

# Receptor를 이용한 Verotoxin 生産 大腸菌의 檢出에 關한 研究( I )

(副題: Verotoxin-2의 分離精製에 關하여)

疫學調查科

車仁鎬 · 權赫東 · 李采南 · 趙顯哲 · 李弘洙 · 李秉圭

## Study on Purification of Verotoxin-2

Epidemiology Division

I.H. Cha, C.N. Lee, H.C. Cho, H.S. Lee, B.G. Lee

### Abstract

The objects of this present study were to establish the method of purification, subunits dissociation of verotoxin-2 from *Escherichia coli* O157 : H7, and to investigate the characteristics of purified verotoxin-2 such as molecular weight and composition of amino acid. The results were summerized as follows ;

Verotoxin-2 was extracted by addition of polymyxin B sulfate from *E. coli* O59(O157 : H7). The purification of VT-2 was accomplished by a series of column chromatography techniques ; anion-exchange, chromatofocusing and cation-exchange column chromatography. The purified VT-2 revealed  $1.8 \times 10^7$  CD<sub>50</sub>/ml in cytotoxicity analysis for Vero cell.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) for purified

VT-2 showed two protein bands. The upper band, approximately 32 Kd, was supposed as A subunit and the lower band, approximately 7.7 Kd, was supposed as B subunit.

When the toxin was incubated and separated in the subunit-dissociating solution, two peaks emerged with retention times of 15 and 28 min by HPLC. These peaks represented A subunit and B subunit, respectively.

The amino acid composition of purified VT-2 were made up in order of glutamic acid, histamine, asparaginic acid, histidine, lysine, alanine and leucine etc. One of the most few amount among the amino acid composing VT-2 was methionine.

Challenged rabbit with denatured toxin produced the most high titer antitoxin on 55 days after first injection.

## I. 緒 論

Verotoxin(VT) 生産 大腸菌은 泄瀉病의 중요한 原因體로 作用하며,<sup>1,2)</sup> 사람에게 溶血性 結腸炎(Hemorrhagic colitis),<sup>3,4)</sup> 및 급성 신장장애, 혈소판감소증, 소혈관성 빈혈 등을 증상으로 하는 假稱 溶血性 尿毒症후군(Hemolytic Uremic Syndrome)<sup>5)</sup> 등을 誘發하여 近年에 많은 문제가 되고 있다.

VT를 생산하는 大腸菌으로는 43種의 血清型이 알려져 있으며<sup>6)</sup> 이들 중 血清型 O157 : H7은 분리되는 VT 生産 大腸菌의 折半以上으로 檢出된다.<sup>1,7)</sup>

VT는 病原性 大腸菌에 의하여 生産되는 cytotoxin으로서 *Shigella dysenteriae* type I 이 생산하는 Shiga toxin과 構造 및 機能이<sup>8)</sup> 類似하여 Shiga-like toxin(SLT)이라고도 하며,<sup>9,10,11)</sup> 1977년 Konowalchuk등<sup>12)</sup>에 의하여 verotoxins 이라고 命名되었다.

현재까지 알려진 VT의 종류는 VT-1, VT-2 및 VTE등 3종류가 알려져 있으며<sup>12,13)</sup> VT-1은 shiga toxin의 抗血清에 中和되지만<sup>14,15)</sup> VT-2와 VTE는 Shiga toxin의 抗血清에 中和되지 않는 것으로 알려져 있다.<sup>11,16)</sup> 또한 VT-2와 VTE의 抗血清은 서로의 항원성에 交叉反應을 나타내기 때문에 生物學的 活性으로 이들을 구분하고 있다.

VT는 分子량이 32 Kd인 A subunit 하나와 分子량 7.7 Kd인 다섯개의 B subunit로 이루어져 있다.<sup>17,18)</sup> 이들중 A subunit는 細胞內 蛋白質 合成을 抑制하고<sup>19)</sup> B subunit는 toxin과 receptor와의 特異的인 結合에 關與하는 것으로 알려져 있으며<sup>20,21)</sup> 특히 A subunit는 蛋白質 分解酵素에 의하여 分子량 27 Kd의 A1과 5 Kd의 A2 polypeptide로 나누어지는 것으로 알려져 있다.<sup>22)</sup> 또한 A1의 切斷部가 遊離되어 있을 경우에는 완전한 독소보다 작용이 더 증가하는 것으로 알려져 있고<sup>23)</sup> A1 polypeptide는 A와 B subunit를 서로 연결하는데 關與한다.

VT는 globotriosyl ceramide(Gb3) 및 globotetraosyl ceramide(Gb4)와 같은 glycosphingolipid에 特異적으로 결합하는 것으로 알려져 있으며,<sup>23,24</sup> 이들을 受容體로 응용한 많은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 법이 개발되어 微量의 毒素檢出 및 診斷에 利用되고 있다.<sup>25</sup>

Lingwood등<sup>26</sup>은 verotoxin-1(VT-1)을 검출하기 위하여 Gb3를 deacylation시켜 microplate에 固定할 수 있는 lyso-Gb3를 만들었으며 김 등<sup>27</sup>이 Gb3와 양이온성 물질인 phosphatidyl ethanolamine과의 리포솜을 형성시켜 verotoxin-2(VT-2) 및 VT-1을 微量分析할 수 있는 receptor binding enzyme-linked immunosorbent assay(RELISA) 법을 개발한 바 있다.

이와 같이 VT에 대한 抗血清 製造뿐만 아니라 미량의 독소검출 및 진단을 위하여는 基本的으로 순수하게 정제된 VT가 필요하며 이를 위하여 定立된 毒素精製方法이 精確히 要求되고 있다.

외국의 경우 TV에 대한 연구는 毒素精製, 단클론성 抗體製造, PCR을 이용한 VT 생산 대장균의 診斷 및 遺傳子 再조합을 이용한 vaccine 생산가능성에 관한 연구등이 활발하게 연구되고 있으나 국내에서는 아직까지 VT에 대한 연구가 未備한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 verotoxin의 검출 및 진단방법 개발의 一環으로 標準菌株인 VT-2 생산 대장균 O59 strain으로부터 독소의 精製方法을 確立하고 毒素의 分子量 및 構成아미노산 등 VT-2의 여러가지 특성을 調査하고자 본 實驗을 실시하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 公試菌株 및 細胞株

Verotoxin-2 생성균주는 Canada Ottawa의 Laboratory Center for Disease Control(LCDC)에서 分讓받은 *E. coli* 혈청형 O157:H7인 O59 strain을 독소의 분리 및 정제에 사용하였다.

細胞毒性 시험을 위한 細胞株들은 國立保健院으로부터 分讓받은 Vero cell 및 HeLa cell을 사용하였고, 5% FBS(fetal bovine serum)와 100 $\mu$ g/ml의 gentamicin 및 100U/ml의 penicillin이 첨가된 minimal essential medium (MEM; Sigma)에 계대배양 하면서 公試하였다.

### 2. VT-2의 抽出

Head 등<sup>28</sup>의 방법에 따라 公試菌인 O59 strain을 0.2mg/ml의 mitomycin C를 첨가한 2 $\ell$ ×3의 Penassay broth에 接種 培養하고 3,000×g로 15분간 원심분리하여 沈澱된 菌體를 200ml의 PBS (phosphate buffered saline)로 현탁시킨후, phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)와 polymyxin B sulfate를 첨가하여 French press 200 psi에서 세포를 破碎하였다. 그 다음 4 $^{\circ}$ C에서 9,000×g로

細胞殘骸物을 원심분리하여 침전시킨 후, 독소를 함유한 上層液에 30% 및 70%의 황산 암모늄을 가하여 4°C에서 10,000×g로 원심분리 함으로써 독소를 침전시켰다. 침전물에 15ml의 磷酸완충액을 가하여 12,000MW cutoff dialysis tube를 사용하여 4ℓ 인산완충액으로 투석하였다.

### 3. VT-2의 精製

Downes등<sup>8)</sup>의 방법에 따라 그림 1과 같이 3종류의 column을 사용하여 정제하였다.

#### 가. Anion-exchange column chromatography(AE)

DEAE Sepharose CL-6B(Pharmacia Co.) 50ml로 충전한 column을 0.1M Tris-HCl(pH 6.5)로 平衡化시킨 다음 인산완충액으로 투석한 crude toxin을 loading하여 NaCl gradient(0-0.6M)로 용출시키면서 3ml씩의 分劃을 取하였으며, 각각의 分劃에 대한 細胞毒性 活性을 檢査하여 毒性을 나타내는 分劃을 수집하여 투석하고 Amicon filter로 濃縮하였다.

#### 나. Chromatofocussing column chromatography(CF)

Polybuffer exchange 94(Pharmacia Co.) 57ml을 충전한 column을 0.2M histidine-HCl 완충액 (pH 6.2)으로 平衡化시킨 다음 AE column에서 수집 농축한 시료를 loading하여 pH gradient(pH 6.4-4.0)로 용출시키면서 3ml씩의 分劃을 취하였다. 각 分劃에 대한 細胞毒性 活性을 檢査하여 毒性을 나타내는 分劃을 收集하여 투석하고 Amicon filter로 濃縮하였다.

#### 다. Cation-exchange column chromatography(CE)

CM-Sepharose CL-6B(Pharmacia Co.) 25ml을 충전한 column을 0.2M citrate 완충액(pH 4.0)으로 平衡化시킨 다음 CF column에서 수집 농축한 시료를 loading하여 NaCl gradient(0-0.6 M) 용출시키면서 3ml씩의 分劃을 취하였다. 각 分劃에 대하여 細胞毒性을 檢査하고 活性이 있는 부분의 分劃을 收集하였으며 투석 및 농축하였다.

### 4. 細胞毒性 檢査

정제단계별 세포독성 시험은 Karmali등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 정제된 또는 정제중인 toxin을 0.22μm membrane filter로 濾過한 뒤, 濾液 50μl를 10배 段階稀釋하여 96 well microplate에 單層배양한 Vero cell과 HeLa cell에 각각 接種하였다. 接種한 plate는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 3일간 배

양하면서 매일 cytopathic effects를 顯微鏡으로 관찰하였으며, 배양 3일후 세포를 50% 死滅시키는 (CD<sub>50</sub>) 시료의 가장 높은 稀釋倍數를 endpoint로 하여 VT-2 活性의 정도를 결정하였다. CD<sub>50</sub>의 判定方法은 Mary등<sup>30)</sup>의 方法에 따라 배양한 plate를 조심스럽게 진탕하여 사멸한 세포와 배양액을 제거하고, 2% formalin이 첨가된 0.067M phosphate buffered saline(2% formalin-PBS, pH 7.2)으로 1분간 固定시킨 후, 0.13% crystal violet(5% ethanol-2% formalin-PBS)으로 20분간 染色하였다. 염색한 세포를 실온에서 건조시킨 후, 50% ethanol 200 $\mu$ l로 溶出시키고 용출액 100 $\mu$ l를 0.9ml의 PBS에 희석하여 spectrophotometer 595 nm에서 吸光度를 측정하였으며, toxin 비침가 대조군의 흡광도와 對比하여 CD<sub>50</sub>을 정하였다.

#### Anion-exchange Chromatography

- Column ..... 1.6 $\times$ 25cm
- Resin ..... DEAE Sepharose CL-6B  
(Pharmacia)
- Equilibration buffer ..... 0.1M Tris-HCl(pH 6.5)
- Gradients ..... 0.6M NaCl

#### Chromatofocussing Chromatography

- Column ..... 1.0 $\times$ 26cm
- Resin ..... Polybuffer exchange 94  
(Pharmacia)
- Equilibration buffer ..... 0.025M Histidine-HCl  
(pH 6.2)
- Gradients ..... Polybuffer 74  
(Pharmacia, pH 6.4)

#### Cation-exchange Chromatography

- Column ..... 1.0 $\times$ 30cm
- Resin ..... CM-Sepharose CL-6B  
(Pharmacia)
- Equilibration buffer ..... 0.2M Citrate buffer  
(pH 4.0)
- Gradients ..... 0.6M NaCl

Fig. 1 Column system for purification of VT-2

## 5. Toxin protein의 確認

Native polyacrylamide gel electrophoresis(Native-PAGE) : 濃縮한 毒素과 2-mercaptoethanol 및 sodium dodecyl sulfate(SDS)가 포함되어 있지 않은 동량의 sample treatment 완충액을 혼합하여 nondenaturation 조건으로 15% polyacrylamide gel에 loading하고 전기영동한 후, Coomassie brilliant blue R-250으로 染色하여 脫色시켜 toxin protein을 확인하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) : 각 정제과정에서 독소 활성부분의 分割을 收集하여 凍結 및 농축하고 동량의 sample treatment 완충액[0.125M Tris-HCl(pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol]과 혼합하여 100℃에서 4~10분동안 가열하였다. 變性된 toxin protein을 1mm 두께의 20% SDS-polyacrylamide gel에 loading하였으며, Laemmli<sup>20</sup>의 방법에 따라 전기영동하고 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후, 脫색시켜 protein band를 확인하였다.

## 6. 精製한 toxin의 아미노산 分析

公試菌 O59, strain으로부터 분리정제된 toxin의 polypeptide를 還流加水法<sup>21</sup>으로 분해하여 아미노산 분석기(Pharmacia Co.)로 독소의 구성 아미노산을 分析하였다. 정제한 독소 1ml를 100ml의 환류 플라스크에 넣어 0.1% phenol을 포함하는 5.7M HCl을 첨가하여 냉각관을 연결하고 110℃에서 24시간 還流하였다. 7.5M NaOH 용액으로 pH를 중화시키고 0.02N HCl로 양을 조정하여 아미노산 분석기에 10 $\mu$ l를 주입하여 분석하였다.

## 7. HPLC를 이용한 毒素의 subunit 解離

Head등<sup>22</sup>의 방법에 따라 정제된 독소 1mg을 subunit 해리 완충액(6M Urea, 0.1M propionic acid, pH 4.0) 1ml를 혼합하여 4℃에서 1시간동안 定置한 후, 동일 완충액으로 평형화시킨 TSK-G 2000 SW HPLC gel filtration column에 주입하였다. 流速은 1.0ml/min로 조정하고  $\lambda=280\text{nm}$ 에서 peak를 측정하였다.

## 8. VI-2에 대한 家兔 抗血清의 생산

Brown등<sup>23</sup>의 방법에 따라 정제된 독소 55 $\mu$ g/ml에 대하여 0.11% glutaraldehyde로 처리하여 變性毒素로 만든후, 동량의 Freund complete adjuvant(Difco)와 油和하였다. 10 $\mu$ g의 독소 蛋白質을 포함하는 혼합액 0.5ml을 3개월령의 토끼 背部에 皮内接種하였다. 2주후 adjuvant를

첨가하지 않은 變性毒素 0.5ml을 皮下로 接種하고, 첫번째 접종후 40일째에 追加接種으로 변성독소만 0.5ml을 靜脈注射하여 追加免疫시켰다. 抗體價를 측정한 후 추가접종 7일경에 採血하였다.

### III. 結果 및 考察

#### 1. Verotoxin-2의 精製

0.1M Tris-HCl(pH 7.5) 완충액으로 투석한 crude toxin을 0~0.6M NaCl 농도구배로 Anion-exchange(AE) column에서 정제한 결과는 Fig. 2와 같이 0.2~0.3M NaCl 농도 부분인 33번 分割에서 81번 分割까지 10'  $CD_{50}/ml$  이상의 세포독성을 나타내었으며, 독성을 나타낸 이들 分割을 收集하여 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 많은 band가 관찰되었다.

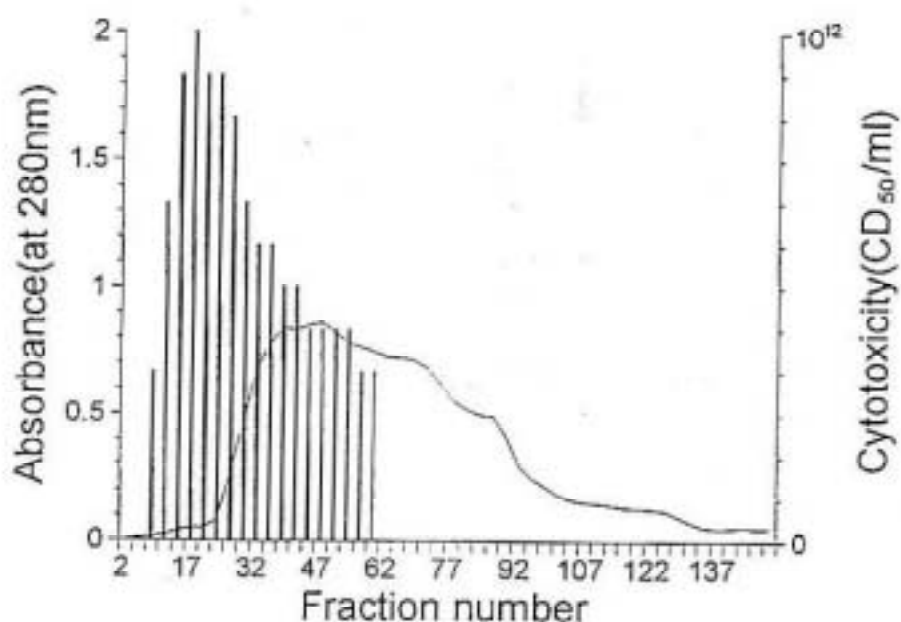


Fig. 2 Representative anion-exchange (DEAE-sepharose) column elution profile and cytotoxicity of VT-2

AE column에서 收集한 toxin을 Amicon filter로 濃縮하고 약 250 volumes의 0.025M Histidine-HCl(pH 7.5) 완충액으로 투석한 후 pH 6.0~4.5의 농도구배로 Chromatofocussing(CF) column에서 정제한 결과는 Fig. 3과 같이 pH 6.0~5.0 사이의 농도경사 부분인 38번 분획에서 77번 분획까지  $10^4$  CD<sub>50</sub>/ml 이상의 細胞毒성을 나타내었다. Toxin 분획을 수집하여 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 AE column에서 관찰되었던 많은 band가 나타나지 않아 다소 정제되었다는 것을 確認할 수 있었다.

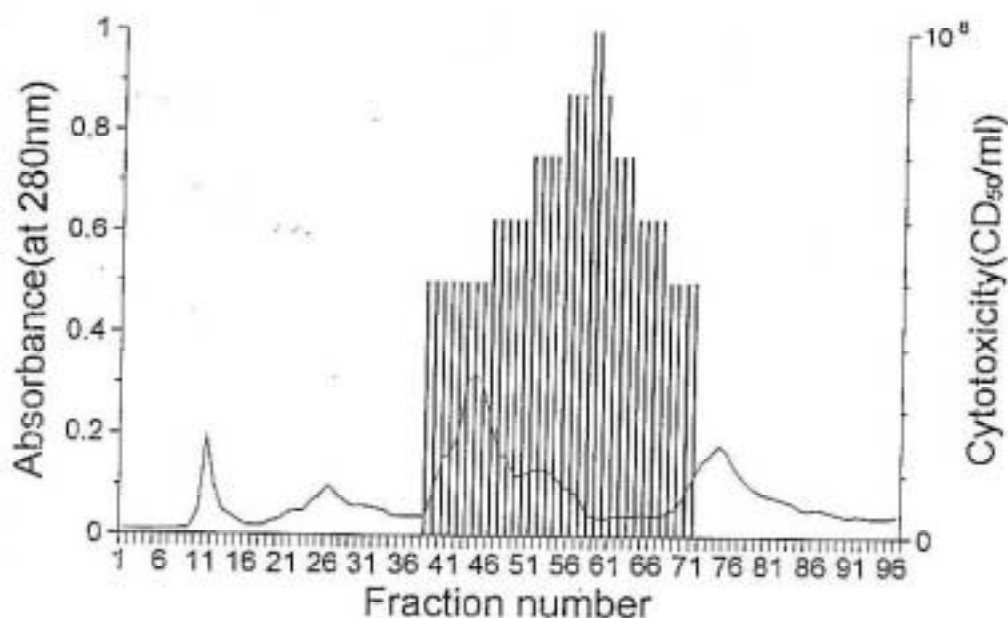


Fig. 3 Representative chromatofocusing column elution profile and cytotoxicity of VT-2

최종적으로 CF column에서 細胞毒성을 나타내는 分割을 收集하여 Amiconfilter로 농축하고 약 200 volumes의 0.1M Citrate 완충액(pH 5.0)로 투석한 다음 0~0.6M NaCl 농도구배로 Cation-exchange(CE) column에서 정제한 결과는 Fig. 4와 같다. NaCl 0.2~0.5M 농도의 마지막 peak 부분인 81번 분획에서 117번 분획까지  $10^4$  CD<sub>50</sub>/ml 이상의 세포독성을 나타내었으며 이 분획들을 SDS-PAGE로 전기영동하여 Coomassie blue로 확인한 결과 Fig. 5와 같이 分子量 약 32Kd의 A subunit band와 7.7Kd의 B subunit를 觀察할 수 있었다.



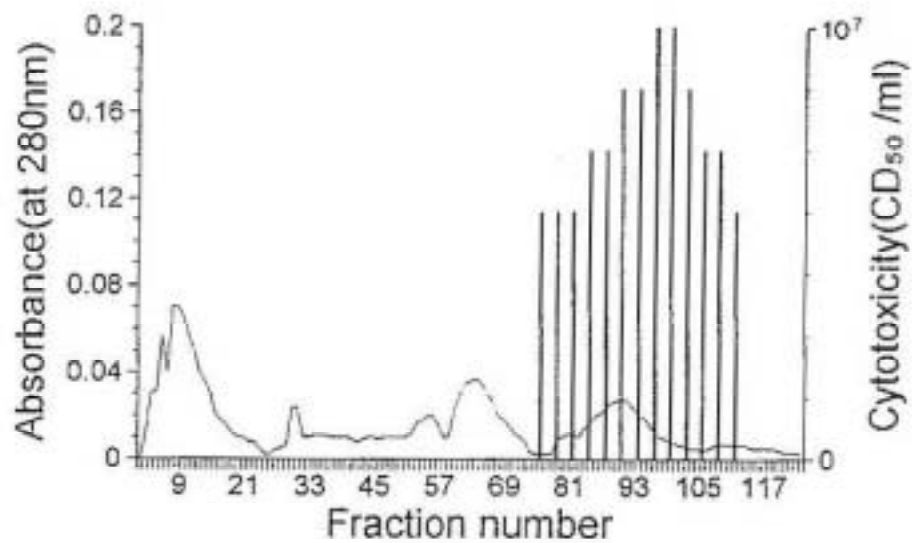


Fig. 4 Representative cation-exchange (CM-sepharose) column elution profile and cytotoxicity of VT-2

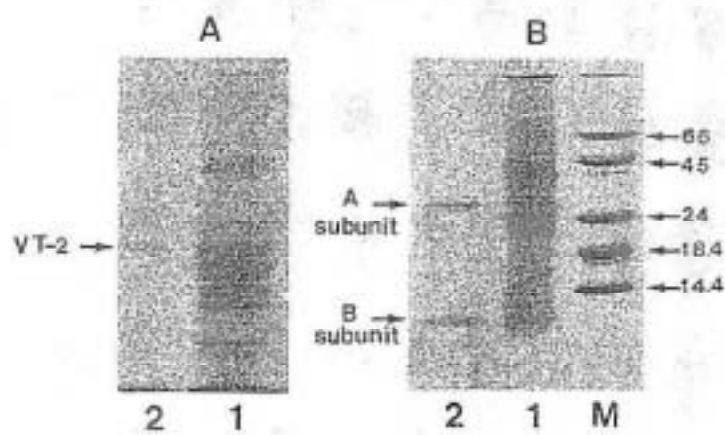


Fig. 5 Native-PAGE (12.5% gel) and SDS-PAGE (20% gel) of purified VT-2 protein stained with Coomassie brilliant blue. A: Native-PAGE, lane 1, crude VT-2; lane 2, purified VT-2. B: SDS-PAGE, lane 1, crude VT-2; lane 2, purified VT-2; lane M, standards of molecular weight (from top to bottom); bovine albumine, egg albumin, trypsinogen,  $\beta$ -lactoglobulin and lysozyme.

각 精製段階別 回收率 및 細胞毒性은 Table 1과 같이 total activity와 total protein은 精製段階에 따라 점차 減少하여 CE column의 최종 정제단계에서 각각  $1.2 \times 10^7$  CD<sub>50</sub>과 0.68mg 이었으며, 최종정제에서의 specific activity는  $1.8 \times 10^7$  CD<sub>50</sub>/mg 이었고 fold purification은 첫단계에 비하여 60배로 정제되었다.

Table 1. Yield and toxicity of VT-2 fractions purified from different sources

Fraction	Volume (ml)	Total cytotoxicity (CD <sub>50</sub> )	Total protein (mg)	Sp act (CD <sub>50</sub> /mg)	Fold purification	Yield (%)
Bacterial cell lysate	310	$3.1 \times 10^8$	1,004	$3.0 \times 10^5$		100
Ammonium sulfate precipitate	18	$1.8 \times 10^8$	432	$4.1 \times 10^5$	1.36	58.1
Anion-exchange pool concentrate	12	$1.2 \times 10^8$	38.7	$3.1 \times 10^6$	10.3	39
Chromatofocusing pool concentrate	13	$1.3 \times 10^7$	1.2	$1.1 \times 10^7$	36.7	4.8
Cation-exchange concentrate	12	$1.2 \times 10^7$	0.68	$1.8 \times 10^7$	60	3.8

† : Specific activity

본 실험에서는 VT-2 生産 大腸菌을 培養集菌하고 periplasmic space에 결합된 독소를 遊離하기 위하여 polymyxin B sulfate를 가하여 배양하고 French press로 균체를 破碎한 결과 Cerny등<sup>30</sup>의 成績과 동일하게 다량의 crude toxin을 얻을 수 있었다. 이는 Karmali등<sup>31</sup>이 polymyxin B를 가하여 遊離한 toxin 抽出物은 specific activity가 증가하며 Shiga toxin, VT-1, VT-2를 遊離하는데 効果적이라고 한 결과와 一致하였다.

Petric등<sup>32</sup>은 polymyxin B sulfate를 처리한 toxin 추출물을 원심침전하여 細胞殘骸物을 제거하고 4°C에서 상층액에 ammonium sulfate를 가하여 40% 飽和狀態로 한 다음, 원심침전하여 다시 상층액에 60% 포화상태로 되게 ammonium sulfate를 가하고 遠心沈澱하여 回數한 沈澱物을 toxin 정제에 사용하였으며 40% 포화농도일때 toxin의 약 5%가 沈澱하며, 60% 농도일때 toxin의 90% 이상이 침전한다고 하였다. 또한 Lingwood등<sup>33</sup>은 toxin을 정제하기 위하여 ammonium sulfate의 농도를 30%와 70% 포화농도로 사용하였다. 본 실험에서도 toxin의 損失을 最少化하기 위하여 30%와 70%의 ammonium sulfate 飽和濃度로 사용하였다.

각각의 column에 따른 정제결과는 Downes<sup>34</sup>의 VT 정제결과와 類似하였고 본실험에서 정제된 VT-2의 A subunit와 B subunit의 分子量을 SDS-PAGE로 전개하여 본 결과 각각 32 Kd와 7.7 Kd로 확인되어 MacLeod등<sup>35</sup>이 정제한 VTE의 결과와 類似하였으며, Weinstein 등의 A와 B subunit와 DNA 鹽基序列 分析에 의하여 推測한 分子量과 거의 一致하였다.

## 2. HPLC에서의 subunit 확인

공식균 *E. coli* O59 strain 으로부터 정제한 VT-2를 解離溶液으로 해리하여 TSK-G2000 SW HPLC gel filtration column으로 HPLC한 결과는 Fig. 6과 같이 retention time 15분대에 A subunit가, 28분대에 B subunit가 解離되었다.

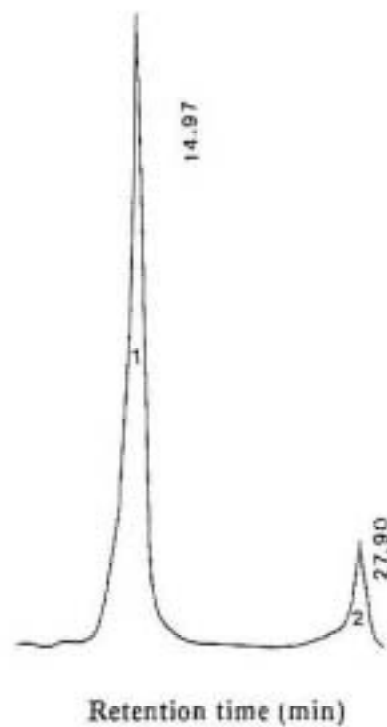


Fig. 6 HPLC profiles of separated VT-2 subunits. Peak 1, A subunit ; peak 2, B subunit

이와같은 成績은 Head등<sup>20)</sup>이 VT-1과 VT-2의 hybrid toxin을 조합하기 위하여 VT-2의 subunit를 解離하여 HPLC로 확인한 결과 A subunit는 retention time 15분에, B subunit는 17분에 각각 단일 peak를 形成하였다고 보고는 성적과 類似하였다.

## 3. 정제한 毒素의 構成아미노산 分析

정제한 VT-2의 polypeptide를 還流加水法으로 分解하여 아미노산 분석기로 분석한 결과는

Fig. 7과 같이 18종류의 구성아미노산이 檢出되었으며, 이들 아미노산의含量은 glutamic acid가 가장 높고 histidine, asparaginic acid, lysine, alanine 및 leucine 등의 順으로 높은 함량을 나타내었으며, methionine이 가장 낮은 함량을 나타내었다(Table 2).



Fig. 7 VT-2 Analysed profiles of amino acid composition of purified VT-2 by Amino acid Analyzer.

VT-2의 구성아미노산에 대한 보고는 VT-2를 encoding하는 DNA의 糖基序列을 결정하여 추측한 많은 보고가 있으나, toxin protein의 polypeptide를 직접 분해하여 구성아미노산을 밝힌 예는 흔하지 않으므로 본 성적은 VT-2의 연구에 중요한 基礎資料가 되리라 思料된다.

Table 2. Composition of amino acid of purified VT-2

Amino acids	Composition of purified VT-2( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
Asparaginic acid(Asp)	3.934
Threonine(Thr)	0.421
Serine(Ser)	0.050
Glutamic acid(Glu)	2.032
Proline(Pro)	0.049
Glycine(Gly)	2.130
Alanine(Ala)	1.541

Cysteine(Cys)	0.754
Valine(Val)	1.782
Methionine(Met)	0.445
Isoleucine(Ile)	0.648
Leucine(Leu)	1.736
Tyrosine(Tyr)	0.033
Phenylalanine(Phe)	0.919
Histidine(His)	10.829
Lysine(Lys)	2.016
Ammonia(Amm)	1.064
Arginine(Arg)	2.019
Total	32.402

#### ④. VT-2에 대한 家兔 抗血清의 생산

정제된 VT-2를 Brown등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 3개월령의 토끼에 接種하여 생산한 항체와  $10^8$  CD<sub>50</sub>

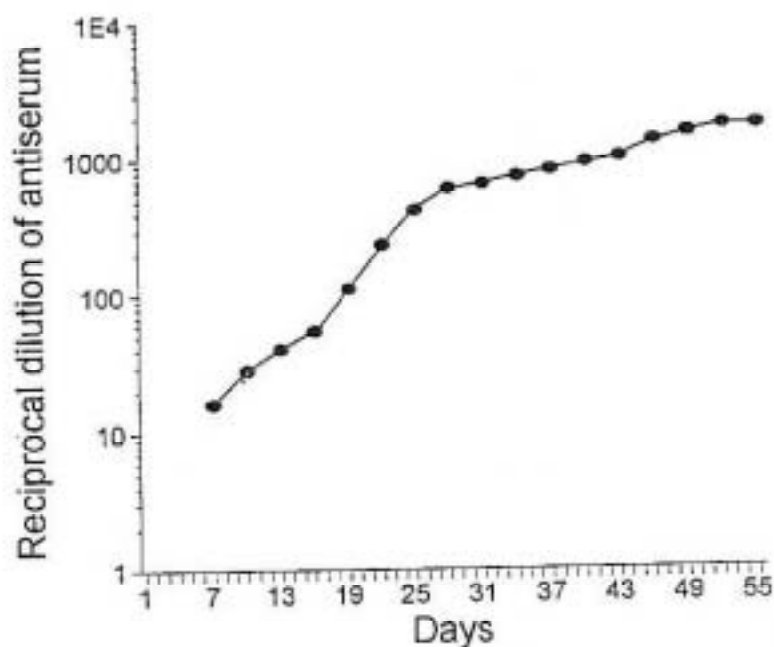


Fig. 8 Reciprocal titers of VT-2 antiserum produced from rabbit by inoculation with purified VT-2

/ml의 cytotoxicity를 나타내는 VT-2 간의 中和抗體價를 측정한 결과는 Fig. 8과 같이 1차 접종후 7일째에 1 : 16, 14일째에 1 : 48의 중화항체가를 나타내었으며, 2차 접종후 7일째에 1 : 224, 14일째에 1 : 640의 중화항체가를 나타내었다. 3차 접종후 5일째에는 1 : 1,024의 중화항체가를 나타내었고 12일째에 1 : 1,692의 항체가를 나타내었다.

Lingwood등<sup>20)</sup>과 김등<sup>21)</sup>은 verotoxin에 特異的인 receptor인 Gb3를 microplate에 固定할 수 있도록 receptor를 開發한 바 있고 본 실험에서는 토끼에 대하여 정제한 VT-2의 多柯抗血清을 생산할 수 있었으며, 이들을 이용할 경우 verotoxin-2 生産 大腸菌의 感染症에서 患者로부터 微量의 毒素을 迅速하게 檢出할 수 있는 ELISA 법이나 receptor를 이용한 REISA(receptor binding enzyme-linked immunosorbent assay) 법의 이용으로 診斷이 가능하리라 생각된다. 차등<sup>22)</sup>에 의하면 부산지역의 池瀉患者 177명중 8.5%에서 verotoxin 生産 大腸菌을 分離 報告하였던 바, 신속하고 精確한 診斷方法을 定立하기 위하여 단크론성 항체의 생산, VT에 特異적인 receptor의 분리뿐만 아니라 진단방법의 개발등에 대한 연구가 계속 이루어져야 할 것으로 思料된다.

#### IV. 參 考 文 獻

1. Hockin, J.C. and Lior, H. Haemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157 : H7 in Canada. Can. Dis. Wkly. Rep. 13 : 203-204, 1987
2. Pai, C.H., Ahmed, N., Lior, H., Johnson, W.M., Sims, H.V. and Woods, D.E. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* : a two-years prospective study. J. Infect. Dis. 157 : 1054-1057, 1988.
3. Karmali, M.A., Petric, M., Lom, C., Fleming, P.C., Arbus, S. and Lior, H. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 151 : 775-782, 1985.
4. Shanks, P.L. : An unusual condition affecting the digestive organs of the pig. Vet. Rec. 50 : 356-358, 1938.
5. Pai, C.H., Gordon, R., Sims, H.V., et al. Sporadic causes of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157 : H7. Ann. Int. Med. 101 : 738-742, 1984.
6. Konowalchuk, J., Spiers, I.J. and Wavric, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 18, 775-779, 1977.
7. Yustudo, T., Honda, T., Miwatami, T. and Takeda, Y. Characterization of purified Shiga toxin from *Shigella dysenteriae*. Microbiol. Immunol. 30 : 115-1127, 1986.
8. Downes, F.P., Barrett, T.J., Green, J.H., Aloisio, C.H., Spika, J.S., Strockbine, N.A. and Wachsmuth, I.K. Affinity purification and characterization of shiga-like toxin II and produ-

- ction of toxin specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 56 : 1926-1933, 1988.
9. Huang, A., DeGrandis, S., Friesen, J., Karmali, M., Petric, M., Cingi, R. and Brunton, J.L. Cloning and expression of the genes specifying Shiga-like toxin production in *Escherichia coli* H19. *Infect. Immun.* 166 : 375-379, 1986.
  10. Jacson, M.P., Neill, R.L., O'Brien, A.D., Holmes, R.K. and Newland, J.W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Lett.* 44 : 109-114, 1987.
  11. Karmali, M.A., petric, M., Louie, S. and Cheung, R. Antigenic heterogeneity of *Escherichia coli* verotoxins. *Lancet*, i : 164-165, 1986.
  12. Konowalchuk, J., Dickie, N., Stavric, S. and Spiers, J.L. Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 22 : 644-648, 1978.
  13. Konowalchuk, J., Dickie, N., Stavric, S. and Spiers, J.L. Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. *Infect. Immun.* 20 : 575-577, 1978.
  14. Calderwood, S.B., AuClair, F., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G.T. and Nekalanes, J.J. Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 4363-4368, 1987.
  15. Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K. and O'Brion, A.D. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type IJ. *Bacteriol.* 170 : 1116-1122, 1988.
  16. Downes, F.P., Barrett, T.J., Green, J.H., Aloisio, C.H., Spika, J.S., Strockbine, N.A. and Wachsmuth, I.K. Affinity purification and characterization of Shiga-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 56 : 1926-1933, 1988.
  17. Marques, L.R.M., Peiris, J.S., Cryz, S.J. and O'Brion, A.D. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44 : 33-38, 1987.
  18. O'Brion, A.D. and Holmes, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51 : 206-220, 1987.
  19. O'Brion, A.D. and LaVeck, G.D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* I-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40 : 675-683, 1983.
  20. Endo, Y., Tsurugi, K., Yusudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T. and Igarashi, K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157 : H7 and of Shiga toxin on Eukaryotic ribosome. *Eur. J. Biochem.* 171 : 45-50, 1988.
  21. Igarashi, K., Ogasawara, T., Ito, K., Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Nakabayashi, N.

- and Dakeda, Y. Mode of action of Verotoxins(VT1 and VT2) : demonstration of RNA N-glycosidase activity of the toxins. Abstract Presented at An International Symposium and Workshop on Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Infections, Toronto, July. 12-15, 1987.
22. Olsnes, S. and Eiklid, K. Isolation and characterization of Shigella cytotoxin. *J.Biol. Chem.* 255 : 284-289, 1980
  23. Reisbig, R., Olsnes, S. and Eiklid, K. The cytotoxic activity of Shigella toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60s ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 256 : 8739-8744, 1981.
  24. Royd, B. and Lingwood, C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron*, 51 : 207-210, 1989.
  25. Cohen, A., Hannigan, G.E., Williams, B.R.G. and Lingwood, C.A. Roles of globotriosyl and galabiosylceramide in verotoxin binding and high affinity interferon receptor. *J. Biol. Chem.* 262 : 17988-17991, 1987.
  26. Basta, M., Karmali, M.A. and Lingwood, C.A. Sensitive receptor-specified enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* verocytotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 1617-1622, 1989.
  27. Lingwood, C.A., Petric, M., Brunton, J., Cohen, A. and Karmali, M.A. Glycolipid receptor for verotoxin. Abstract Presented at An International Symposium and Workshop on Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* Infections, Toronto, July. 12-15, 1987.
  28. 김용환, Lingwood, C.A. Verotoxin 생산 대장균의 병원성에 관한 연구. *한국수의공중보건학회* 16 : 215-221, 1992.
  29. Head, S.C., Petric, M., Richardson, S., Roscoe, M.E., and Karmali, M. Purification and characterization of verotoxin 2. *FEMS Microbiol. Lett.* 51 : 211-216, 1988.
  30. Karmali, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2 : 15-38, 1989.
  31. Mary, G.K. and Joel, M.D. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *J. Clin. Microbiol.* 12 : 361-366, 1980.
  32. Brown, J.E., Griffin, D.E., Rothman, S.W. and Dotor, B.P. Purification and biological characterization of Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1. *Infect. Immun.* 27 : 1617-1622, 1982.
  33. Cerny, G. and Teuber, M. Differential release of periplasmic versus cytoplasmic proteins from *Escherichia coli* by polymyxin B. *Arch. Microbiol.* 179 : 166-179, 1971.
  34. Karmali, M.A., Petric, M., Lom, C., Fleming, P.C., Arbus, G.S. and Lior, H. the association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin producing *Escherichia*



- coli*. J. Infect. Dis. 151 : 775-782, 1985.
35. Petric, M., Karmali, M.A., Richardson S. and Cheung, R. Purification and biological properties of *Escherichia coli* verocytotoxin. FEMS Microbiol. Lett. 41 : 63-68, 1987.
  36. Lingwood, C.A., Lae, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., DeGrandis, S. and Karmali, M.A. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. J. Biol. chem. 262 : 8834-8839, 1987.
  37. MacLeod, D.L., Gyles, C.L. and Wilcock, B.P. Reproduction of edema disease of swine with purified shiga-like toxin II variant. Vet. Pathol. 28 : 66-73, 1991.
  38. Weinstein, D.L., Jacson, M.P., Samuel, J.E., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. J. Bacteriol. 170 : 4223-4230.
  40. 차인호, 권혁동, 이재남, 빈재훈, 이병규. 설사환자로부터 분리한 설사유발 원인균의 분리 및 분포도에 대한 조사연구(부제 : Verotoxin을 생산하는 병원성대장균의 분리 및 분포조사), 부산직할시 보건환경연구원 5 : 13-28, 1994.