

## 부루세라 RB51의 ELISA 진단법 개발 II. *Brucella abortus* RB51 균의 8 kDa 항원 정제 및 ELISA 진단법 개발

허 문 · 조동희 · 정병열 · 조성근 · 정석찬 · 김옥경

국립수의과학검역원 세균과  
(2000년 12월 4일 게재승인)

### Development of ELISA for *Brucella abortus* RB51 II. Purification of 8 kDa antigen and development of ELISA using its antigen of *Brucella abortus* RB51

Moon Her, Dong-hee Cho, Byeong-yeal Jung, Seong-kun Cho  
Suk-chan Jung and Ok-kyung Kim

Bacteriology and Parasitology Division, National Veterinary Research and Quarantine Services  
(Accepted by December 4, 2000)

**Abstract :** A procedure for extraction and purification of 8 kDa antigen of *Brucella abortus* RB51 was developed. Bacteria heat inactivated at 60°C, 30 min was extracted by 1% sarcosine and followed by fluid pressure liquid gel filtration chromatography of 2 series, Superose 12 HR 10/30 and Sephacryl S-100. There was produced 71.46 µg/g(wet) of 8 kDa antigen, and it resisted 1% trypsin, solved 1% triton X-100 higher than distilled water and inactivated 0.1% proteinase K. These results show that 8 kDa antigen may be a lipoprotein existed cell surface of *B. abortus* RB51. Also, we developed ELISA using purified 8 kDa surface antigen of *Brucella abortus* RB51 strain, its specificity and sensitivity was 95.0%, 98.6%, respectively. As compared with dot-blot assay using whole cell and ELISA using 8 kDa antigen, its correlation was 93.5%.

**Key words :** *Brucella abortus*, RB51, 8 kDa antigen, lipoprotein, ELISA

## 서 론

소 부루세라병은 암소에서 유산 및 수소에서 고환염, 전립선염 등 번식장애를 일으키는 전염성 질병으로 가축 뿐만 아니라 사람에도 감염되어 파상열, 관절염, 오한 등을 일으키는 인수공통질병으로서 공중위생상 매우 중요하기 때문에 전세계적으로 많은 연구가 진행되고 있다<sup>1,2</sup>.

소 부루세라병은 국내에서 1955년 도입 젖소에서 혈청학적 검사 결과 양성우가 처음으로 검색되었으며, 그 이듬해인 1956년에 병원균 분리가 이루어져 본 병의 발생이 확인된 후 우리나라에서는 이 전염병을 가축의 법정전염병으로 지정하고 가축전염병 예방법, 동법 시행

령 및 시행규칙, 결핵병 및 부루세라 방역실시요령에 의하여 부루세라병 검색 및 양성우 살처분 등의 방제대책을 수립하여 시행하고 있다<sup>3,5</sup>. 하지만 최근 들어서 전국적으로 질병발생이 만연되고 있어 방역당국에 심각한 우려를 자아내고 있다.

부루세라병 근절을 위해 세계 여러 나라에서는 혈청학적 검사 후 양성우 살처분 방법과 부루세라병 예방을 위해 생후 4-12개월령의 소에 백신 등을 접종하는 방법을 선택하여 사용하고 있지만 부루세라 균은 잠복기가 길고, 숙주 세포내 기생하는 세균으로 예방 및 치료가 어렵고, 혈청학적으로 자연감염우와 예방접종우와의 감별이 어렵기 때문에 효과적인 근절대책을 수립하기가 어려운 실정이다<sup>4,6-8</sup>.

최근들어 미국 등 외국에서는 lipopolysaccharide O-side chains이 결손된 *B. abortus* strain 2308의 rough mutant 인 *B. abortus* strain RB51을 이용한 생균백신을 개발하여 부루세라병 예방에 사용하고 있으며 국내에서도 이를 적용하고 있다<sup>9-15</sup>. *B. abortus* RB51 백신에 의한 항체는 주로 부루세라 lipopolysaccharide(LPS)에 대한 항체를 검사하는 기존 방법 즉, 우유유회환반응법(Milk ring test), 로즈벵갈평판응집반응법(Rose Bengal plate test), 표준평판응집반응법(standard plate agglutination test), 표준시험관응집반응법(standard tube agglutination test) 및 보체결합반응법(complement fixation test) 등에서는 검색되지 않아 자연 감염우와 감별된다는 특징을 가지고 있어 다른 백신과 구분된다<sup>12,14,16-19</sup>.

RB51 백신의 효용성을 제고하기 위한 혈중 항체가를 측정하는 방법으로 균체 항원을 이용한 dot-blot assay 법을 사용하고 있으나<sup>20-22</sup> 이 검사법은 항원으로서 균체(whole cell)을 이용하기 때문에 비특이 반응이 비교적 많고 여기에 사용하는 nitrocellulose paper(NC)은 그 종류가 매우 다양하고 단백질류에 대한 흡착성도 많은 차이를 보인다. 따라서 이 검사법은 NC paper의 종류에 따라 conjugate의 농도, substrate의 종류 및 반응시간에 매우 민감하게 반응하여 진단방법의 설정이 어렵고 다른 실험실간의 결과에 차이를 보일 수 있어 RB51 백신의 진단법으로 보편적으로 사용하는데는 문제점을 가지고 있다.

따라서 본 연구는 *B. abortus* RB51의 항원분석을 바탕으로 기존의 dot-blot assay 법을 대체할 수 있는 ELISA 진단법을 개발하기 위해 주 면역원성 물질중의 하나인 8 kDa 항원을 정제하는 기법을 확립하고 정제된 항원의 성상을 분석하였으며 정제항원을 이용하여 부루세라 RB51 백신의 효율적인 항체검사법을 개발함으로써 주요 인수공통전염병의 하나인 부루세라병의 조기근절에 정책적 유용성을 제고하고 질병의 근절을 통한 농가의 생산성 향상에 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

8 kDa 항원 정제를 위해 사용된 균주는 미국 NVSL(national veterinary services laboratory)에서 분양받은 *B. abortus* RB51 strain를 이용하였다.

### 균 배양 및 회수

공시균주를 10% bovine serum이 함유된 부루세라 한천배지에 접종한 다음 candle jar에 36~48시간 종균 배양한 다음 같은 배지에 36~48시간 호기상태로 종균 배

양하였다. 배양한 균은 plate 당 0.15M phosphate buffered saline(PBS) 10 ml을 넣어 회수한 다음 6,000×g, 30분간 3회 원심세척하여 회수하였으며 최종 0.5 g(wet)/ml로 부유시켜 항온수조에서 65°C, 30분간 처리하여 사멸시켰다.

### 항원 추출 및 농축

사멸 처리된 균부유액에 2% sarcosine 용액을 동량 첨가하여 37°C 진탕항온수조에서 30분간 균체 표면항원을 추출한 다음 20,000×g, 30분 원심침전하여 상층액을 회수하였다<sup>23</sup>. 상층액에 1% trypsin(1:250, Difco)을 용량의 1/10로 첨가하여 진탕항온수조에 37°C, 30분간 반응시켜 단백질류를 분해하고 여기에 proteinase inhibitor(0.5M EDTA 4 ml, 50 mM 1, 10-phenanthroline 2 ml, 1M 2-mercaptoethanol 2 ml/L)을 첨가한 다음 0.45 μm 여과하여 sarcosine soluble, trypsin resistant 항원을 추출하였다. 추출된 항원에 ammonium sulfate을 75% 수준으로 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고 3000×g, 30분 원심한 다음 모세피펫을 이용하여 하층액을 조심스럽게 모두 제거하고 0.5% Triton X-100이 함유된 0.15M PBS을 조금씩 첨가하여 상층액을 완전히 녹여 항원을 농축시킨다.

### 겔펄크로마토그래피

FPLC system을 이용한 gel filtration column으로 균체 표면에서 추출된 항원으로부터 8 kDa 항원을 순수분리, 정제하였다. 추출된 항원을 0.1% Triton X-100이 함유된 0.15M PBS로 안정화 된 Superose 12 HR 10/30 column(Pharmacia, Sweden)에 1.0 ml/을 주입하여 유속 0.5 ml/min으로 column을 통과시켜 254 nm에서 흡광도를 측정 하면서 1.0 ml 씩 분액하였고, 각각의 분액을 15% SDS-PAGE 하여 8 kDa 항원이 함유된 분획을 회수하였다.

직경 15 mm, 길이 1200 mm의 빈 column(Amicon)에 Sephacryl S-100 resin(Pharmacia, Sweden)을 충전하여 column을 만들고 0.1% Triton X-100이 함유된 0.15M PBS로 안정화시킨 후 여기에 Superose 12 column에서 분획된 8 kDa 항원이 함유된 분액 2.0 ml/을 주입하여 유속 2.0 ml/min으로 column을 통과시켜 여기에 함유된 이물질들을 제거하여 8 kDa 항원을 순수 정제하였다. 정제된 항원을 15% SDS-PAGE로 전개하여 silver stain과 Western blot으로 항원의 순수성과 특이성을 확인하였다.

### 전기영동(SDS-PAGE)

*B. abortus* 항원분석을 위해 초음파 파쇄된 항원을 Lameli 법<sup>24</sup>에 준하여 15% SDS-PAGE gel을 100V에서 1시간 동안 전기영동을 실시한 다음 Coomassie blue R-250 또는 silver stain kit(Sigma Co.)로 염색하여 전개된

항원을 분석하고 Standard molecular weight marker (Sigma Co.)와 비교하여 항원의 분자량을 산출하였다.

### Western blot

Winston & Fuller<sup>25</sup>에 따라 SDS-PAGE에 의해 분리된 *B. abortus* sonicated 항원을 함유한 gel을 electroblotting buffer(20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM glycine, 20% methanol) 내에서 nitrocellulose membrane에 1.0A로 3~4시간 동안 전사하였다. Toxin 분획들이 전사된 NC membrane을 PBS(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.23 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g, NaCl 9.0 g/L, pH 7.2)로 2회 세척한 후, blocking buffer(1% skim milk in PBS)에 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후 PBS로 3회 세척하고 여기에 RB51 양성혈청 또는 야외 부루세라 양성혈청을 blocking buffer로 100배 또는 10,000배 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 PBS를 넣고 3회 세척하였다. 다시 Goat anti-bovine IgG(H+L specific), horseradish peroxidase conjugate (KPL)를 blocking buffer에 1,000배 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고 PBS로 4회 이상 세척한 후, substrate 용액(3,3'-diaminobenzidine; DAB 50 mg, 1% CoCl<sub>2</sub> 2 ml, PBS 98 ml, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 ml)을 10-15분간 반응하여 band를 확인하였다.

### 단백질량 측정

정제단계별로 각각의 분획에 대한 단백질 농도는 Lowry 방법<sup>26</sup>에 준한 BCA kit(Pierce Co.)을 사용하여 단백질량을 측정하였다.

### ELISA

정제항원(8 kDa)을 coating buffer(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.93 g/L, pH 9.6±0.1)에 2 µg/ml로 희석하여 ELISA plate 각 well에 희석된 항원 100 µl 씩 분주한 다음 37°C에 하룻밤 항원을 흡착시킨다. TBS buffer를 각 well에 120 µl 씩 분주한 다음 3회 세척하고 각 well에 blocking buffer(1% skim milk in TBS) 120 µl 씩 분주한 다음 37°C, 1시간 배양시킨다. TBST로 3회 세척한다. U-form microplate를 이용하여 각 well에 blocking buffer 285 µl에 가검혈청 15 µl를 혼합하고 항원이 흡착된 ELISA plate에 희석된 가검혈청과 양성, 음성혈청 100 µl을 혈청당 2 well 씩에 옮긴 후 37°C, 1시간 30분 반응시킨다. TBST로 3회 세척한 다음 conjugate(rabbit anti-bovine IgG peroxidase, sigma)을 TBS에 1:5,000배 희석하여 각 well에 100 µl 씩 분주한 후 37°C, 1시간 반응시키고 TBST로 4회 반복 세척한 다음 substrate(ABTS, KPL)를 각 well에 100 µl 씩 분주하여 실온에서 약 30분간 반응시켜 ELISA reader(405 nm)로 흡광도를 측정한다.

### dot-blot assay

부루세라 RB51 균을 10% bovine serum이 함유된 부루세라 한천배지에 Bacitracin 25 unit/ml, Polymixin B 5 unit/ml, Nalidixic acid 5 µg/ml, Vancomycin 20 µg/ml, Cycloheximide 100 µg/ml이 첨가된 BPNV medium에 37°C, 36~48hrs 배양하여 0.15M PBS로 균 회수하여 3,000×g, 30분간 3회 원심세척하고 균 농도를 약 3×10<sup>11</sup> CFU/ml로 조정, 항원수조에서 65°C, 30분간 처리하여 사멸시켜 다시 원심세척하여 4°C에 보관하였다. 최종 항원사용농도는 280 nm에서 OD 0.82±0.01로 TBS buffer(Trisma base 0.47 g, Trisma HCl 2.54 g, NaCl 29.22 g/L, pH7.5)로 희석하여 사용하였다.

NC membrane(Bio-Rad)에 100 µl 씩 분주하여 진공펌프를 이용하여 10분간 흡착한 다음 TBS로 1회 세척한 다음 37°C에서 건조시켜 사용시까지 보관하였다. GTBS(0.25% Gelatin in TBS)에 30분간 정치시키고 TBS로 1회 세척하였고 혈청을 GTBS로 1/20 희석하여 각 well에 100 µl 씩 분주, 30분간 반응시킨 다음 진공펌프를 이용하여 NC membrane을 통과시키고 TBST(0.05% Tween 20 in TBS)로 5회 세척하였다. conjugate(goat anti-bovine IgG HRP, KPL) 1/2,000배 희석하여 30분간 반응시키고 TBST로 3회, TBS로 1회, D.W로 1회 세척한 다음 Substrate(0.5 mg 4-chloro-1-naphthol/ml in TBS and 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 넣어 3~5분간 반응시키고 발색유무에 따라 판정하였다.

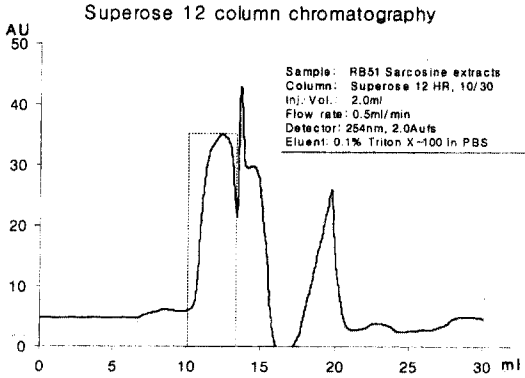
## 결 과

10% bovine serum이 함유된 부루세라 한천배지 50 plate(87×15 mm, petridish)에 strain RB51 균을 접종하여 48시간 배양하여 균을 회수한 결과 4.48 g(wet)의 균을 회수하였다. 여기에 최종농도 1% sarcosine을 처리하여 균체 표면에 존재하는 항원을 추출한 다음 trypsin을 처리하여 단백질류의 항원을 제거하고 용량에 50%의 ammonium sulfate(포화농도 약 75%)를 첨가하여 농축시켜 균체 g(wet) 당 약 855.46 µg의 항원을 얻었다(Table 1).

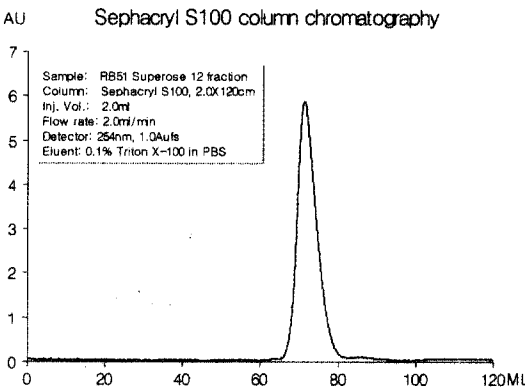
농축된 항원을 FPLC system을 이용한 Superose 12 HR 10/30 column에 통과시켜 분획하였으며 254 nm에서 흡광도를 측정하여 7개의 분획을 확인하였다(Fig 1). 각각의 분획을 15% SDS-PAGE 및 Western blot으로 확인한 결과 8 kDa 항원은 첫 번째 분획에서 농후하게 분포하고 있었다(Fig 3A). 또한 이 분획에는 25~70 kDa의 항원이 분포하고 있었으며 Western blot에서 확인한 결과 부루세라 RB51 양성혈청에는 거의 면역반응을 보이지 않았다(Fig 3B). 하지만 이 항원들은 야외 부루세라균 또는 다른 종류의 세균과 교차반응이나 비특이 반응이

**Table 1.** Protein concentration and recovery rate by purification step

purification step	protein concentration	recovery (%)
RB51 strain harvests	4.48 g(wet)	100
Sarcosine extracts	855.46 µg/g(wet)	0.0187
Superose 12 column	101.23 µg/g(wet)	0.0022
Sephacryl S-100 column	71.46 µg/g(wet)	0.0016



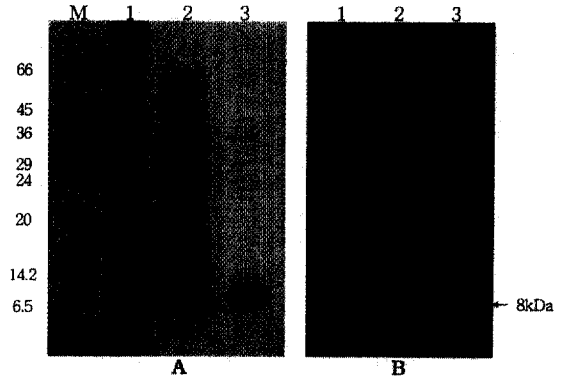
**Fig 1.** Superose 12 HR 10/30 FPLC chromatogram of sarcosine extracts.



**Fig 2.** Sephacryl S-100 FPLC chromatogram of fraction including 8 kDa from Superose 12 HR 10/30.

일어날 우려가 있어 이들을 제거할 목적으로 추가 정제를 시도하였다.

Superose 12 column으로 1차 정제된 항원을 Sephacryl S-100 column(Ø15 mm×1200 mm)으로 2차 정제를 한 결과 하나의 단일 분획을 확인할 수 있었다(Fig 2). Silver stain과 Western blot으로 1차 정제시 포함된 20~70 kDa의 항원이 거의 제거되고 strain RB51의 8 kDa 항원이 순수하게 정제되었음을 확인하였다.



**Fig 3.** 15% SDS-PAGE(A), silver stain and Western blot Analysis(B) of *Br. abortus* RB51 8 kDa antigen through a series of purification steps. Lane M. molecular Weight marker(Sigma), Lanes 1, sarcosine extracts, Lane 2, Superose 12 column fraction and Lane 3, Sephacryl S-100 column fraction.

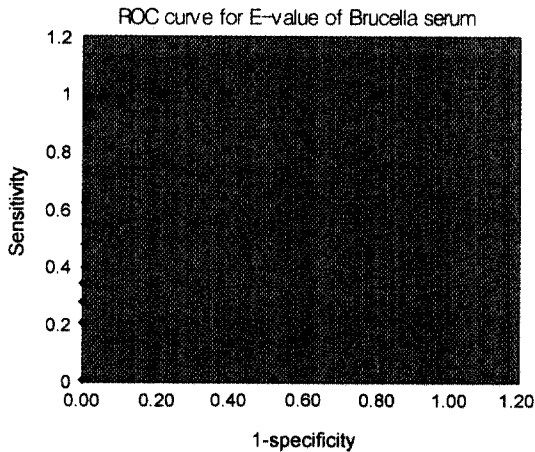
최종 정제된 항원을 Lowry 방법에 준한 BCA kit (Pierce, Rockford, USA)을 사용하여 단백질량을 측정된 결과 균체 g(wet) 당 71.46 µg의 항원을 얻을 수 있었으며 회수율은 0.0016% 이었다(Table 1).

최종 정제된 8 kDa 항원의 성상을 조사하기 위해 다양한 실험을 수행하였다. 1% sarcosine으로 *Br. abortus* RB51 균체에서 8 kDa 항원을 추출할 수 있었으며 이 결과는 균체 외막에 존재하는 항원임을 알 수 있었다. 또한 중성세제인 Triton X-100 처리시 그 용해도가 증가하였고 trypsin에 처리에 저항하는 것으로 보아 lipid의 성질을 가지고 있으며 proteanase K에 불활화되어 protein의 성질을 띄고 있어 8 kDa 항원은 부투세라 균체표면에 존재하는 lipoprotein으로 추정된다(Table 2).

이와 같이 정제된 항원을 이용하여 RB51 예방약을 접종한 소의 항체가를 측정하기 위해 ELISA 진단법을 개발하였다. 개발된 ELISA 법의 조건을 설정하기 위하여 다양한 농도의 항원을 plate에 흡착시켜 비교하여 보았으며 반응의 최적 조건은 1.0~2.5(2.0)µg/µl, 37°C, 18~24 hrs coating 한 다음 사용시까지 4°C 보관하였다. 1% skim milk, 37°C, 1hrs~1.5hrs(1hrs)로 blocking 함으로서 비특이 반응을 줄일 수 있었다. 혈청은 skim milk가 함유된 TBS에 20배 희석하여 실시하였으며 conjugate로는 rabbit anti-bovine IgG, substrate는 ABTS를 사용하였다(data not shown). 시험결과와 산출은 E value = S - N / P - N(P : mean positive serum O.D, N : mean negative serum O.D, S : mean sample serum O.D)로 하였으며<sup>27</sup> 반복실험을 통해 실험결과와 신뢰도를 높이기 위해 유효조건을 설정하였다. 유효조건은 P/N가 4.5~7.5[M(6.0)±

**Table 2.** Properties of 8 kDa antigen of *Br. abortus* RB51

Treatment	1% sarcosine (37°C, 30 min)	1% trypsin (37°C, 30 min)	Triton X-100 solubility	0.1% proteinase K (37°C, 1hrs)
Result	extract	resistant	highly soluble	50% inactivate
Property	bacteria surface		lipid	protein



**Fig 4.** ROC curve of E-value for *Brucella* RB51 positive sera.

**Table 3.** Correlation of dot-blot assay and ELISA using 8 kDa antigen against 1,376 sera

Method	dot-blot assay	
	positive	negative
ELISA	positive	37
	negative	950

SD(1.5)]이어야 하며 이때  $N = 0.114[M(0.103) + SD(0.011)]$  이하이어야 한다. 또한 결과 판정(cut-off point)을 위해 양성혈청 146두, 음성혈청 200두를 대상으로 E value에 대한 ROC(receiver operating characteristic) curve<sup>28</sup> 작성하여 cut-off point을 0.9로 설정하였고(Fig 4) 이 때의 ELISA 진단법의 특이도와 민감도는 각각 95.0%, 98.6% 이었다. 또한 '99년 상반기에 접수된 부루세라 가검혈청 1,376점에 대하여 기존 dot-blot assay 법과 개발된 ELISA 법을 비교한 결과 93.5%의 높은 상관관계를 보였다 (Table 3).

### 고 찰

Lipopolysaccharide O-side chains이 결손된 *B. abortus* strain 2308의 rough mutant인 *B. abortus* strain RB51 균

은 고도 면역된 소에서도 LPS에 대한 항체를 형성하지 않아 기존 혈청학적 진단방법으로는 항체를 측정할 수 없음이 보고되었으나<sup>14,19,29</sup> RB51의 균체 단백질 성분을 *B. abortus* S19, S2308과 비교하여 87~91%의 유사성을 보임을 보고하였으며 또한 균체 외막단백질(OMP)도 RB51과 S19, S2308이 서로 일치함이 보고되었다<sup>14,30</sup>.

RB51의 고면역원성 물질인 32, 27, 18 및 18 kDa 이하의 단백 항원은 RB51 백신 접종한 소의 입과구 증식을 자극시킴을 보고하였으며 immunoblot에 의하여 LPS에 대한 항체는 형성하지 않으며 84 kDa과 20 kDa 이하의 단백 항원과 반응함을 보고되었다<sup>31-33</sup>.

RB51 균의 초음파파쇄 항원을 이용하여 Westen blot으로 면역원성을 분석한 결과 8 kDa 항원에 강한 면역 반응을 관찰할 수 있었으며 특히 이 항원은 백신접종 3~4주령부터 면역반응을 보이며 dot-blot assay 법보다 특이성이 높음을 이전에 보고하였다.

본 연구에서 백신 접종시 초기에 반응하는 특이성이 확인된 8 kDa 항원을 detergents를 처리하여 항원을 추출하고 FPLC system을 이용하여 정제를 하였으며 정제 항원의 성상을 조사하였다. 8 kDa 항원은 RB51 균체에 1% sarcosin을 처리하여 쉽게 추출할 수 있었으며 이는 Rapp 등<sup>23</sup>이 G(-)균인 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 OMP 추출 방법을 응용하였다. sarcosine은 균체 외막을 녹일 수 없는 특징을 가지고 있어 부루세라 균체에 이를 처리함으로써 균체 외막에 함유된 항원을 쉽게 추출할 수 있었으며 여기에 8 kDa 항원이 다량 함유됨으로서 이 항원이 균체 외막에 존재함을 알 수 있었다. 추출된 항원을 ammonium sulfate를 이용하여 농축하고 증류수나 생리적 식염수보다는 중성세제인 Triton X-100이 함유된 용액에 쉽게 녹는 점으로 보아 추출된 항원에 지질성분이 함유되어 있다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 이렇게 추출된 항원을 1%Triton X-100이 함유된 용액을 이동상으로 하여 FPLC system을 이용한 Superose 12 HR 10/30, Sephacryl S-100 gel filtration column으로 분획하고 각 분획을 전기영동과 western blot으로 확인하여 균체 1 wet g 당 약 72 µg의 8 kDa 항원을 순수 정제할 수 있었고 재현성 역시 매우 우수한 정제 기법을 확립하였다(Fig 1, 2, 3, Table 1). Maria 등<sup>34</sup>의 SDS extraction-trypsin digestion에 의한 추출 방법에

비해 추출이 쉽고 재현성이 높은 방법이라 여겨진다. 8 kDa 정제항원의 성상은 trypsin 처리에 저항하고 proteinase K에 불활화되는 성질을 가지고 있어 Maria 등<sup>34</sup>이 추출한 peptidoglycan-linked lipoprotein의 성상과 유사하였으며 본 실험에서 추출된 8 kDa 항원 역시 균체 표면에 존재하는 Lipoprotein으로 추정된다 (Table 2).

한편 RB51 백신의 효용성을 제고하기 위한 혈중 항체를 측정하는 유일한 방법으로 균체 항원을 이용한 dot-blot assay 법을 사용하고 있으나<sup>20,22</sup> 이 검사법은 항원으로서 균체(whole cell)를 이용하기 때문에 비특이 반응이 비교적 많고 여기에 사용하는 NC paper의 종류, conjugate의 농도, substrate의 종류 및 반응시간에 매우 민감하게 반응하여 진단방법의 설정이 어렵고 다른 실험실간의 결과에 차이를 보일 수 있다. 따라서 본 연구는 8 kDa 정제항원을 이용하여 RB51 백신에 대한 항체를 측정하기 위하여 ELISA 진단법을 개발하였다. 개발된 ELISA 법을 RB51 양성혈청 146두 및 음성혈청 200두를 대상으로 E value에 대한 ROC curve 작성하여 cut-off point을 0.9로 설정하였고 이 때의 ELISA 진단법의 특이도와 민감도는 각각 95.0%, 98.6%로 매우 우수한 결과를 얻을 수 있었으며 개발된 진단법을 이용하여 '99년 상반기에 접수된 부루세라 가검혈청 1,376점에 대하여 기존 dot-blot assay 법과 상관관계를 조사한 결과 93.5%가 일치하였다(Table 3). 따라서 개발된 ELISA 진단법은 기존 방법을 대체하여 부루세라 RB51의 혈청검사에 용이하게 사용될 수 있으리라 여겨진다.

## 결 론

본 연구에서 부루세라 RB51 균의 8 kDa 항원을 추출하고 정제하는 기법을 개발하였다. 60°C, 30분 열처리로 불활화된 균체에 1% sarcosine을 처리하여 추출하였으며 Superose 12 HR 10/30, Sephacryl S-100 gel filtration 컬럼크로마토그래피에 의해 정제하였다. 8 kDa 항원은 균체 1 g(wet) 당 71.46 µg을 정제할 수 있었으며 이 정제항원은 1% trypsin 처리에 안정하였으며 1% Triton X-100이 함유된 용액에 높은 용해도를 보이고 0.1% proteinase K에 불활화되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 8 kDa 항원은 부루세라 RB51 균체 표면에 존재하는 lipoprotein 인 것으로 여겨진다.

또한 8 kDa 정제항원을 이용하여 RB51 백신의 ELISA 진단법을 개발하였으며 진단법의 특이도와 민감도는 각각 95.0%, 98.6% 이었다. 또한 부루세라 가검혈청 1,376점에 대하여 기존 dot-blot assay 법과 개발된 ELISA 법의 상관관계를 조사한 결과 93.5%가 일치하였다.

## 참고문헌

- Spink WW. Present status of Brucellosis in man: Clinical and diagnostic problems. *JAVMA*. 155:2091, 1969.
- Young EJ. Human Brucellosis. *Rev Infect Dis*. 5:821, 1983.
- 농림부. 결핵병 및 부루세라병 방역실시 요령. 농림부고시 제 1999-52.
- 정석찬. 세균성 인수공통전염병의 최근 연구동향: 부루세라병 예방대책. 수의과학연구소, 45-59, 1996.
- 농촌진흥청 가축위생연구소. 한국의 가축위생연구소: 가축위생연구소 80년사.
- Frye GH, Gilsdorf MJ and Taft A. Brucellosis eradication-FY 96 Status report. *USDA APHIS Veterinary Services*, 1996.
- USDA APHIS Veterinary Services. Facts about brucellosis.
- Beh KJ. Quantative distribution of brucella antibody among immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. *Res. Vet. Sci*. 17:1-12, 1974.
- Stevens MG, Olsen SC, Palmer MV, et al. *Brucella abortus* strain RB51: a new brucellosis vaccine for cattle. *Food Animal*. 19(6):766-774, 1997.
- Olsen SC, Cheville NF, Bricker B, et al. Technical report on vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. *Technical Committee for Vaccine Evaluation Zoonotic Disease Unit, USDA/ARS/NADC*, 1-13, 1997.
- Olsen SC, Cheville NF, Bricker B, et al. Technical report on vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. *Technical Committee for Vaccine Evaluation Zoonotic Disease Unit, USDA/ARS/NADC*, 1-11, 1996.
- Palmer MV, Cheville NF, Jensen AE. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet Pathol*. 33(6):682-691, 1996.
- Jensen AE, Ewalt DR, Cheville NF, et al. Determination of stability of *Brucella abortus* RB51 by use of genomic fingerprint, oxidative metabolism, and colonial morphology and differentiation of strain RB51 from *B abortus* isolates from bison and elk. *J Clin Microbiol*. 34(3):628-633, 1996.
- Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet Immunol Immunopathol*. 44(3-4):223-235, 1995.
- Schurig GG, Roop RM 2d, Bagchi T, et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*. 28(2):171-188, 1991.
- Tobias L, Schurig GG, Cordes DO. Comparative behaviour of *Brucella abortus* strains 19 and RB51 in the pregnant mouse. *Res Vet Sci*. 53(2):179-183, 1992.
- Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, et al. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain

- RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am J Vet Res.* 57(8):1153-1156, 1996.
18. Cheville NF, Jensen AE, Halling SM, *et al.* Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res.* 53(10):1881-1888, 1992.
  19. Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, *et al.* Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res.* 54(10):1591-1597, 1993.
  20. Olsen SC, Stevens MG, Cheville NF, *et al.* Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J Vet Diagn Invest.* 9:363-367, 1997.
  21. Olsen SC, Bricker B, Palmer MV, *et al.* Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res Vet Sci.* 66:101-105, 1999.
  22. Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res.* 58(5):472-477, 1997.
  23. Rapp VJ, Munson RS, Ross RF. Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect Immun.* 52(2):414-420, 1986.
  24. Laemmli E.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
  25. Winstone and Fuller : Immunoblotting, Current Protocols in Immunology, Unit 8.10.1-8.10.5, 1991.
  26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
  27. J. Nicolet and P. Paroz. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci.* 29:305-309, 1980.
  28. 박선일, 한홍율. 수의임상 역학 및 통계. 한길아카데미출판사. 75-128, 1999.
  29. Olsen SC, Evans D, Hennager SG, *et al.* Serologic responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. *J Vet Diagn Invest.* 8(4):451-454, 1996.
  30. Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW Jr, *et al.* Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Infect Immun.* 62(8):3206-3212, 1994.
  31. Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF. Lymphocyte proliferation in response to immunodominant antigens of *Brucella abortus* 2308 and RB51 in strain 2308-infected cattle. *Infect Immun.* 62(10):4646-4649, 1994.
  32. Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF. Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* RB51 and 2308 proteins in RB51-vaccinated or 2308-infected cattle. *Infect Immun.* 64(3):1007-1010, 1996.
  33. Stevens MG, Olsen SC. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B abortus* RB51. *Infect Immun.* 64(3):1030-1034, 1996.
  34. Maria J, Gomez-Miguel and Igmacio M. Demonstration of a peptidoglycan -linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella spp.* *Infect Immun.* 53(3):678-684, 1986.