

Verotoxin의 검출을 위한 Receptor Binding  
Enzyme-Linked Immunosorbent  
Assay (RELISA) 에 관하여

차인호 · 조현철 · 이채남 · 이홍수

역 학 조 사 과

**Verotoxin의 검출을 위한 Receptor Binding  
Enzyme-Linked Immunosorbent  
Assay(RELISA)에 관하여**

역학조사과

차인호 · 조현철 · 이채남 · 이홍수

**Receptor Binding Enzyme-Linked  
Immunosorbent Assay for Detection  
of Verotoxins**

*Epidemiology Division*

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

**Abstract**

*Escherichia coli* derived verotoxins has been implicated in the etiology of the he-

molytic uremic syndrome and hemorrhagic colitis in human, and edema disease in swine. Currently available toxin assays, however, are not suitable for most clinical or public health laboratories. This study was carried out to develop more sensitive and practical method for detection of low level verotoxins.

Globotriosyl ceramide (Gb3) and globotetraosyl ceramide (Gb4) as receptors for verotoxins were extracted from intestine of swine and kidney of canine, and the Gb3 was de-N-acylated(lyso-Gb3). Also, monoclonal antibodies were generated against purified VT2 B subunit. After TLC separation of lyso-Gb3, it was found to bind very well VT1 than VT2 to a lyso-Gb3 by immunoblotting. In order to build the sensitive receptor, lyso-Gb3 was conjugated with bovine serum albumin (BSA) and polydialdehyde (PA) by catalysates such as 1-methyl-3 (3-di-methyl-aminopropyl) carbodiimide (EDAC) and pyridine solution, respectively. Liposome, furthermore, was formed between Gb3 and phosphatidyl ethanolamine (PE) for receptor binding enzyme-linked immunosorbent assay (RELISA). As the results compared between lyso-Gb3 and PE-Gb3 liposome for detection of verotoxins, as receptor, detectable concentration of VT1 and VT2 in the RELISA coated 100ng/well of lyso-Gb3 were 1 ng and 4 ng, respectively. However, VT1 and VT2 could be detection 1 ng and 100 pg in the RELISA coated with PE-Gb3 liposome, respectively. Therefore, the RELISA using PE-Gb3 as receptor may be useful for diagnosis or detection of verotoxins infection.

## I. 서 론

Verotoxins(VT) 중 verotoxin 1(VT1)과 verotoxin 2(VT2)는 Vero cells 및 HeLa cells에 세포독성을 나타내고, VT2v(VTE)는 Vero cells에만 독성을 나타내어<sup>12,3)</sup> 이들 독소의 생물학적 감별진단에 이용되고 있으나, VT1과 VT2는 생물학적인 특성이 흡사하여 단클론성 항체를 이용한 중화법으로 진단하고 있다. 그러나 이와 같은 진단

방법은 많은 시간이 소요되어 질병의 진단과 치료에 어려움이 있으며, 경제적으로도 비효율적이다.

한편, glycosphingolipid는 세포막에 다량 함유되어 있고 극성의 탄수화물과 비극성의 ceramide로 이루어져 있으며, 탄수화물의 수, 형태 및 결합방식에 따라 globocerebroside, lactocerebroside 및 ganglioside로 대별된다.<sup>1)</sup> 이들중 globo- 계열인 globotriosyl ceramide (Gb3)와 globotetraosyl ceramide (Gb4)는 중성의 glycolipid로서 소장과 신장을 비롯한 대부분의 장기조직에서 분리되고 있으며<sup>16)</sup>, 이들은 VT를 비롯한 일부 세균과 독소의 수용체로 작용하여 숙주세포의 기능을 저하시키는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. VT가 이들 receptor와 결합하면 receptor의 전자전달작용으로 낭을 형성하여 세포질내로 수송되며, 독소는 효소작용에 의하여 A와 B subunit로 분해되고 receptor는 개회수낭을 형성하여 세포막으로 복귀한다. 세포질내에서 B subunit는 lysosome 내에서 amino acid 수준까지 분해되어 항체형성을 유도하는 항원의 정보로 작용하며, A subunit는 60S ribosome에 작용하여 숙주세포의 단백질합성을 차단하는 것으로 밝혀져 있다<sup>18)</sup>.

VT1은  $\alpha$  1-4 Gal disaccharide성분의 종말기를 가지는 Gb3와 특이적으로 결합하며<sup>11)</sup>, 돼지에서 부종병을 일으키는 VTE는 Gb3 말단부에 N-acetyl glucosamine이 추가된 Gb4와 친화성이 있는 것으로 밝혀져<sup>11)</sup> 이들을 receptor로 이용한 receptor binding enzyme-linked immunosorbent assay (RELISA)법이 개발되어 미량의 toxin검출 및 진단에 이용되고 있으나<sup>12)</sup>, VT2는 Gb3에 대하여 1개의 결합부위만 가지고 있어 이를 이용한 RELISA법으로는 민감도가 약하여 미량의 toxin 검출 및 진단을 위한 적절한 방법의 개발이 필요하다. 근년 외국에서는 Gb3를 microplate에 잘 부착되도록 deacylation 시킨 lyso-Gb3를 receptor로한 RELISA를 실시하여 verotoxin의 검출여부를 보고한 바 있으며<sup>13)</sup>, 새로운 receptor의 개발에 많은 관심을 보이고 있다.

본 연구에서는 VT2의 B subunit에 대한 단크론성 항체를 생산하고 동물의 장기로부터 분리한 Gb3 및 lyso-Gb3에 양이온성 물질을 결합시켜 결합가름 높게 하므로써 VTS의 검출 및 진단을 위한 보다 신속하고 정확한 RELISA법을 모색하기 위하여 새로운 receptor를 개발하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. VT2에 대한 단클론성 항체생산

#### 1) 면역

생후 6주령의 BALB/c mouse 5마리에 *E. coli* LCDC O59로부터 분리정제한 VT2 B subunit 0.1~0.5 $\mu$ g을 복강내로 접종하고, 21일과 35일 경과후 추가접종하여 면역을시켰다. 1일째에는 B subunit와 complete Freund adjuvant를 동량으로 혼합하여 접종하고, 21일경에는 B subunit와 incomplete Freund adjuvant를 동량으로 혼합하여 피하로 추가접종하였으며, 35일경에는 B subunit와 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.0)를 동량으로 혼합하여 정맥내로 주입하였다.

#### 2) 융합

최종면역후 3일이 경과된 BALB/c mouse로부터 비장을 적출하고 비장세포를 분리하였다. 골수종 세포주 P<sub>3</sub>NS<sub>1</sub>-Ag4-1와 비장세포를 1:10의 비율로 혼합하여 원심침착한 다음, 1ml의 50% polyethylene glycol 1,000에 1분간 침적하여 세포를 융합시켰다. 융합한 세포에 HAT 배지를 1, 3, 5 및 7일에 well당 50 $\mu$ l씩 첨가하고, 9일째에 150 $\mu$ l씩의 배지를 교환하여 융합세포의 증식을 확인하였다.

#### 3) 선발

융합후 10~15일 사이에 융합된 세포가 well 바닥의 1/3이상 성장하였을때 배양 삼층액을 취하여 세포독성 중화반응법으로 항체분비 세포를 선발하였다. 항체생산 세포를 microplate well에 옮겨 배양하면서 항체역가가 계속 유지되고 세포의 증식이 활발한 hybrid를 선발하여 cloning을 실시하였다. 항체의 역가가 높은 hybridoma를 최종 선택하여 증식시키고, 그 배양액을 수집하여 RELISA 및 immunoblotting 시험에 사용하였다.

## 2. Glycolipid의 추출

Receptor의 추출을 위하여 돼지 5두의 소장 1kg 및 개 5두의 신장 1kg으로부터 Lingwood 등<sup>40)</sup>의 방법에 따라 Fig. 1과 같이 실시하였다. 세절한 공시재료에 chloroform을 가하여 nonpolar lipid를 추출하고, acetone-methanol(A/M)용액을 가하여 중성의 glycolipid를 석출하였다. A/M층은 NaOH용액으로 비누화하여 phospholipid를 제거한 다음, Forch씨 법<sup>41)</sup>에 따라 하층액을 회수 건조시키고 glycolipid를 silicic acid column에서 gradient fraction법으로 분획 회수하여 orcinol로 염색한 후 Gb3와 Gb4를 수집하였다.

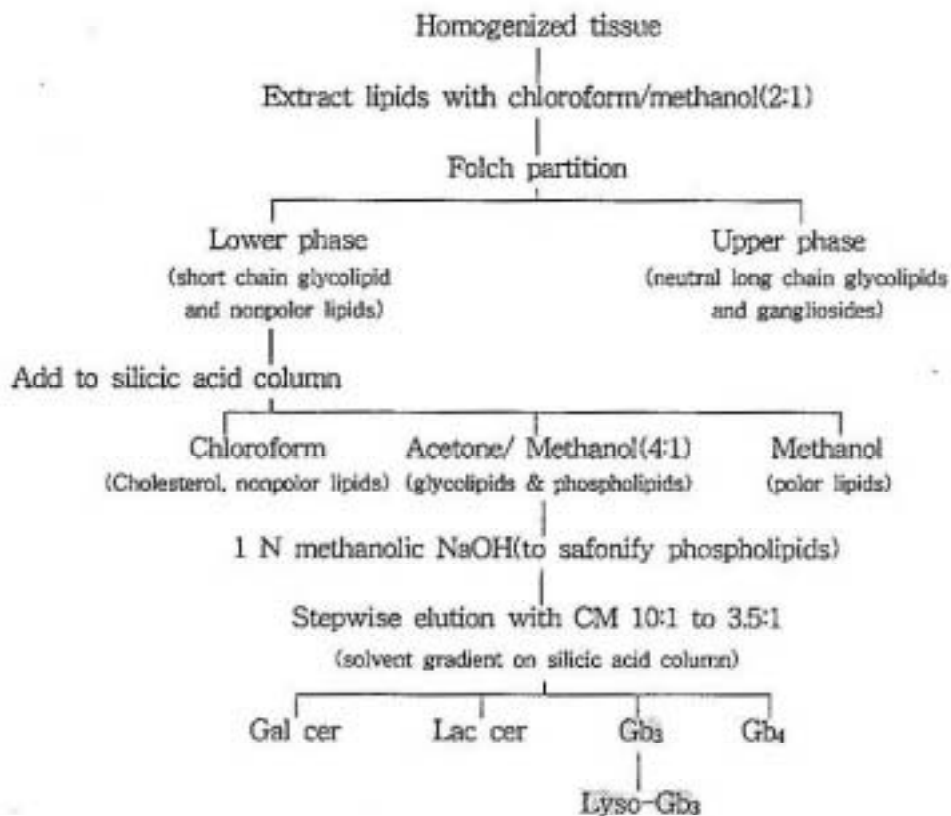


Fig. 1 Extraction method of glycolipid from animal tissues.

## 5. Lyso-Gb3의 형성

동물의 장기로부터 추출한 Gb3를 Lingwood 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 1 N NaOH methanol 용액으로 용해시켜 98℃에서 3시간 동안 가열한 다음, 동량의 1N HCl 용액을 가하여 중화시켰다. 혼합액을 건조하고 chloroform/methanol (2:1) 용액으로 현탁시킨 다음, 상층액을 재건조하여 silicic acid column에 chloroform/methanol 용액을 6:1~1:1까지 농도구배로 분획하고 각 분획을 TLC plate에 전개한 후 orcinol로 염색하여 확인한 다음, 96-well microplate에 coating시켜 RELISA법으로 VT1과 VT2의 검출을 비교하였다.

## 6. 양이온성 물질의 결합에 의한 Gb3의 유도체 형성

Lyso-Gb3와 bovine serum albumin (BSA)의 conjugation은 lyso-Gb3를 dimethyl formamide에 용해하여 BSA와 혼합한 다음, 촉매제로써 1-methyl-3(3-dimethyl aminopropyl) carboimide (EDAC)에 1~3일간 반응시켰다. 이 반응산물을 50% cold ethanol로 침전시키고 동일용액으로 용해하여 TLC에 전개한 다음 orcinol염색 및 immunoblotting법에 따라 verotoxin과의 결합유무를 확인하는 한편, pyridine용액내에서 lyso-Gb3와 polydialdehyde (PA)를 24시간 반응으로 conjugation시켜 반응산물을 TLC에 전개하고 orcinol염색 및 immunoblotting법으로 verotoxins과의 결합유무를 확인하였다. 또한 Gb3와 phosphatidyl ethanolamine (PE)와의 liposome을 형성시키기 위하여 각 농도의 Gb3와 PE를 chloroform/methanol (2:1) 용액에 용해시킨 다음, N2로 건조시키고 증류수 1ml을 가하여 sonicator로 1분간 처리하여 liposome을 형성시켰다. 이 반응산물을 receptor로하여 RELISA법에 의한 VT1과 VT2의 검출을 비교하였다.

## 7. Immunoblotting

VT1 및 VT2에 대한 receptor의 친화성을 알아보기 위한 immunoblotting은 Lingwood 등<sup>10)</sup>의 방법에 따라 Gb3 및 lyso-Gb3를 TLC plate에 전개하고 0.3% gelatin 용액으로

37°C에서 18시간 정치하면서 blocking하였다. 세척후 정제한 VT1 및 VT2 (0.5µg/ml)를 가하여 1시간 동안 반응시키고 tris-borate buffered saline (pH 7.4)으로 세척한 다음, VT1 및 VT2에 대한 항체를 가하여 1시간 동안 반응시켰다. Plate를 세척한 후 각 toxin에 대한 conjugate를 가하여 90분간 반응시키고, 기질용액으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 4-chloro-1-naphtol 용액을 가하여 15분간 반응시킨 다음 TLC plate를 건조시켜 receptor와 VT2간의 반응유무를 판독하였다.

### 8. RELISA법에 의한 toxin의 검출시험

Lyso-Gb3와 Gb3의 유도체를 receptor로한 RELISA는 Basta 등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 96-well microplate의 각 well에 receptor 희석액 100µl 씩을 분주하여 하룻밤 정치시켜 흡착시키고, plate를 PBS에 세척 후 0.1% gelatin을 가하여 상온에서 blocking 한다음 VT1 및 VT2를 0.01% BSA에 각 농도로 희석하여 well에 가하고 45분간 반응시켰다. PBS-Tween 20으로 세척하고 VT1에 대하여는 polyclonal rabbit antibody를, VT2에 대하여는 단클론성 항체를 반응시킨후, 각각에 대하여 peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG와 peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG를 가하여 반응시켰다. 기질용액으로서 0.04% orthophenylenediamine과 0.045% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 포함하는 phosphate citrate buffer (pH 5.0)를 가하여 암실에서 20~30분 반응시킨 다음, 20µl의 1M sulfuric acid로 반응을 정지시켜 ELISA Reader로 492nm에서 판독하였다.

## III. 결 과

### 1. 동물의 장기에서 Gb3의 추출

개의 신장으로부터 Lingwood 등<sup>10)</sup>의 방법에 따라 silicic acid column으로 glycolipid를 추출하여 TLC에 전개하고 orcinol 염색으로 확인한 결과는 Fig. 2와 같이 78번 fraction 이하에서는 fatty acid가 검출되었고 79번에서 91번 fraction까지는 fatty acid와 Gb3가 증점된 상태로 검출되었으며, 92번에서 115번 fraction에서는 Gb3만



순수하게 검출되었다. 돼지의 소장에서는 55번 fraction 이하에서 fatty acid가 검출되었고, 57번에서 71번 fraction까지는 fatty acid와 Gb3가 중첩되어 검출되었으며 72번에서 98번 fraction까지는 Gb3만 검출되었다. 이들 중첩된 부분을 재처리하여 Gb3를 순수분리 하였다.

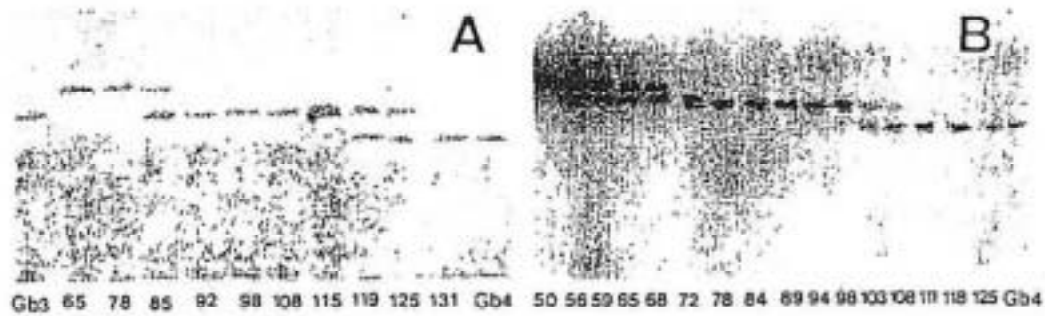


Fig. 2 Patterns of glycolipid extracted from animal organs on the TLC sheet.  
A, kidney of canine ; B, intestine of swine

## 2. Gb3의 deacylation에 의한 lyso-Gb3의 제조

추출한 Gb3를 1N NaOH 용액으로 처리하여 silicic acid column으로 lyso-Gb3를 분획하고 TLC에 전개하여 orcinol로 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 48번 fraction부터 63번 fraction까지는 deacylation되지 않은 Gb3가 검출되었고, 82번 fraction부터 95번 fraction까지 lyso-Gb3가 검출되어 순수분리할 수 있었다.

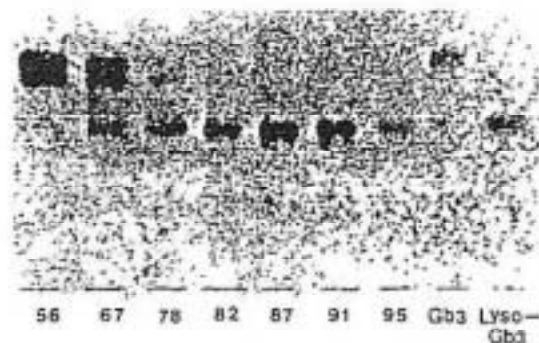


Fig. 3 Patterns of lyso-Gb3 formed from Gb3 on the TLC sheet.

IgG를 가하여 immunoblotting한 것이며, C는 VT1과 VT1에 대한 rabbit의 polyclonal antibody 및 peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG를 가하여 immunoblotting을 실시한 결과로서 VT1은 VT2보다 lyso-Gb3에 강한 반응성을 나타내는 것이 확인되었다.

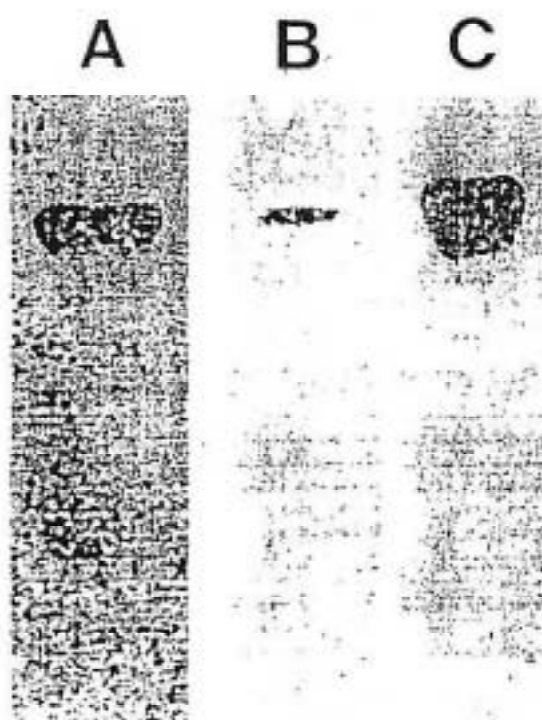


Fig. 4 Immunoblotting for VT2 detection on the TLC sheet. A, thin-layer chromatogram of lyso-Gb3 stained with orcinol; B and C, binding of VT2 (B) and VT1 (C) to immobilized lyso-Gb3 on the TLC sheet, respectively.

한편, lyso-Gb3를 BSA 및 PA로 conjugation시켜 TLC에 전개하고 orcinol로 염색하여 확인한 결과 Fig. 5의 A와 같이 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 이들 receptor에 대한 VT1과 VT2의 결합유무를 immunoblotting으로 확인한 결과는 각각 Fig. 5의 B 및 C와 같다. VT1은 BSA 및 PA로 conjugation된 lyso-Gb3에 강하게 결합한 반면 (Fig. 5의 B), VT2는 VT1 보다 아주 미약한 결합을 나타내었다(Fig. 5의 C).

### 3. VT2에 대한 단클론성 항체생산

*E. coli* LCDC 059 주로부터 분리정제한 VT2의 B subunit로 면역시킨 BALB/c mouse의 비장세포를 P<sub>3</sub>-NS1-Ag4-1 골수종 세포주와 융합하여 clone화한 후, toxin과의 중화반응으로 약 1,500개의 융합세포에 대하여 항체형성 유무를 검사한 결과 Table 1과 같이 교잡세포주인 18G5와 27H3 등 2주의 교잡세포주가 단클론성 항체를 생산하였다. 생산된 항체에 대하여 각 toxin과의 교차반응성을 조사한 결과 VTE에 대하여 약한 중화반응성을 나타내었으나, VT1에 대하여는 중화반응을 전혀 나타내지 못하였다. VT2에 대하여는 강한 중화반응을 나타내어 비교적 특이적인 항체임을 인정할 수 있었다.

Table 1. Characteristics of monoclonal antibody against VT2 B subunit

Monoclonal antibodies produced by	Neutralization to*		
	VT1	VT2	VTE
18G5 cells	-	+++	+
27G3 cells	-	+++	+

\* : Cytotoxic titers of VT1, VT2 and VTE used in neutralization test was 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>3</sup> CD<sub>50</sub>/ml, respectively. CD<sub>50</sub> was expressed as the reciprocal of the dilution required to kill 50% of the cells.

- : Non reaction, + : Weak reaction, +++ : Strong reaction

### 4. Receptor를 이용한 immunoblotting

Lyso-Gb3와 VT1 및 VT2의 immunoblotting 결과는 Fig. 4와 같다. A는 lyso-Gb3만을 TLC에 전개하여 orcinol로 염색한 것이고, B는 lyso-Gb3를 TLC에 전개하고 VT2와 VT2 B subunit에 대한 단클론성 항체 및 peroxidase conjugated rabbit anti-mouse

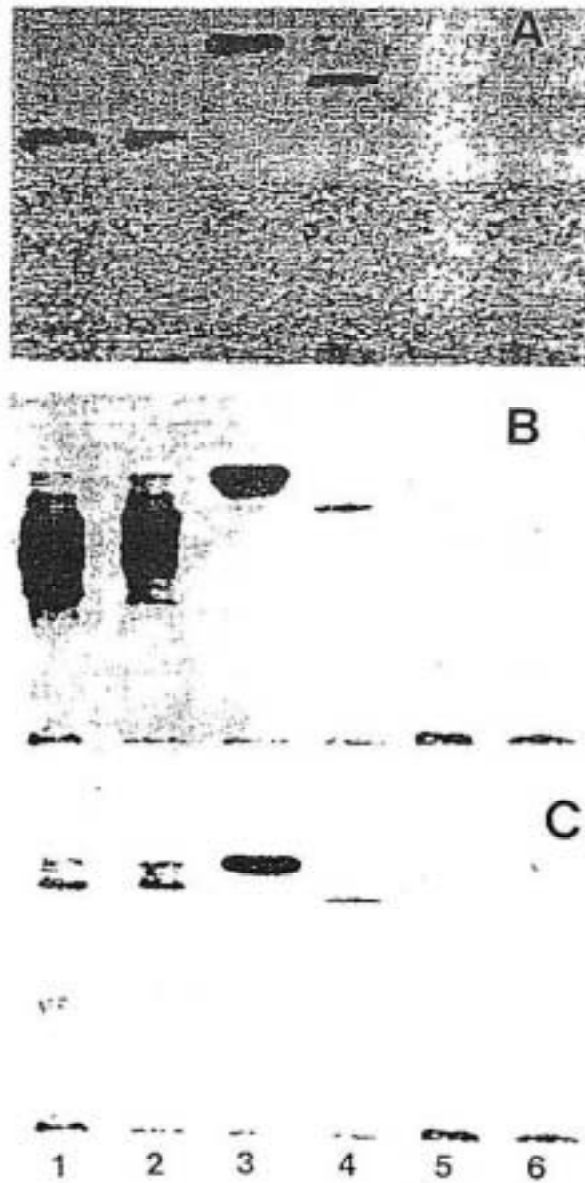


Fig. 5 Detection of conjugated derivatives and binding affinity of conjugative derivatives of lyso-Gb3 for verotoxins detection. A, conjugated derivatives of lyso-Gb3 stained with orcinol, B and C, binding affinity of conjugative derivatives to VT1 and VT2, respectively. Lane 1, BSA-lyso-Gb3 ; 2, PA-lyso-Gb3 ; 3, lyso-Gb3 ; 4, Gb3 standard ; 5, PA ; 6, BSA

## 5. Lyso-Gb3를 receptor로한 VT1과 VT2의 검출비교

### 1) Lyso-Gb3를 receptor로한 VT1과 VT2의 검출

Lyso-Gb3를 receptor로한 VT1과 VT2의 검출을 RELISA로 확인한 결과는 Fig. 6과 같다. Well당 100 ng의 lyso-Gb3를 microplate에 흡착시킨 후, VT1과 VT2의 음성 control을 반응시켜 4회 측정하였을 때 각각의 background OD 평균값은 0.08 및 0.07 이었다. 각 toxin의 양을 달리하여 측정한 결과 VT1은 1 ng의 독소량 근처에서 RELISA curve가 변하는 endpoint인 반면, VT2는 4 ng의 독소량에서 RELISA curve가 변화되는 endpoint 였다. 또한 VT2는 endpoint 이상의 독소량에서도 VT1보다 비교적 완만한 RELISA curve를 나타내어 immunoblotting에서의 결과와 동일하게 lyso-Gb3는 VT2보다 VT1에 더 효과적인 receptor임을 알 수 있었으며, 같은 조건으로 증복시험한 결과 측정값 변동계수는 OD 0.1이하를 나타내어 재현성을 인정할 수 있었다.

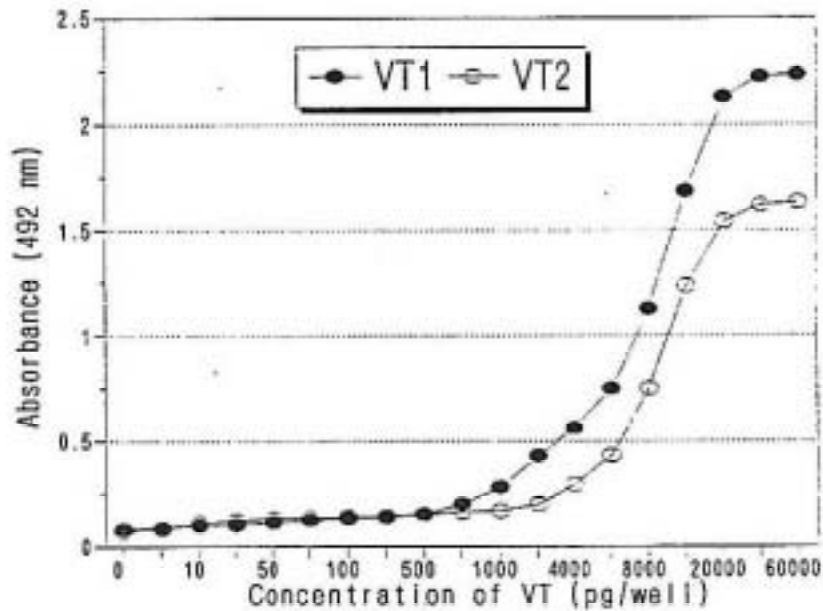


Fig. 6 Dose response of purified VT1 and VT2 in the RELISA used lyso-Gb3 as receptor.

2) PE-Gb3 liposome를 receptor로한 VT1과 VT2의 검출

Gb3와 PE를 이용하여 형성된 liposome을 receptor로하여 VT1과 VT2의 검출을 확인한 결과는 Fig. 7과 같다. 100 ng의 PE-Gb3 liposome을 microplate well에 흡착시키고 VT1과 VT2의 음성 control을 4회 측정하였을 때 각각의 background OD 평균값은 0.1 및 0.12로 나타나 lyso-Gb3를 receptor로한 RELISA에서 보다 background OD 값이 높아진 것을 알 수 있었다. 그러나 VT1의 검출을 위한 RELISA에서는 1 ng의 toxin 량이 RELISA curve를 변화시키는 endpoint였으며, VT2의 경우에는 100 pg의 toxin 량이 RELISA curve를 변화시키는 endpoint로 확인되어 PE-Gb3 liposome은 VT1과 VT2의 검출을 위하여 사용하는 lyso-Gb3 receptor 보다 더 민감한 receptor임을 확인할 수 있었으며, 중복시험한 결과 측정간 변동계수는 OD 0.1 이하로 재현성을 인정할 수 있었다.

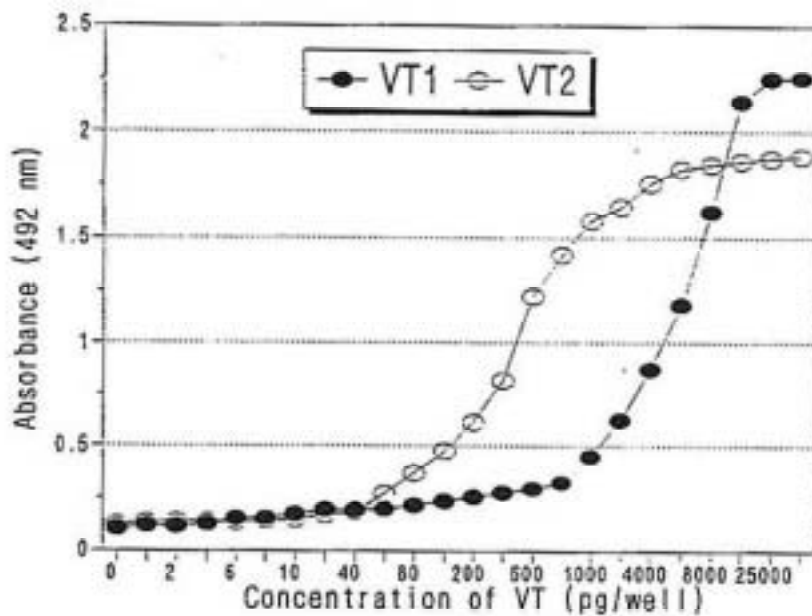


Fig. 7 Dose response of purified VT1 and VT2 in the RELISA used PE-Gb3 as receptor.

## IV. 고 찰

일부 병원성 대장균이 생성하는 verotoxins은 *Shigella dysenteriae* type I이 생성하는 Shiga toxin과 유사하고 사람과 동물에서 여러가지 질병을 일으키며<sup>34,17,18)</sup>, 그 종류는 VT1, VT2 및 VTE등 3종류가 밝혀져 있다<sup>12,19)</sup>. 종래에는 이들에 의하여 유발되는 질병의 진단을 위하여 VT 생성 대장균의 분리, Vero cells 이나 HeLa cells을 이용한 생물학적인 방법, DNA hybridization을 이용한 진단법 등을 시도하여 왔으나 여러가지 단점으로 최근에는 신속하고 정확한 진단을 위하여 ELISA법을 응용한 receptor binding enzyme-linked immunosorbent assay (RELISA)법으로 진단하기 위한 연구에 많은 관심을 나타내고 있는 실정이다. 이러한 RELISA를 위하여는 VT에 대한 단클론성 항체와 특이적인 receptor 개발이 우선적으로 이루어져야 한다. 따라서 본 연구에서는 VT의 receptor로 알려진 glycosphingolipid와 특이적인 결합에 관여하는 VTs의 B subunit에 대한 단클론성 항체의 생산가능성을 파악하는 한편, 동물의 장기관에서 receptor를 분리하여 여러가지 화학적인 처리로 미량의 VTs를 검출할 수 있는 새로운 RELISA 법을 모색하고자 하였다.

본 실험에서 VT의 B subunit에 대한 단클론성 항체 생산의 가능성을 조사하기 위하여 선행한 실험에서 정제한 VT2의 B subunit를 BALB/c mouse에 면역시키고 골수종세포와 융합하여 clone화한 결과, 2주의 교잡세포가 VT2에 특이적인 단클론성 항체를 생산하였으나 VTE와도 소량의 교차반응을 나타내었다. 이는 VTE가 VT2에 대한 항체로 중화된다고 한 Marques 등<sup>20)</sup>의 성적과 무관하지 않으며, VT2와 VTE의 B subunit 구조가 흡사할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 개의 신장과 돼지의 소장을 재료로하여 glycolipid를 분획한 결과 fatty acid, lactose ceramide, Gb3 및 Gb4 순으로 전개되어 VTs의 receptor인 Gb3와 Gb4를 순수하게 분리할 수 있었다. 이러한 결과는 사람의 신장재료로부터 VTs의 receptor를 분리한 Boyd와 Lingwood<sup>21)</sup>의 결과와 일치하였다.

Gb3는 VT1과 VT2의 receptor로 작용하지만 Gb3의 구성성분중 지질성분으로 인하여 ELISA plate에 흡착이 되지 않는다. Lingwood 등<sup>13)</sup>은 Gb3를 deacylation 함으로서 plate에 흡착될 수 있는 lyso-Gb3를 만들었으며, 이를 receptor로 하여 VT1을

미량 분석할 수 있는 RELISA 법을 개발한 바 있으나, VT2는 lyso-Gb3와 결합력이 약하여 미량의 VT2 검출에는 부적합하다고 하였다. 본 실험에서도 TLC sheet에 lyso-Gb3를 전개하고 immunoblotting으로 VT1과 VT2의 결합정도를 확인한 바, Lingwood 등<sup>10)</sup>의 결과와 동일하게 VT1의 결합은 강하게 나타내었으나, VT2와의 결합정도는 미약하였다.

본 연구에서는 미량의 VT1과 VT2를 동시에 검출할 수 있는 receptor를 만들기 위한 방법의 일환으로 lyso-Gb3에 양이온성 물질인 BSA와 PA를 결합시켜 immunoblotting으로 결합정도를 확인한 바, VT1에 대하여는 lyso-Gb3를 receptor로한 결과보다 더 강한 결합반응을 보였으나, VT2에 대한 결합정도는 역시 약하였다.

Lyso-Gb3를 receptor로한 RELISA로 VT1과 VT2의 반응정도를 비교하여 본 결과, immunoblotting에서의 결과와 유사한 성적을 나타내었다. VT1은 1 ng 이상, VT2는 4 ng 이상의 toxin 량에서 검출이 인정되어 VT1의 lyso-Gb3에 대한 결합정도는 VT2보다 약 4배 정도 민감하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로 보아 BSA 또는 PA를 결합시킨 lyso-Gb3는 lyso-Gb3보다 VT1의 검출에 더 민감한 receptor로 이용할 수 있으리라 생각된다.

VT2에 민감한 receptor를 모색하기 위한 다른 일련의 방법으로 Gb3에 PE를 반응시켜 liposome을 형성하고 이를 receptor로하여 VT1과 VT2의 검출을 비교한 결과 VT1은 1 ng 이상, VT2는 100 pg 이상의 toxin 량에서 검출이 인정되어 VT2는 VT1보다 Gb3-PE liposome에 대한 결합정도가 약 10배 정도 민감하다는 것을 알 수 있었다. VT1의 Gb3-PE liposome에 대한 친화성도 lyso-Gb3에 대한 친화성 보다 더 높아 RELISA법을 이용한 VT1 및 VT2의 검출시 receptor로써 PE-Gb3 liposome이 가장 효과적인 것으로 생각되며, 공인된 음성 및 양성 control의 사용으로 RELISA의 quality control이 시급히 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

VT2의 B subunit에 대한 단클론성 항체생산의 가능성을 확인하는 한편 미량의



verotoxins 검출을 위하여 동물의 장기로부터 receptor를 추출하고 양이온성 물질과 이들을 결합시킨 receptor를 이용하여 RELISA를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 개의 신장과 돼지의 소장으로부터 VT에 특이적으로 결합하는 receptor인 Gb3 및 Gb4를 순수분리하였으며, Gb3를 deacylation 함으로써 lyso-Gb3를 형성할 수 있었다.
2. 정제된 VT2의 B subunit에 대한 단크론성 항체를 생산하여 중화반응으로 VT1 및 VTE에 대한 교차반응성을 조사한 결과 VT1에 대하여는 중화반응을 나타내지 않았으며, VTE에 대하여는 약한 교차반응을 나타내었다.
3. Lyso-Gb3를 TLC sheet에 전개한 후, VT1과 VT2의 결합정도를 immunoblotting으로 확인한 결과 VT1은 VT2보다 lyso-Gb3에 강하게 결합하였으며, lyso-Gb3에 양이온성 물질을 결합시킨 lyso-Gb3-BSA 및 lyso-Gb3-PA를 receptor로한 immunoblotting에서도 VT2 보다 VT1이 강한 결합정도를 나타내었다.
4. Lyso-Gb3를 receptor로한 RELISA에서 VT1은 1ng의 독소량 이상을, VT2는 4 ng의 독소량 이상을 검출할 수 있었으며, Gb3에 PE를 처리하여 liposome을 형성한 후 이를 receptor로한 RELISA에서 VT1은 1ng의 독소량 이상을, VT2는 100pg의 독소량 이상을 검출할 수 있어 PE-Gb3 liposome 형태의 receptor는 VT1 및 VT2의 검출을 위한 가장 효과적인 receptor로 인정할 수 있었다.

## VI. 참고문헌

1. Konowalchuk, J., Dickie, N., Stavric, S. and Spiers, J.L. 1978, Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin, *Infect. Immun.*, 20 : 575-577.
2. Konowalchuk, J., Spiers, J.L. and Stavric, S. 1977, Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, 18 : 775-779.

3. Marques, L.R.M., Peiris, J.S., Cryz, S.J. and O'Brien, A.D. 1987, *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant Shiga-like toxin II, *FEMS Microbiol. Lett.*, 44 : 33–38.
4. Kanfer, J.N. and Hakomori, S.I. 1983, In handbook of lipid research. Volume 3. sphingolipid biochemistry, *Plenum Press, New York*, p 485.
5. Makita A. 1964, Biochemistry of organ glycolipids : II. Isolation of human kidney glycolipids, *J. Biochem.*, 55 : 269–276.
6. Sweely, C.C. and Klionsky, B. 1963, Fabry's disease : classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid, *J. Biol. Chem.*, 238 : 3148–3150.
7. Cohen, A., Hannigan, G.E., Williams, B.R.G. and Lingwood, C.A. 1987, Roles of globotriosyl and galabiosyl ceramide in verotoxin binding and high affinity interferon receptor, *J. Biol. Chem.*, 262 : 17088–17091.
8. Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudu, T., Takeda, Y., Ogasawara, T. and Igarashi, K. 1988, Site of action of a verotoxin(VT2) from *Escherichia coli* 0157 : H7 and of shiga toxin on eukaryotic ribosome, *Eur. J. Biochem.*, 171 : 45–50.
9. Boyd, B. and Lingwood, C.A. 1989, Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue, *Nephron.*, 51 : 207–210.
10. Clugston, R.E. and Nielsen, N.O. 1974, Experimental oedema disease of swine(*E. coli* enterotoxemia). I. Detection and preparation of an active principle, *Can. J. Comp. Med.*, 38 : 22–28.
11. Samuel, J.E., Perera, L.P., Ward, S., O'Brien, A.D., Ginsburg, V. and Krivan, H.C. 1990, Comparison of the glycolipid receptor specificities of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants, *Infect. Immun.*, 58 : 611–618.
12. Basta, M., Karmali, M.A. and Lingwood, C.A. 1989, Sensitive receptor-specified

- enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* verocytotoxin, *J. Clin. Microbiol.*, 27 : 1617-1622.
13. Lingwood, C.A., Petric, M., Brunton, J., Cohen, A. and Karmali, M.A. 1987, Glycolipid receptor for verotoxin, *Abstract presented at an International Symposium and Workshop on Verocytotoxin-producing Escherichia coli infections, Tronto, July*, p 12-15.
  14. Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., DeGrandis, S. and Karmali, M.A. 1987, Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro, *J. Biol. Chem.*, 262 : 34-39.
  15. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.A. 1957, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226 : 49-521.
  16. Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.C., Arbus, G.S. and Lior, H. 1985, The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*, *J. Infect. Dis.*, 151 : 775-782.
  17. Pai, C.H., Ahmed, N., Lior, H., Johnson, W.M., Sims, H.V. and Woods, D.E. 1988, Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* : a two year prospective study, *J. Infect. Dis.*, 157 : 1054-1057.
  18. Weinstein, D.L., Jackson, M.P., Samuel, J.E., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. 1988, 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.
  19. Konowalchuk, J., Dickie, N., Stavric, S. and Speirs, J.L. 1978, Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, 22 : 644-648.