

## SDS 처리한 브루셀라 항원과 *Yersinia enterocolitica* 0:9주의 혈청학적 교차반응 연구

임윤규 · 양기천 · 이경갑 · 박전홍 · 이두식 · 박용호\* · 강승원\* · 목지원\*\* · 이영순\*\*\*

제주대학교 수의학과, 농촌진흥청 가축위생연구소\*  
국립보건안전연구원\*\*, 서울대학교 수의과대학\*\*\*

(1994년 11월 21일 접수)

### Serological cross-reaction with *Brucella abortus* antigen extracted by sodium dodecyl sulfate and *Yersinia enterocolitica* 0:9

Yoon-kyu Lim, Ki-chun Yang, Kyung-kap Lee, Jun-hong Park, Du-sik Lee,

Yong-ho Park\*, Seung-won Kang\*, Ji-won Mok\*\*, Yong-soon Lee\*\*\*

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Veterinary Research Institute, RDA\*

National Institute of Safety Research\*\*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University\*\*\*

(Received Nov 21, 1994)

**Abstract :** *Brucella abortus* cell wall antigen was extracted from *Brucella abortus* 1119-3 by ultrasonication and followed by sodium dodecyl sulfate(SDS) treatment. In order to confirm whether this preparation is serologically cross reactive with *Yersinia enterocolitica* 0:9, Western blot analysis with mouse anti-*Brucella abortus*1119-3 and with mouse anti-*Yersinia enterocolitica* 0:9 was performed. ELISA results from using those *Brucella* antigen and *Yersinia* antigen were assessed whether they had correlation.

According to the results of western blot analysis and ELISA, there was no evidence of cross reactivity between the *Brucella abortus* 1119-3 antigen preparation and *Yersinia enterocolitica* 0:9. Therefore the SDS treated antigen prepared in this study could be suitably used as specific ELISA antigen without confusion in the interpretation of serological tests for brucellosis in cattle.

**Key words :** *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* 0:9, cross-reaction, SDS, Western blot, ELISA

## 서 론

브루셀라병은 1955년에 미국으로부터 수입된 젖소

124두에 대한 혈청학적 검사결과 30두가 양성반응으로 판정된 것이 최초의 공식 보고이다<sup>1</sup>. 우리나라에서는 이병을 법정전염병으로 지정하여 모든 축우를 대상

\* 1993년도 과학재단 핵심전문연구 지원에 의하여 연구되었다.

Address reprint requests to Dr Yoon-kyu Lim, Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Republic of Korea.

으로 정기적인 검진을 실시하고 양성축을 도태시켜 이 병을 근절시키고자 노력을 하고 있다<sup>2</sup>. 그러므로 브루셀라병 감염여부를 간편하고도 정확하게 그리고 더욱 조기에 진단할 수 있는 감도 높은 검사법의 실용화가 요구되고 있다. 현재 이용되고 있는 공정진단법은 Rose bengal 방법으로 screening 후 보체결합반응법 (CF test)으로 확정진단하는 방법을 택하고 있다<sup>3</sup>.

근래에 널리 이용되는 ELISA법은 기존의 일반적인 혈청학적인 검사법보다 민감도와 특이도가 양호한 것으로 알려져 있으므로 축우에서의 브루셀라병 감염 진단에 ELISA법을 적용시킨다면 이 병의 방역사업에 유용할 것으로 생각된다. 한편 브루셀라균과 혈청학적인 교차반응이 성립하는 균주 중 자연계에 상재하는 *Yersinia enterocolitica* 0:9주는 특히 중요한 것으로 알려져 있으며<sup>4,5</sup>, 응집반응을 이용한 브루셀라병 감염진단 시 비특이적인 가양성반응을 야기시킬 우려가 있어 국내에서도 안 등<sup>6</sup>에 의하여 감별진단의 방법론을 보고한 바 있다.

이 연구에서는 브루셀라병 감염진단을 위한 감도 높은 ELISA법을 개발함에 있어서 필요한 특이항원을 제조하기 위하여 *Brucella abortus* 1119-3 배양균을 초음파처리로 분쇄한 후 sodium dodecyl sulfate(SDS)로 처리하여 준비하여 보았으며, 이렇게 준비된 항원이 *Yersinia enterocolitica* 0:9와 혈청학적인 교차반응이 일어나는가의 여부를 Western blot의 방법으로 확인하였다. 또한 *Brucella abortus* 1119-3주의 처리항원과 *Yersinia enterocolitica* 0:9주의 처리항원으로 ELISA를 실시하여 반응값간에 상호 관련을 보이는가의 여부를 조사하였다.

## 재료 및 방법

항원의 준비 : 농촌진흥청 가축위생연구소에서 분양 받은 *Brucella abortus* 1119-3주와 제주도의 감염우에서 분리한 *Brucella abortus* biotype 1 주를 brucella agar에 배양 수확하여, Jagannath와 Sehgal의 방법<sup>7</sup>을 응용하여 준비하였다. 즉, 냉 아세톤으로 냉장온도(4℃)에서 18시간 처리하여 침전된 균체를 생리식염수로 세척하여 10%(w/v) 부유액으로 만든 후, ice bath 내에서 초음파 분쇄하였다(120W × 20 min, Othake Works, Japan). 초음파 처리한 균체액은 원심분리(20,000 × g for 20 min at 4℃)하여 상층액을 회수하여 SONI 항원(초음파 분쇄항원)이라 칭하였다. 침전물은 생리식염수로 세척한 후 SDS를 0.01% 되게 용해하여

30℃에서 1시간 장치시킨 다음 원심분리(60,000 × g for 20 min)하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액 중 잔여의 SDS는 phosphate buffered saline(PBS)으로 평형된 Column PD 10(Pharmacia, Sweden)을 사용하여 제거하였으며 이는 SDS 항원(SDS처리 후 항원)이라 하였다.

*Yersinia enterocolitica* 0:9 항원 : 가축위생연구소에서 분양받은 *Yersinia enterocolitica* 0:9주를 trypticase soy agar에 37℃로 배양하여 오염이 없음을 확인하고, trypticase soy agar에 다시 도말하여 37℃에 3일간 배양을 하였다. 배양된 균은 생리식염수로 부유시켜 수확한 후 5℃, 2500 rpm에서 30분씩 6회 세척하고 브루셀라균의 항원제조와 동일한 방법으로 제조하였다.

항혈청제조 : Western blot 분석에 사용하기 위하여 *Brucella abortus* 1119-3주 및 *Yersinia enterocolitica* 0:9주를 마우스에 접종하여 항혈청을 얻었다.

마우스 : 제주대학교 동물과학연구소에서 분양받은 8주령의 ICR마우스 숫컷 각 6수씩 12수를 사용하였다.

면역 : 위에서 배양하여 수확한 *Brucella abortus* 1119-3주 및 *Yersinia enterocolitica* 0:9주를 packed volum으로 약 10% 되게 생리식염수에 부유시키고 동량의 complete Freund adjuvant(CFA)로 유탁액을 만들었다. 각 마우스에 이 유탁액 0.1ml씩을 복강내로 주사한 후, 1주일 간격으로 균부유액을 0.1ml씩 복강내로 추가접종(Booster immunization)하였다. 접종 4주 후에 모든 마우스를 이더(ether)로 마취하고 심장을 통하여 전체혈을 실시하여 분리한 후 Western blot 분석에 사용하였다.

### Western Blot

시료의 단백질량 계산 : Bicinchoninic acid protein assay kit을 사용하여 측정하였다.

SDS polyacrylamide gel 전기영동 : 전기영동에 사용한 항원으로는 *Brucella abortus* 1119-3의 각 처리별 항원과 *Brucella abortus* biotype 1의 SDS처리항원, *Yersinia enterocolitica* 0:9의 각 처리별 항원이었다. BioRad에서 제조한 MINIPROTEIN II cell과 Power supply(BioRad 200/2.0)를 사용하여 실시하였다. 실시한 조건은 다음과 같다. 즉, Stacking gel은 5%, Separating gel은 10% 사용하였고, Sample volume은 10 $\mu$ l/well 되게 하여 한 시간 동안 100V, 200mA에서 영동하였다. Spacer는 0.75mm짜리를 사용하였으며 Marker는 biotinylated materials를 사용하였다. Gel은 Coomassie brilliant R로 염색하였다.

Blotting : 전기영동이 끝나고 transfer buffer에 15분

간 평형시킨 후 NC paper에 tranblotting을 실시하였다. Running condition은 100V, 0.36A에서 1시간 동안 실시하였다.

Immunoassay : 전기영동 후 immunoassay는 마우스 anti-Brucella 혈청과 마우스 anti-Yersinia혈청을 각각 사용하여 염색 양상을 비교하였다. Blotting이 끝난 NC paper를 1% BAS PBS에 담그고 37°C에서 1시간 동안 정치하여 blocking 한 다음 물기를 제거하고, 4000배로 희석한 anti-Brucella 및 anti-Yersinia 혈청을 NC paper 전면에 골고루 부어 입히고 37°C에 1시간 반응시켰다. 세척과정은 각 단계마다 PBS를 사용하여 5분씩 4회 실시하였다. Avidin-Biotin-용액은 미리 30분 전에 만들어 두고, 세척 후 이 액에 30분간 반응시켰다. 세척 후 Stainig 용액(diaminobenbenzidine tetrahydrochloride(DAB) 10mg+0.2M Tris-HCl, pH 7.2, 15ml)을 준비하고, 30%의 과산화수소수를 60 $\mu$ l 부은 용액에 NC paper를 반응시키며 적당한 반응이 나타나면 즉시 PBS에 헹구 후 흡수지에 끼워 말렸다.

비교 ELISA : 각 축우들에 있어서 *Brucella abortus*에 대한 항체와 *Yersinia enterocolitica* 0:9에 대한 항체간의 상관관계를 알아보기 위하여, 브루셀라의 각 항원과 *Yersinia enterocolitica* 항원을 사용하며 ELISA를 실시하였다. 흡착에 사용한 항원은 브루셀라의 경우 SONI ag와 SDS ag를 사용하였고, 예시니아의 경우는 SONI ag와 합한 Whole cell component preparation을 사용하였다.

항원의 흡착 : ELISA plate(Nunc-Immuno Module, Polysorb U16, Denmark)의 각 well에 흡착용환충액(50mM Carbonate buffer, pH 9.6, containing 0.02% sodium azide)으로 희석한 항원을 10 $\mu$ l 씩 분주하고 냉장온도에서 약 16시간 동안 정치한 후 PBS 등으로 세척하고, 0.5%의 BSA로 실온에서 30분간 봉쇄하고 PBS로 세척한 다음 건조시켜 냉장 desiccator에 넣고 보관하며 실험에 사용하였다.

ELISA : 적정조건을 찾기 위하여 임 등<sup>8)</sup>의 ELISA 조건을 기본으로 다소 변형시켜 가며 실험하였다. 즉, 동물혈청을 1% BSA와 0.05% Tween 20이 함유된 PBS로 20 내지 100배 희석하여 100 $\mu$ l씩 각 well에 가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 5회의 세척 후, Horse radish peroxidase(HRP)가 표지된 protein G를 100 $\mu$ l씩 well에 가하고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 5회 세척하였다. 발색제로는 ABTS(2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)를 사용하였다. 반응완료 후 0.005% sodium azide액 100 $\mu$ l로 반응을 정지시키고, reader(SLT 400ATC, Austria)를 사용하여 파장 405nm에서 492nm의 대조 파장을 대입하여 흡

광도를 측정하였다.

검사대상혈청 : 제주도에서 방역사업의 일환으로 채혈한 소 혈청 중 1993년도에 검진하여 판정한 28건의 혈청을 대상으로 실시하였다.

## 결 과

*Brucella abortus*항원과 *Yersinia enterocolitica* 0:9균주간의 항원성 교차반응 : 두 균주간의 공통된 항원성의 유무를 검증하기 위하여 Western blot을 실시한 결과는 Fig 1과 2에 나타내었다. 마우스 anti-Brucella혈청으로 Immunoassay를 실시할 때(Fig 3), *Brucella*균의 각 정제단계별 항원들의 열(제 2, 3, 4, 5열)에서는 분자량 약 25kDa부터 50kDa 사이에 위치한 특이항원의 분포가 보였으며, biotype 1의 경우(제5열)에는 비교적 더 넓은 분포를 나타내었다. *Yersinia*균의 정제단계별 항원열(제6, 7, 8열)에서는 분자량 약 15, 20, 30 및 40 kDa의 위치에서 반응한 band가 약하게 나타났다. 한편 anti-*Yersinia*혈청으로 Immunoassay를 실시한 결과는 Fig 2에서와 같이, *Yersinia*항원(제1, 2, 3열)과는 뚜렷한 반응을 보이고 있는 반면에 대조적으로 *Brucella* 항원(제4, 5, 6, 7열)과는 반응한 증거가 나타나지 않았다.

브루셀라 및 예시니아 항원을 사용한 비교 ELISA : 브루셀라 SDS항원과 SONI항원을 각각 사용하여 측정된 ELISA 반응값의 상관관계를 검증하기 위해 단순회귀분석한 결과는 Fig 3에 나타난 것과 같이 대단히 높은 상관관계를 보이고 있었다( $y=0.013+0.921x$ ,  $R^2=0.917$ ). 한편 SDS항원으로 측정할 때 최대치(OD=2.5)를 보이는 혈청들 중 SONI항원으로 측정하였을 때에는 다양한 반응치(OD=1.0-2.5)를 보이고 있으며, 다소 낮은 반응치(OD=1.0)를 보이는 예도 있었으므로 이후의 브루셀라 검출용 ELISA 항원으로는 SDS항원을 사용하기로 하였다. 브루셀라 SDS항원과 *Yersinia* whole cell항원을 사용한 ELISA반응값 간에는 Fig 4에서 보듯이 전혀 상관관계를 인정할 수 없었다( $y=0.773-0.00075x$ ,  $R^2=0.0006$ ). 마찬가지로 브루셀라 SONI항원과 *Yersinia* whole cell항원 간에도 브루셀라 SDS항원의 경우와 유사하여 서로간에 상관관계를 보이지 않았다( $y=1.059-0.1392x$ ,  $R^2=0.096$ ).

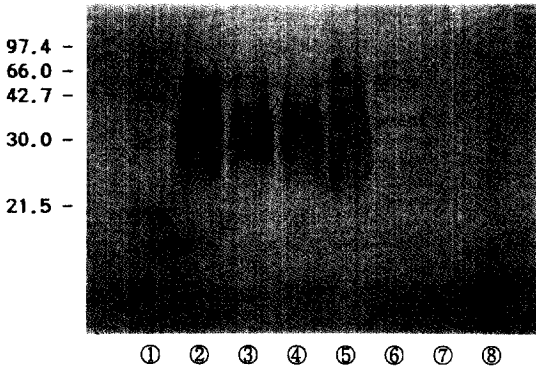


Fig 1. Western blot analysis with mouse anti-*Brucella abortus* 1119-3 of *Brucella abortus* ag and *Yersinia enterocolitica* ag fractions.  
 Lane 1: biotinylated markers  
 Lane 2: whole cell component preparation of *Brucella abortus* 1119-3  
 Lane 3: SONI ag of *Brucella abortus* 1119-3  
 Lane 4: SDS ag of *Brucella abortus* 1119-3  
 Lane 5: SDS ag of *Brucella abortus* biotype 1  
 Lane 6: whole cell component preparation of *Yersinia enterocolitica* 0:9  
 Lane 7: SONI ag of *Yersinia enterocolitica* 0:9  
 Lane 8: SDS ag of *Yersinia enterocolitica* 0:9

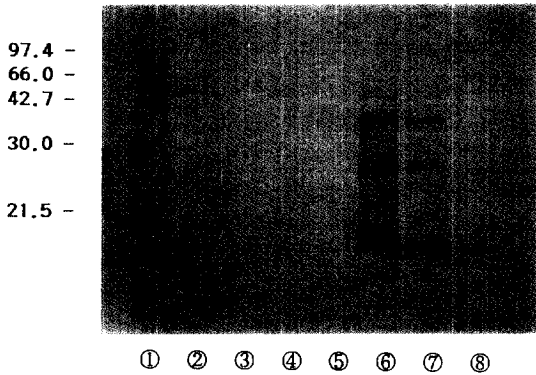


Fig 2. Western blot analysis with mouse anti-*Yersinia enterocolitica* 0:9 of *Brucella abortus* ag and *Yersinia enterocolitica* ag fractions.  
 Lane 1: biotinylated markers  
 Lane 2: whole cell component preparation of *Brucella abortus* 1119-3  
 Lane 3: SONI ag of *Brucella abortus* 1119-3  
 Lane 4: SDS ag of *Brucella abortus* 1119-3  
 Lane 5: SDS ag of *Brucella abortus* biotype 1  
 Lane 6: whole cell component preparation of *Yersinia enterocolitica* 0:9  
 Lane 7: SONI ag of *Yersinia enterocolitica* 0:9  
 Lane 8: SDS ag of *Yersinia enterocolitica* 0:9

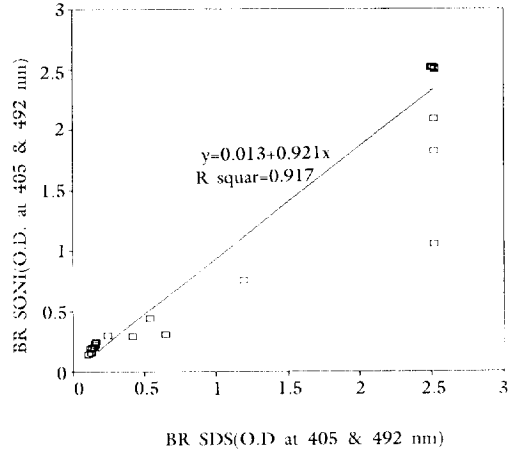


Fig 3. Correlation between ELISA result.  
*Brucella* SDS antigen and SONI antigen were used as plate coating antigen.

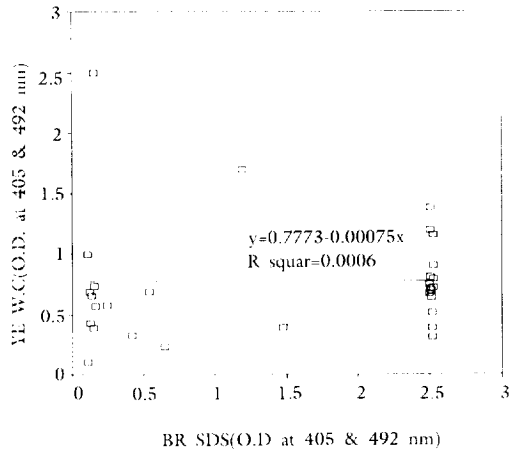


Fig 4. Correlation between ELISA results.  
*Brucella* SDS antigen and SONI *Yersinia* whole cell antigen were used as plate coating antigen.

## 고 찰

*Brucella abortus* 감염진단을 위한 혈청학적인 방법을 이용할 때 항원적인 교차반응을 보이는 기타의 다른 감염증이 존재한다면 판정에 많은 혼동을 야기시킬 우

려가 있다. 이들중에는 Francisella, Pasteurella, Salmonella, Campylobacter 균 등이 있으며 이들은 브루셀라 감염의 진단에 큰 문제는 되지 않은 것으로 알려져 있다. 그러나 *Yersinia enterocolitica* 0:9주는 브루셀라균과 강력한 혈청학적인 교차반응을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>5,6</sup>. 그러므로 브루셀라감염의 혈청학적인 진단을 위한 시약을 개발하기 위해서는 예시니아균과 교차반응 여부를 반드시 확인하여야 할 것이다.

본 연구에서는 소에서의 브루셀라 감염 진단을 위한 ELISA방법을 개발하고자 먼저 *Yersinia enterocolitica* 0:9주와 혈청학적인 교차반응이 없는 브루셀라균 특이 항원을 정제하기 위하여 초음파 분쇄 및 SDS처리 등의 과정을 거쳐 세포벽 항원을 준비하였으며 이들과 *Yersinia enterocolitica* 0:9주 간에 혈청학적인 교차반응의 여부를 관찰하기 위한 실험을 실시하였다. Anti-*Brucella* 혈청과 *Yersinia enterocolitica* 0:9주의 항원분획에서는 약하지만 항원항체 결합반응이 나타났으나 (Fig 1), anti-*Yersinia* 혈청과 *Brucella abortus* 1119-3주의 항원분획간에는 아무런 반응이 나타나지 않았다 (Fig 2).

Fig 1의 결과는 두가지 균주 유래의 항원간에 교차성이 인정되는 것으로 해석되며, 반면에 Fig 2의 결과는 두 균주간에 항원적인 교차성이 인정되지 않는다는 결론에 도달하게 된다. 이러한 상반된 결론이 야기되는 원인은, 아마도 브루셀라 항원을 제조할 때, *Yersinia enterocolitica* 0:9과 교차반응을 보이는 부분이 완전하게 제거되었을 경우이거나, 혹은 두 균주들 간에 공통적인 항원기가 없는 때문으로 추론할 수 있겠다. 그러나 Fig 2의 제2열은 브루셀라의 whole cell을 초음파로 처리한 부유액을 그대로 SDS로 처리한 항원이기 때문에 사실상 특정한 분획만 정제된 상태가 아니며, 또한 각 처리별 항원들의 경우도 전기영동상의 pattern으로 미루어 볼 때, 분리정제가 완벽한상태라고 볼 수는 없다. 그러므로 교차반응을 보이는 부분을 완전하게 제거했기 때문은 아닐 것이다. 한편 *Yersinia enterocolitica*는 주위 환경에 상재되어 있는 병원균으로 알려져 있다. 그러므로 항혈청 생산에 사용된 마우스가 이 균에 노출되었을 가능성은 충분하다. 만일 이 마우스들이 *Yersinia enterocolitica* 0:9에 노출되어 있었다면, *Brucella abortus* 균을 접종하여 항혈청을 얻어 내었을 때, 이 anti-*Brucella* 항혈청에는 다소간에 anti-*Yersinia* antibody도 형성되어 있을 가능성이 있으며, 그렇다면 이러한 anti-*Yersinia* antibody가 Western blot상의 교차반응을 야기시킨 것이 아닌가 생각할 수 있으며, 이러한 가정은 *Yersinia* 항체가 없는 동물의 혈청을 대상으로 확인

실험을 하여야 할 것으로 생각된다.

브루셀라 SDS 항원을 사용한 ELISA값과 예시니아 항원을 사용한 ELISA값과의 상관관계를 살펴보기 위한 Fig 4에서는 반응값의 분포에서 어떠한 상관관계도 인정되지 않았다. 또한 브루셀라 양성혈청 21건을 *Yersinia* 항원으로 ELISA를 실시하였을 때 흡광도의 평균 및 표준편차는  $0.720 \pm 0.357$  이었으며, 브루셀라 음성혈청 7건을 *Yersinia* 항원으로 ELISA를 실시하였을 때  $0.938 \pm 0.657$ 을 나타내어(Data 생략), 브루셀라 항체의 양성 혹은 음성에 따른 상관관계를 보이지 않았으며, 이들 값간의 편차 또한 상당히 큰 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 준비한 SDS처리 항원을 사용하여 브루셀라 감염진단을 위한 ELISA를 실시할 때, *Yersinia enterocolitica* 0:9과의 반응에 의한 위양성반응(false positive)을 야기시키지 않을 것으로 생각된다.

## 결 론

*Brucella abortus* 1119-3주를 초음파처리한 후 SDS로 처리하여 *Brucella abortus* 세포벽항원을 제조하였다. 이렇게 준비한 항원이 *Yersinia enterocolitica* 0:9주와 항원적인 교차반응을 보이는가 여부를 확인하기 위하여 마우스 유래의 anti-*Brucella abortus* 1119-3 항혈청과 또한, anti-*Yersinia enterocolitica* 0:9 항혈청을 각각 사용하여 Western blot 분석을 하였다. 또한, *Brucella abortus* SDS 처리항원과 *Yersinia enterocolitica* 0:9주를 각각 사용하여 소 혈청들을 대상으로 ELISA를 실시하고, 그 결과들 간에 상관관계가 나타나는가 비교하여 보았다.

Western blot의 결과 ELISA의 결과는 두 균주 유래의 항원간에 교차반응이나 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 그러므로 본 연구에서 제조하여 사용한 SDS처리 *Brucella abortus* 세포벽 항원은 축우의 브루셀라 감염 진단용 ELISA 시약에 적용시켜도 적합할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. 농촌진흥청 가축위생연구소. 한국의 가축위생연구(가축위생연구소 80년사). 박근식 발행. 박정문 편집. 도서출판 상록. 1991; 77-82.
2. 농림수산부예규. 제142호 제10조 -제15조 1988. 1. 11.

3. 농림수산부예구. 제160호. 결핵병 및 브루셀라병 방역실시요령중 개정. 1991.
4. Mittal KR, Tizard I. Serological cross-reaction between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotype 09. *Vet Bulletin* 1981; 51(6): 501-505.
5. Mittal KR, Tizard I. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res Vet Sci* 1980; 28: 311-314.
6. 안수환, 김금화, 박용호 등. 브루셀라병과 *Yersinia enterocolitica* 감염의 혈청학적 감별진단에 관한 연구. 농시보고 1982; 24(축산. 가위): 106-111.
7. Jagannath C, Sehgal S. Enhancement of the antigen-binding capacity of incomplete IgG antibodies to *Brucella melitensis* through Fc region interactions with staphylococcal protein A. *J Immunol Methods* 1989; 124: 251-259.
8. 임윤규, 우희중, 이영순. Protein G 효소표지면역 방법에 의한 Sendai Virus 항체검출. 한국실험동물 학회지 1991; 7(2): 53-61.
9. 임윤규, 이두식, 박전홍 등. 축우 브루셀라병의 ELISA 진단법에 관한 연구. 대한수의학회지 1993; 33(1): 131-135.