

## *Vibrio fluvialis*의 세포외 Hemolysin(용혈소)에 관한 특성

허문수 · 송준복 · 이재희 · 여인규 · 이미현\*  
제주대학교 · 부산대학교

### 서론

병원성 *Vibrio spp* 등의 추정되는 병원성 인자들로서는 Hemolysin(용혈소) Protease, Phospholipase와 Siderophores 등 여러 가지가 있으며 이 가운데 Hemolysin 은 공통인자로 중요시되어 왔다. *V. fluvialis*는 자연환경에서도 분리가능 하였지만, 임상에서도 분리되었다. 본 연구에서는 병원성 비브리오속인 *V. fluvialis*의 용혈소를 분리정제하여 그 물리화학적 특성을 확인하였다.

### 재료 및 방법

사용균주는 일본국립위생연구소 T. Shimada에게 분양 받은 *Vibrio fluvialis* NCT 11327의 표준균주를 사용하였다. 용혈활성의 측정은 용혈소와 2% 사람적혈구 부유액을 동량 혼합하여 37°C에서 2시간 반응 시킨 후 원심분리하여 상층액을 540nm에서의 흡광도로 측정하였다. 이때 반응액의 회석시에 0.1% BSA(bovine serum albumin)을 함유한 PBS(0.67M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.07M NaCl pH7.0)를 사용하였다. 각 반응시에 1% Triton X-100에 의한 적혈구 용혈의 흡광도를 100% 용혈로 정하였으며, 본 실험에서의 용혈소의 한단위는 20% 용혈의 값으로 정하였다. Bradford 등의 미량정량법으로 실시하였다. 황산암모늄에 의한 침전은 균의 생육도가 640nm에서 흡광도가 약 1.2~1.5에 이르렀을 때, 원심분리(6,000rpm, 30분, r=30cm)한 후, 상층액을 취하여 40%(243g/l)의 황산암모늄을 가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리(6,000rpm, 20분, r=30cm)하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물을 0.1M NaCl을 가한 0.05M Tris-Cl(pH 7.5)완충액에 녹여서 동일 완충액으로 2~3일간 투석시키면서 수 차례 완충액을 교환하였다. 충분히 투석한 황산암모늄 침전물(조용혈소)을 원심분리(10,000rpm, 20분, r=20cm)하여 불용성 침전물을 제거시킨 후 DEAE-Sephadex A-5 Columne(2.7×30cm) 크로마토그래피를 실시하였다. 0.1M NaCl을 가한 0.05M Tris-Cl(pH 7.5) DEAE-Sephadex A-50 Column에 흡착시킨 후, 동일 완충액으로 비흡

착 단백질을 충분히 용출시킨 다음 완충액 NaCl로 0.1M~1M농도의 직선구배를 걸어 흡착, 단백질을 용출시켰다. 용출 후 활성부위를 모아 2차 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. 먼저 활성부위를 모아 완충액을 교환해가며 충분히 투석한 후, 원심분리(10,000rpm, 20분, r=20cm)하여 불용성 물질을 제거하고 1차와 동일한 조건으로 2차 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. 이 때 유속은 시간당 25ml로 하였으며 1개의 분획은 4~5ml로 하였다. 2차 이온교환 크로마토그래피로부터 활성부위를 모아 0.1M NaCl을 가한 .05M Tris-Cl(pH 7.5)완충액으로 충분히 투석 시킨 후, 원심분리하여 동일 완충액으로 평형화 시킨 Sephadex G-100 Column(2.6×90cm)에 첨가하여 동일완충액으로 용출시켰다. 이 때 유속은 시간당 12ml로 하였으며 1개의 분획은 6ml로 하였다. Davis법에 준하여 정제 확인을 실시하였다.

## 결과 및 요약

용혈소의 정제는 ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-50와 Sephadex G-100 gel permeation chromatography를 거쳐 *V. fluvialis* 용혈소는 366배로 정제되었으며 회수율은 각각 11.6%로 나타났다. 전기영동법과 면역 침강법으로 용혈소를 정제를 확인한 결과 단일 밴드와 단일 침강대 형성을 관찰할 수 있었다. *V. fluvialis*의 용혈소의 분자량은 65,000이었고, SDS-PAGE결과 subunit는 존재하지 않았다. 또한 열에 불안정한 이열성 용혈소이며  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ 와 cholesterol에 의해 용혈활성이 저해되었다. 용혈기작에 있어서 온도의존성 용혈기작으로서 최적 용혈의 온도는 37~43°C로 나타났다. 정제용혈소의 pH안전성은 pH6.0, 10.0에서 불안정 하였다. 용혈활성에 있어서 최적 혈구 농도는 0.5 ~2.0%이었다.

## 참고문헌

- Andrews, P., 1970. Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. *Methods Biochem. Anal.* 18:1-10.
- Asao, T., and G. Sakaguchi., 1994. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.* 46:122-130.
- Avigad, L. S., and A. W. Bernheimer., 1996. Inhibition by zinc of hemolysis induced by bacterial and other cytolytic agents. *Infect. Immun.* 13:1378-1386.