

## 효소면역 전기영동이적법에 의한 톡소포자충 용해물 및 분비 항원의 분석

안명희\*, 손혁진, 임미혜, 민득영

한양대학교 의과대학 기생충학교실

국문초록: 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 세포내에 기생하는 구포자충(Coccidia)의 일종으로 항원은 여러 가지 단백질로 구성되어 있으며 이들 항원의 분석은 면역학적, 생화학적인 면에서 시도해 볼 필요가 있다. 톡소포자충(RH주) tachyzoite의 용해물 및 분비항원을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 단백질 분획을 관찰하고 면역 전기영동이적법(EITB, enzyme-linked immunoelectrotransfer blot)을 시행하여 반응대를 관찰하였다. 토끼(New Zealand산) 또는 BALB/c마우스를 톡소포자충으로 면역 또는 감염시키고 3주 또는 7주 후에 채혈하였다. 면역 후 토끼나 마우스 혈청은 간접형광항체법(IFA)으로 항체가 1:1024 또는 1:128임을 확인하였다. 톡소포자충 용해물 및 분비항원으로 SDS-PAGE를 시행하였을 때 10 kDa에서 220 kDa까지 광범위한 단백질 분포대를 보였다. 톡소포자충 용해물 항원을 IgG 항혈청과 반응시켰을 때 주요 항원의 분자량은 23에서 35 kDa까지 5개의 반응대를 관찰하였으며 IgG와 IgM의 공동반응대는 24, 27, 30, 35 kDa에서 관찰되었다. 분비항원을 IgG 항혈청과 반응시켰을 때 감염 마우스의 복강액을 항원으로 한 경우 33(P30), 45 kDa의 반응대가 주요 항원임을 알 수 있었고 톡소포자충을 CHL 세포로 *in vitro*에서 배양시킨 후 배양액의 상청액을 항원으로 EITB를 시행하였을 때 20 kDa, 30 kDa 이하의 분획에서 반응대가 관찰되었다. 이상으로 30 kDa 항원이 톡소포자충 tachyzoite의 용해물 뿐만 아니라 분비물에서도 관찰되는 중요한 항원임을 알 수 있었다.

### 서 론

톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 구포자충류(Coccidia)에 속하는 원충이며 bradyzoite, tachyzoite 그리고 oocyst-sporozoite 등의 다양한 형태를 가진다. 또 톡소포자충은 세포내에서만 기생하는 원충이므로 계대배양에 어려움이 있는데 마우스 복강내 주사하여 증식시키거나 *in vitro*에서 배양된 섬유아세포(fibroblast) 등의 세포에 접종하는 방법이 있다. 최근에는 단일클론 항체에 의한 진단(Wee *et al.*, 1992), ELISA를 이용한 감염혈청내 항원의 측정(Ise *et al.*, 1985), PCR 등을 이용한 표면항원 유전자의 분석 및 진단도 가능하다(Brindley *et al.*, 1993; Makioka and Kobayashi,

1991). 또 원충의 단백질 성분이나 항원성에 관한 연구가 활발하며 숙주의 면역반응을 일으키는 항원을 분석함도 중요하다(Bonhomme *et al.*, 1994).

이 연구에서는 톡소포자충(RH주)를 SDS-PAGE를 이용하여 tachyzoite를 구성하는 단백질을 분류하고 *T. gondii*로 면역 또는 감염시킨 토끼 또는 마우스에서 채혈한 항혈청으로 반응시켜 효소면역 전기영동이적법(enzyme-linked immunoelectrotransfer blot, EITB)을 이용하여 단백질을 nitrocellulose membrane에 이적시킨 후 톡소포자충 RH주의 특이항원을 규명하고 또 약독주인 Fukaya주 및 Beverly주로 감염된 마우스 항혈청을 이용하여 공동항원의 존재를 알아보고자 하였다. 또 감염 마우스의 복강액이나 CHL cell을 이용한 *in vitro* 배양의 상청액에서 톡소포자충의 분비항원을 찾아보고자 하였다.

\* 논문접수 1994년 10월 21일, 게재확정 11월 11일.

\* 이 연구는 1992년도 한양대학교 의과대학 교내 연구비 지원으로 이루어졌음.

\* 별책 요청 저자

### 재료 및 방법

#### 1. 독소포자충 및 항원

독소포자충 RH주는 ICR 마우스에서 1주에 2회씩 복강내 주사하여 제대하였다. 감염 3~4일 후 마우스를 희생 시킨 뒤 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS) 4 ml를 복강내 주사하고, 복강액을 뽑아 500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상청액을 얻고 다시 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전된 원충을 얻은 후 PBS로 3회 세척하여 그 수를 조절하여 사용하였다. 분비 항원(excretory-secretory antigen)은 5% 우태아혈청(fetal calf serum)을 첨가한 MEM(minimal essential medium) 배지에서 배양한 CHL(Chinese hamster lung) cell에  $1\sim5 \times 10^6$  tachyzoite를 *in vitro*로 감염시키고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 72시간 배양 후 배양액을 수집하고 3,000 × g에서 원심분리하여 상청액을 얻었으며 centriprep 10 (Amicon, MA)에 넣어 다시 원심분리하여 10배로 농축시킨 뒤 분비항원으로 사용하였다. 또 BALB/c 마우스에  $1\sim2 \times 10^6$ 의 RH tachyzoite를 복강내 감염시키고 3일 후 사망직전의 마우스를 희생시켰다. 마우스 복강내로 PBS 4 ml 주사하고 복강액을 채취하여 원침시켜 상청액을 사용하였으며 배양액과 동일 방법으로 농축시켜 SDS-PAGE를 시행하였다. 대조군으로 동량의 PBS를 넣은 정상마우스 복강액을 사용하였다. 각 항원의 단백질 함량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법으로 정량하였다.

#### 2. 실험동물의 면역 및 항혈청

면역을 위한 실험 동물로는 New Zealand 흰 토끼 및 BALB/c 마우스를 사용하였다. 면역은 먼저 수 차례 냉동·해빙을 시행한 독소포자충 tachyzoites( $2.6 \times 10^8$  cells)에서 얻은 수용성 항원을 300 μl의 PBS에 섞고, 여기에 동량의 Freund's complete adjuvant(Chemicon, Los Angeles, CA)를 섞어 토끼의 발바닥 피내 조직에 주사하고, 4주 후 동량의 항원을 Freund's incomplete adjuvant(Chemicon, Los Angeles, CA)와 섞어 등쪽에 피하주사하였다. 1차 면역 10일 후, 2차 면역 10일 후 그리고 20일 후 토끼의 귀 정맥 또는 심장으로부터 채혈하고 혈청을 분리하여 -20°C에서 보관하여 사용하였다. 정상 대조군 혈청은 면역하기 전 채혈하여 분리하였다.

마우스 면역은 RH주 tachyzoite의 동량의 수용성 항원(50 μl)과 complete adjuvant를 혼합하거나 냉동·포르말린 처리한 tachyzoite( $2 \times 10^6$ )를 1주간격으로 4회 복강내 주사하였고 면역 시작후 4주에 안와뒤 정맥에서 채혈하여 혈청을 수집하였다.

Fukaya주와 Beverly주의 항혈청은 10~20개의

cyst를 마우스 복강내로 감염시켜 7주 후에 같은 방법으로 채혈하고 혈청을 분리하여 -20°C에서 보관하였다. 실험동물을 면역시키기 위한 독소포자충의 수용성 항원은 tachyzoite(RH주)를 수차례 냉동·해빙을 시행한후 glass bead(300 μm 지름)를 섞어 10분 이상 vortex mix를 수차례 시행하여 현미경하에서 원충의 형태가 없음을 확인한 후 3,000 rpm에서 20분 원침하여 상청액을 사용하였다. 단백질의 측정은 Lowry *et al.*(1951)의 방법에 의해 측정하였다.

#### 3. 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody test, IFAT)을 이용한 항체가 측정(Fletcher, 1965)

독소포자충 tachyzoite를 PBS로 4°C에서 2,000 rpm으로 10분간 3회 원심세척하고 그 침사에 10% 포르말린을 넣어 30분간 고정하였다. 고정된 tachyzoites를 PBS로 3회 세척한 다음 1% NH<sub>4</sub>OH에 5분간 실온에서 처치 후 PBS로 3회 세척하였다. 그 침사를 3% Tween 80으로 실온에서 5분간 처리한 다음 다시 PBS로 3회 세척하고 수가  $2 \times 10^5$ /ml 되게 부유액을 만들어 슬라이드 글라스에 50 μl씩 넣어 실내에서 건조시키고 -70°C에 보관하여 간접형광항체법의 항원으로 사용하였다.

항원을 도말한 슬라이드에 1:8~1:4.096로 배수 희석된 토끼 또는 마우스의 항혈청을 20 μl씩 항원 위에 떨어뜨리고 37°C 온습상자에서 1시간 동안 방치 하였다. 이를 PBS(pH 7.4)로 2회 세척하고 증류수로 1회 세척한 다음 희석된 conjugate (fluorescein-labelled anti-rabbit goat IgG), IgM (Fc fragment, 단백질 함량 20 mg/ml, Cappel, Pennsylvania) 또는 anti-mouse IgG를 20 μl씩 떨어뜨려 37°C 온습상자에서 1시간 동안 반응 시켰다. 이때 IgG conjugate는 0.2% bovine serum albumin(BSA, Sigma, St. Louis)이 함유된 PBS(pH 7.4)로 1:30 으로 희석하여 사용하였다. 이 슬라이드를 다시 PBS로 2회 세척하고 증류수에 1회 세척한 다음 0.1% Evans blue에 5분간 염색하였다. 염색된 슬라이드를 증류수로 2회 세척하고 실온에서 건조시킨 다음 90% glycerin(pH 7.4)으로 포매하여 형광현미경(Fluovar, Jenaval Co, Germany)으로 관찰하였다. 이때 원충 세포막 주변에 형광을 띄거나 세포 전체가 형광을 보일 때 양성 반응으로 판정하였으며, 양성반응 원충과 음성반응 원충의 수가 같을 때에도 양성반응으로 판정하였다.

#### 4. Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

독소포자충 tachyzoites를 2% SDS와 1% 2-mercaptoethanol을 함유한 62.5 mM Tris-HCl 완충용액(pH 6.8)에서  $2 \times 10^8$  tachyzoites/ml 농

도의 용액을 만들고, 5분간 끓인 후 2,000 × g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상청액을 항원으로 사용하였다(Verhofstede et al., 1988).

Laemmli(1970)의 방법에 따라 discontinuous buffer system을 사용하여, 12.5% running gel과 3% stacking gel에서  $2 \times 10^8$  tachyzoites를 300 μl의 sample buffer에 녹여 5분간 끓인 후 원심분리하여 얻은 상청액을 well 당 50 μl씩 부하하여 stacking gel에서는 15 mA로 running gel에서는 30 mA로 일정하게 하여 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동된 각 분획의 분자량은 표준단백(MW 14,400~97,400, Bio-Rad, Rockville Center, NY)을 사용하여 Lambin(1978)의 방법으로 환산하였으며, 전기영동된 gel은 Coomassie brilliant blue-R 250에 염색하거나 immunoblotting에 사용하였다.

### 5. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot(EITB)

EITB는 Towbin et al.(1979)과 Tsang et al.(1983)의 방법에 따라 시행하였다. 전기영동한 gel은 nitrocellulose paper(pore size 0.45 μm, Bio-Rad, Rockville Center, NY)에 밀착시켜 transfer buffer(20% methanol, 25 mM trizma base, 19 mM glycine, pH 8.3)로 채운 다음 70V에서 3시간 동안 전이시켰다. 표준단백이 전이된 nitrocellulose paper는 amido black으로 염색하여 탈색 시킨다음 분자량 비교에 사용하였다.

항원이 전이된 nitrocellulose paper를 5% skim milk에 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 반응을 억제시키고, 1% skim milk에서 항혈청을 1:500으로 희석시켜 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. nitrocellulose paper를 세척한 후 1:1,000으로 희석된 peroxidase conjugated anti-rabbit IgG, IgM(Cappel, Pennsylvania) 및 peroxidase conjugated anti-mouse IgG(Cappel, Pennsylvania)를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 세척하고 기질용액(diaminobenzidine, DAB) 50 mg, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μl, PBS(pH 7.5) 100 ml)을 넣고 10분 후 항원-항체 반응을 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 간접형광항체법에 의한 혈청내 항체가

독소포자충(RH주) tachyzoite로 면역시켜 얻은 토끼 항 혈청의 혈청내 항체를 간접형광항체법으로 확인해 본 결과 1차 면역 후 10일에는 1:512에서, 2차 면역 후 10일에는 1:2,048에서, 2차 면역 후 20일에는 1:1,024에서 양성반응을 보였다. 또 마우스 항혈청으로 시행한 간접형광항체법에서는 tachyzoite 면역 후 3주에 1:8이었고 Beverly 또는

Fukaya 감염 후 3, 7주에 모두에서 각각 1:128, 1:128의 항체가 나타내었다.

### 2. SDS-PAGE

독소포자충(RH주) tachyzoite 항원의 분자량 분포를 알아보기 위하여 12.5% running gel에서 discontinuous SDS-PAGE를 시행하였다(Laemmli, 1970).

독소포자충 RH주는 분자량 10 kDa~220 kDa까지 약 25개 정도의 분획이 관찰되었는데, 주요 반응대는 10 kDa, 22 kDa, 24 kDa, 27 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 38 kDa, 45 kDa, 47 kDa, 52-60 kDa, 73 kDa, 84 kDa, 97 kDa이었다(Table 1, Fig. 1).

### 3. 효소면역 전기영동이적법(EITB)

독소포자충(RH주) tachyzoite를 항원으로 하고, 면역 시기별로 채혈하여 얻은 토끼 항혈청에 대한 IgG, IgM의 반응을 본 결과 2차 면역 후 10일과 20일에 IgG와의 주요 반응대는 23 kDa, 24 kDa, 27 kDa, 30 kDa, 35 kDa이었으며 IgM과의 주요

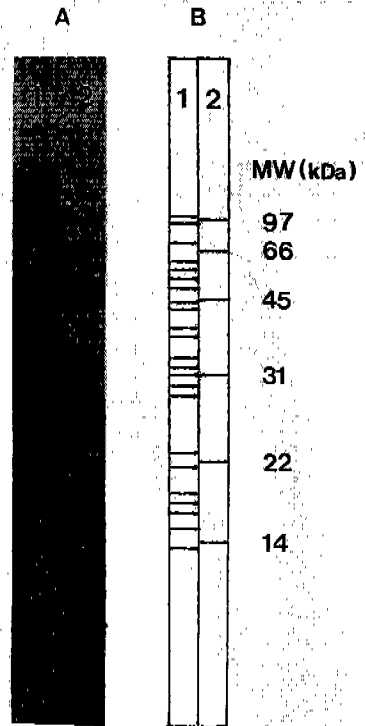
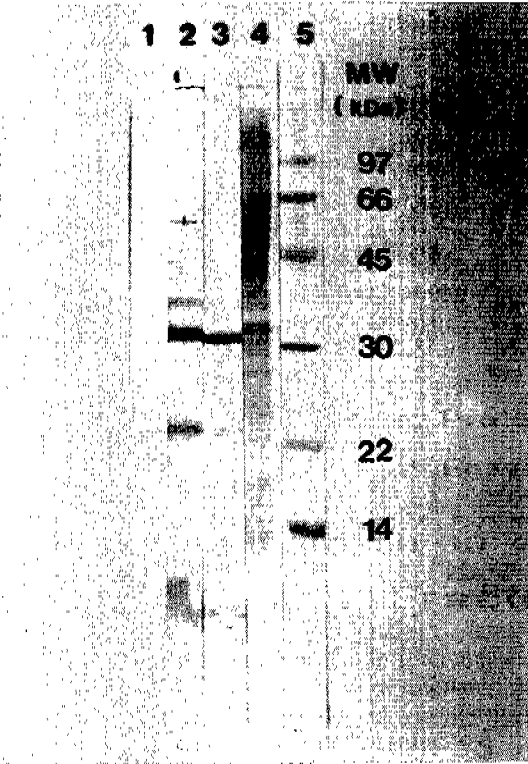


Fig. 1. Coomassie blue stained SDS-PAGE pattern of *T. gondii* (RH) lysate. lane 1: RH tachyzoite lysate; lane 2: standard marker



**Fig. 2.** Reaction of IgG antibody to *T. gondii* (RH) lysate antigen by EITB (lane 1-3). lane 1: normal rabbit serum; lane 2, 3: *T. gondii* anti-serum of rabbit; lane 4: *T. gondii* lysate, amidoblack staining; lane 5: standard marker

반응대는 24 kDa, 27 kDa, 32 kDa, 35 kDa, 58 kDa, 67 kDa, 84-97 kDa이었다(Fig. 3). 또한 동일 항원에 대해 RH주, Fukaya주 및 Beverly주 각각에 대한 마우스 항혈청의 IgG와 반응성을 살펴본 결과 IgG와 반응시킨 경우 Fukaya주와 Beverly주의 감염 8주 혈청에서는 IgG 반응대가 동일하였으며, 주요 반응대는 24 kDa, 27 kDa, 35 kDa, 38 kDa, 95 kDa이었다. 그러나 RH주의 면역 3주 혈청에서는 반응대가 관찰되지 않았다(Figs. 2 & 3).

특소포자충 분비항원은 CHL 세포에서 RH tachyzoite를 72시간 배양 후 얻은 배양액의 상청액에서는 25, 30 kDa 부근에서 항원의 반응대를 관찰하였고 마우스에 RH를 감염 후 3일에 얻은 복강액에서는 25, 30, 45, 50, 60 kDa 부근의 반응대를 볼 수 있었으나 정상마우스의 복강액에서도 25, 50, 60 kDa의 분획이 관찰되어 30, 45 kDa의 항원대가 주요항원임을 알 수 있었다 (Fig. 4).

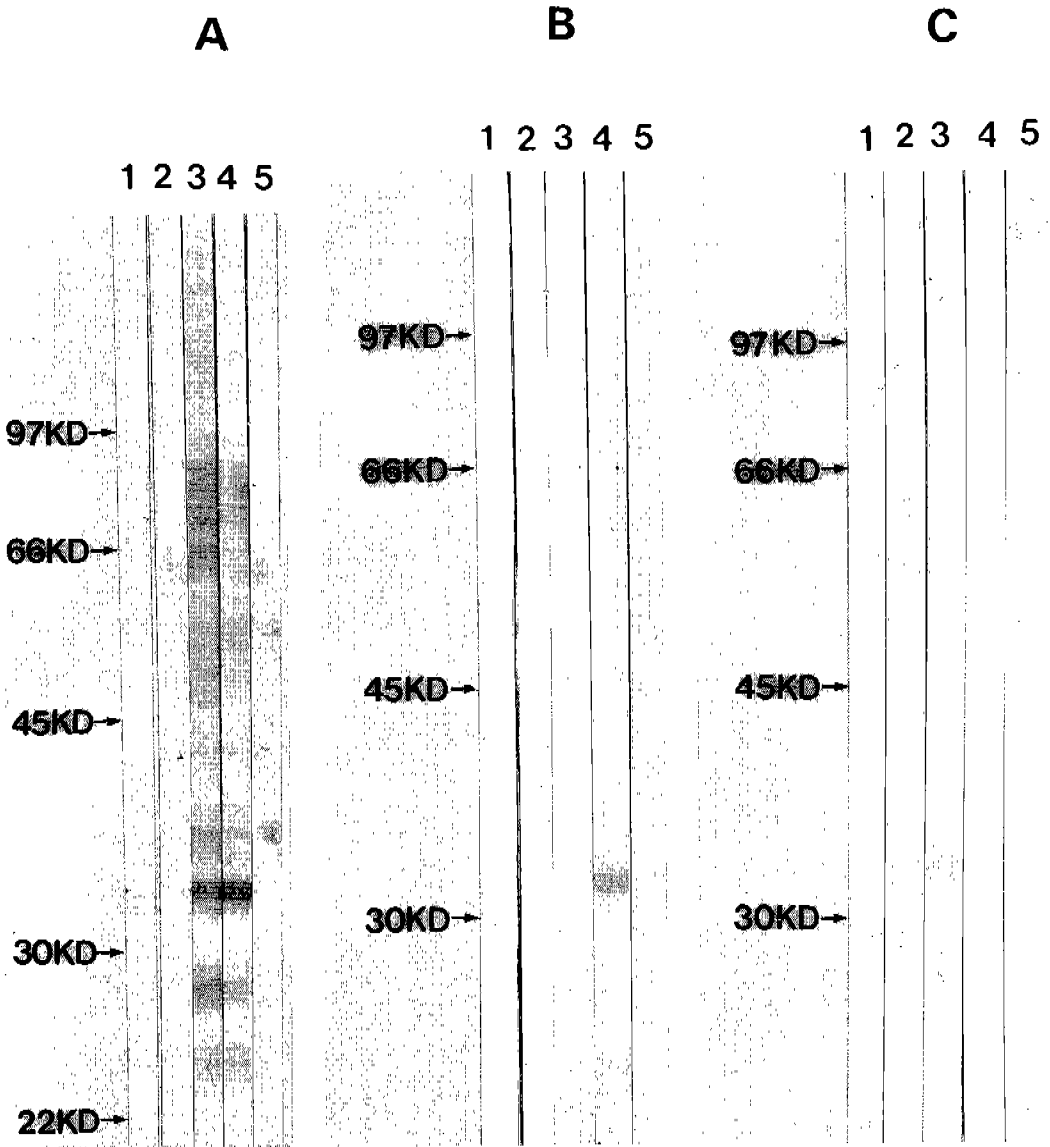
### 고 찰

특소포자충증(Toxoplasmosis)의 진단은 효소표식 면역검사법(ELISA)이나 간접형광항체법(IFA) 등 혈청학적 방법이 널리 이용되고 있으며, 혈청내 IgM 또는 IgG 항체가의 측정을 위한 항원의 분리를 위해 항원성 물질의 분석은 그 중요성이 이미 잘 알려져 있다(Fletcher, 1965; Takahashi *et al.*, 1985). 최근에는 효소면역전기영동이적법(EITB)을 이용하여 IgG나 IgM의 특이 반응대를 관찰함으로써

**Table 1.** Recognition of *T. gondii* (RH) lysate and excretory-secretory antigens from culture supernatant or infected mouse peritoneal fluid with rabbit or mouse antisera by EITB.

(Exp. I)		<i>T. gondii</i> lysate antigen	
SDS-PAGE		22-97.4 kDa (25 bands)	
EITB		a)PI 7 wks rabbit serum (RH)	
	IgG	major band: 23, 24, 27, 30, 35 kDa	
	IgM	24, 27, 32, 35, 58, 67, 84-97 kDa	
		b)PI 8 wks mouse serum (Fukaya/Beverly)	
	IgG	24, 27, 35, 38, 95 kDa	
(Exp. II)		<i>T. gondii</i> lysate Ag	b)E/S Ag
			Culture sup
			Peritoneal fluid
SDS-PAGE:		10-220 kDa (over 24 bands)	
EITB			
	IgG	major band: 10, 18, 33, 39 47, 72 kDa	20, 30 kDa
			33, 45 kDa

a)PI: Post-infection; b)E/S Ag: excretory-secretory antigen



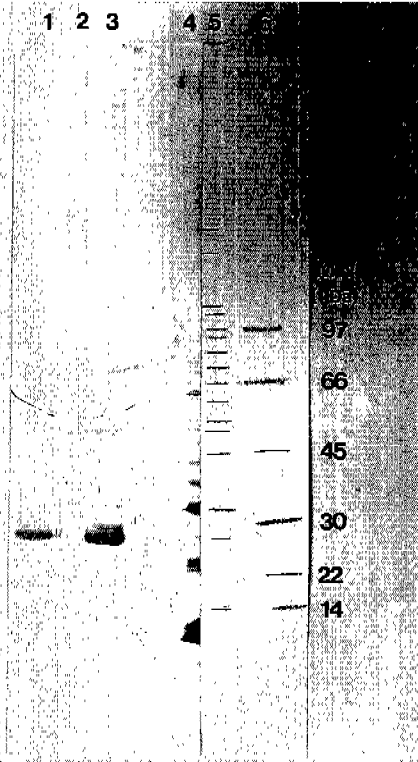
**Fig. 3.** Reaction of IgG and IgM antibodies to *T. gondii* lysate antigen by EITB. (A and B) IgG and IgM antibodies to *T. gondii* (RH) lysate Ag. lane 1: normal rabbit serum; lane 2, 3, 4: *T. gondii* (RH) immunized rabbit serum; lane 5: *T. vaginalis* antigen. (C) IgG antibody to *T. gondii* (RH) lysate Ag. lane 1, 4: normal mouse serum; lane 2, 3: serum infected with Fukaya and Beverly strains; lane 5: *P. westermani* antigen

독소포자충의 특이항원을 찾아내고 이를 이용하여 단일클론 항체를 생산함으로써 독소포자충종의 진단을 보다 용이하게 하고 있다(Wee et al., 1992; Tomavo et al., 1994).

독소포자충의 주요 막 항원(membrane antigen)은 보고자에 따라 다소 차이가 있으나 22, 23, 30, 35, 43 kDa으로 알려져 있다(Tomavo et al., 1992). 이러한 항원은 glycosyl-phosphatidyl-

inositol에 의해 막에 부착되어 있다. Sharma et al (1983)이나 Tomavo et al.(1994)은 *T. gondii*에는 IgM 또는 IgG와 반응하는 6 또는 4~5 kDa의 낮은 분자량의 항원이 있음을 보고하였으나 이 항원은 *in vitro*에서 배양한 tachyzoite에서는 관찰 할 수 없었고 마우스 복강내 계대한 tachyzoite에서만 존재한다고 하였다.

이 실험에서는 독소포자충 용해물 항원에 대한



**Fig. 4.** Reaction of IgG antibody to excretory-secretory antigen of *T. gondii* by EITB (lane 1-4). lane 1: normal mouse peritoneal fluid; lane 2: culture supernatant of *T. gondii* (RH) with CHL cell; lane 3: *T. gondii* (RH) infected mouse peritoneal fluid; lane 4: *T. gondii* (RH) lysate Ag; lane 5: *T. gondii* lysate Ag, amidoblack staining; lane 6: standard marker

IgG와 주요반응대는 23, 24, 27, 30, 35 kDa이었고 IgM과의 주요반응대는 24, 27, 32, 35, 58, 67, 84~97 kDa으로 24, 27, 30, 35 kDa의 공동반응대를 관찰할 수 있었다.

Ware and Kasper(1987)는 독소포자충의 RH, C, P주에서 주(strain)에 따른 특이 항원성을 관찰한 결과 3가지 주에서 P80, P61, P50, P43, P30, P22의 공동반응대를 관찰하였고 또 RH주에서 분자량 39,000에서 26,000, P주에서 분자량 54,000, C주에서 분자량 88,000에서 25,000의 특이 항원대를 관찰하였다. Choi *et al.*(1988)은 독소포자충의 RH주와 Fukaya주에서 토끼 항혈청으로 EITB를 시행한 결과 IgG와 반응에서 RH주는 25, 30, 52 kDa의 주요반응대를 Fukaya에서는 15 kDa의 특이항원을 나타냈다고 하였다.

이 실험에서도 RH tachyzoite 항원에 대한 Fukaya 또는 Beverly주에 감염된 마우스혈청을 반

응시켰을 때 24, 27, 35, 38, 95 kDa의 반응대가 관찰되어 RH주와 공동반응대가 존재함을 알 수 있었다.

EITB에 의한 항체와의 반응대는 독소포자충의 감염시기를 알 수 있는 유용한 지표가 된다. Verhofstede *et al.*(1988)은 토끼에서 감염초기에는 IgG와의 반응에서 35 kDa이 만성감염에서는 13~15 kDa이 주요 반응대라고 하였으며 최소 3개월까지도 IgM의 양성반응대를 관찰하여 혈청내 IgM이 오래 지속됨을 알 수 있었다. Ise *et al.*(1985)은 독소포자충 감염 동물 혈청에서 감염 후 3일부터 분자량  $\geq 400,000, 220,000, 130,000, 45,000$ 의 항원을 관찰하였고, 그중 분자량 220,000과 130,000이 더욱 뚜렷하다고 하였다. Bessieres *et al.*(1992)도 인체 감염혈청에서 감염후 1개월 후에 30, 27 kDa의 항원이 2개월 후에 30, 27, 78, 57-52, 43, 38, 35 kDa이 6개월 후에는 24, 22, 20 kDa, 1년 후에는 14 kDa의 항원과 혈청이 반응함을 보여주었다. Lappin *et al.*(1994)은 독소포자충 ME 49주를 고양이에게 감염시켰을때 IgM은 4주 후에 가장 강한 반응을 보였으며 28, 29, 35, 38 kDa 분자량의 항원을 IgG는 12주 후에 26, 28, 29, 31, 35 kDa의 반응대를 EITB상 관찰하였다.

이 실험에서는 토끼나 마우스에서 면역 시작 후 2달 이내에 채혈한 혈청이므로 급성 또는 만성 감염시 나타나는 항원의 반응대가 나타난 것으로 생각된다.

독소포자충 총체 뿐만 아니라 분비 항원(excretory-secretory antigen)에서도 특이항원을 분리하였다. Bessieres *et al.*(1992)은 독소포자충의 총체와 이 원충의 배양액에서 57, 52(doublet), 43, 38, 35, 30 kDa의 공동항원을 분리하였고 그중 분비항원의 주요 특이항원으로 78, 30, 27 kDa의 항원을 보고하였다. Hafid *et al.*(1992)은 감염 토끼의 혈청으로 독소포자충 분비항원과 혈청내 항원(circulating antigen)을 반응시켰을때 110, 75, 48, 30, 24, 22 kDa에서 6개의 분자량이 같은 항원이 양쪽 모두에 존재함을 보고하였다. 이 실험에서는 CHL 세포에 72시간 배양 후 얻은 분비항원에서는 25, 30 kDa 항원을 마우스 감염 3일 후 얻은 복강액에서는 30(P30), 45 kDa의 반응대를 관찰하였다. 독소포자충 용해물에서도 10, 18, 33(P30), 39, 47, 72 kDa의 특이 항원을 나타내었다. 따라서 30 kDa의 항원은 독소포자충 RH주의 용해물 항원 뿐만 아니라 분비항원에서도 관찰되는 중요한 항원이며 배양액에서 얻은 25, 30 kDa의 항원이나 복강액에서 얻은 33(P30), 45 kDa의 항원은 감염초기에 얻을 수 있는 특이 항원임을 알 수 있었다. 독소포자충 P30, P22 등은 tachyzoite에 존재하는 중요한 막항원이며 총체표면 뿐만 아니라

rophtries에도 증명되었다(Bonhomme *et al.*, 1994; Parmley *et al.*, 1994). 또 P30 항원으로 면역시킨 마우스의 대식세포는 *in vitro*에서 독소포자충을 죽일 수 있으며(Makioka and Kobayashi, 1991) 면역된 마우스의 혈청에서 항체를 상승시킴으로 숙주의 면역반응을 유도하는 단백질로 알려져 있다(Kasper *et al.*, 1985). Sharma *et al.*(1984)도 P28.5의 항원을 찾아내었고 이런 항원은 총체의 막보다 dense granule, 골기체, parasitophorous vacuole 등에서 관찰된다고 하였다(Sibley and Sharma, 1987; Linder *et al.*, 1992). 또 Darcy *et al.*(1992)은 P30, 48~67 kDa 항원으로 실험동물에 면역시켜 T-림프구의 면역반응을 유도하거나 IgG 항체의 증가로 P30이 중요한 항원임을 증명하였다. 또 독소포자충의 용해물 항원 뿐만아니라 분비항원(P24)도 T-cell을 활성화시켜 숙주의 면역기능을 증강시킬 수 있다(Duquesne *et al.*, 1991).

최근에는 독소포자충의 단일클론 항체를 이용하여 막단백질 뿐만 아니라 총체내에서 주요항원을 찾아내었고 재조합 항원으로 혈청학적 진단을 시도하기도 한다(Achbarou *et al.*, 1991; Tenter and Johnson, 1991).

EITB 방법에 의한 항혈청과 반응하는 독소포자충의 특이항원을 찾으려는 많은 연구가 있었으나 그 대상이 사람 또는 실험동물(마우스, 토끼, 고양이), 항원의 준비과정, 혈청을 얻는 시기 또는 같은 실험 일지라도 개체의 차이에 따라 특이 반응대가 다소 차이가 있는 것으로 나타났다(Bessieres *et al.*, 1992; Hafid *et al.*, 1992; Lappin *et al.*, 1994).

이 실험에서는 anti-*Toxoplasma* IgG, IgM과 반응하는 특이항원을 찾았으나 분자량이 낮은 항원은 분리하지 못하였고 면역후 2개월 이내 모두 재혈하여 시기별 항체가 변동에 따른 특이항원을 분리하지 못하였다. 또 정상마우스 복강액에서 관찰된 25, 50, 70 kDa의 항원에 대해 좀 더 연구해 볼 필요가 있겠다.

### 감사의 글

독소포자충을 제공하여 주신 연세의대 기생충학 교실, 가톨릭의대 기생충학교실에 감사드립니다.

### 참고문헌

Achbarou A, Mercereau-Puijalon O, Sadak A, *et al.* (1991) Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **103**: 321-329.  
 Bessieres MH, Breton SL, Seguela JP (1992) Analysis by immunoblotting of *Toxoplasma*

*gondii* exo-antigens and comparison with somatic antigens. *Parasitol Res* **78**: 222-228.  
 Bonhomme A, Thirion C, Boulanger F, *et al.* (1994) *Toxoplasma gondii*-structure variations of the antigen P30. *Parasitology* **108**: 281-287.  
 Brindley PJ, Gazzinelli RT, Denkers EY, *et al.* (1993) Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related Coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* **48**: 447-456.  
 Choi WY, Nam HW, Yoo JE (1988) Membrane proteins and their antigenicity of *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasit* **26**: 155-162.  
 Darcy F, Maes P, Gras-Masse H, *et al.* (1992) Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J Immunol* **149**: 3636-3641.  
 Duquesne V, Auriault C, Gras-Masse H, *et al.* (1991) Identification of T cell epitopes within a 23-KD antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol* **84**: 527-534.  
 Fletcher S (1965) Indirect fluorescent antibody technique in the serology of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Path* **18**: 193-199.  
 Hafid J, Raberin H, Pozzetto B, *et al.* (1992) Comparison of excretory/secretory and circulating antigens of *Toxoplasma gondii* by enzyme immunoassay and immunoblotting. *Intern J Parasitol* **22**: 1083-1088.  
 Ise Y, Iida T, Sato K, Suzuki T, Shimada K, Nishioka K (1985) Detection of circulating antigens in sera of rabbits infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **48**: 1: 269-272.  
 Kasper LH, Currie KM, Bradley MS (1985) An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **134**: 3426-3431.  
 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.  
 Lambin P (1978) Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* **85**: 114-125.  
 Lappin MR, Bush DJ, Reduker DW (1994) Feline serum antibody responses to *Toxoplasma gondii* and characterization of target antigens.

- J Parasitol* **80**: 73-80.
- Linder E, Thors C, Edberg F, Haglund S, von Bonsdorff CH (1992) Generation of antibodies against *Toxoplasma gondii* antigen associated with dense granules and parasitophorous vacuole of the host cell. *Parasitol Res* **78**: 175-178.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Makioka A, Kobayashi A (1991) Toxoplasma-cidal activity of macrophages activated by recombinant major surface antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **59**: 2851-2852.
- Parmley SF, Gross U, Sucharczuk A, Windeck T, Sgarlato GD, Remington JS (1994) Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* **80**: 293-301.
- Sharma SD, Mullenax J, Araujo FG, Erlich HA, Remington JS (1983) Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J Immunol* **131**(2): 977-983.
- Sharma SD, Araujo FG, Remington JS (1984) *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **133**: 2818-2820.
- Sibley LD, Sharma SD (1987) Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infect Immun* **55**: 2137-2141.
- Takahashi J, Konish E, Matsumura T (1985) A survey of antibody to *Toxoplasma gondii* among patient of a hospital in Hyogo Prefecture, Japan. by enzyme-linked immunosorbent assay. *Jpn J Parasitol* **34**(2): 87-92.
- Tenter AM, Johnson AM (1991) Recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by human sera in an ELISA. *Parasitol Res* **77**: 197-203.
- Tomavo S, Martinage A, Dubremetz JF (1992) Phosphorylation of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Parasitol Res* **78**: 541-544.
- Tomavo S, Couvreur G, Leriche MA, et al. (1994) Immunolocalization and characterization of the low molecular weight antigen (4-5 kDa) of *Toxoplasma gondii* that elicits an early IgM response upon primary infection. *Parasitology* **108**: 139-145.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some application. *Proc Natl Acad Sci* **76**: 4350-4354.
- Tsang VCW, Peralta JM, Simon AR (1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique (EITB) for studying the specificities on antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **92**: 377-391.
- Verhofstede C, Gelder PV, Rabaey M (1988) The infection-stage-related IgG response to *Toxoplasma gondii* studied by immunoblotting. *Parasitol Res* **74**: 516-520.
- Ware PL, Kasper LH (1987) Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **55**: 3: 778-783.
- Wee LK, Ho LC, Yap EH, Singh M (1992) A monoclonal-based IgM capture ELISA for detection of antibodies to 22 and 41 kDa membrane antigen of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **104**: 25-31.



**= Abstract =****Antigen analysis of *Toxoplasma gondii* lysate and excretory-secretory materials by enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB)**

Myoung-Hee Ahn\*, Hyeog-Jin Son, Mi-Hyea Leem and Duk-Young Min

*Department of Parasitology, College of Medicine, Hanyang University Seoul 133-791, Korea*

Recently, the importance of toxoplasmosis is raised as a complication in immunosuppressed or AIDS patients. Our study focused on the identification of a variety of *Toxoplasma* antigens by immunoblotting. Rabbits and BALB/c mice were immunized with *Toxoplasma* lysate (RH strain), frozen tachyzoites (RH strain) or cysts (Beverly and Fukaya strain). Blood were collected from ear vein, heart or orbital plexus for detecting the serum antibody levels. For excretory-secretory (E.S) antigens, *T. gondii* (RH) tachyzoite were cultured in CHL (Chinese hamster lung) cells with MEM containing of 5% FCS. After 72hrs, culture supernatant was collected. BALB/c mice were inoculated with RH tachyzoite intraperitoneally and peritoneal fluids were extracted three days later. E.S antigens were detected in culture supernatant and infected mouse peritoneal fluid by EITB. Serum IgG levels in rabbit were 1:512 of 10 days after primary immunization, 1:2,048 of 10 days after secondary immunization, 1:1,024 of 20 days after secondary immunization by IFAT, respectively. Serum IgG levels of immunized mice were 1:128 after 7 weeks. Tachyzoite antigens of the RH strain were detected 25 protein bands ranging 10 kDa-220 kDa of molecular weights with Coomassie blue stain. *Toxoplasma* major antigens corresponding to MW of 24 kDa, 27 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 38 kDa were recognized by IgG and IgM antibodies. Excretory-secretory antigens present in culture supernatant with M. W. of 20, 30 kDa and in infected mouse peritoneal fluid with M.W. of 33 (P30), 45 kDa. When RH tachyzoite antigen was probed with different mice sera immunized with 2 strains of *T. gondii*, the IgG antibody band of Fukaya and Beverly strain (8 week-serum) is identical to those of RH strain. It is considered that the 30 kDa polypeptide detected in excretory-secretory materials and lysate was important major antigen of *T. gondii* (RH).

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, lysate, excretory-secretory antigen, SDS-PAGE, EITB**[Korean J. Parasit., 32(4): 249-257, December 1994]**

---

\* Corresponding author