G : Crude hemolysin preparation obtained from *V. vulnificus* each strain

할 것으로 사료된다.

## 요약

*Vibrio vulnificus*가 생산하는 용혈독소의 단백화학적, 면역화학적 연구에 이용할 목적으로 이 균의 용혈독소에 대한 항혈청을 간편하게 만드는 방법을 실험한 결과는 다음과 같다. *Vibrio vulnificus*가 생산하는 조용혈독소를 인위적으로 만든 liposome (cholesterol-phosphatidyl-liposome)에 혼합하여 반응시킨 결과 분자량 50kD의 단백질인 용혈독소만 선택적으로 liposome에 결합되었다. 그러므로 liposome에 결합시킨 조용혈독소를 면역원으로 하고 이 면역원을 토끼의 등근육에 주사하여 항혈청을 간편하게 만들 수 있었으며 이 항혈청은 용혈독소에 대한 특이성이 높았다. 환자와 환경에서 분리된 *Vibrio vulnificus*의 용혈독소와 liposome를 이용하여 제조한 항혈청을 gel 내 침강반응으로 확인한 결과 단일 침강선을 형성하였다.

## 문현

1. Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G. and Heublein, P. C. : Disease caused by a marine *Vibrio* clinical characteristics and epidemiology. *N. Engl. J. Med.*, **300**, 1 (1979)
2. 구정순, 김대원, 한규섭, 석종성, 박명희, 김상인 : Lactose fermenting *Vibrio* (*Vibrio vulnificus*) 패혈증 5 예. 대한병리학회지, **16**(3), 463 (1982)
3. 김옥렬, 정윤섭, 이삼열, 전재은, 강진경 : *Aeromonas hydrophila*로 잘못 동정된 2예를 포함한 *Vibrio vulnificus* 패혈증 4예. 대한임상병리학회지, **4**(1), 115 (1984)
4. Gray, L. D. and Kerger, A. S. : Detection of *Vibrio vulnificus* cytolsin in *Vibrio vulnificus* infected mi-

- ce. *Toxicicon.*, **27**, 459(1989)
- 5. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. C. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem.*, **193**, 265(1951)
  - 6. Laemmli, U. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680(1970)
  - 7. Ouchterlony, O. : Antigen-antibody reaction in gels. *Acta Pathological et Microbiological Scandinavica*, **26**, 505(1949)
  - 8. Yamanaka, H., Satoh, T. and Shinoda, S. : Preparation of specific antiserum against *Vibrio vulnificus* hemolysin by immunization with hemolysin bound liposomes. *FEMS Micro. Letters*, **41**, 313(1987)
  - 9. Gray, L. D. and Kreger, A. S. : Detection of anti-*Vibrio vulnificus* cytolsin antibodies in sera from mice and a human surviving *V. vulnificus* disease. *Infection and Immunity*, **51**, 964(1986)
  - 10. Tison, D. L. and Kelly, M. T. : Virulence of *Vibrio vulnificus* starins from marine environments. *Appl. Environ. Microbial.*, **51**, 104(1986)
  - 11. Umeda, M., Tomita, T., Shibata, H., Seki, M. and Yasuda, T. : Homogeneous liposome lysis assay for determination of anti-streptomyces O antibody titer in serum. *J. Clin. Micro.*, **26**, 804(1988)

(1993년 1월 12일 접수)