

## 해양에서 분리한 *Vibrio vulnificus*의 면역학적 특성

허문수\* · 정초록<sup>1</sup> · 전유진

제주대학교 해양생산과학부, <sup>1</sup>울산대학교 생명과학부

### Immunological Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from Marine Environment

Moon-Soo Heo\*, Cho-Rok Jung<sup>1</sup> and You-Jin Jeon

Division of Biological Sciences, Ulsan University,  
<sup>1</sup>Faculty of Applied Marine Sciences, Cheju National University

**Abstract** - Immunoglobulin G was purified by 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation, DEAE-Sephadex, Sephadex G-150 column chromatographies from rabbit antiserum against *V. vulnificus* ATCC 27562 O antigen and used for immunological test for *V. vulnificus* isolates.

The profiles of cell lysate total protein and outer membrane protein from the isolates were analyzed by SDS-PAGE and densitometry. The overall profiles in all isolates were similar. Distinct protein band was observed in comparison with *V. parahaemolyticus*. Western Blotting with rabbit Immunoglobulin G against cell lysates and OMP of *V. vulnificus* isolates showed a strong antigenic response to antigen 66, 60, 54, 48, 33 and 26 kDa which were common to all strains examined. The 26 kDa antigen showed *V. vulnificus* specific antigen in comparison with *Vibrio parahaemolyticus*. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay was developed by using rat anti-*V. vulnificus* ATCC 27562 polyclonal antibodies as capture antibody, a purified rabbit IgG antibody as detector antibody, and goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate as developer antibody. When four *V. vulnificus* isolates were tested, the reactivity showed from 50 to 70% by sandwich ELISA.

**Key words** : *Vibrio vulnificus*, ELISA, Western blotting, Immunoglobulin G

## 서론

*Vibrio vulnificus*는 주로 하구나 연안의 바닷물에 사는 세균종의 한가지로 바닷물, 바다의 침사물, 갯벌, 각종 어패류, 해조류, 플랑크톤, 해초류에 부착 서식하며, 그외 소금기가 약간 있는 호수나 시냇물에서도 분리되는 호염성균이다(Hollis *et al.* 1976).

*V. vulnificus* 감염증은 1979년에 감염증 환자 39명의 자료를 역학적 특성과 임상증상에 따라 원발성 패혈증군(primary septicemia group)과 상처감염군(wound infection group)으로 분류하였다(Blake *et al.* 1979). 원발성 패혈증은 균이 오염된 해산물을 생식하였을 경우 위를 거쳐 소장에서 증식하여 장벽을 뚫고 혈류로 들어가 패혈증을 일으킨다(Shirouzu *et al.* 1985). 우리나라에서의 사망률은 평균 62~79%로 매우 높게 보고되어 있다(김 등 1985).

*V. vulnificus*의 독성인자로는 세포용해소(cytolysin),

\*Corresponding author: Moon-Soo Heo, Tel. 064-754-3473, Fax. 064-756-3493, E-mail : msheo@cheju.cheju.ac.kr

내독소인 LPS (lipopolysaccharide), 세포벽 단백질, 세포 외 효소 (extracellular enzyme), siderophore 생산, 단백질 분해 효소 등이 있는 것으로 보고 되고 있다 (Simpson and Oliver 1983; Testa *et al.* 1984; Oliver *et al.* 1986; Miyosh *et al.* 1987; Bahani *et al.* 1991; Stelma *et al.* 1992). 표면항원의 일부가 보체작용에 저항성을 나타내며, 사람의 다형핵 백혈구와 대식세포의 식균작용에도 저항성을 가지게 한다고 밝혀져 있다 (Kreger *et al.* 1981). 이와같이 *V. vulnificus*의 병원성에 있어 표면항원의 중요성이 시사됨에 따라 더 자세한 연구가 잇따르게 되었다 (Kreger AS *et al.* 1984; Dilip *et al.* 1991; Gautam *et al.* 1994).

*V. vulnificus*의 표면항원을 이루는 주요한 성분으로는 협막성분과 LPS, OMP (outer membrane proteins)의 세 가지가 있다 (Kreger AS *et al.* 1984). 이 중에서 외막단백질 (OMP)에 관한 연구는 최근에 시작되었다. 병원성 균주에 있어서는 장에서의 균부착기구와 상피세포 침투기구로 작용하며, 열이나 pH의 변화에 대한 균 자체의 방어기작에도 OMP는 중요한 것으로 여겨지고 있으며, 또한 *V. vulnificus*의 주외막단백질이 36 kDa로 밝혀졌는데 이것이 항체생산과 병원성에 관련한다고 보고되었다 (Biosca *et al.* 1991, 1993).

*V. vulnificus*에 의한 질병은 고대에도 기록이 있으나 근래에 들어 증가하고 있으며 또한 패혈증은 치사율이 높기 때문에 질병의 원인균인 *V. vulnificus*에 대한 신속한 검출방법이 요구되고 있다. 본군의 동정방법으로는 생화학적 검사를 통한 방법이 주류를 이루고 있었다 (주와 김 1985; 주 1987). 해양이나 환자의 가검물로부터 얻은 시료에서 *Vibrio*속 검출용 배지인 TCBS를 사용하여 의심되는 집락을 얻은 후에 생화학검사를 실시하여 *V. vulnificus*를 얻기까지 시간과 경비가 많이 소요되고 시험 조건에 따라 결과가 다를 때가 있어 불편이 있었다. 이후 분자생물학의 발전에 힘입어 *V. vulnificus*의 hemolysin gene을 PCR으로 검출하거나 DNA probe를 이용한 DNA hybridization 방법과 항혈청을 이용한 면역학적 방법을 사용한 연구도 보고되어 있다 (Wright *et al.* 1993).

본 연구에서는 각 분리 균주의 cell lysates의 SDS-PAGE 분석과 표면항원을 이루는 중요성분인 OMP와 LPS를 분리하고 전기영동 분석을 실시하여 그 특성을 알아보려고 하였다. 또, 표준균주 *V. vulnificus* ATCC 27562의 O항원으로 제작한 항혈청으로부터 보다 특이성이 높은 면역반응의 유도를 위하여 면역글로블린 G를 부분 정제하고, 이를 사용하여 각 분리 균주의 면역학적 특성을 시험하여 *V. vulnificus*의 분리 검출에 유

용한 정보를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용균주

본 실험에서 표준균주로 *V. vulnificus* ATCC 27562를 사용하였으며, 해양에서 분리한 *V. vulnificus* 4균주 (A, B, C, D)와 serotype 03 균주가 실험에 사용되었다. 대조균주로는 일본의 국립 감염성 질환 연구소로부터 분양 받은 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802를 사용하였다.

### 2. 면역

#### 1) 실험균주의 O항원 제조

*V. vulnificus* ATCC 27562를 1.5% 식염첨가 brain heart infusion (BHI) 액체 배지에서 37°C, 9시간 배양하고 phosphate buffer solution (PBS)로 세척한 후 1% formalin으로 4°C, 24시간 처리하였다. 3,000 rpm, 20분간 원심분리하여 침전균체를 PBS로 3회 세척하고 0.9% 식염수로 현탁하여 O항원 농축액을 제조하고 4°C에서 보관하여 이를 이하 실험에 사용하였다.

#### 2) 실험동물의 면역

부착항체의 생산을 위해서는 300 g의 rat를 사용하였으며 항체를 생성을 위한 실험동물로는 2kg의 rabbit를 사용하였다. O항원 부유액을 0.9% 식염수 1.5 × 10<sup>9</sup> cells/ml (이하 McFarland No. 5로 약함)이 되도록 희석하여 처음에는 Freund's complete adjuvant (Sigma)와 혼합하여 피하에 1 ml 주사하고 2회부터는 항원만으로 1주일 간격으로 rat은 총 5회를 그리고 rabbit에는 총 7회 주사하여 2주째부터 부분 채혈하여 혈청의 항체역가를 ELISA로 확인하였다.

#### 3) 항체생산과 채혈

실험 동물의 심장에서 채혈하여 실온에서 응고시킨 후 멸균된 목봉을 넣어 한번 회전시킨 다음 4°C에서 하룻밤 방치한 후 10,000 × g, 10~15분 원심분리하여 항혈청을 분리하였다. 분리한 항혈청은 56°C에서 30분 비동화시켜 4°C에서 보관하였다.

#### 4) 항체 역가 측정

항 혈청속에 존재하는 항체의 역가를 확인하기 위해 ELISA를 실시하였다. 먼저 96 well microplate에 *V. vulnificus* O항원의 농도를 Spectrophotometer (Shimazu)를 이용하여 흡광도 602 nm에서 O.D 0.2가 되도록 코팅 완충액으로 조정하여 100 μl씩 넣어 4°C에서 하룻밤 방

치하였다. 그리고 3% BSA가 첨가된 phosphated buffered saline tween 20 (PBST)용액을 200  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 1시간 차단하였다. 여기에 *V. vulnificus* 항혈청을 1% BSA-PBST를 사용하여 적정농도가 되도록 2배 연속 희석하여 100  $\mu$ l씩 분주하고 2시간 반응시켰다. PBST로 5분간 3회 세척한 후 anti-rabbit 혹은 anti-rat IgG alkaline phosphatase conjugate를 1% BSA-PBST로 1,000배 희석하여 100  $\mu$ l씩 넣고 2시간 반응시켰다. PBST로 5분간 3회 세척한 후 N-pNPP (Sigma)가 첨가된 기질용액을 100  $\mu$ l씩 넣고 30분 반응시켰다. 3 M NaOH를 50  $\mu$ l씩 넣어 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 면역글로불린 G의 정제

#### 1) 황산암모늄 침전

혈액에서 분리한 혈청을 Van Oss (Laemli 1970) 등의 방법에 따라 황산암모늄 분획을 실시하였다. 혈청에 미세한 황산암모늄 분말을 40% 포화시켜 4°C에서 18~24시간 방치한 후 15,000  $\times$  g, 10분 원심분리 (Sorvall, RC5C)하여 상층액을 제거하고 침전물을 pH 6.3, 0.1 M 인산완충액에 용해시켜 동일한 완충액으로 충분히 투석하였다.

#### 2) DEAE-Sephadex A-50 Ion exchange chromatography

0.1 M NaCl을 함유한 0.1 M 인산완충액 (pH 6.3)으로 충분히 평형화시킨 DEAE-sephadex A-50 column에 투석이 끝난 혈청액을 흡착시켜 동일완충액으로 씻어 내면서 용출양상을 조사하였다. 그 후 동일 완충액의 식염 농도를 0.1~0.7 M 축차구배하여 용출양상을 보았다.

#### 3) Sephadex G-150 gel filtration chromatography

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography를 하여 0.1~0.15 M NaCl 농도에서 용출된 활성부위를 황산암모늄 분말을 40% 포화시켜 4°C에서 18~24시간 방치한 후 냉동원심분리 (15,000  $\times$  g, 10분)하여 상층액을 제거하고 침전물을 pH 6.3, 0.1 M 식염을 함유한 0.0175 M 인산완충액에 용해시켜 동일한 완충액으로 충분히 투석하였다. 투석 후 동일완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-150 컬럼 (2.7  $\times$  100 cm)에 통과시켜 겔여과를 행하였다. 전개액으로는 pH 6.3, 0.1 M 식염을 함유한 0.0175 M 인산완충액을 사용하여 전개하였으며, 유속은 4 ml/hr 용출액은 3 ml씩 분획용출시켜 용출양상을 조사하였다.

### 4. 면역글로불린 G의 정제 확인

#### 1) ELISA

크로마토그래피하여 용출된 각 분획의 면역글로불린 G 활성을 측정하기 위하여 ELISA 방법을 실시하였다. 96 well microplate에 *V. vulnificus* O항원의 농도를 602 nm에서 O.D 0.2가 되도록 코팅 완충액으로 조정하여 100  $\mu$ l씩 넣어 4°C에서 하룻밤 방치하여, 상기 기술한 역가 측정법으로써 ELISA 법과 동일하게 실시하였다.

#### 2) SDS-PAGE

크로마토그래피하여 용출된 각 분획의 면역글로부린 G 활성을 측정하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다 (Laemli 1970). Gel filtration chromatography 실시상에서 나온 활성 peak인 fraction I과 fraction II분획의 활성을 비교 하기 위하여 각 분획을 전기영동하고 겔을 Coomassie로 염색하여 확인하였다.

#### 3) 항체의 *V. vulnificus* O항원에 대한 반응성 특이성

정제된 항체와 항원의 반응특이성을 확인하기 위하여 competitive ELISA를 실시하였다. 먼저 96 well microplate에 항원을 코팅 완충액으로 농도를 조정하여 100  $\mu$ l씩 넣어 4°C에서 하룻밤 방치시켰다. 차단 완충액으로 상온에서 1시간 방치한 후 0~100  $\mu$ g/ml의 농도의 inhibitor 항원과 100배 희석된 부분 정제 면역글로불린 G를 혼합하여 각 well에 100  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 2시간 반응시켰다. PBST로 5분간 3회 세척한 후 anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate를 1,000배 희석하여 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C에서 2시간 반응시켰다. 5분간 3회 세척 후 N-pNPP가 첨가된 기질용액을 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C 30분간 반응시켰다. 3 M NaOH를 50  $\mu$ l씩 넣어 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. 분리균주의 표면항원의 특성

*V. vulnificus*의 표면항원의 특성을 알아보기 위해서 다음과 같이 실시하였다.

#### 1) 균의 배양

1.5% 식염첨가 BHI 액체 배지에서 37°C 9시간 진탕배양 시킨 *V. vulnificus*를 집균한 후 PBS로 세척하고 이 균액을 다음과 같이 처리하여 사용하였다.

#### 2) Cell lysates의 제조

집균된 균체를 TEAN 완충액에 현탁시켜 sonicator (outputm 8, 30'  $\times$  10회)로 파쇄하였다. 파쇄되지 않은 균체를 4,500  $\times$  g, 20분 원심분리해서 제거하고 상층액을

사용하였다. Cell lysates의 단백질 농도는 Bradford assay 방법(Bradford 1976)으로 정량하였고 SDS-PAGE로 확인하였다.

### 3) OMP의 분석

Filip *et al.* (1973)의 방법으로 OMP를 추출하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 균주를 배양한 후 집균하여 TEAN buffer에 현탁시켜 sonicator로 균체를 파쇄하고 파쇄되지 않은 균체를 4,500 × g, 20분 원심분리로 제거하였다. 이후 얻어진 상청액을 45,000 × g, 1시간 동안 원심분리하여 막침전물(membrane protein pellet)과 상청액의 원형질 단백(cytoplasm protein)을 분리하였다. 침전물을 1% Sarcosine (C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>NNO<sub>3</sub>, Amresco)이 첨가된 TEAN buffer에 현탁시켜 37°C에서 30분간 방치하고 이것을 초원심분리기로 100,000 × g, 1시간 동안 원심분리하여 용해성 내막 단백질(soluble inner membrane protein)과 불용성 외막단백질(insoluble outer membrane protein)을 분리하였다. OMP부분을 TEAN buffer에 현탁하여 세척하였다. 분리된 OMP의 양은 Bradford법으로 정량하였고, SDS-PAGE를 행하여 Coomassie blue로써 염색하여 검출하였다.

## 6. 분리균주의 면역학적 특성

### 1) Cell lysates와 OMP의 western blotting assay

분리한 균의 cell lysates와 OMP를 SDS-PAGE를 실시한 후 이동 완충액으로 30분 동안 겔을 평형화시키고 semi-dry transfer를 사용하여 15 Volt의 전기로 20분 동안 니트로셀룰로스(nitrocellulose)막에 옮겼다. 이것을 세척 완충액(0.5% Tween-20 in Tris-buffered saline)으로 세척하고 3% BSA가 첨가된 반응 완충액으로 차단한 후 부분 정제된 면역글로블린 G와 2시간 반응시켰다. 다음 anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate와 2시간 반응시키고, Fast Red (Sigma)로 발색 시킨 후 정지하여 판단하였다.

### 2) Sandwich ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)에 의한 적정 항원 항체 농도의 측정

Sandwich ELISA를 실시하기 위한 *V. vulnificus* cell lysate 항원과 항체의 농도를 측정하였다. 먼저 부착항체의 농도를 10 µg/ml이 되도록 코팅 완충액으로 희석하여 100 µl를 96 well microplate well에 가하고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 3% BSA가 첨가된 PBST용액 200 µl로 1시간 실온에서 차단한 후 항원을 가하여 2시간 반응시켰다. 이때 항원의 농도는 0.5~100 µg/ml의 농도가 되도록 1% BSA-PBST 완충액에 희석하여 100 µl를 가

하였다. PBST로 3회 세척한 후 부분 정제된 면역글로블린 G를 1/100, 1/500, 1/1,000, 1/5,000, 1/10,000배로 각각 희석하여 100 µl씩 분주하고 2시간 동안 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후 1/10,000배로 희석한 anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate를 분주하여 2시간 반응시켰다. 여기에 기질을 가하여 반응시키고 반응을 정지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) Cell lysates의 Sandwich ELISA

부착항체(anti-*V. vulnificus* rat serum)의 농도를 10 µg/ml가 되도록 코팅 완충액에 희석하여 100 µl를 96 well microplate well에 가하고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 3% BSA-PBST로 1시간 차단하고 10 µg/ml의 농도가 되도록 항원을 1% BSA-PBST에 희석하여 100 µl씩 넣고 2시간 반응시켰다. 5분간 3회 세척 후 일차항체를 1/1,000배 희석하여 100 µl씩 넣고 2시간 반응시켰다. 세척 후 anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate를 1/10,000배 희석하여 100 µl씩 넣고 2시간 반응시켰다. 세척 후 N-pNPP용액을 100 µl씩 넣어 30분간 반응시키고 3 M NaOH를 넣어 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

### 1. 항혈청 역가 측정

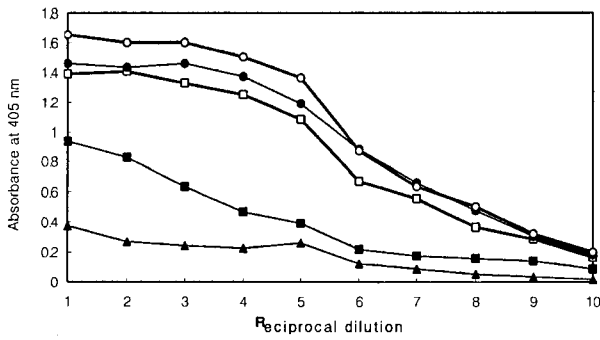
부착항체와 면역글로블린 G 정제를 위한 항체 생산시 역가 측정은 O항원과 항체의 반응을 ELISA법으로 측정하였다. 부착항체를 위한 rat 항혈청의 경우는 3주째부터 역가가 증가하여 1:3,200까지 증가하였으며(Fig. 1), 면역글로블린 G 정제를 위한 rabbit의 항혈청의 항체의 역가는 5주째부터 증가가 현저히 나타나 1:12,800까지 증가하였다(Fig. 2).

### 2. 면역글로블린 G의 정제

#### 1) DEAE-sephadex A-50 column chromatography

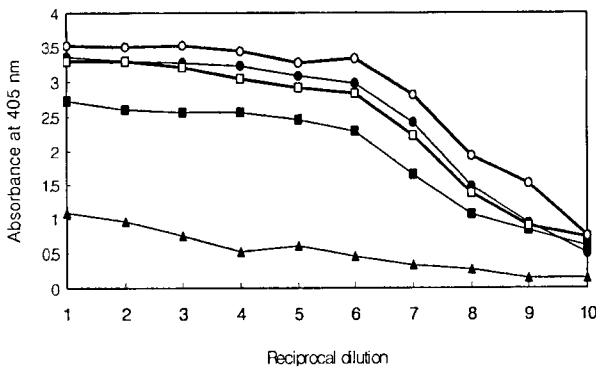
혈청을 DEAE-sephadex A-50 컬럼(1.7 × 30 cm)에 흡착시켜 이온교환크로마토그래피를 실시하였다. 면역글로블린 G의 활성부분은 0.1 M~0.015 M 식염농도 부근에서 나타났으며, 그 용출형태는 Fig. 3에 나타나 있다. 따라서 면역글로블린 G 활성을 나타내는 fraction No. 15~35을 혼합하여 다음 정제과정에 사용하였다.

#### 2) Sephadex G-150 gel filtration chromatography DEAE-sephadex A-50 ion exchange chromatography



**Fig. 1.** Antibody production of rat antisera against *V. vulnificus* ATCC 27562 O antigen by ELISA.

- ▲: normal rat serum
- : 7 days serum after injection (1/4 fold dilution)
- : 14 days serum after injection (1/10 fold dilution)
- : 21 days serum after injection (1/50 fold dilution)
- : 28 days serum after injection (1/100 fold dilution)



**Fig. 2.** Antibody production of rabbit antisera against *V. vulnificus* ATCC 27562 O antigen by ELISA.

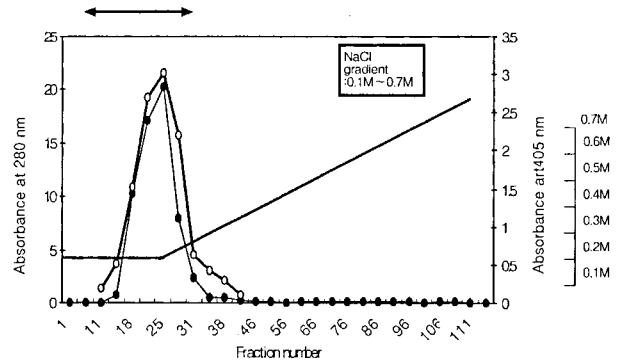
- ▲: normal rat serum
- : 21 days serum after injection (1/4 fold dilution)
- : 28 days serum after injection (1/10 fold dilution)
- : 35 days serum after injection (1/50 fold dilution)
- : 40 days serum after injection (1/100 fold dilution)

하여 모든 활성부분을 2.6×100 cm의 G-150컬럼에 겔 여과를 실시하였다. 단백질 활성 peak와 면역글로불린 G의 활성 peak는 일치하였으며, fraction No. 21~29을 모아 fraction I로 그리고 fraction No. 31~45를 fraction II로 하여 그 활성을 비교하였다. 용출 형태는 Fig. 4에 나타내었다.

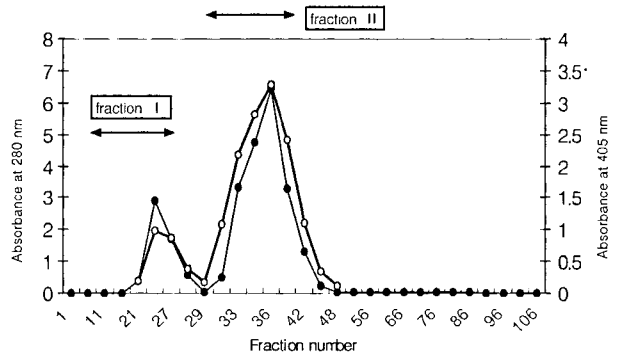
### 3. 면역글로불린 G의 정제 확인

#### 1) ELISA

크로마토그래피에서 용출된 각 분획의 면역글로불린 G 활성은 ELISA방법을 실시하여 알아보았다. 용출된 각



**Fig. 3.** DEAE-sephadex A-50 column chromatography of rabbit antisera against *V. vulnificus* ATCC 27562 O antigen. Fractions were assayed for antibody activity and for A<sub>280</sub>. Symbols: (●), protein concentration A<sub>280</sub>; (○), antibody activity in ELISA; the bar (↔) indicates the fractions concentrated for further purification.



**Fig. 4.** Sephadex G-150 gel filtration chromatography of DEAE-sephadex A-50 fraction. Fractions were assayed for antibody activity and for A<sub>280</sub>. Symbols: (●), protein concentration A<sub>280</sub>; (○), antibody activity in ELISA; the bar (↔), indicates the fractions concentrated for further purification.

분획의 단백질 활성과 면역글로불린 G 활성이 동일한 peak를 보였으며 (Figs. 3, 4), 특히 gel filtration시 용출된 fraction II에서 현저히 높은 활성을 확인할 수 있었다.

#### 2) SDS-PAGE

토끼의 항혈청의 sephadex-150 컬럼의 활성부위 분획을 전기영동한 결과 fraction II에서 면역글로불린 G의 H쇄와 L쇄에 해당하는 분자량 51 kDa와 23 kDa의 2개의 밴드가 각각 분리되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 또, 각 정제단계에서 모든 활성부위 즉 DEAE-sephadex ion column chromatography에서 나온 활성부

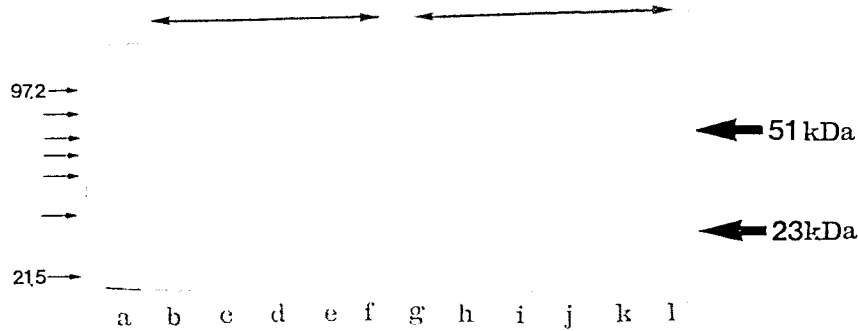


Fig. 5. SDS-PAGE of sephadex G-150 gel filtration column chromatography peak fractions. Lane a: Molecular weight marker (Promega mid range), lane b: fraction number 21, lane c: 23, lane d: 25, lane e: 27, lane f: 29, lane g: 31, lane h: 33, lane I: 35, lane j: 37, lane k: 39, lane l: 41 kDa The bar (→) indicates moelcular weight marker, the bar (←) indicates H chain and L chain of immunoglobulin G, the bar (↔) indicates the fractionI and fraction II.

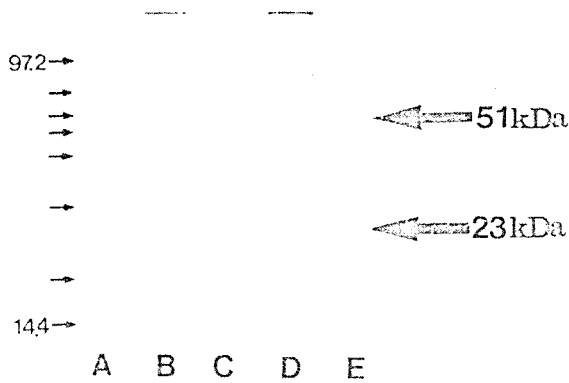


Fig. 6. SDS-PAGE of purified rabbit IgG to the *V. vulnificus* ATCC 27562 O antigen. Lane A: Molecular weight marker (Promega mid range), lane B: After ammonium sulphate precipitation, lane C: After DEAE-Sephadex A-50 chromatography, lane D: Fraction I, lane E: Fraction II; The bar (→) indicates molecular weight marker, the bar (←) indicates H chain and L chain of immunoglobulin G.

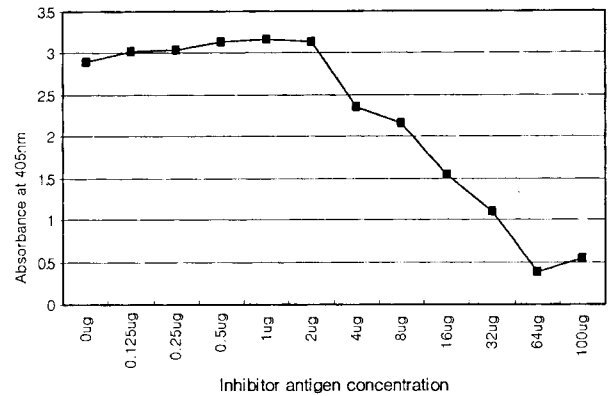


Fig. 7. A competitive ELISA for detection of *V. vulnificus* ATCC 27562 O antigen with purified rabbit IgG.

위와 sephadex G-150 gel filtration에서 나온 fraction과 fraction II를 각각 농축시켜 전기영동한 결과에서도 마찬가지로 fraction II에서 면역글로불린 G가 정제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 6)

3) 항원과 항체의 반응 특이성

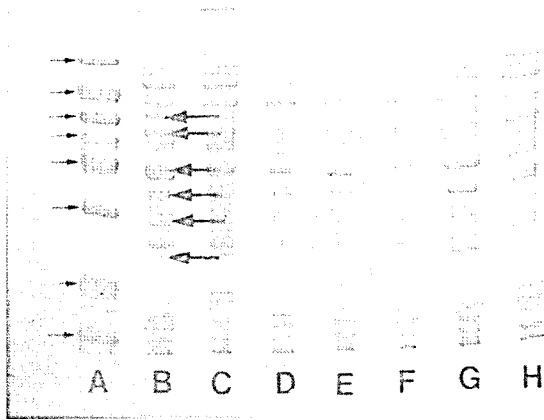
부분 정제된 면역글로불린 G를 이용한 *V. vulnificus* 해양분리주의 면역학적 특성 규명시험에 사용하기 위해 항원과의 반응특이성을 competitive ELISA를 실시하였다(Fig. 7). 정제된 면역글로불린 G와 항원과의 반응성은 항원의 농도가 2μg까지는 반응성이 낮았으며, 4μg부

터는 inhibitor antigen의 양에 비례하여 부착된 항원과 항체의 반응성을 저해하는 것으로 나타나 항원과 정제된 면역글로불린 G의 반응특이성을 확인할 수 있었다. 그리고 64 μg 이상이 되면 포화상태가 되는 것으로 나타나 항원 4~64 μg에서 면역글로불린 G와의 반응성이 특이적임을 확인할 수 있었다.

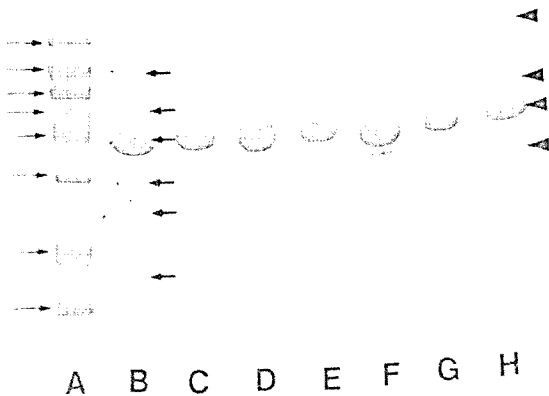
4. 분리균주의 표면항원의 특성

1) Cell lysates의 SDS-PAGE

해양에서 분리된 *V. vulnificus*의 cell lysates를 SDS-PAGE를 행하여 coomassie stain으로 단백밴드를 확인하였다(Fig. 8). 표준균주로 사용된 *V. vulnificus* ATCC 27562와 serotype 03 균주, 해양에서 분리한 균주의 단백밴드의 profile을 비교하였다. 대조균으로 사용된 *V. parahaemolyticus*와 비교될 수 있는 54, 48, 36, 33, 30,



**Fig. 8.** SDS-PAGE profiles of cell lysates of *V. vulnificus* isolates. Lane A; Molecular weight marker (Promega mid range), lane B; *V. vulnificus* ATCC 27562, lane C; *V. vulnificus* 03 strain, lane D~lane G; *V. vulnificus* isolates, lane H; *V. parahaemolyticus*: The bar (→) indicates molecular weights as follows: 97.4 kDa, 66.2 kDa, 55.0 kDa, 42.7 kDa, 40.0 kDa, 31.0 kDa, 21.5 kDa, 14.4 kDa: The bar (←) indicates common protein band of *V. vulnificus*. Estimated molecular weights are as follows; 54, 48, 36, 33, 30, 26 kDa.



**Fig. 9.** SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins of *V. vulnificus* isolates. Lane A; Molecular weight marker (Promega mid range), lane B; *V. vulnificus* ATCC 27562, lane C; *V. vulnificus* 03 strain, lane D~lane G; *V. vulnificus* isolates, lane H; *V. parahaemolyticus*: The bar (→) indicates molecular weights as follows: 97.4 kDa, 66.2 kDa, 55.0 kDa, 42.7 kDa, 40.0 kDa, 31.0 kDa, 21.5 kDa, 14.4 kDa: The bar (←) indicates common protein band of *V. vulnificus*. Estimated molecular weights are as follows; 64, 48, 36, 30, 26, 18 kDa; The symbol (▶), indicates common protein band of *V. parahaemolyticus*.

26 kDa 단백질 밴드 등을 *V. vulnificus* 공통 밴드로 확인할 수 있었으며, *V. parahaemolyticus*에는 105, 40, 34, 38 kDa의 단백질 밴드가 확인 되었다.

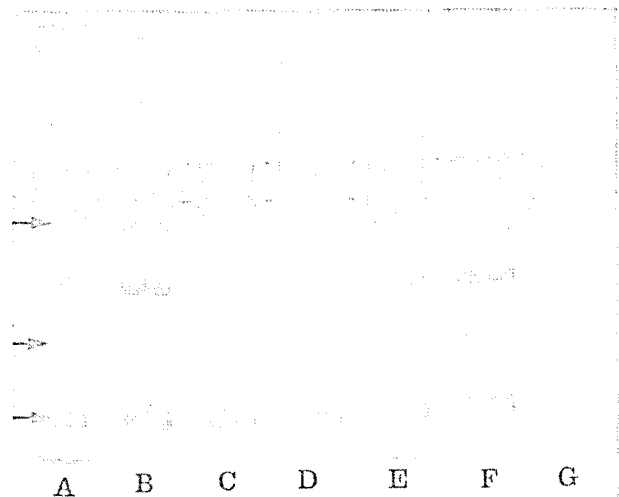
2) OMP의 SDS-PAGE

1.5%의 NaCl이 첨가된 BHI배지에서 37°C, 9시간 진탕배양시킨 세균을 집균하여 초음파처리하여 세포를 파괴한 후 1% Sarcosine으로 OMP만을 얻었다. 4% stacking gel과 15% running gel을 사용하여 전기영동을 실시한 후 coomassie stain으로 확인하여 (Fig. 9). *V. vulnificus*의 공통 단백질 밴드로는 주밴드인 36 kDa 밴드를 중심으로 그 외 64, 48, 30, 26, 18 kDa 밴드 등을 확인하였다. 이와는 달리 *V. parahaemolyticus*의 경우에는 105, 50, 40, 34 kDa 등의 주밴드가 뚜렷하지 않은 5~6개의 OMP 밴드를 가져 *V. vulnificus*와는 다른 양상을 보였다.

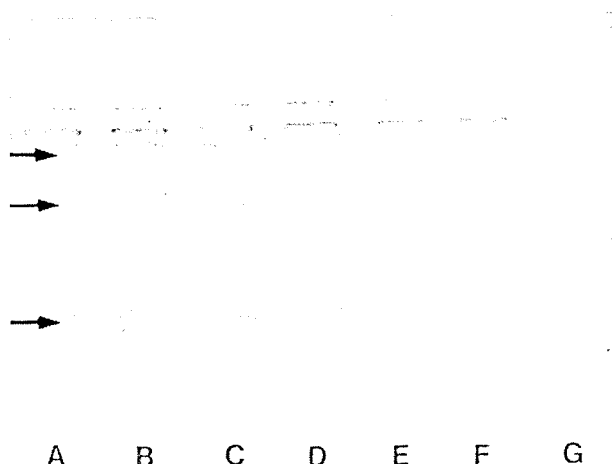
5. 분리균주의 면역학적 특성

1) Cell lysates의 western blotting

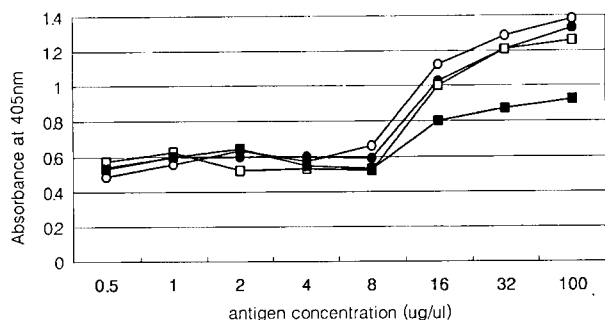
분리한 균의 cell lysates를 SDS-PAGE를 실시한 후 정제된 면역글로부린 G로 western blotting을 실시하였다 (Fig. 10). 면역글로불린 G와 반응을 보이는 밴드로는 66, 58, 54, 48, 36, 33, 26, 14 kDa 등의 비교적 많은 수가 반응성을 보였으며, 그 중에서 *V. vulnificus*에 공통적으로 나타나는 특이항원으로는 54, 36, 26 kDa 등을 볼 수



**Fig. 10.** Western blotting of cell lysates of *V. vulnificus* isolates with purified rabbit IgG. Lane A; *V. vulnificus* ATCC 27562, lane B; *V. vulnificus* 03 strain, lane C~lane F; *V. vulnificus* isolates, lane G; *V. parahaemolyticus*: The bar (→) indicates specific antigen of *V. vulnificus*: Molecular weights as follows: 54 kDa, 36 kDa, 26 kDa.



**Fig. 11.** Western blotting of outer membrane proteins of *V. vulnificus* isolates with purified rabbit IgG. Lane A; *V. vulnificus* ATCC 27562, lane B; *V. vulnificus* 03 strain, lane C~lane F; *V. vulnificus* isolates, lane G; *V. parahaemolyticus*: The bar (→) indicates specific antigen of *V. vulnificus*: Molecular weights as follows: 97.4 kDa, 36 kDa, 26 kDa.



**Fig. 12.** Titer of *V. vulnificus* ATCC 27562 O antigen and purified rabbit IgG concentration by sandwich ELISA. Symbol (○), 1/100 dilution of purified rabbit IgG; (●), 1/500 dilution of purified rabbit IgG; (□), 1/1,000 dilution of purified rabbit IgG; (■), 1/5,000 dilution of purified rabbit IgG.

있었다.

2) OMP의 western blotting

분리한 균의 OMP를 분리하고 이를 전기영동한 후 정제된 면역글로불린 G로 western blotting을 실시하였다 (Fig. 11). 강한 반응성을 나타내는 항원으로 66, 58, 54, 36, 26 kDa 등을 확인할 수 있었으며, 97.4, 36과 26 kDa 등이 *V. vulnificus*에 특이적인 항원으로 확인되었다.

**Table 1.** Sandwich ELISA of cell lysates total proteins of several *V. vulnificus* isolates with purified rabbit IgG

Strains	A405 nm	Relative cross reaction
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	1.244	100%
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	0.777	62%
<i>V. vulnificus</i> isolates A	0.655	53%
<i>V. vulnificus</i> isolates B	0.728	59%
<i>V. vulnificus</i> isolates C	0.793	64%
<i>V. vulnificus</i> isolates D	0.893	72%
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0.182	15%

3) Sandwich ELISA 적정 항원 항체 농도의 측정  
정제된 면역글로불린 G와 해양에서 분리한 균의 면역학적 반응성을 ELISA법으로 알아보기 위하여 표준균주인 *V. vulnificus* ATCC 27562 cell lysates에 대한 항원, 항체의 적정 농도를 측정하여 보았다 (Fig. 12). 그 결과, 항원은 8~16 µg/ml의 농도가 적정농도로 측정되었으며, 정제된 면역글로불린 G는 1/1,000배 희석배수가 적정농도로 측정되어 이후 실험에서는 항원의 농도를 10 µg/ml, 항체는 1/1,000배를 사용하였다.

4) Cell lysates의 sandwich ELISA

정제된 면역글로불린 G를 일차항체로 하여 해양에서 분리한 *V. vulnificus* 균주에 대한 sandwich ELISA를 실시하여 그 반응성을 알아보았다 (Table 1). 표준균주에 대한 반응성을 100%로 했을 경우 해양 분리균주는 50~70%의 반응성을 보였으며, 대조균주인 *V. parahaemolyticus*의 경우는 15%로 현저한 차이를 보였다.

고 찰

*V. vulnificus*는 호염성 *Vibrio*균 중에서 경구감염인 원발성 패혈증과 비경구감염인 창상감염을 일으키는 균으로 알려져 있다. *V. vulnificus*에 의한 원발성 패혈증은 간 및 담도계 질환 환자나 간기능이 저하되어 있는 환자 혹은 당뇨병 등으로 면역기능이 저하되어 있는 환자가 오염된 해산물을 생식한 경우에 주로 발생하며 창상감염은 외상이 있는 사람이 바닷물이나 갯벌 등의 침사물과 접촉했을 때 주로 피부 병변의 형태로 발병한다. 패혈증은 급속하게 진행하며 50~80%의 높은 치사율을 보이고 있어 여러 연구자들에 의해 역학적 분리조사, 독성물질 규명, 생리적 성질조사, 패혈증의 병인론 등 다방면에서 연구가 활발히 진행되고 있다 (김 등 1985; 조 1986).



국내에서는 주로 원발성 패혈증이 보고되고 있으며, 장상감염에 대한 보고는 드물다. *V. vulnificus*의 패혈증은 우리나라의 지리적 조건상 해산물의 소비가 많고 해수의 접촉기회가 많아 그 임상상이 대중매체를 통해 보도되면서 하절기의 중요한 보건 및 사회문제로 대두되고 있다(김 등 1985; Chin *et al.* 1987). *V. vulnificus*를 검출하기 위한 방법들로는 증균배지에 증식시킨 후 선택배지에 도말하여 특징적인 집락을 취하여 각종 생화학 검사를 실시하는 방법이 보편적으로 사용되고 있다. 사용되는 선택배지로는 TCBS 한천배지, SPS 한천배지, VV 한천배지, CPC 한천배지 등이 있다(Testa *et al.* 1984). 그외에 23S rRNA 유전자에 대한 nested PCR방법이나, cytotoxin-hemolysin 유전자에 대한 PCR방법, 항혈청을 사용하는 immunoassay방법 등이 소개되고 있다(Brauns *et al.* 1991; Arias *et al.* 1995).

이번 연구에서 저자는 해양으로부터 TCBS 한천배지로 일차선택 분리하고 API 20E kit와 생화학 검사로 동정한 *V. vulnificus* 해양 분리주들에 대한 면역학적 특성을 알아보고 이를 바탕으로 *V. vulnificus*의 검출가능성을 타진해 보았다. 먼저 표준균주인 *V. vulnificus* ATCC 27562를 면역하여 얻은 토끼 항혈청으로부터 면역글로불린 G를 부분정제하여 면역학적 특성 규명에 사용하였으며, 정제된 면역글로불린 G로 *V. vulnificus* 해양 분리주의 표면항원과의 면역학적인 반응성을 조사하였다. 또, *V. vulnificus* 해양 분리주의 cell lysates와 OMP, LPS등을 각각 분리하여 electrophoretic analysis를 시행하여 그 특성을 알아 보았다.

분리된 균주의 생화학적 성질은 표준균주인 *V. vulnificus* ATCC 27562와 비슷한 양상을 보였으며, API 20E kit에서도 93% 이상의 동정률을 확인할 수 있었다. 표준균주인 *V. vulnificus* ATCC 27562로써 O항원을 제조하고 이를 토끼에 면역하여 얻은 항혈청으로부터 면역글로불린 G의 부분정제를 시행하였다. 황산암모늄 침전, DEAE-sephadex A-50 column chromatography와 sephadex G-150 gel filtration과정을 거쳐 면역글로불린 G는 정제되었으며, Ouchterlony test와 전기영동, 그리고 competitive ELISA를 시행하여 면역글로불린 G의 정제와 항원과의 반응성을 확인하였다.

면역글로불린 G의 정제에 있어서 이온교환크로마토그래피에서 면역글로불린 G는 컬럼 통과후 처음에 용출되는데(Kreger *et al.* 1984), 본 실험 결과도 Fig. 3과 같이 이와 일치하였으며 겔의 비흡착 부분에서 용출되는 성질은 Arias *et al.* (1995)의 연구 결과와 또한 상응하였다.

이온교환에서 나온 하나의 peak의 분획만을 모아서

겔 여과한 결과 2개의 정상부위가 얻어졌다. 1974년 Spiegelberg에 의하면 토끼는  $\gamma 2G$ 와  $\gamma 1G$ 의 2개의 subclass를 가진다고 하였다(Spiegelberg 1974). 본 실험에서는 겔여과후 2개의 정상부위가 나누어지는 것은 subclass에 의한 것으로 여겨졌으나, Ouchterlony test와 환원제 처리하여 SDS-PAGE 전기영동한 결과에서 fraction II에서 보다 높은 활성이 보이고 fraction II에서 보다 정확하게 H쇄와 L쇄로 분리되는 것으로 보여 fraction II만을 모아 이후의 면역글로불린 G로하여 실험을 행하였다. *V. vulnificus* 해양 분리주의 cell lysates와 OMP, LPS 등을 각각 분리하고 이의 electrophoretic analysis를 실시하기 위해 SDS-PAGE 전기영동을 실시하고 profiles을 분석하였다. *V. vulnificus* 해양 분리주의 cell lysates의 SDS-PAGE 전기영동 profiles 분석에 의하면 54, 48, 36, 33, 30, 26 kDa 등의 공통밴드를 가졌으며, 대조균으로 사용된 *V. parahaemolyticus*와는 다른 형태의 pattern을 보였다. OMP의 전기영동 profiles 분석 결과는 cell lysates의 결과와 유사하였으며 보다 뚜렷한 차이를 볼 수 있었다. *V. vulnificus*의 특징인 36 kDa major 밴드가 표준균주와 해양분리주에 공통적으로 존재하였으며 그 외 4~5개의 공통 밴드가 확인되었다. 이에 반해 *V. parahaemolyticus*의 OMP는 하나의 뚜렷한 major 밴드가 아닌 5~6개의 OMP 밴드가 확인되어 *V. vulnificus*와 구별되는 특징으로 볼 수 있었다.

표준 균주에 의해 토끼혈청에서부터 정제된 면역글로불린 G를 사용하여 해양분리주에 대한 western blotting assay와 sandwich ELISA를 실시하였다. 분리균의 cell lysates와 OMP를 SDS-PAGE 전기영동하고 western blotting을 실시한 결과 *V. vulnificus*에 특이적으로 반응을 보이는 항원으로 54, 33, 26 kDa 등을 확인할 수 있었다. 물론 66, 60, 48, 46, 44 kDa 등의 단백질도 면역반응을 유발시켜 정제된 면역글로불린 G와의 반응성을 보였으나 *V. vulnificus* ATCC 27562에 한정되고 모든 해양분리주에 공통적인 반응은 아니었다.

정제된 면역글로불린 G와 다른 *Vibrio*종에 대한 면역학적인 교차반응을 알아보기위해 cell lysates에 대한 western blotting assay를 실시한 결과 균에 따라서 반응을 보이는 항원에는 각기 차이를 보였으며, 이의 비교 결과에서 *V. vulnificus*종 특이성을 보이는 26 kDa를 확인할 수 있었다.

Sandwich ELISA 방법을 실시하여 *V. vulnificus* 해양 분리주와 정제된 면역글로불린 G의 면역학적 반응성을 측정 한 결과 표준균주에 대한 반응성을 100%로 했을 경우 다른 *Vibrio* 종은 15% 미만의 교차반응을 보였고 50~70%의 상당히 높은 반응성을 보였다.

본 연구에서 저자는 *V. vulnificus* 해양 분리주의 electrophoretic analysis를 실시하고, 면역학적인 특성을 규명하여 이를 바탕으로한 혈청학적인 진단에 도움이 되고자 하였다. Electrophoretic analysis에서 비교적 뚜렷한 차이를 보이는 것은 OMP를 SDS-PAGE 전기영동한 profiles의 비교이지만 균을 배양하고 OMP를 추출한 후 전기영동을 해야하므로 신속한 동정법으로 사용하는 것은 힘들것으로 생각된다. 그러나, 균을 동정, 검출 한다고 하는 것은 간단하고 쉬운 것은 아니며, 한가지 실험방법과 하나의 결과로 확증할 수는 없다고 사료되었다. 그러므로 본 연구 결과는 보다 정확한 동정을 위한 참고자료로 검토될 수 있으리라 사료된다. 계속하여 특이성이 높은 항혈청을 개발하거나 중 특이 표면항원에 대한 임상학적인 연구가 지속되어야 할 것으로 사료되었다.

## 인 용 문 헌

- 김학경, 최우영, 이수택, 안관용, 백홍신, 안득수, 이춘희, 박수정. 1985. *Vibrio vulnificus* 패혈증 3예. 대한의학협회지. 28:773-780.
- 조남중. 1986. *Vibrio vulnificus* 국내 감염증의 역학 및 임상상, 1983년에서 1985년 사이에 균배양검사로 확인된 예. 대한의학협회지. 29:69-77.
- 주진우. 1987. *Vibrio vulnificus* 백신제조원의 혈청형 균주의 분리. 대한미생물 학회지. 22:339-402.
- 주진우, 김 일. 1985. *Vibrio vulnificus*에 관한 연구: 한국 동해안 일대의 해수 및 해산물에서 *Vibrio vulnificus*의 분리. 부산대학교 자연과학대학 논문집. 40:215-226.
- Arias CR, E Garay and R Aznar. 1995. Nested PCR method for rapid sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediment, and water. Appl Environ Microbiol. 61:3476-3578.
- Barhani KF and JD Oliver. 1991. Electrophoretic analysis of lipopoly saccharide isolated from opaque and translucent colony variants of *Vibrio vulnificus* using various extraction methods. Microbios. 66:83-93.
- Biosca EG, C Esteve and C Amaro. 1991. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eels (*Anguilla anguilla*). J. Fish Dis. 14:103-109.
- Biosca EG, E Garay and AE Toranzo. 1993. Comparison of outer membrane profiles of *Vibrio vulnificus* biotype 1 and 2. FEMS Microbiol Lett. 107:217-222.
- Blake PA, H Merson and RE Weaver. 1979. Disease caused by a marine *Vibrio*: clinical characteristics and epidemiology. N. Engl. J. Med. 300: 1-5.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Brauns LA, MC Hudson and JD Oliver. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. Appl Environ Microbiol. 57:2651-2655.
- Chin KP, MA Lowe and MJ Tong. 1987. *Vibrio vulnificus* infection after raw oyster ingestion in a patient with liver disease and acquired immune deficiency syndrome-related complex. Gastroenterology. 92:796-799.
- Dilip K Sengupta, Tapas K Sengupta and Asoke C Ghose. 1992. Major outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* and their role in induction of protective immunity through inhibition of intestinal colonization. Infect Immun. 60:4848-4855.
- Filip, Fletcher CG, Wulff JL and CF Earhart. 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent : sodium lauroyl sarcosinate. J. Bacteriol. 15:171-177.
- Gautam KS, C Rukhsama and P Jyotirmoy. 1994. Heat shock response and heat shock protein antigens of *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 60: 5624-5631.
- Hollis DG, RE Weaver and CN Baker. 1976. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. J. Clin. Microbiol. 3:425-431.
- Kreger A, L Dechatelet and P Shivley. 1981. Interaction of *Vibrio vulnificus* with human polymorphonuclear leukocyte association of virulence with resistance to phagocytosis. J. Infect. Dis. 144:244-248.
- Kreger AS, JM Gaskin and J Testa. 1984. Production of mice against *Vibrio vulnificus* disease by vaccination with surface antigen preparation and antisurface antigen antisera. Infect. Immun. 45:537-543.
- Laemli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
- Miyosh N, C Shimizu and S Miyoshi. 1987. Purification and characterization of *Vibrio vulnificus* protease. Microbiol. Immunol. 31:13-25.
- Oliver JD, JE Wear and MB Hemas. 1986. Production of extracellular enzyme and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. Diag. Microbiol. Infect Dis. 5:99-111.
- Simpson LM and JD Oliver. 1983. Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun. 41:644-649.
- Spiegelberg HL. 1974. Biological activities of immunoglobulins of differnt classes and sub classes. Advan. Immunol. 19:259-267.
- Stelma GN Jr, AL Reyes and JT Peeler. 1992. Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. 58:2776-2782.

Testa J, LW Daniel and AS Kreger. 1984. Extracellular phospholipase A2 and lysophospholipase in *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 45:458-463.

Wright AC, GA Miceli and WL Landy. 1993. Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on selective media with an

alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:707-711.

(Received 9 November 2001, accepted 1 December 2001)