

## 효소면역 전기영동 이적법을 이용한 질트리코모나스 항원의 비교 분석

한양대학교 의과대학 기생충학교실, 자연과학대학 생물학과 미생물학교실\*

민득영 · 임미혜 · 김재단 · 최영길\*

**요 약 :** 질트리코모나스의 항원 분석을 시행하기 위하여 병원성이 확인된 질트리코모나스(*Trichomonas vaginalis*) 6개주(HY-1, 2, 3, 9, 10, 13)의 항원을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 한 결과 Coomassie brilliant blue 염색상에서 peptide의 밀도 차이를 제외하고는 주간에 동일한 단백질 분포양상을 보였으며, 12 kDa에서 170 kDa까지 약 25개 정도의 분획이 관찰되었다. 또한 질트리코모나스 HY-1주준 항원으로 하고 질트리코모나스 6개주에 대해 면역된 마우스의 항혈청을 이용하여 enzyme-linked immunoelectrotransfer blot(EITB)을 시행한 결과 각 주마다 서로 다른 반응양상을 보였으며, 51 kDa과 96 kDa에서 질트리코모나스의 특이한 공통 반응대가 관찰되었고, 각기 다른 6개주의 항원에 대해 HY-1주의 항혈청으로 EITB한 결과 HY-1 항원(homologous antigen)과의 반응 양상과 타항원(heterologous antigen)과의 반응 양상간의 특이한 차이는 관찰할 수 없었다. 이상의 결과로 보아 질트리코모나스 각 주의 항원은 항원-항체 반응에서 주간에 이종(antigenic heterogeneity)을 형성하고 있는 것으로 보였으며, 41, 47, 55, 74 및 94 kDa에서 질트리코모나스에 특이한 공통반응대를 보였으며, 이 부분이 숙주-기생충의 상호관계에 있어서 중요한 의의를 내포하고 있을 것으로 생각된다.

**Key words:** *Trichomonas vaginalis*, enzyme-linked immunoelectrotransfer blot(EITB), antigenic heterogeneity

### 서 론

질트리코모나스에 감염되면 숙주에서는 세포매개성 면역 반응이 일어난다. 숙주에서는 백혈구의 화학주성(chemotaxis)으로 질트리코모나스에 백혈구가 국소적으로 침윤되고(Mason and Forman, 1980), 대식세포나 자궁경부 상피세포 내로 질트리코모나스가 internalization 되기도 하며(Honigberg and McLure, 1961; Honigberg, 1978), 호중구에 의한 항 질트리코모나스 작용도 일어나는 것으로 알려져 있다(Rein *et al.*, 1980). 또한 질트리코모나스에 감염된 환자의 질분비물에서 질트리코모나스에 대한 항체가 검출되며(Ackers *et al.*, 1975; Su, 1982) 질트리코모나스 감염환자의 혈청 내에서는 IgG 및 IgM 항체가 증가되어 있어(Mason, 1979; Street *et al.*, 1982) 체액성 면역 반응도 관여하는 것으로 알려져 있다.

국내에서는 이 질병의 기전에 대한 연구가 미진한 상태이며 부분적으로 질트리코모나스의 환자의 체액성 및 세포매개성 면역반응에 대한 연구가 있었으며(김 등, 1983; 윤 등, 1987; 신 등, 1990; 이 등, 1990), 최근 들어 질염환자로부터 분리한 질트리코모나스를 항원으로 하여 항원성 분석을 시도하였으나 분리주간의

차이는 발견하지 못하였다(송 등, 1991).

이 실험에서는 질트리코모나스증 환자에서 숙주와 원충의 상호관계에서 일어나는 면역학적 반응의 기전을 규명하려는 시도의 일환으로 질트리코모나스 항원을 분획하고, 각 분획 항원과 각 주의 질트리코모나스에 대해 면역시킨 마우스의 항 혈청을 반응시켜 특이항원과 공통항원의 존재 여부를 확인하였으며, 각 분획에 대한 항원-항체 반응을 관찰함으로써 분자량별 항원의 유의성을 비교 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 항 원

1) 질트리코모나스의 분리 : 질트리코모나스는 한양 대학병원 산부인과에 내원한 질염환자로부터 분리하여 얻었으며, 이들 분리주들 중 마우스에 배주 피하 조직에 접종하였을 때 나타난 피하농양으로 병원성이 확인된 HY-1, 2, 3, 9, 10, 13 등 6개주의 원충을 이 실험에 사용하였다.

2) 질트리코모나스의 배양 : 질트리코모나스는 Diamond(1957)의 TPS-1 배지에  $2 \times 10^6$  cells/ml의 밀도로 접종하여 37°C 항온기에서 무균적으로 배양, 본 실험에 사용하였다.

3) 질트리로코모나스의 항원: 질트리로코모나스는 대량 배양하여 인산완충용액으로 3,000×g에서 5분간 원심 분리하여 3회 세척한 다음 항원으로 사용하였다. 마우스에 면역시키기 위해서는 세척된 살아 있는 항원을 사용하였으며, 수용성 항원은 다음과 같은 세 가지 방법으로 제조하였다. 즉 세척한 질트리로코모나스에 trichloroacetic acid(TCA)가 10%(v/v)되게 잘 섞어 4시간 정도 4°C냉장고에 둔 다음 10,000×g, 4°C에서 5분간 원심분리하고 인산완충용액으로 동일 조건에서 3회 세척하여 침사를 강산으로 처리하여 항원으로 사용하였으며, 세척한 질트리로코모나스를 얼음상자 내에서 sonicator로 분쇄하고 10,000×g에서 30분간 2회 원심 침전시키고 상청액을 sonication에 의해 처리된 항원으로 사용하였고, 계면활성제로 처리된 수용성 항원을 얻기 위하여 세척한 질트리로코모나스를 1% Triton X-100 과 antiprotease mixture로서 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, 1 mM p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (Sigma, St. Louis)을 넣은 인산완충 용액에 혼합시킨 다음 dry ice-ethanol 상에서 3회 얼렸다 녹이는 과정을 반복하고, 100,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상청액을 항원으로 사용하였다. 각 항원의 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 정량하였다.

2. 항혈청

질트리로코모나스에 대한 항혈청을 얻기 위하여 4주된 BALB/c 마우스 10마리에 각 주의 살아있는 2×10<sup>6</sup>의 질트리로코모나스를 각각 피내주사하고 1주 후에 1×10<sup>6</sup>의 질트리로코모나스를 피하주사한 다음 10일 후에 후안 와 정맥총으로부터 채혈, 혈청을 분리하였다.

3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

질트리로코모나스 항원의 분자량별 분획을 확인하고 질트리로코모나스 분리주간의 항원을 비교하기 위하여 Laemmli(1970)의 방법에 따라 5~20% linear gradient gel에 HY-1, 2, 3, 9, 10, 13주의 항원을 50 μg씩 부하하여 전기영동을 실시하였다.

전기영동된 각 분획의 분자량은 표준단백(low M.W. marker: M.W. 14,400~79,400, high M.W. marker: M.W. 45,000~200,000, Bio-Rad, Rockville Center, N.Y.)을 사용하여 Lambin(1978)의 방법으로 환산하였으며, 전기영동된 gel은 Coomassie brilliant blue-R 250에 염색하거나 immunoblotting에 사용하였다.

4. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot(EITB)

EITB는 Towbin *et al.* (1979)과 Tsang *et al.* (1983)의 방법에 따라 실시하였다.

1) SDS-PAGE: TCA로 처리하여 준비된 질트리로코모나스를 항원으로 하여 앞의 방법과 동일하게 시행하였다.

2) Blotting: 전기영동된 gel은 nitrocellulose paper (pore size 0.45 μm, Bio-Rad, Rockville Center, N.Y.)에 밀착시켜 transfer chamber(Bio-Rad, Rockville Center, N.Y.)에 넣고 transfer buffer(20% methanol, 25 mM Trizma base, 19 mM glycine, pH 8.3)로 채운 다음 70V, 4°C에서 3시간 동안 전이시켰다. 이때 표준 단백질이 전이된 nitrocellulose paper는 Amido black 10B로 염색한 다음 분자량 환산에 이용하였다.

3) Immunostaining: 항원이 전이된 nitrocellulose paper는 5% skim milk에 넣어 37°C에서 2시간동안 반응시켜 비특이적 반응을 억제시켰으며 항혈청이 1:200으로 희석된 용액에 넣어 37°C에서 하룻밤을 두었다. 항원-항체 반응이 일어난 nitrocellulose paper는 1:500으로 희석된 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG(Cappel, West Chester, Pa.) 용액에 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 기질용액(diaminobenzidine 50mg, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μl, PBS 100 ml)에서 반응시켜 10분내에 항원-항체 반응을 관찰하였다.

결 과

1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

질트리로코모나스 항원의 분자량 분포를 알아보기 위하여 병원성이 확인된 6개주의 질트리로코모나스 항원을 5~20%의 linear gradient gel에서 SDS-PAGE하였다.

먼저 항원의 준비 과정에서 어느 방법이 가장 안정된 방법인가 알아보기 위하여 TCA로 처리한 군, sonication한 군, detergent로 처리한 군을 각각 전기영동시켰던 마 TCA를 처리한 군에서는 sonication한 군이나 detergent로 처리한 군에서는 볼 수 없었던 96, 135, 170 kDa의 높은 분자량의 분획이 보였던 반면 sonication한 군은 12 kDa에서부터 110 kDa까지 20~25개의 분획이 보였으며 detergent를 처리한 군은 12 kDa에서 부터 55 kDa까지 25개 정도의 분획이 보였다(Fig. 1).

질트리로코모나스 항원의 주간 차이를 비교하기 위하여 TCA로 처리한 6개주의 항원을 전기영동하여 Coomassie brilliant blue로 염색하였을 때 질트리로코모나스의 항원은 12 kDa에서 170 kDa까지 약 25개 정도의 분획으로 분리되었으며 peptide들의 밀도차이를 제외하고는 주간에 동일한 단백질 분포 양상을 보였다(Fig. 2). 이것은 전기영동후 nitrocellulose paper에 이적된 항원을 amido black으로 염색한 결과와도 동일하였다.

2. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot(EITB)

질트리로코모나스 항원의 다양성을 확인하기 위하여 병원성이 가장 높은 것으로 나타난 HY-1주를 항원으로 하고 질트리로코모나스 6주에 대한 각각의 항혈청을 반응시킨 결과(Fig. 3) 주마다 서로 다른 주형 양상을

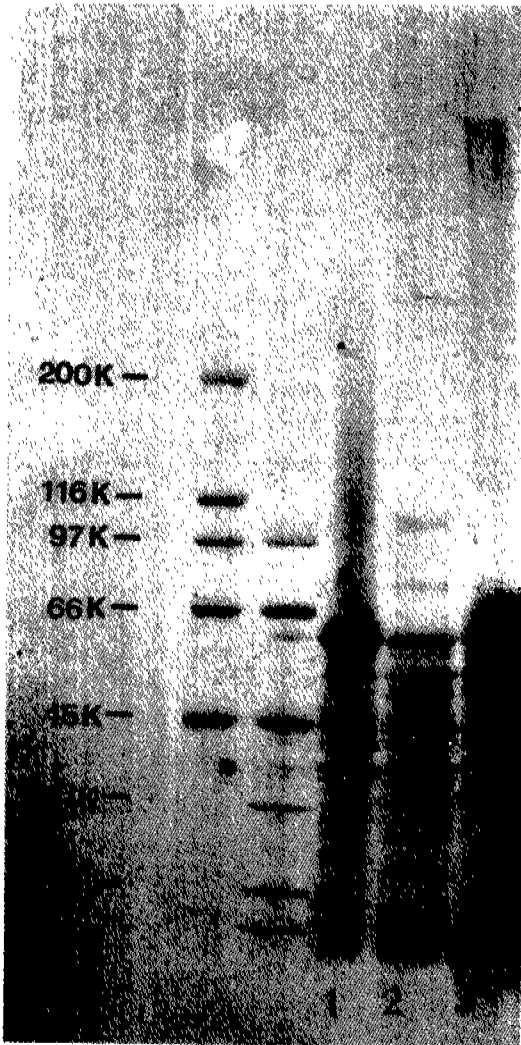


Fig. 1. SDS-PAGE of TCA-treated(lane 1), sonicated(lane 2) and detergent-treated(lane 3) proteins of pathogenic human *T. vaginalis* isolate HY-1.

나타냈으며, HY-1주(Fig. 3, lane 2)가 가장 많은 반응대를 보였던 반면 HY-2주(Fig. 3, lane 3)는 가장 적은 반응대를 보였다.

그러나 그중에서도 41, 47, 55, 74 및 94 kDa에서는 공통반응대를 보였으나, 이중 55 kDa의 반응대가 정상대조군에서도 관찰되어 41, 47, 74 및 94 kDa의 반응대만이 질트리코모나스에 면역된 마우스혈청에 특이한 공통반응대인 것으로 나타났다(Fig. 3). 자기 다른 6주의 항원에 대한 HY-1 항혈청의 반응을 관찰한 바 homologous 항원에 대해 더 많은 반응대를 나타내거나, 반응성이 강하게 관찰되지 않았다.

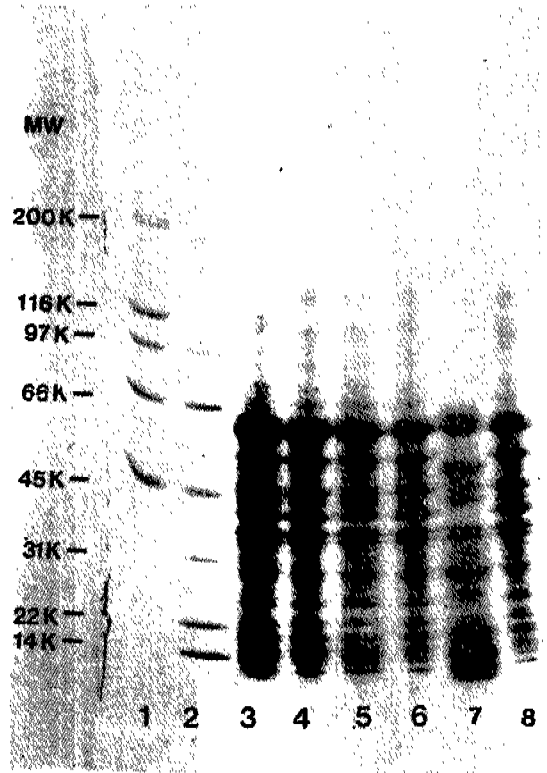


Fig. 2. SDS-PAGE of six pathogenic human *T. vaginalis* isolates treated with TCA. Lane 3; HY-1, lane 4; HY-3, lane 5; HY-13, lane 6; HY-2, lane 7; HY-9, lane 8; HY-10

고 찰

질트리코모나스증에 의한 숙주의 면역학적 반응을 이해하기 위한 연구의 일환으로 질트리코모나스의 항원분석이 시도됨에 따라 질트리코모나스는 주간 또는 중간과는 물론 같은 편모충류와도 공통항원을 공유하고 있으며(Alerate, 1983; Honigberg, 1978; Kott and Adler, 1961; Torian *et al.* 1984) 또한 서로 다른 특이항원도 보유하고 있다고 알려지고 있다. 따라서 질트리코모나스의 공통된 항원과 특이한 항원을 찾아 혈청학적 검사방법으로 나타나는 다양성과의 관계를 추적해 보는 것은 이 원충에 의한 질병을 면역학적 관점에서 이해하는데 매우 중요하다고 할 수 있다.

이 실험에서는 질트리코모나스의 항원을 전기영동상에서 비교하기 위하여 먼저 수용성 항원을 준비하는 방법을 비교하였는데 TCA로 처리한 항원을 전기영동했던 경우 sonication한 군에서나 detergent를 처리했던 군에서는 볼 수 없었던 96, 135 및 170 kDa의 높은

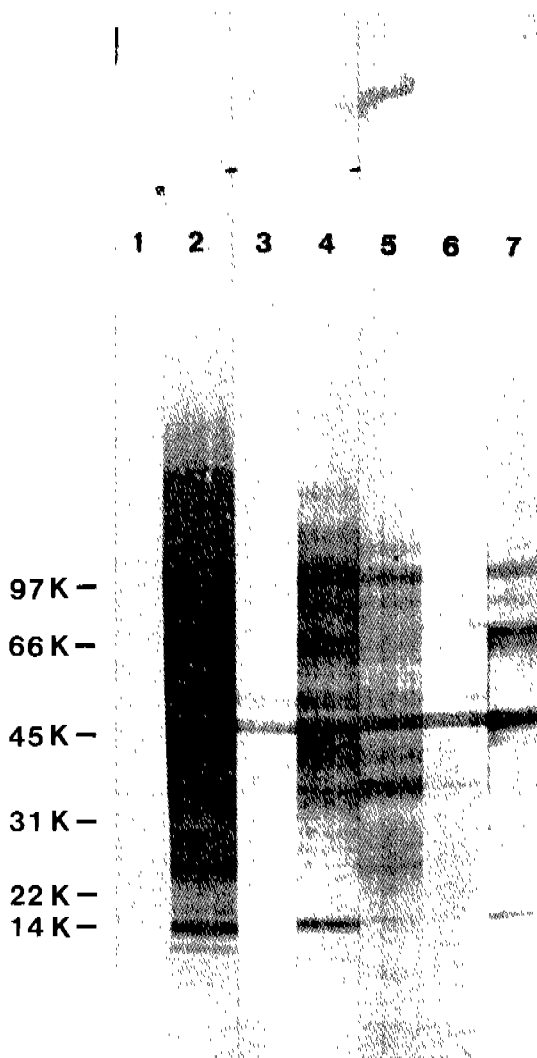


Fig. 3. Immunoblot of a single isolate (HY-1) of *T. vaginalis* probed with normal mouse serum (lane 1) or serum from mice immunized with isolates HY-1 (lane 2), HY-2 (lane 3), HY-3 (lane 4), HY-9 (lane 5), HY-10 (lane 6) and HY-13 (lane 7).

분자량의 분획을 보였으므로 TCA로 처리하여 항원을 준비하는 방법이 질트리로코모나스 항원을 가장 안정되게 용출시킬 수 있을 것으로 생각되었다 (Fig. 1).

질트리로코모나스 분리주들 (HY-1, 2, 3, 9, 10, 13)의 단백질 분포를 TCA 처리된 항원으로 SDS-PAGE 상에서 비교해 본 결과, 12 kDa에서 170 kDa까지 25개 정도의 분획이 분리주간에 동일하게 분포하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 이것은 Aldcrat (1983)의 보고와도 부합되는 결과였다.

질트리로코모나스 HY-1주의 전기영동으로 전개된 항원이 6개 주 (HY-1, 2, 3, 9, 10, 13)에 대한 각각의 마우스 항원청과 반응하는 양상을 비교하기 위해 EITB를 시행하였던 바 (Fig. 3), 각 6개의 분리주는 독특한 반응 양상을 보여 각각의 분리주에 대한 type-specific antigen을 확인할 수 있었고, 그 중에서도 44, 47, 74 및 94 kDa 분자량의 반응대는 모든 분리주에서 공통으로 나타났으며, 음성대조군인 정상마우스의 혈청과의 반응은 보이지 않아 이 반응대는 질트리로코모나스에서 독특한 공통반응대로 추정할 수 있었다. 또한 이 중 EITB 상 반응대가 많이 나타나는 것이 면역원성 (immunogenicity)이 높은 것으로 볼 때 HY-1주는 비교적 면역원성이 높은 것으로 나타났으며 HY-2주는 비교적 낮은 것으로 나타나, 이 결과로 Alderate *et al.* (1985)을 포함하여 많은 연구자들에 의해 보고되고 있는 질트리로코모나스의 antigenic heterogeneity를 확인할 수 있었다.

한편 이 실험의 결과에는 나타나 있지 않지만 마우스의 피하농양으로 질트리로코모나스 분리주 HY-1, 2, 3, 9, 10, 13주의 병원성을 측정하고 각 주에 대한 마우스의 반응을 EITB 상으로 비교하였을 때 마우스 개체마다의 차이도 있는 것으로 나타났는데, Fig. 3의 결과 면역원성이 높았으며 마우스의 피하농양 형성에서 병원성이 높은 것으로 나타난 분리주 HY-1에 대해 면역된 마우스는 EITB 상 개체 모두가 높은 면역원성을 나타냈던 반면, 병원성이 낮게 나타났으며 면역원성도 비교적 낮았던 분리주 HY-10에 면역된 마우스는 면역원성을 나타내는 개체가 7마리 중 2마리 정도의 적은 빈도로 나타났으므로 병원성이 높은 분리주 (HY-1)는 면역원성도 높게 나타나며 병원성이 낮은 분리주 (HY-10)는 면역원성도 낮게 나타난다고 이해되었다. 이는 질트리로코모나스 감염에 대한 숙주의 면역반응이 개체마다 다르게 일어날 수 있기 때문이라고 설명할 수 있으며, 질트리로코모나스 주 (isolate) 내에도 면역원성이 있는 표면항원을 가진 population이 따로 존재하고 있어 이 population이 클수록 항원성이 높은 주 (isolate)가 될 수 있다고 antigenic heterogeneity를 설명한 Alderate *et al.* (1985)의 보고와 어느정도 부합되는 결과였다.

이 실험의 결과로 볼 때 질트리로코모나스는 분리주간에 차이가 있어 주간에 변동성 (variability)이 형성되고 있는 것으로 나타났으며, 주간에 나타나는 면역원성의 차이와 병원성은 서로 상관관계가 있는 것으로 해석되었으나 이 실험 결과로는 그 기전을 설명할 수 없다. 따라서 앞으로는 antigenic heterogeneity를 유발하는 것으로 알려져 있는 표면항원을 분리하여 분리주간의 차이를 비교하고 분리주간에 공통항원으로 나타났던 44, 47, 74 및 94 kDa 분자량을 가진 반응대의 locality를 확인해야 할 것으로 생각되며, 이 결과에 따른 질병 발생 기전과 숙주의 면역반응과의 상관관계가

계속 추시되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 金珍鏡·金載診·任敬一·李根泰 (1983) 질트리코모나스(*Trichomonas vaginalis*) 감염의 면역학적 진단법에 관한 비교연구. 연세의대 논문집, 16:422-431.
- 송준호·김재만·임미혜·민득영 (1991) 질트리코모나스의 항원성 분석. 漢陽醫大學術誌, 11:199-210.
- 신수재·류재숙·신명현·안명희·민득영 (1990) 질트리코모나스에 대한 마우스의 세포매개성 면역반응에 관한 연구. 漢陽醫大學術誌, 10:237-244.
- 윤 경·김경민·안명희·민득영. (1987) 질트리코모나스증에서 간접형광항체법을 이용한 혈청내 항질트리코모나스 IgG 및 IgM 항체의 측정. 기생충학잡지, 25:7-12.
- 이미리·신명현·임미혜·류재숙·안명희·민득영. (1990) 질트리코모나스 환자에서 포식면역 검사법을 이용한 혈청내 항질트리코모나스 IgG 및 IgM의 측정. 기생충학잡지, 28:25-30.
- Ackers, J.P., Lumsden, W.H.R., Catterall, R.D. and Coyle, R. (1975) Antitrichomonal antibody in the vaginal secretions of women infected with *Trichomonas vaginalis*. *Br. J. Vener. Dis.*, 51:319-323.
- Alderate, J.F. (1983) Antigen analysis of several pathogenic strains of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.*, 39:1041-1047.
- Alderate, J.F., Sprun-Brown, L., Kasmala, L., Smith, J. and Spence, M. (1985) Heterogeneity of *Trichomonas vaginalis* and discrimination among trichomonal isolate and subpopulations with sera of patients and experimentally infected mice. *Infect. Immun.*, 49:463-468.
- Diamond, L.S. (1957) The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.*, 43:488-490.
- Honigberg, B.M. (1978) Trichomonads of importance in human medicine. In: Parasitic Protozoa II. Kreier, J.P. (ed.). pp. 275-454. Academic Press, Inc., New York.
- Honigberg, B.M. and McClure, M.T. (1961) Intracellular *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* in natural and experimental infections. *J. Parasitol.*, 47:302-303.
- Kott, H. and Adler, S. (1961) A serological study of *Trichomonas* sp. parasitic in man. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 55:333-344.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature (London)*, 227:680-685.
- Lambin, P. (1978) Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.*, 85:114-125.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Mason, P.R. (1979) Serodiagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by the indirect fluorescent antibody test. *J. Clin. Pathol.*, 32:1211-1215.
- Mason, P.R. and Forman, L. (1980) *In vitro* attraction of polymorphonuclear leukocytes by *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.*, 66:888-892.
- Street, D.A., Taylor-Robinson, D., Ackers, J.P., Hanna, N.F. and McMillan, A. (1982) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to *Trichomonas vaginalis* in sera and vaginal secretions. *Br. J. Vener. Dis.*, 58:330-333.
- Su, K.E. (1982) Antibody to *Trichomonas vaginalis* in human cervicovaginal secretions. *Infect. Immun.*, 37:832-857.
- Torian, B.E., Connelly, R.J., Stephens, R.S. and Stibbs, H.H. (1984) Specific and common antigens of *Trichomonas vaginalis* detected by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 43:270-275.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76:4350-4354.
- Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. and Simons, A.R. (1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique(EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*, 92:377-391.

=Abstract=

**Comparative antigen analysis of *Trichomonas vaginalis* by  
enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique**

Duk-Young Min, Mi-Hyea Leem, Jae-Man Kim and Yong-Keel Choi\*

*Department of Parasitology, College of Medicine,  
and Department of Biology\*, College of Natural Sciences  
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea*

Analysis of six isolates of *Trichomonas vaginalis* was carried out with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB). Trichloroacetic acid-treated antigens of the 6 isolates revealed 25 protein profiles ranging 12~170 kDa of molecular weight in SDS-PAGE. In EITB, the specific immunogenic bands were visualized at 51 kDa and 96 kDa when HY-1 antigen was probed with different mice sera immunized with 6 isolates of *T. vaginalis*. The banding patterns with different sera showed isolate-to-isolate variability. In EITB, homologous antigen (HY-1) did not show any enhanced response in reacting to homologous antiserum (HY-1) when 6 isolates of *T. vaginalis* were probed with a single serum (HY-1). It is assumed that the different banding patterns of six isolates show isolate-to-isolate variability and immunogenic common bands in 41, 47, 74 and 94 kDa on EITB may connote the important significance on immune response in *T. vaginalis* infection.

[**Korean J. Parasit.**, 30(4):323-328, **December 1992**]