

장독성 대장균 eKT-53 균주의 내열성 장독소 정제

도대홍¹ · 김교창* · 김도영**

충청전문대학 식품가공과

*충북대학교 식품공학과

**충청전문대학 식품영양과

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

Dea-Hong Do¹, Kyo-Chang Kim* and Do-Young Kim**

Dept. of Food Science and Technology, Chungcheong College, Cheongweon 363-890, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Chungcheong College, Cheongweon 363-890, Korea

Abstract

Enterotoxigenic *E. coli* is one of the major causative agents of the infantile diarrhea and traveler's diarrhea. The heat-stable enterotoxin (ST) is thought to be a virulence factor in the pathogenesis of the diarrhea and to be a maker for identification of the enterotoxigenic *E. coli* from non pathogenic *E. coli*. ST producing *E. coli* KM-7 strain was isolated from the swine and molecular cloning of ST gene of KM-7 strain. Transformant eKT-53 (ST⁺, LT⁻) was selected by infant mouse assay (IMA). The culture supernatant of eKT-53 strain was performed purification by multiplied steps. The culture supernatant (crude ST) was purified by sequentially applying batch adsorption chromatography on Amberlite XAD-2 resin, ion exchange chromatography on DEAE-Sephacel anion exchanger, gel filtration chromatography on Bio-Gel P-6 and preparative polyacrylamide slab gel electrophoresis. About 113-fold purification was achieved with a yield of about 11% of crude ST and the minimum effective dose(MED) of this purified ST was about 2.8ng in IMA. Homogeneity of purified ST was demonstrated by showing a single band in analytical SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis.

Key words : *E. coli* eKT-53, heat-stable enterotoxin, ST purification

서론

병원성대장균은 주로 음식물과 음료수를 통해 장관 내로 감염되어 위장염을 유발하여 설사, 복통 등을 유발하는 경우가 대부분이며¹⁾ 요도에 감염되어 요도

염을 유발시키는 경우도 있다²⁾.

장독성대장균은 음식물과 음료수를 통한 감염 외에도 사람과 직접적인 접촉으로도 감염되며 가축, 사람 또는 보균자의 분변물을 통하여 쉽게 감염이 이루어진다. 특히 환경이 불량한 지역을 여행하는 여행자의 급성설사는 주로 오염된 음식과 음료수가 원인이며 장독성 대장균에 의해 유발된다³⁾. 병원성은 장독성대

¹To whom all correspondence should be addressed

장균이 생산하는 내열성장독소(Heat-stable enterotoxin ; ST) 혹은 이열성장독소(Heat-labile enterotoxin ; LT)에 기인하며 장독성대장균에는 혈청형이 서로 다른 pilus가 있어 소장내의 장점막에 부착하여 증식 하면서 장독소를 분비하여 가축과 사람에게 설사를 유발시킨다⁴⁻⁶. Pilus 항원성은 K88, K99, F41, 987P, CFA(Colonization Factor Antigen) I 과 II 등을 갖고 있다⁷⁻⁹. 장독성대장균은 LT와 ST 중에 하나 또는 둘을 생산하며 장독소중에 LT는 소장내 표피세포의 adenylate cyclase-cyclic AMP를 활성화시켜 설사를 일으키고 높은 면역성을 갖지만 ST는 소장내 표피세포의 guanylate cyclase-cyclic GMP를 활성화시켜 설사를 유발시키고¹⁰ 면역성이 낮아 ST 단독으로는 항체를 얻기 어렵다. 설사환자나 동물의 진단에 있어서 병원성대장균과 생화학적 성질이나 혈청형이 구별되지 않아 ST 측정법은 생물학적 방법인 토끼, 개, 돼지등을 이용하는 ligated loop법¹¹과 젓먹이 생쥐 검사법 (Infant Mouse Assay : IMA)¹²이나 배양세포실험¹³ 등을 이용하고 있다. 그러나 이들 실험들은 많은 시간과 노력이 요구되므로 간편하고 신뢰성있는 방법의 개발이 요구되고 있다. LT는 최근 분리정제가 이루어져 일부 독성이 밝혀지고 있으며 단일항체 생산이 가능하게 되어 효소면역반응법(ELISA)까지 개발되었으나¹⁴ ST는 LT에 비하여 연구가 미흡하며 ST 정제, 단일항체생산, ST 생산유전자의 생화학적 성질조사 등을 시도하고 있으나 ST의 성질을 명확하게 밝히지 못하고 있다. 현재까지 알려진 ST의 성질은 분자량이 1,000~10,000정도이며 ST는 methanol에 이용성이고 IMA 검정시 양성인 ST_A와 methanol에 불용성이고 IMA 검정시 음성인 ST_B가 있다. ST_A유전자는 장독성대장균내 plasmid에 존재한다는 것이 확인되었다^{15,16}. 일반적으로 세균들은 주위환경에 따라 적절하게 변화하는 조절유전자를 갖고 있어서 단백질 생산이나 DNA 및 mRNA 합성등을 조절한다. 이러한 대사 조절기구는 ST를 생산하는 병원성대장균에도 마찬가지로 지역과 분리원에 따라 성상이 다양하여 생화학적인 성질과 생물학적 성질이 일치하는 경우가 드물며 더구나 항생제 사용에 따른 저항균의 출현빈도가 높아가고 있어 R-plasmid의 내성전달에 의해 쉽게 항생제 내성전달이 이루어지고 있다¹⁷. ST의 성질과 면역학적 연구를 위해서는 정제가 필수적이다. 순수한 항원(ST)의 제조는 ST를 분비하여 설사를 유발시키는 병원성대장균에 의한 영유아, 신

생가축 및 여행자설사증 진단을 위한 효소면역반응법의 적용 및 효율적인 단일항체생산이 가능하게 되어 면역학적 성질 파악이 가능하고 장독성대장균설사증 백신개발도 가능 할 것이다.

따라서 본 실험의 목적은 우리나라 장독성설사를 유발하는 장독성대장균을 설사돈으로 부터 분리한 *E. coli* KM-7 균주로 부터 형질전환시킨 eKT-53 균주¹⁸가 생산하는 ST를 정제하여 그 성질을 파악하고 이를 이용하여 항체를 생산하여 효소면역반응법에 의한 장독성대장균설사증 진단에 적용하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 eKT-53 균주¹⁸는 설사돈의 분변 재료로부터 분리된 ST 생산능력이 우수한 KM-7 균주로부터 ST 생산유전자를 함유하는 약 80Kbp plasmid를 분리하고 EcoR I 제한효소로 절단한 절편을 pBR 322 vector에 접합시켜 *E. coli* K-12 균주에 형질전환시킨 균주들 중 ST 생산능력이 우수한 집락을 선발한 것으로서 KM-7 균주의 G/B율 0.096보다 높은 0.102였다.

IMA에 의한 ST 검정 및 ST unit 산출

IMA(Infant Mouse Assay)에 의한 ST 검정은 WHO 장독성대장균검사법¹⁹에 따라 실시하였고 ST unit 산출은 이 등²⁰의 판정기준에 따라 G/B율(Gut/Body ratio)이 0.070 일때를 양성으로 하고 희석배율에 40(1,000 μ l/25 μ l, 25 μ l는 주사량)을 곱하여 구했다.

조 ST 용액

형질전환균주 eKT-53균주를 succinate salts 배지를 사용하여 1L씩 37°C에서 120rpm으로 배양한 10L의 배양액을 30,000g로 10분간 원심분리하고 상층액은 4°C에서 24시간 정치하여 침전되는 단백질을 염 등을 제거시키고 4°C에서 Seitz filter로 여과한 후 여과액을 조 ST 용액으로 사용하였다.

Amberlite XAD-2 adsorption chromatography

Staples 등²¹의 방법에 따라 Amberlite XAD-2 (Sigma) 450g(dry weight)을 채운 2.6×30cm의

column에 10L의 조 ST 용액을 실온에서 60ml/min의 속도로 통과시키고 다음의 용액들을 차례로 통과시켜 용출시켰다. 즉 증류수 1L, 1% acetic acid를 함유하는 20% methanol 1L, 1% acetic acid를 함유한 99% methanol 0.5L, 1% acetic acid를 함유한 80% methanol 1L와 1% acetic acid를 함유한 99% methanol 0.5L의 용출액을 60ml/min의 속도로 용출하고 용출액중 대부분의 ST활성을 함유하는 1% acetic acid를 함유하는 99% methanol 분획분을 rotary evaporator를 사용하여 50ml로 농축하고 10mM phosphate buffer (pH 7.2) 2L로 YM-2 membrane (Amicon, M. W. cut-off 1,000)로 투석하였다.

DEAE-Sephacel anion exchange chromatography

투석한 Amberlite XAD-2 chromatography의 ST 분획을 약 20ml로 농축하고 이 등²⁰⁾과 Dreyfus 등²²⁾의 방법을 변용하여 DEAE-Sephacel anion exchange (Pharmacia) column (2.0×30cm)에 통과시키고 10mM phosphate buffer (pH 7.2) 600ml로 용출시켰다. 용출액은 0mM에서 300mM의 NaCl 농도분배를 두고 20ml/hr로 용출하고 각 분획의 ST양을 측정하여 ST를 함유한 분획분을 모아 NaCl 200mM을 함유하는 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 용액으로 YM-2 membrane을 통하여 투석하였다.

Bio-Gel P-6 gel 여과

DEAE-Sephacel 용출액은 3~4ml로 농축하여 5% acetic acid로 미리 평균화시킨 Bio-Gel P-6 (Bio-Red) gel filtration column (0.8×80cm)에 주입하고 Dreyfus 등²²⁾과 Lallier 등²³⁾의 방법을 참고로 하여 200mM NaCl을 함유하는 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 용액으로 5ml/hr의 속도로 용출하였다.

Polyacrylamide slab gel 전기영동

Bio-Gel P-6 gel로 여과한 ST 분획은 증류수로 YM-2 membrane을 통하여 투석하고 냉동건조하여 60mM Tris-HCl (pH 6.8)에 녹인 후 Dreyfus 등²²⁾과 이 등²⁰⁾ 방법을 참고하여 17.5% polyacrylamide slab gel (0.2×9×10cm)로 25mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 18mA로 4시간 전기영동하고 gel을 2.5mm 간격으로 잘라 5ml의 10mM phosphate buffer

(pH 7.2)가 들어 있는 시험관에 하나씩 넣고 30℃에서 24시간 동안 120rpm으로 용출하였다. 각 slice는 ST 검정 후 ST 함유 분획분은 증류수로 투석하고 동결건조하여 60mM Tris-HCl (pH 6.8) 0.5ml에 녹였다.

SDS-polyacrylamide disc gel 전기영동

Polyacrylamide gel을 통해 분리한 ST의 정제도를 확인하기 위해 ST 정제액에 2% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)를 함유한 sample buffer에서 100℃로 3분간 처리하고 12.5% polyacrylamide disc gel (0.5×8cm)을 통해 25mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)로 2mA/tube의 전압으로 전기영동하여 gel을 Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG-250) 염색액으로 염색하였다. 염색액의 제조와 염색과정은 Pesti 등²⁴⁾의 방법에 따랐다.

단백질량 측정

정제 단계별 ST 분획의 단백질량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Johnson 등²⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

조 ST 용액

ST 생산조건을 검토한 결과 등을 토대로 succinate salts 배지를 사용하여 배양초기 pH를 8.5로 조정하여 형질전환균주 eKT-53¹⁸⁾를 접종하고 37℃에서 120rpm으로 20시간 배양하였다. 배양액 10L를 원심분리하고 4℃에서 24시간 정치하여 침전물을 제거하고 정제에 사용했다. 조 ST 용액의 total protein 양은 2,270mg이었고 total units는 7.2×10^6 이었다 (Table 1).

Amberlite XAD-2 adsorption chromatography

Dreyfus 등²²⁾과 이 등²⁰⁾은 ST가 Amberlite XAD-2 수지에 비교적 특이적으로 결합한다고 보고한 바 있어 이들의 방법을 토대로 하여 조 ST 용액으로 Amberlite XAD-2 adsorption chromatography를 실시하고 각각의 분획에서 ST양을 측정한 결과 Fig. 1과 같은 성적을 얻었다. 살균증류수로 용출한 I과 II 분획은 ST가 소량 검출되었고 20% methanol로 용출한

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

Step	Total protein* (mg)	Total activity (unit* × 10 ⁶)	Specific activity (unit/mg)	MED** (ng)	Purification fold	Recovery (%)
Filtrated culture supernatant (10L)	2,270.00	7.20	3,172	315.3	0	100
Amberlite XAD-2 chromatography	88.80	3.90	43,919	22.8	14	55
DEAE-Sephacel ion exchange chromatography	9.04	2.88	318,584	3.1	102	40
Bio-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

*Determined by Lowry method

**Minimum effective dose in infant mouse assay (IMA)

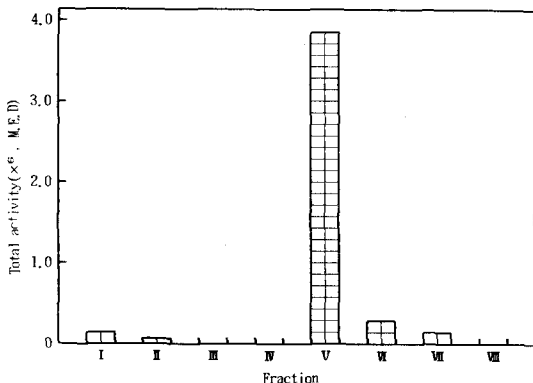


Fig. 1. Elution profile of heat-stable enterotoxin (ST) on Amberlite XAD-2 adsorption chromatography.

Filtered culture supernatant of 10 liters loaded on the column (2.6 × 30cm) at a flow rate of 60ml/min and eluted with each eluent as follows. I · II ; distilled water, III · IV ; 1% acetic acid in 20% methanol, V ; 1% acetic acid in 99% methanol, VI · VII ; 1% acetic acid in 80% methanol, VIII ; 1% acetic acid in 99% methanol. The V fraction contained most of ST activity and this fraction was collected for the further purification.

III, IV분획에서는 ST가 검출되지 않았으나 99% methanol로 용출시킨 V분획에서 대부분의 ST가 검출되었다. 그리고 80% methanol로 용출한 VI, VII분획은 일부 ST가 검출되었지만 마지막 분획인 99% methanol용출액에서는 ST가 검출되지 않았다. 이들 중 V분획만 ST 분리액으로 사용하였다. 이 분획의 전체 ST 양과 단백질량을 측정한 결과 각각 3.90 × 10⁶ units와 88.8mg으로서 조 ST 용액에 비하여 55%

의 회수율과 22.8mg의 생물학적 최소단위량(MED : Minimum Effective Dose)을 나타냈다(Table 1). 이같은 결과는 이 등¹⁹⁾의 66%의 회수율과 7ng의 생물학적 최소단위량에 비해 다소 비효율적이었지만 total protein과 total activity는 거의 비슷한 수준이었다. 이를 보다 더 정제하기 위해 anion exchange chromatography를 실시하였다.

DEAE-Sephacel anion exchange chromatography

Saeed 등²⁰⁾과 이 등²⁰⁾이 효율적인 ST 정제용 anion 교환수지로 보고한 바 있는 DEAE-Sephacel anion exchanger를 선택하여 사용하였다. Amberlite XAD-2 adsorption chromatography로부터 얻은 V분획을 10mM phosphate buffer(pH 7.2)로 투석한 후 DEAE-Sephacel anion exchange chromatography를 실시한 다음 280nm에서 흡광도를 측정하고 각 분획의 ST 양을 측정하여 Fig. 2와 같은 성적을 얻었다. 대부분의 ST는 54~66분획에 함유되어 있었고 NaCl 농도분배 상에서 약 200mM NaCl의 농도를 나타내는 지점에 위치하고 있었다. 이 peak의 분획분의 총 ST 양을 측정한 결과 약 40%의 회수율을 보였고 3.1ng의 생물학적 최소단위량을 나타내었다. Amberlite XAD-2 adsorption chromatography를 통하여 분리된 ST에 비해서 7배 가량 더 정제되었고 조 ST 용액에 비해서는 100배 가량 정제된 결과를 얻었다.

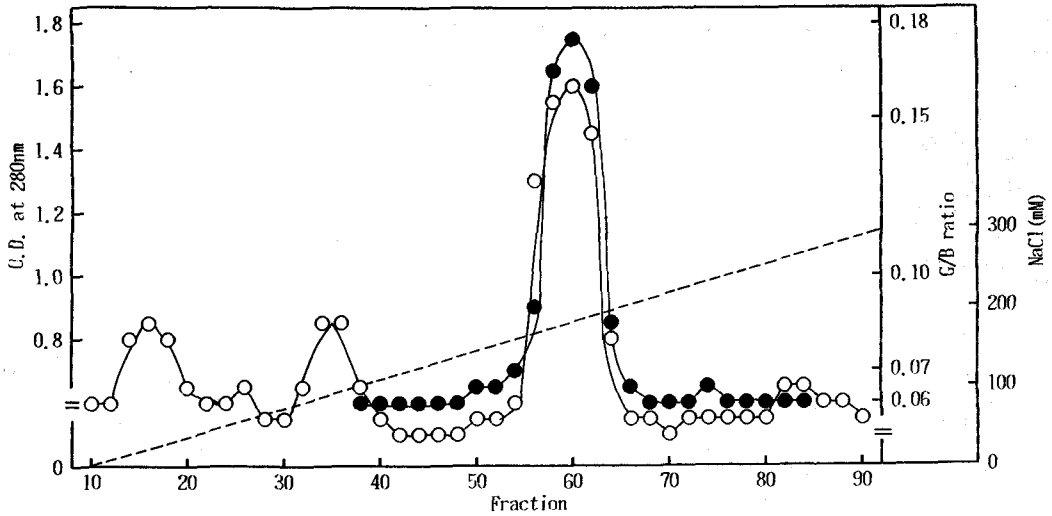


Fig. 2. Elution profile of DEAE-Sephacel anion exchange chromatography.

The fraction collected from the Amberlite XAD-2 chromatography was dialyzed against 10mM phosphate buffer of pH 7.2, and applied to a column(2×30cm) of DEAE-Sephacel. The column was eluted with 600ml linear gradient, 0 to 300mM NaCl, in 10mM phosphate buffer of pH 7.2 at a flow rate of 20ml/hr. The elute was measured by its absorbance at 280nm and infant mouse assay(IMA).

●—● ; G/B ratio, ○—○ ; protein, - - - ; NaCl(mM)

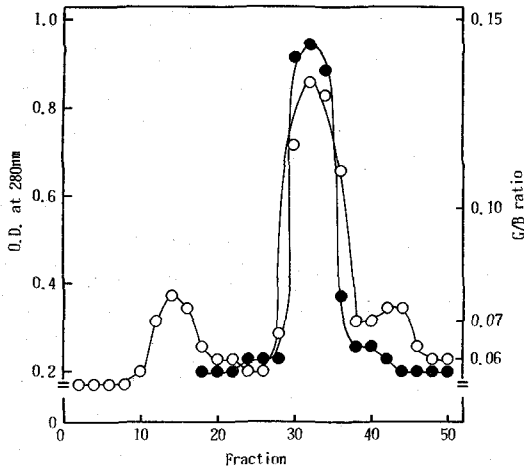


Fig. 3. Elution profile of Bio-Gel P-6 gel filtration.

The fraction collected from DEAE-Sephacel chromatography was dialyzed with 10mM Tris-HCl buffer containing 200mM NaCl of pH 7.5 and applied to a column(0.8×80cm) of Bio-Gel P-6 gel. The column was eluted with 10mM Tris-HCl buffer containing 200mM NaCl of pH 7.5 at a flow rate of 5 ml/hr. The eluate was measured by its absorbance at 280nm and infant mouse assay(IMA).

●—● ; G/B ratio, ○—○ ; protein

Bio-Gel P-6 gel 여과

앞서 기술한 바와 같이 ST의 분자량은 보고자에

따라 다양하다. 웨지에서 분리한 ST의 분자량을 5, 100²⁷⁾ 혹은 4, 200~4, 450²⁸⁾ 등으로 보고하고 있어 본 실험에서도 Dreyfus 등²²⁾과 같이 분획 가능범위가 1, 900~6, 000인 Bio-Gel P-6를 사용하여 정제를 실시하기 위하여 DEAE-Sephacel anion exchange chromatography로 부터 얻은 ST분획을 200mM NaCl이 함유된 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 투석하고 Bio-Gel P-6를 사용하여 gel 여과를 실시한 결과 Fig. 3과 같은 성적을 얻었다. 각 분획을 280nm에서 흡광도를 측정 한 결과 몇개의 peak가 나타났으나 ST량을 측정해 본 결과 28~40의 분획에서 대부분 ST가 함유되어 있었다. 이 peak를 모아서 증류수로 투석하였다. 회수율은 35%이었고 생물학적 최소단위량은 2.0mg이었으며 이때의 정제도는 158배였다. ST가 함유되어 있는 peak의 모양 및 정제도가 Dreyfus 등²²⁾의 결과와 비슷하였으나 이 등²⁰⁾의 Bio-Gel P-6 대신 Sephadex G-25를 사용한 것에 비해서는 다소 효과적이었다.

Polyacrylamide slab gel 전기영동

Bio-Gel P-6 여과를 통하여 정제한 ST 분획의 정제도를 확인하기 위하여 실험적으로 실시한 analytical polyacrylamide disc gel 전기영동에서 ST 이의

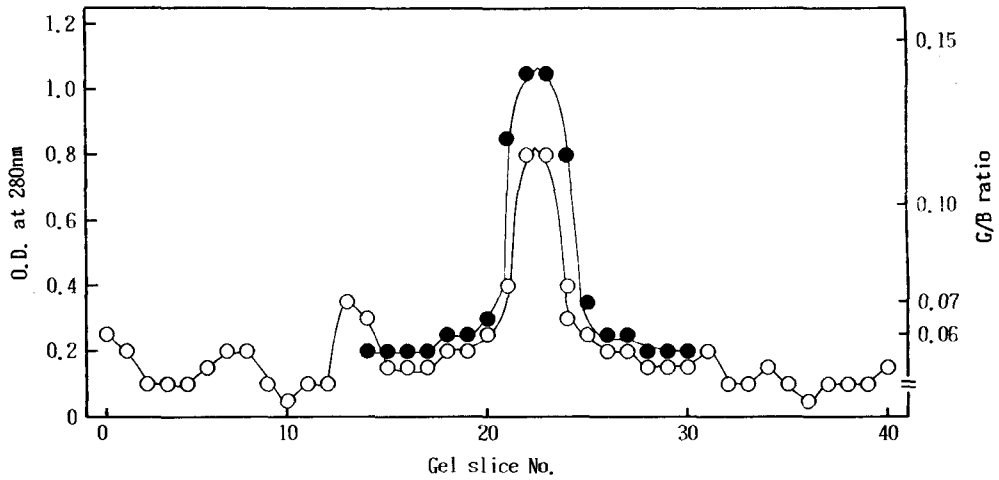


Fig. 4. Elution profile of polyacrylamide slab gel electrophoresis.

The lyophilized fraction collected from Bio-Gel P-6 gel filtration was dissolved in 60mM Tris-HCl buffer of pH 6.8 and applied to 17.5% polyacrylamide slab gel(0.2×9×10cm). Electrophoresis was performed at a constant current of 18 mA for 4 hrs with 25mM Trisglycine buffer of pH 8.3. After electrophoresis, gel was sliced in 2.5mm intervals and eluted with 10mM phosphate buffer of pH 7.2. The eluate was measured by its absorbance at 280nm and infant mouse assay(IMA).

●—● ; G/B ratio, ○—○ ; protein.

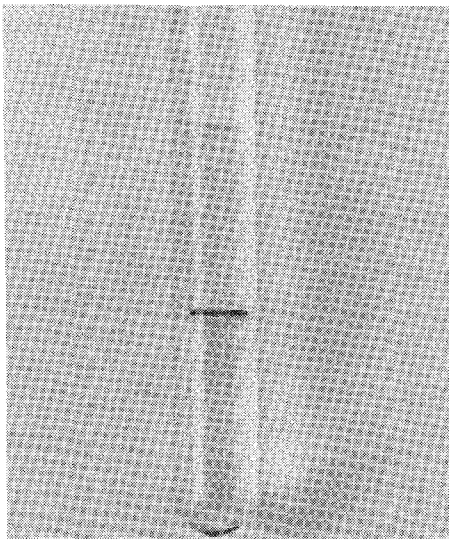


Fig. 5. Analytical SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified heat-stable enterotoxin.

Electrophoresis was performed to 12.5% polyacrylamide disc gel at a constant current of 2mA/cm for 120 minutes with 25mM Tris-glycine buffer (pH 8.3). After electrophoresis, gels were stained directly in modified CBBG-250 staining solution.

에도 다른 물질들이 관찰되어 아직까지 ST가 순수정제되지 않았음을 알 수 있었다. 따라서 마지막 정제를 위하여 gel 여과를 통하여 얻은 ST 분획을 모아 polyacrylamide slab gel로 전기영동하고 10cm gel를 2.5cm 간격으로 잘라서 10mM phosphate buffer (pH 7.2)로 용출한 후 용출액을 280nm에서 흡광도를 측정하고 ST를 검정하였다(Fig. 4). 음극으로부터 약 5.5cm되는 지점에 peak가 관찰되었으며 이 분획의 전체 단백질량과 ST 함유량을 측정한 결과 11%의 회수율과 2.8ng의 생물학적 최소단위량을 나타내어 오히려 전 정제단계의 Bio-Gel P-6 gel 여과에 비하여 생물학적 최소단위량이 0.8ng 더 증가하였다. 이 등²⁰에 의하면 강한 소수성을 지닌 ST가 순수정제될 수록 쉽게 응괴를 형성하여 생물학적 활성부위가 감소한다는 보고와 상응되는 현상이며 또한 통전시 발생하는 저항열에 의한 변성에도 기인되는 것으로 추정되어 진다.

SDS-Polyacrylamide disc gel 전기영동

Polyacrylamide slab gel 전기영동을 통해 최종적으로 분리되어진 ST가 비록 생물학적 ST 활성이 감소하였지만 정제정도를 확인하기 위하여 SDS-polyacrylamide disc gel 전기영동을 실시하고 gel을 염

색하여 band를 확인한 결과 Fig. 5에서 보는 바와같이 분리정제된 ST의 단일 band를 관찰할 수 있었다. 한편 일반적으로 이용되는 단백질염색법인 CBBR-250 염색액을 사용하는 방법은 분자량이 대단히 적은 ST의 경우 염색과 탈색과정에서 gel로부터 유리되어 ST의 band를 확인 할 수 없다는 Alderete 등²⁷⁾과 Lallier 등²⁸⁾의 보고가 있었다. 최근 Pesti 등²⁹⁾과 이 등³⁰⁾이 사용한 바 있는 염색법을 본 실험에 적용함으로써 단일 ST band를 확인 할 수 있었다. 이것은 염색액의 구성성분인 황산과 trichloroacetic acid에 의해 gel 내의 ST가 침전되고 다시 CBBG-250에 의해 ST chain들 간에 cross-link가 형성됨으로서 gel 내에 고정되어 염색된다고 하였다.

이상의 정제과정에서 분리된 ST의 회수율 11%와 생물학적 최소단위량 2.8ng은 이 등³⁰⁾의 4단계 정제 (Amberlite XAD-2 chromatography, DEAE-Sephacel anion exchange chromatography, Sephadex G-25 gel filtration, Preparative disc gel electrophoresis)로 얻은 회수율 15%, MED 3.4ng의 결과 및 Lallier 등²⁸⁾의 3단계 정제 (Ammonium sulfate precipitation, PM-30 ultrafiltration, Bio-Gel P-4 gel filtration)에서 얻은 회수율 80%, MED 14ng의 성적과 비교하여 보다 정제된 ST를 얻었으나 회수율은 낮았다. 그러나 면역을 위한 항원용 ST는 정제도가 높을수록 효과적이므로 면역을 위한 ST 정제에는 본 정제방법이 유용할 것으로 생각된다.

요 약

장독성대장균은 영유아설사 및 여행자설사의 주요한 원인균의 하나로서 이들이 생산하는 내열성장독소는 설사 유발 원인물질로 이들 생산균주는 비병원성 대장균과 비교하여 검정할 수 있다. 본 실험에서는 이러한 내열성장독소를 순수정제하였다. 저자들이 보고한 바 있는 형질전환균주 eKT-53을 사용하여 10L의 succinate salts 배지에 배양한 배양액을 30,000g로 원심분리하여 조 ST 용액을 사용하여 몇 단계의 정제과정을 통하여 정제하였다. 즉 Amberlite XAD-2 chromatography, DEAE-Sephacel anion exchange chromatography, Bio-Gel P-6 gel filtration, Polyacrylamide slab gel 전기영동을 통하여 정제하고 장독소의 정제도 및 장독소의 생물학적 최소단위량을 조사하였다. 최종적으로 정제되어진 ST는 조 ST 용액에

비해 113배 더 정제되었고 회수율은 11%였다. 또한 생물학적 최소단위량이 2.8ng이었고 SDS-polyacrylamide disc gel상에서 단일 band를 나타내어 거의 순수정제된 것으로 보이며 면역을 위한 항원으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

문 헌

1. Sherman, P., Drumm, B., Karmall, M. and Cutz, E. : Adherence of bacteria to the intestinal in sporadic cases of enterotoxigenic *E. coli* associated diarrhea in infants and young children. *Gastroenterology*, **96**, 86 (1989)
2. Burgess, M. N., Bywater, R. J., Cowley, C. M., Mullan, N. A. and Newsom, P. M. : Biological evaluation of a methanol soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. *Infect. Immun.*, **43**, 1027 (1979)
3. Smith, H. W. and Linggard, M. A. : Further observations on *E. coli* enterotoxin with particular regard to those produced by a typical biglet strains and by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.*, **5**, 243 (1972)
4. De Ree, J. M. and Van-Den Bosh, J. F. : Fimbrial serotypes of *E. coli* strains isolated from extra-intestinal infections. *J. Med. Microbiol.*, **29**, 95 (1989)
5. Evans, D. G. and Evans Jr, D. J. : New surface associated heat-stable colonization factor antigen (CFA II) produce by enterotoxigenic *E. coli* of serotypes 06 and 08. *Infect. Immun.*, **21**, 638 (1978)
6. Evans, D. G., Evans Jr, D. J., Clegg, S. L. and Pauley, J. A. : Purification, characterization of the CFA/1 antigen of enterotoxigenic *E. coli*. *Infect. Immun.*, **25**, 738 (1979)
7. De Graaf, F. K. and Roorda, I. : Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* B 41M. *Infect. Immun.*, **36**, 751 (1982)
8. Evans Jr, D. G., Chen, L. C., Curlin, G. T. and Evans, D. G. : Stimulation of adenylyl-cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. *New Biol.*, **236** *Nature* (London), 137 (1972)
9. Johnes, G. W. : In "adhesive properties of enteropathogenic bacteria I", Schlessinger (ed), American Society for Microbiology, Washington, D. C., p.50 (1987)
10. Guerrant, 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)
11. Lichodzi ejewka, M., Topley, M. N., Steadman, R., Mackenziw, R. K., Jones, K. V. and Williams, J. D. : Variable express of P fimbriae in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Lancet.*, **24**, 1414(1989)
 12. Gasstra, W., Klemn, P., Walker, J. M. and Graaf, F. K. : K88 fimbrial proteins and cyanogen bromide fragment. *FEMS Microbiol. Lett.*, **6**, 15(1979)
 13. Hirst, T. R., Randall, L. L. and Hardy, S. T. : Cellular location of heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **157**, 637(1984)
 14. Kunkel, S. L. and Robertson, D. C. : Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **25**, 586(1976)
 15. Chityothin, O., Sethabutr, O., Echeveria, P., Joylor, D. N., Vongsthongstri, U. and Tharvanij, S. : Detection of heat-stable enterotoxigenic *Escherichia coli* by hybridization with an DNA transcript probe. *J. Clinical Microbiol.*, **25**(8), 1572(1987)
 16. Jitivimol, S., Peter, E., David, N. T., Thamma, S., Suchita, C. and Orapan, C. : Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* with synthetic alkaline phosphatase-conjugated oligonucleotide DNA probe. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1438(1987)
 17. 이연태, 박경란 : 대장균 및 이질균의 R-plasmid에 관한 연구. *감염학*, **15**, 77(1983)
 18. 도대홍 : 대장균의 내열성장독소, 충북대학교 박사 학위 논문(1990)
 19. WHO/CDD : *Manual for laboratory investigations of acute enteric infections*; Microbiology epidemiology. Immunology and vaccine development, p. 83, (1983)
 20. 이우곤, 김상익, 장우현, 차광용, 이광호 : 장독성 대장균의 내열성장독소의 정제. *대한미생물학회지*, **20**, 199(1985)
 21. Staples, S. J., Asher, S. E. and Giannella, R. A. : Purification and characterization of heatstable enterotoxin produced by a strain of *E. coli* pathogenic for man. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4716(1980)
 22. Dreyfus, L. A., Frntz, 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)
 23. 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)
 24. Pesti, L. and Lukacs, K. : Staining technique for peptide of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, **33**, 944(1981)
 25. Johnson, W. H., Lior, H. and Johnson, K. G. : Heat-stable enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **20**, 352(1978)
 26. 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.*, **440**, 701(1983)
 27. Alderete, J. F. and Robertson, D. C. : Purification and chemical characterization of heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **19**, 1021(1978)

(1991년 10월 7일 접수)