

# Vibrio parahaemolyticus에 대한 Immunoglobulin yolk(IgY)의 생산과 특이성 조사

김예정, 심원보, 박선자, 박정현, 정덕화

경상대학교 대학원 응용생명과학부

## 1. 서론

*Vibrio parahaemolyticus*는 1950년 일본에서 처음 분리되었으며, 장염 비브리오 식중독을 일으키는 원인균이다. 장염비브리오균은 해수에서 서식하는 세균으로 2~5%농도의 식염에서도 잘 자란다. 장염 비브리오 식중독의 주원인은 해산물의 섭취로 인한 것으로, 우리나라의 경우 수산물의 소비가 많고 날것의 섭취가 많아 *Salmonella* 다음으로 *Vibrio*균에 의한 식중독 발생건수가 높은 비율로 발생하고 있다.

계란의 난황에 존재하는 IgY는 IgG 계열의 수용성 면역단백질로써, 어미닭이 획득한 면역항체가 난황 중에 이행, 축적된 것이며, 계란 한 개 당 항체의 양은 100~150 mg정도로 면역된 닭 한 마리로부터 생산될 수 있는 항체의 양은 매우 많다. 이러한 IgY는 분리가 쉽고 항혈청보다는 값싼 비용으로도 대량 확보가 가능하며, 항원과 특이적인 반응을 일으키는 특징 때문에 순수한 연구분야, 진단분야에서 폭 넓게 이용되고 있다. 또한 계란항체의 경구 투여에 의한 실험동물 장 내에서의 *E. coli*나 rotavirus의 감염 예방에도 효과가 있다고 보고되어 있다.

그러므로 본 연구에서는 *V. parahaemolyticus*의 lipopolysaccharide (LPS)층을 분리하여 암탉에 면역시켜 항 비브리오 난황을 생산하고 항체역가의 변화와 특이성을 조사하여 항체의 이용방안을 모색하였다.

## 2. 재료 및 방법

**항원제조 및 면역** : 생명공학연구소 유전자원센터에서 분양받은 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2729를 사용하였으며, 3% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth(TSB) 배지를 사용, 37°C에서 24시간동안 진탕 배양하였다. *V. parahaemolyticus*의 LPS층을 Westphal과 Jann<sup>3)</sup>의 phenol- hot water extraction method에 의해서 추출하였으며, polyethylene glycol을 이용하여 농축 후 동결 건조시켜 사용하였다.

분리한 LPS층을 항원(10 mg/mL)으로 사용하여 28주령 된 산란용 암탉(Hylain)에 Freund's complete adjuvant와 1:1로 emulsion 후 다리 근육에 각각 1차 면역을 하였다. 2, 3차 면역은 Freund's incomplete adjuvant를 항원과 1:1 emulsion 하여 1차 면역 후 2주 간격으로 실시하였고, 4차 면역은 항원만 주입하였다.

**계란 항체 정제** : 면역기간동안 생산된 계란은 매일 수집하고, Akita와 Nakai의 water-dilution<sup>2)</sup>법에 의해 난황으로부터 IgY를 분리 정제하였고, 본 실험에서 시행한 IgY 정제방법의 평가를 위해 Promega에서 판매 중

인EGGstract™ IgY purification system kit로 IgY를 추출하여 water-dilution법으로 정제한 IgY와 그 정제도를 비교 실험하였다.

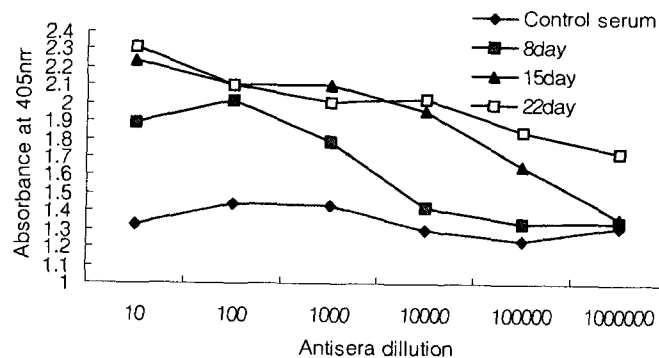
**ELISA에 의한 혈청과 난황항체의 역가 측정 :** *V. parahaemolyticus*의 formalin killed cell(FKC)를 carbonate buffer 10<sup>8</sup> cell/100 μl 농도로 coating한 microtitre plate를 사용하여 *V. parahaemolyticus*에 대한 항혈청과 IgY의 역가를 ELISA법으로 확인하였다.

**교차반응성 측정 :** 정제된 IgY의 *Vibrio* 속과 *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*에 대한 교차 반응성을 측정하기 위하여 ELISA법을 실시하였다. FKC를 carbonate buffer 10<sup>8</sup> cell/100 μl 농도로 coating한 microtitre plate를 4°C overnight 반응시키고, PBST로 3회 세척 후 *Vibrio*속과 다른 식중독 균을 200배 희석된 계란항체에 37°C에서 1시간 경쟁반응을 시킨 후 세척하고 1:10,000배 희석된 peroxidase-conjugated affinity pure rabbit anti-chicken IgY로 37°C로 1시간 반응 후 기질로서 ABTS를 반응시킨 후 30분 후 반응정지 용액을 첨가하여 ELISA Reader (Bio Rad, Model 550, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Immunoblotting :** SDS-PAGE는 Laemmli<sup>9)</sup>의 방법에 따라서 행하였고, Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 분리된 band를 확인하였다. 동시에 정제된 IgY의 항원에 대한 특이성을 알아보기 위해 immunoblotting을 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

**ELISA에 의한 혈청과 난황항체의 역가 측정 :** 1차 면역 후 1주 간격으로 암탉으로부터 혈액을 채취, 혈청을 분리하여 ELISA로서 역가를 측정한 결과 1주째부터 *V. parahaemolyticus*에 대한 항체가 생성된 것으로 나타났으나 3주 후부터 가장 높은 역가를 가진 항체를 생성하는 것으로 측정되었으며 그 결과는 Fig. 1과 같다.



**Fig. 1. Antisera titration of LPS immunized hen.**

혈청에서의 항체생성을 확인 후 같은 주의 압탕으로부터 획득된 계란의 난황에서 IgY를 정제하여 ELISA 방법으로 역가를 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 난황으로부터 정제된 IgY에서 높은 역가의 항체가 생성된 것을 알 수 있었다.

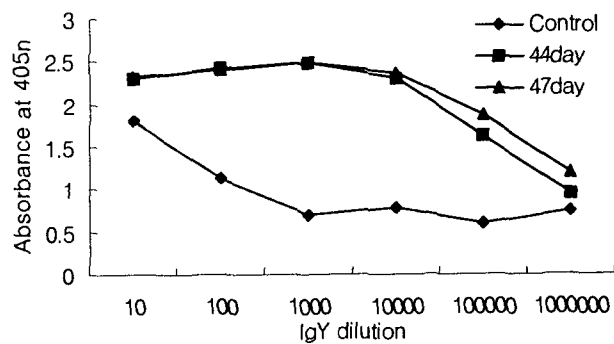


Fig. 2. IgY titer of LPS immunized hen.

본 실험에서 사용된 IgY정제법의 정제도에 대해 검증을 하기 위해 항체역가를 가진 동일한 난황에 대하여 Promega(USA)에서 시판되는 IgY정제 kit을 사용하여 정제한 IgY와 water-dilution 법에 의해 정제된 IgY의 역가를 비교 측정한 결과 Fig. 3과 같았고, 두 방법에 의해 정제된 IgY의 역가차가 거의 없음을 확인 할 수 있었다.

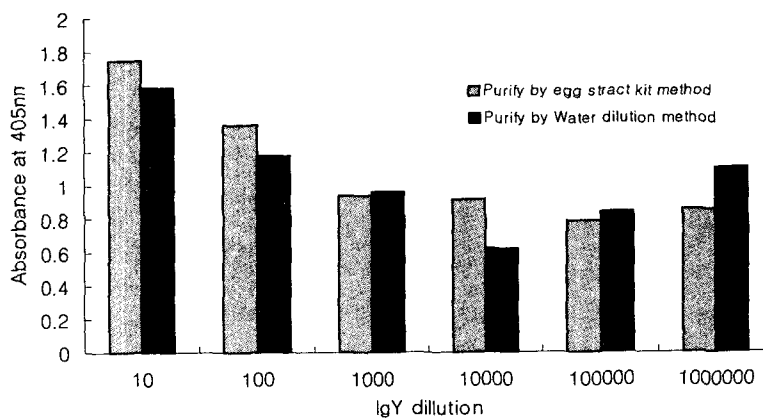


Fig. 3. Comparison of EGGstract™ IgY purification system kit and water dilution method for the extraction of IgY from egg yolk.

**교차반응성** : LPS층 면역에 의해 생성된 계란항체에 대해 *Vibrio* 속과 다른 식중독 균인 *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* 등의 교차반응성을 측정 한 결과는 Fig. 4의 A, B에서 보는 바와 같이 생성된 계란 항체는 *Vibrio* 속과 다른 식중독 균인 *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*에 대한 교차반응성이 없으며, *V. parahaemolyticus*에 특이하게 반응하는 것으로 나타났다.

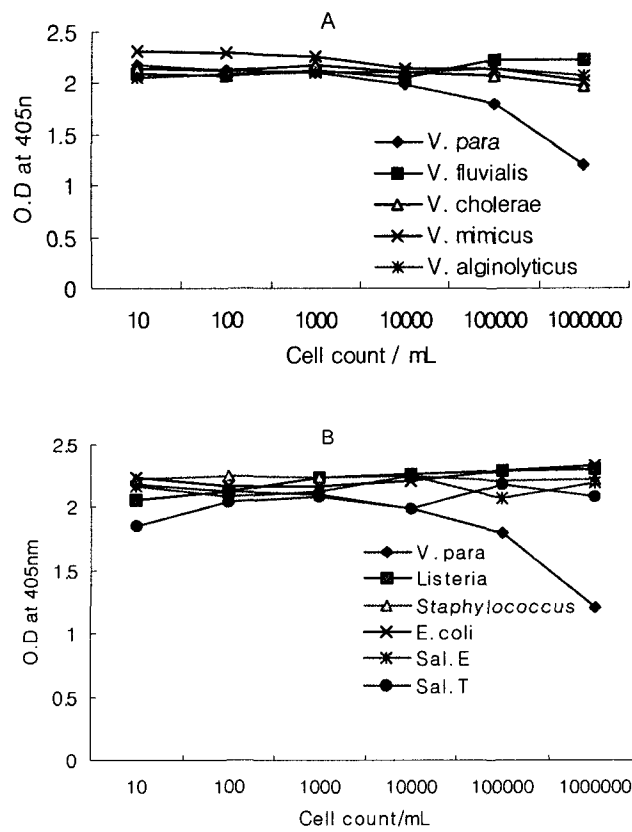
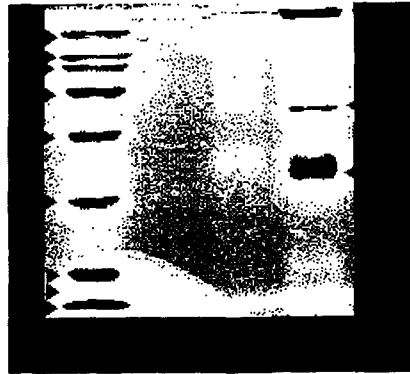
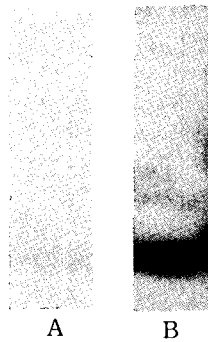


Fig. 4. Cross-reactivity of LPS IgY for Vibrio strains and the other strains.

**Immunoblotting** : 정제된 IgY의 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같고, LPS를 SDS-PAGE를 실시하여, Immunoblotting을 실시한 결과(Fig. 6) 생성된 계란항체가 LPS 항원에 민감하게 반응하는 것으로 나타났으며, 면역전 정제된 계란 항체는 LPS항원에 반응하지 않는 것으로 보아, 면역된 암탉으로부터 항원에 민감한 항체가 생성된 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 5. SDS-PAGE patterns of IgY purified from egg yolk.**  
(lane 1: Standard marker lane 2: Normal IgY lane 3: LPS Immunized IgY, H: heavy chain, L:light chain)



**Fig. 6. Western blotting of LPS of *V. parahaemolyticus* KTCC 2729**  
A: Using normal IgY as primary antibody, B: Using LPS Immunized IgY as primary antibody

## Reference

- 1) Seung Bae Lee, Yoshinori Mine. Effects of Hen Egg Yolk Immunoglobulin in Passive Protection of Rainbow Trout against *Yersinia ruckeri*. *J. Agric. Food Chem.* 2000. 48. 110-115
- 2) Akita, E. M.; Nakai, S. Immunoglobulin from egg yolk ; isolation and purification. *J. Food Sci.* 1992, 57, 629-634
- 3) Westphal, O.; Jann, K. Bacterial lipopolysaccharides. *Methods Carbohydr. Chem.* 1965, 5, 83-91
- 4) Tetsuro Koga, Tomio Kawata. Isolation and Characterization of Outer Membrane from *Vibrio parahaemolyticus*. *J. General Microbiology.* 1983. 129. 3185-3196.

- 5) Tsung C. Chang, Chi H. Chen, and Hui C. Chen. Development of Latex Agglutination Test for the Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Protection* 1994. 57(1). 31-36
- 6) T. Honda, Y. Ni, M. Yoh, and T. Miwatani. Production of monoclonal antibodies against thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* and application of the antibodies for enzyme-linked immunosorbent assay. *Med. Microbiol Immunol.* 1989. 178:245-253.
- 7) Shahjahan Kabir. Composition and Immunochemical properties of the Cell Surface Proteins of *Vibrio Cholerae*. *J. General Microbiology*. 1986. 132. 2235-2242.
- 8) Antonio Verdoliva, Giancarlo Basile, Giorgio Fassina. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *Journal of Chromatography B*. 2000. 749 233-242.
- 9) Leammli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227. 680-685