

장독성 대장균 eKT-53균주의 내열성 장독소의 성질

도대홍[†] · 김교창* · 김도영**

충청전문대학 식품가공과

*충북대학교 식품공학과

**충청전문대학 식품영양과

Characterization of Heat-Stable Enterotoxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli* eKT-53

Dae-Hong Do[†], Kyo-Chang Kim* and Do-Young Kim**

Dept. of Food Science and Technology, Chung-Cheong College, Cheong-Weon 363-890, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Chung-Buk National University, Chungju 360-763, Korea

**Dept. of Food Nutrition, Chung-Cheong College, Chung-Weon 363-890, Korea

Abstract

Heat-stable enterotoxin(ST) from enterotoxigenic *E. coli* eKT-53(ST⁺ LT⁻, transformant from isolate KM-7) that was produced in succinate salts medium. The culture supernatant(crude ST) was purified by multiplied steps and investigated some characterization of the ST. The heat-stability of purified ST activity was completely lost by treating at 100°C for 30minutes. ST activity was lost by treatment at pH 1 and 12 conditions, while the activity was not reduced by treatment at pH 2~10, and then the α -amylase and pepsin was not decreased activity but disulfide reducing agents was lost the activity. The molecular weight of the purified ST was approximately 4, 200, the isoelectric point was about 4. 0.

Key words : enterotoxigenic *E. coli* eKT-53, characterization of heat-stable enterotoxin

서 론

대장균은 장내상주균으로만 인식되어 오다가 1923년¹⁾ 처음으로 신생아 설사의 원인균으로 인식되기 시작했다. 그후 1945년^{2,3)} 영국의 London병원에서 접단급식에 의한 접단설사를 유발시킨 원인균이 특수한 혈청형을 가진 대장균에 의한 것으로 밝혀져 대장균이 설사를 유발시키는 원인균임을 인식하게 되었다. 장내 설사질환을 유발시키는 원인균은 종류가 다양

하지만 주로 병원성대장균과 *Shigella*, *Salmonella* 및 *Vibrio*속으로 여름철에 많은 설사질환이 발생하지만 최근에는 생활수준의 향상으로 연중 발생하고 있다^{4~6)}. 병원성대장균의 혈청학적 판별을 위하여 수년간 식생활환경이 불량하고 온도와 습도가 높은 개발도상국가에서 발생하는 소아설사의 원인균을 중심으로 조사를 시도 했지만 명확한 성상을 밝히지 못했다⁷⁾. 그렇지만 병원성대장균은 장내 설사유발원인에 따라 통상적으로 장병원성, 장침투성, 장독성등으로 분류되어진다. 장독성대장균은 LT(Heat-labile enterotoxin)와 ST

*To whom all correspondence should be addressed

(Heat-stable enterotoxin) 중에서 하나 또는 둘을 생산 한다. LT는 최근 분리정제가 이루어져 일부 독성이 밝혀지고 있으며 단일항체 생산이 가능하게 되어 효소면역반응법(Enzyme-Linkage Immuno-Sorbent Assay : ELISA)까지 개발되었지만⁹ ST는 LT에 비해 연구가 미흡하며 ST 정제, 단일항체 생산, ST유전자의 생화학적 성질조사등을 시도하고 있으나 ST의 성질을 명확하게 밝혀내지 못하고 있다. 현재까지 알려진 ST의 성질은 문자량이 1,000~10,000정도이며¹⁰ ST는 methanol에 이 용성이고 IMA(Infant Mouse Assay) 검정시 양성인 STa와 methanol에 불용성이고 IMA검정시 음성인 STb가 있다. STa 유전자는 장독성대장균내 plasmid에 존재한다는 것이 확인되었다¹¹. ST의 성질과 면역학적 연구을 위해서는 정제가 필수적이다. ST정제는 ST유전자를 형질전환하여 보다 많은 ST생산을 유도하고 이를 이용한다면 손쉽게 다량의 ST를 생산할 수 있을 것이다. 특히 보다 순수한 항원(ST)의 제조는 ST를 분비하여 설사를 유발시키는 병원성대장균에 의한 영유아, 신생아족 및 여행자 설사증 진단을 위한 효소면역반응법(ELISA)의 적용 및 효율적인 단일항체 생산이 가능하게 되어 면역학적 성질 파악이 가능하고 장독성대장균 설사증 백신개발도 가능할 것이다.

따라서 본 실험의 목적은 정제된 ST의 성질을 파악하여 항체생산에 이용하고 ST 항원과 항체를 이용하여 ELISA에 의한 장독성대장균 설사증 진단에 적용하여 보고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 ST정제

형질전환균주 eKT 53¹²으로부터 저자들이 보고한 바 있는 내열성장독소 정제방법¹³에 따라 정제하여 실험에 사용하였다. 정제된 내열성장독소는 polyacrylamide disc gel로 순수 정제 유무를 확인하고 실험에 사용하였다.

IMA에 의한 ST 검정 및 ST unit 산출

ST unit산출은 배양상충액을 2단계회석법으로 회석하여 25μl씩 생후 만 3일된 젖먹이 생쥐 위에 적접주사한 후 장 등¹⁴의 판정기준에 따라 G/B(Gut/B-ody)율이 0.07이 되는 경우 양성으로 판정하고 회석

배율에 40(1,000μl/25μl)를 곱하여 배양액 1ml에 상당하는 unit로 산출하였다.

열 안정성

정제한 ST 용액을 10mM PBS(Phosphate Buffered Saline, pH 7.2)를 사용하여 320unit로 회석하고 이 등¹⁵의 방법에 따라 20℃에서 120℃까지 20℃의 간격으로 각각 30분간 가열하고 얼음수조에서 급냉한 후 가열전의 액량으로 재조정하여 G/B율을 측정하였다.

pH 안정성

10mM PBS(pH 7.2)로 회석한 320unit의 ST용액을 Dreyfus 등¹⁶의 방법에 따라 5N-HCl과 5N-NaOH로 pH 1에서 12까지 조정하고 실온에서 60분간 정치한 후 pH 7.0으로 재조정하여 G/B율을 측정하였다.

Isoelectric focusing

Hames 등¹⁷의 방법에 따라 electrofocusing을 실시하고 gel은 tube에서 분리하여 -20℃에서 얼려 5mm의 간격으로 자른 후 각각의 단편들을 10mM NaCl 5ml로 4℃에서 24시간 침출하여 pH를 측정하고 CBBG-250(Coomassie Brilliant Blue G-250)으로 염색한 gel과 비교하였다. Gel은 pH 3~10의 ampholine (Pharmalyte : Pharmacia)를 함유한 12.5% polyacrylamide gel을 사용하였다.

Disulfate 환원제에 의한 ST 활성변화

Mohamed 등¹⁸의 방법을 참고로하여 2-mercaptoethanol, sodium sulfate, dithiothreitol, glutathione, L-cysteine, sodium thiosulfate를 소정의 농도로 처리하고 G/B율을 측정하였다. 시약용액들이 G/B율에 미치는 영향을 알기 위하여 ST가 함유되지 않은 동일 시약용액의 G/B율을 측정하였다.

ST 문자량

12.5% SDS-polyacrylamide slab gel을 이용하여 Swank 등¹⁹의 방법에 따라 실시하였다. 사용한 polypeptide(Pharmacia fine chemical)는 myoglobin (intact), M.W. 17,201; myoglobin I + II, M.W. 14,632; myoglobin, M.W. 8,235; myoglobin, M.W. 6,383; myoglobin, M.W. 2,556; myoglobin

- 기 : 내열성장독소 생산 대장균의 판정. 대한미생물학회, 18(1), 53(1983)
15. 이우곤, 김의상, 장우현, 차창용, 이광호 : 장독성 대장균의 내열성 장독소의 정체. 대한미생물학회지, 20, 199(1985)
 16. Dreyfus, L. A., Frantz, J. C. and Robertson, D. C. : Chemical properties of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of different host origins. *Infect. Immun.*, 42, 539(1983)
 17. Hames, B. D. and Rickwood, D. : *Gel electrophoresis of proteins*. I. R. L. Press, Oxford, Washington, D. C., USA (1983)
 18. Mohamed, M. R., Robert, D. C., Charlotte, D. P. and Trygve, L. V. : Removal of the biological activity of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by disulfidereducing agents. *Infect. Immun.*, 51, 24(1986)
 19. Swank, R. T. and Munkres, K. D. : The methods of protein electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 39, 462(1971)
 20. Saeed, A. M. K., Sriranganathan, N., Cosand, W. and Burger, D. : Purification and characterization of heat-stable enterotoxin from bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 44, 701(1983)
 21. Jacks, T. M. and Wu, B. J. : Biochemical properties of *Escherichia coli* low molecular weight, heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 9, 342(1974)
 22. Idels, L., Proia, R. L. and Hart, D. A. : Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.*, 47(4), 596(1983)
 23. Gurrant, R. L., Hughes, J. M., Chang, B., Robertson, D. C. and Murard, F. : Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*; Studies of tissue specificity, potential receptors and intermediates. *J. Infect. Dis.*, 142, 220(1980)

(1991년 10월 7일 접수)

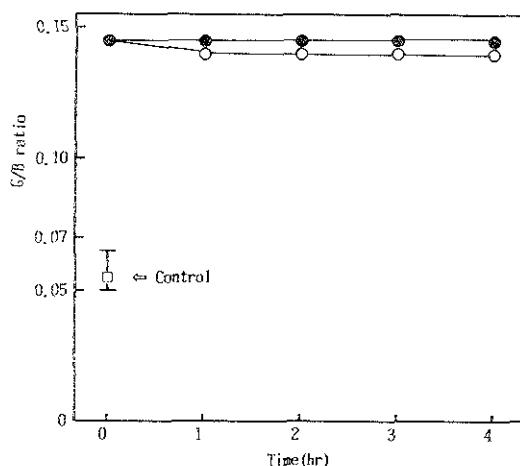


Fig. 8. Effect of enzyme on heat-stable enterotoxin activity.

Samples were treated with α -amylase (*Bacillus subtilis*) and pepsin (porcine). The mixtures of ST with enzymes were prepared with 50mM phosphate buffer of pH 6.9. All mixtures contained 0.1mg of enzyme per ml. Before being tested for ST activity, the mixtures were incubated for 4 hrs at 37°C.

●—●; α -amylase, ○—○; pepsin

8). 실험에 사용한 효소 모두 ST 활성변화에 거의 영향을 주지 않았다. 이와같은 결과는 protease, nuclease, lipase, phospholipase C 및 amylase를 처리하여도 ST 활성변화에는 영향을 주지 않는다는 Alderete 등², Dreyfus 등¹⁶ 및 Lallier 등⁹의 보고 내용과 일치하였다.

요 약

형질전환균주 eKT-53(ST⁺ LT⁺)를 사용하여 succinate salts 배지에 배양한 배양상증액으로부터 분리 정제한 내열성장독소(ST; heat-stable enterotoxin)의 몇가지 성질에 대하여 조사하였다. 분리 정제된 ST의 내열성은 100°C에서 30분 이상 열처리하였을 때 ST 활성이 소실되었다. pH에 대한 안정성은 pH 2~10에서는 대단히 안정하였지만 pH 1과 pH 12에서는 불안정하였다. 또한 α -amylase (*Bacillus subtilis*) 와 pepsin (porcine)에 대해서 매우 안정하여 활성변화가 없었으나 disulfide 환원제를 처리할 경우 쉽게 활성이 소실되었다. 이러한 ST의 분자량은 약 4,200이었고 pl값은 4.0이였다.

문 헌

- Aimoto, S., Takao, T., Shimonish, Y., Hera, S., Takeda, T., Takeda, Y. and Miwatani, T.: Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **29**, 257(1982)
- Alderete, J. F. and Robertson, D. C.: Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **19**, 1021(1978)
- Bray, J.: Isolation of antigenically homogenous strain of bact. coli neapolitanum from summer diarrhea of infants. *J. Pathol. Bacterial.*, **57**, 239 (1945)
- Bhan, M. K., Rai, P., Levine, M. N., Kaper, J. B., Bhandari, N., Srivastava, R., Kumar, R. and Sazawaal, S.: Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in india. *J. Infect. Dis.*, **159**(6), 1061(1989)
- 보건사회부: 83년 급성전염병 통계연보. (1985)
- Brumfitt, W., Gargan, R. A. and Hamilton, M.: Enterobacterial carriage preceding urinary infection. *Lancet*, **11**, 824(1987)
- 고광육, 서정기: 장독성대장균에 의한 소아설사의 빈도에 관한 연구. 소아과학회지, **26**(10), 949 (1983)
- Belisle, B. W., Twiddy, E. M. and Holmes, R. K.: Characterization of monoclonal antibodies to heat-stable enterotoxin encoded by a plasmid from clinical isolate of *E. coli*. *Infect. Immun.*, **43**, 1027(1984)
- Lallier, R., Lariviere, S. and St. Pierre, S.: *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin; Rapid method of purification and some characterization of the toxin. *Infect. Immun.*, **28**, 469(1980)
- Jitivimol, S., Peter, E., David, N. T., Thamma, S., Suchta, C. and Orapan, C.: Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* with synthetic alkaline phosphatase-conjugated oligonucleotide DNA probe. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1438 (1987)
- Luz-Maria, G. V. and Yankel, M. K.: Fusion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and heat-labile enterotoxin production and drug resistance. *J. Bacteriol.*, **169**, 5201(1987)
- 도대홍: 대장균의 내열성장독소. 중북대학교 박사학위 논문 (1990)
- 도대홍, 김교창, 김도영: 장독성대장균 eKT-53 균주의 내열성장독소 정제. 한국영양식량학회지, **21**(1), 인체예정(1992)
- 장우현, 김문교, 최명식, 양남웅, 고광육, 서정기

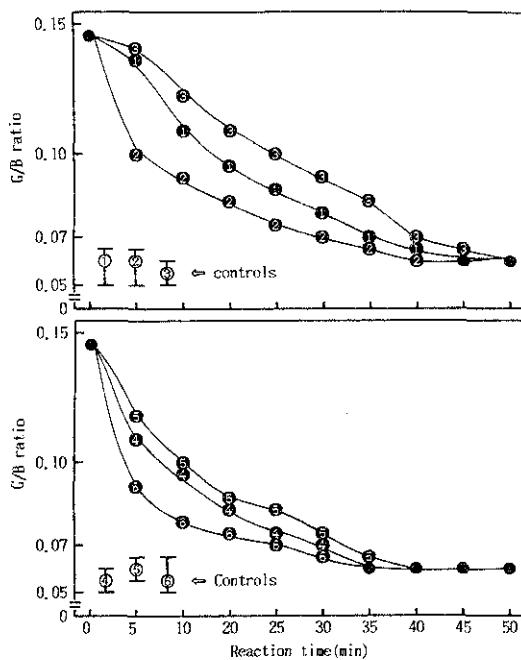


Fig. 6. Inactivation time of the heat-stable enterotoxin by disulfide-reducing agents.

Reaction mixture contained an 8 mouse units per ml of the heat-stable enterotoxin. After, 10mM PBS of 10 μ l preincubated for 5 min, added to 15 μ l of 30mM disulfide-reducing agents, and incubated at 30°C. Reactions were terminated at the indicated times at 30°C. Each agents were 2-mercaptopropanoic acid(1), sodium sulfite(2), dithiothreitol(3), glutathione(4), L-cysteine(5), sodium thiosulfate(6). Their G/B ratios were determined in IMA with the purified heat-stable enterotoxin. The controls indicates numbered hole ring, and contained 10mM agents.

fite, dithiothreitol, glutathione, L-cysteine 등도 각각 40mM, 25mM, 50mM, 30mM, 35mM의 농도에서 ST 활성이 음성으로 관찰되었다.

Disulfide환원제의 처리시간에 따른 ST의 영향

Disulfide 환원제의 종류와 처리시간에 따른 ST 활성의 영향은 환원제의 종류에 따른 다소의 차이는 있지만 ST활성소실이 쉽게 일어났다. 각 disulfide 환원제의 종류에 따른 ST 활성소실 시간을 조사하기 위하여 각 disulfide 환원제의 농도를 10mM로 조정하여 5분에서 50분까지 반응시키면서 5분간격으로 반응액의 잔존 ST 활성을 측정하였다(Fig. 6).

혼합액들중 sodium sulfate의 경우 25분 반응에서

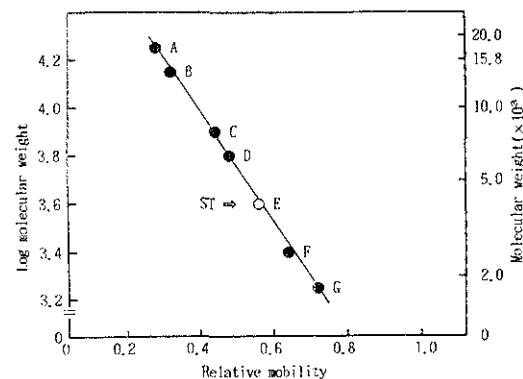


Fig. 7. Estimation of molecular weight of the heat-stable enterotoxin by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

A comparison of the log molecular weight for purified ST and standard polypeptides was performed according to the Swank and Munkres technique.

- A : myoglobin intact, mol. wt. ; 17, 200
- B : myoglobin fragment I + II, mol. wt. ; 14, 632
- C : myoglobin fragment I, mol. wt. ; 8, 235
- D : myoglobin fragment II, mol. wt. ; 6, 383
- E : purified ST, mol. wt. ; 4,200 approximately, log mol. wt. ; 3.62
- F : myoglobin fragment II, mol. wt. ; 2, 556
- G : myoglobin fragment I+II ; 1, 695

ST 활성이 완전히 소실되었으며 sodium sulfite와 glutathione은 30분 반응시, 2-mercaptopropanoic acid과 L-cysteine은 35분 반응에서 완전히 활성이 소실되었다. Disulfide 환원제 자체의 G/B율에 대한 영향은 거의 없었다. ST 활성을 소실시키는 환원제로는 sodium thiosulfate가 가장 효과적이었고 그외 다른 disulfide 환원제도 상당한 효과를 나타내었다.

정제 ST의 분자량 측정

정제한 ST를 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 후 CBBG-250염색액으로 염색하여 표준 peptide band와 비교하여 ST의 분자량을 측정한 결과 약 4,200이었다(Fig. 7). Aimoto 등¹¹은 4,200~4,450으로 보고하였다. 본 실험의 정제된 ST의 분자량은 Dreyfus 등¹²의 보고와 비슷한 크기로 측정되었다.

효소에 의한 ST 활성의 변화

사용효소는 α -amylase와 pepsin을 사용해 37°C에서 4시간 반응 후 잔존하는 ST 활성을 측정하였다(Fig.

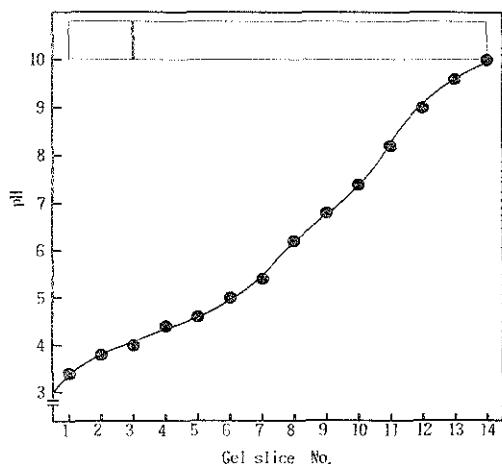


Fig. 4. Isoelectric focusing of purified heat-stable enterotoxin in polyacrylamide disc gel.

Isoelectric focusing was performed with 12.5% polyacrylamide disc gel containing the carrier ampholine (pH 3.0~10.0).

ST의 isoelectric focusing

통상적인 방법^{16, 20}으로 electrofocusing을 실시하고 gel를 tube에서 분리하여 열린 다음 5mm 간격으로 절단하여 10mM NaCl 5ml로 각각 4°C에서 24시간 동안 추출한 추출액의 pH를 측정하고 함께 전기영동하여 염색한 gel의 ST band 위치와 비교하여 본 결과 Fig. 4에서 같이 pH 4.0부근의 gel slice에서 ST band가 위치하고 있었다. 정제된 ST의 등전점은 4.0으로서 Dreyfus 등¹⁶이 보고한 3.98±1과는 거의 비슷한 결과였지만 Saeed 등²⁰이 보고한 4.3과는 다소 차이가 있었다.

Disulfide환원제에 의한 ST 영향

Mohamed 등¹⁸, Saeed 등²⁰ 및 Dreyfus 등¹⁶은 disulfide환원제에 의해 ST활성이 쉽게 소실된다고 보고하였으나 disulfide 환원제의 종류에 따른 ST 활성소실 차이와 완전한 ST 활성소실에 필요한 농도와 처리시간에 관한 자세한 보고가 없었다. 이에 ST의 disulfide 환원제의 종류와 처리농도에 의한 영향을 조사하기 위하여 2-mercaptopropanol, sodium sulfite, dithiothreitol, glutathione, L-cysteine, sodium thiosulfate를 5~100mM농도의 범위에서 disulfide 환원제를 첨가하고 30°C에서 각각 10분간씩 반응시킨 다음 반응액의 G/B율을 측정한 결과 Fig. 5와 같은 성적을

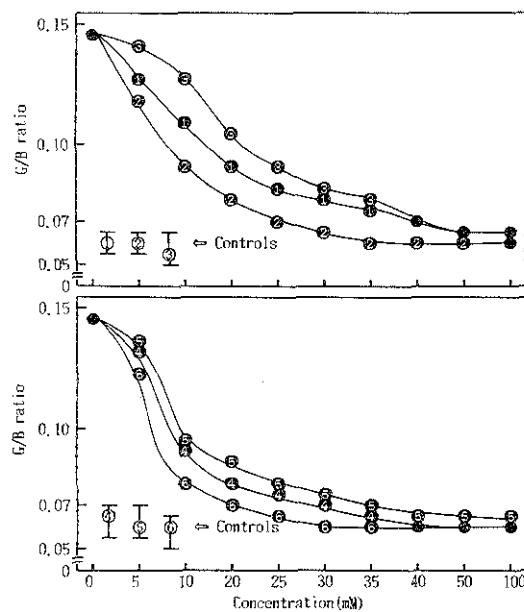


Fig. 5. Inactivation of heat-stable enterotoxin by disulfide-reducing agents.

Concentration of agents were adjusted with 10mM PBS of pH 7.2. After the 10mM PBS preincubated for 5 min, and added 15μl of agents solution. Reactions were gone for 10 min at 30°C. Reaction mixtures contained an 8 mouse units per 25μl of the heat-stable enterotoxin. Each symbols were control(○~○); 100mM disulfide-reducing agents, 2-mercaptopropanol (●), sodium sulfite(○), dithiothreitol(△), glutathione(□), L-cysteine(◎), sodium thiosulfate(■). Their G/B ratios were determined in IMA with an 8 mouse units per 25μl of the heat-stable enterotoxin.

얻었다.

반응전의 ST 용액과 disulfide 환원제를 혼합한 반응액은 25μl당 8 units의 ST를 함유하게 조제하였고, 또한 사용한 disulfide 환원제에 의한 G/B율의 영향을 알기 위하여 disulfide 환원제를 각각 10mM씩 함유하는 10mM PBS(pH 7.2)용액을 주사하고 G/B율의 영향을 관찰해 본 결과 다소간의 차이는 있었지만 G/B율에 직접 영향을 주지는 않았다. 반응액의 G/B율은 대부분의 disulfide 환원제가 상당한 영향을 미쳐 일정농도 이상에서는 활성이 소실 되었다. 특히 sodium thiosulfate의 경우 20mM 농도에서 활성이 완전 소실되었으며 그외에 2-mercaptopropanol, sodium sul-

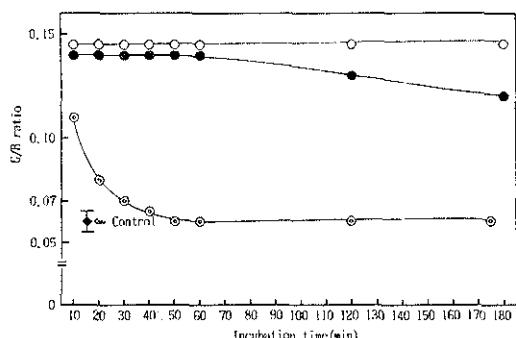


Fig. 2. Heat stability of the purified heat-stable enterotoxin at 60, 80 and 100°C.

After heating in 10mM PBS of pH 7.0, the samples were reconstituted to their original volumes. The ratio of 5 mice G/B ratio obtained with an 8 units injection per mouse were plotted against each reaction time as above. The control (●; boiled 10mM PBS, none ST) is 0.055 ± 0.005 of the mean ratio, data indicates the point deviation of the vertical line at control mean point. The symbols were rings (○; 60°C, ●; 80°C, ◎; 100°C).

ST 활성이 남아 있었다는 보고와 유사하였다.

열처리시간에 따른 ST의 안정성

1ml당 320 units로 희석한 ST 용액을 60°C, 80°C, 100°C에서 열처리하면서 처리시간에 따른 ST 장독성의 활성소실 정도를 알기 위하여 10분 간격으로 열처리한 ST 용액의 G/B율을 측정하였다(Fig. 2).

60°C로 열처리할 경우 열처리시작 180분이 경과할 때까지 ST의 활성변화가 거의 없었으며 80°C에서 열처리할 경우 열처리시작 120분이 경과할 때 약간의 활성소실을 확인할 수 있었지만 거의 영향을 받지 않았고 열처리시작 180분이 경과했을 때 약 20%의 활성소실이 있었다. 100°C에서는 열처리를 시작한지 30분이 경과되면서 ST 활성이 음성이 되었다. ST 용액을 열처리에 의해 ST 장독성을 소실시키려면 80°C 이하의 온도에서는 활성소실을 기대할 수 없고 100°C 이상의 온도에서 30분 이상의 시간이 필요함을 알 수 있다.

ST의 pH 안정성

ST의 pH에 따른 안정성을 조사하기 위하여 10mM PBS(pH 7.0)로 IMA 검정에 사용되는 ST units의 2 배 (640 units/ml)로 희석한 ST용액의 pH를 1에서 12 까지 조정하여 37°C에서 1시간 처리한 다음 pH 7.0

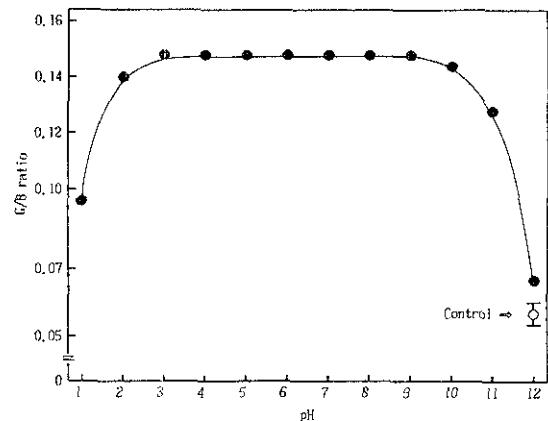


Fig. 3. pH stability of the purified heat-stable enterotoxin.

The ratio of 7 mice G/B ratio obtained with an 8 mouse units injection per mouse. Solution of ST (640 units/ml) were adjusted to pH ranges from 1 to 12 by the addition of 5N HCl or 5N NaOH. After incubation at 37°C for 1 hr, the samples were adjusted to pH 7.0 and diluted to approximately 320 units per ml with 10mM PBS of pH 7.0. Data are means of duplicate incubations. The control of none contained ST was obtained 0.055 ± 0.005 of the G/B ratio. Data indicate the point deviation of the vertical line at the control point.

으로 재조정하여 ml당 320 units(8 units/25μl)로 희석하고 G/B율을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 pH 12에서 가장 많은 영향을 받아 약 85%의 ST장독성이 소실되었고 pH 1과 pH 11에서도 각각 40%와 11%정도의 소실을 나타내었다.

pH 2에서 pH 10까지의 pH범위에서는 ST의 안정성이 대단히 높아서 거의 영향을 받지 않았다. pH에 대한 ST의 안정성은 극단적인 pH를 제외하고는 대단히 안정한 것으로 보인다. Lallierc 등⁹은 pH 2~10의 범위에서 ST는 안정하다고 하였고, Dreyfus 등¹⁰과 Alderete 등¹¹은 산처리에도 안정하다고 하였고 Guerrant¹²는 pH 11에서 약 80%의 ST 활성을 잃었다고 보고하였다. 이들의 보고내용으로 보아 pH 2~10에서는 대단히 안정하고 pH 11에서는 일부 활성소실이 일어나며 pH 1과 pH 12에서는 대단히 불안정하다는 것을 알 수 있다. 본 실험의 결과도 pH 2~10에서는 거의 ST 활성소실이 없었으며 pH 12에서는 85%, pH 1과 pH 11에서는 각각 40%와 11%의 활성소실을 나타내어 상기 보고자들의 보고내용과 대체로 일치하였다.

1~14, M. W. 1,695였다. 전기영동 후 gel은 CBBG-250용액으로 염색하고 증류수로 탈색한 다음 densito-meter (Joyce-Loebl, Chromoscan 3)로 단백질 band의 위치를 측정하고 Rf치를 구하여 분자량을 측정하였다.

Enzyme의 ST 활성 영향

Lallier 등⁹의 방법을 참고로 하여 α -amylase (*Bacillus subtilis*) 와 pepsin (porcine) 을 ST와 혼합하여 37°C에서 4시간 반응시킨 다음 잔류 ST활성을 측정하였다. 사용한 효소는 50mM phosphate buffer (pH 6.9)로 100 μ g/ml의 효소량으로 효소액을 만들고 ST용액 (8 units/25 μ l)과 동량씩 섞어 반응액으로 하였다. 반응 후 반응액의 주사량은 4 units/25 μ l에 상당하는 양을 주사하였다.

결과 및 고찰

ST의 열 안정성

정제한 ST를 25 μ l당 8 units가 되게 10mM PBS (pH 7.2)로 희석하고 희석한 ST 용액 5ml를 20°C, 40°C, 60°C, 80°C, 100°C, 120°C에서 각각 30분간 열처리한 후 열처리전의 액량과 동일하게 재조정하여 젖먹이생 쥐 한마리당 25 μ l씩 주사하고 4시간 동안 25°C의 실내에 둔 후 G/B율을 측정한 결과 Fig. 1과 같은 성적을 얻었다.

40°C, 60°C, 80°C로 각각 열처리한 ST용액은 20°C에서 열처리한 ST 용액의 G/B율과 비교하여 거의 변화가 없었다. 100°C로 열처리한 경우는 대부분의 ST가 소실되어 ST를 함유하지 않은 PBS 용액을 주

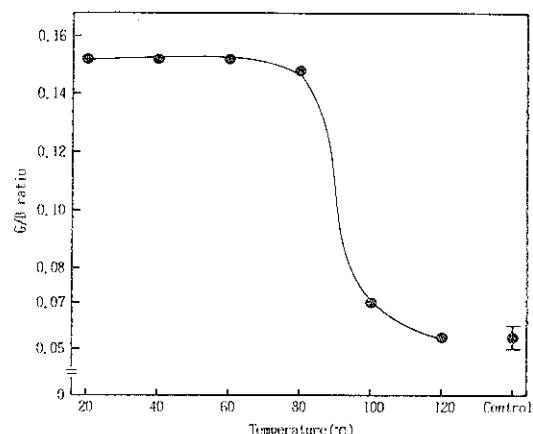


Fig. 1. Heat stability of the purified heat-stable enterotoxin.

Portions of the test sample were heated at each temperature for 30 minutes. After heating, samples were reconstituted to their original volumes. The ratio of 7 mice G/B ratio obtained with an 8 units injection per mouse were plotted against each temperature as above. Data are means of triplicate incubations. The control (boiled 10mM PBS, none ST) is 0.054±0.006 of the mean ratio, each point indicates the deviation of the ratio as control.

사했을 때와 G/B율이 거의 동일하게 나타났다. 8 units의 ST용액을 100°C로 열처리한 경우 ST 활성이 거의 모두 소실시킬 수 있었고, 120°C로 열처리했을 때는 완전히 활성이 소실되어 ST 활성이 확인되지 않았다. 이같은 열안정성은 Lallier 등⁹, Aldcrete 등² 및 Saeed 등¹⁰의 100°C에서 30분간 열처리한 후 일부 ST활성을 확인할 수 있었다는 보고 내용과 다소 차이가 있었으나 Jacks 등²¹과 이 등¹⁵의 100°C에서 30분간 열처리시 ST활성이 완전히 소실되었다는 보고와 lidels 등²²의 100°C에서 15~30분 열처리시 일부

Table 1. Purification of heat-stable enterotoxin (ST) from eKT 53

Step	Total protein* (mg)	Total activity (unit × 10 ⁶)	Specific activity (unit/mg)	M. E. D. ** (ng)	Purification fold	Recovery (%)
Filtrated culture supernatant(10L)	2,270.000	7.20	3,172	315.3	0	100
Amberlite XAD-2 chromatography	88.80	3.90	43,919	22.8	14	55
DEAE-Sephadex ion exchange chromatography	9.04	2.88	318,584	3.1	102	40
Bil-gel. p-4 gel filtration	5.08	2.52	496,063	2.0	158	35
Preparative polyacrylamide slab gel electrophoresis	2.24	0.80	357,143	2.8	113	11

Total protein* ; determined by Lowry method. M. E. D. ; minimum effective dose in infant mouse assay (IMA)