

SDS-PAGE, Crossed Immunoelectrophoresis 및 Immunoblotting을 이용한 *Leptospira interrogans* 혈청형간 항원 비교

백 영 옥 · 마 집 술*

제일제당주식회사
서울대학교수의과대학*
(1992. 3. 5 접수)

Comparison of soluble antigens from *Leptospira interrogans* serovars by SDS-PAGE, Crossed Immunoelectrophoresis and Immunoblotting

Yeong-ok Baik, Jum-sool Mah*

Cheil sugar & Co., LTD
College of Veterinary Medicine Seoul National University*
(Received March 5, 1992)

Abstract : The soluble antigen profiles and antigenic specificities of *Leptospira interrogans* serovars icterhaemorrhagiae, canicola, pomona and hardjo were examined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, crossed immunoelectrophoresis and immunoblotting.

The profiles of protein, glycoprotein and fraction containing N-acetylglucosamine of 4 serovars were compared. The protein profiles of 4 serovars were very similar except the range of 14,400 to 30,000 daltons. Molecular weight of glycoprotein of *L. pomona* was lower than other serovars. *L. canicola* showed extra N-acetylglucosamine bands having molecular weight of 82,000 and 90,000 daltons.

In crossed immunoelectrophoresis, a close antigenic relationship was found between *L. icterohaemorrhagiae* and *L. canicola*.

In immunoblottings conducted with soluble antigens and rabbit antisera of 4 serovars, *Leptospira interrogans* serovars possessed cross-reactive antigens and serovar-specific antigens. The molecular weights of serovar-specific antigens were 45,000, 82,000 and 90,000, 31,000 and 24,000 daltons in *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. pomona*, and *L. hardjo*, respectively.

Key words : *Leptospira interrogans*, Soluble serovar-specific antigens, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, Immunoblotting, Crossed immunoelectrophoresis.

서 론

렙토스피라균은 병원성이 있는 *L. interrogans*와 비병원성인 *L. biflexa*의 2종으로 분류한다.^{1,2} *L. interrogans*는 광범위한 감염숙주를 가지며 형태학적,

생화학적 및 배양특성 등으로는 쉽게 구분할 수 없지만 현미경응집시험^{3,4}에서 나타나는 공통의 교차반응 응집원을 중심으로 19개의 혈청군으로 분류하며 다시 교차응집원 흡착시험으로 확인할 수 있는 안정한 특이 항원에 따라 180여 혈청형으로 분류하고 있다.^{1,2}

우리나라에서는 Ryu와 Suh(1974)⁵가 개에서 채집한 혈청 982예중 148예(15%)의 *L. icterohaemorrhagiae* 및 *L. canicola* 항원에 대한 양성반응을 보고하였다. Kim 등⁶은 한우 및 돼지에서 3.7%(11/292) 및 5.7%(13/226)의 혈청양성반응을 보고하였으며, 혈청군 *Canicola*, *Icterhaemorrhagiae*, *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Wolffi*, *Autumnalis* 및 *Bataviae*에 대한 항체의 검출로 가족의 렙토스피라균 감염 가능성을 시사하였다.

렙토스피라균의 항원성은 특이하여 동일 혈청형에 한해서만 방어능력이 부여되며⁷, 혈청형의 변동도 드물지 않게 일어나므로⁸, 렙토스피라병의 발병지역에 존재하는 균주의 정확한 혈청형을 밝히는 것은 렙토스피라병에 대한 예방, 진단, 백신제조 등에 있어서 매우 중요하다.

*L. interrogans*의 혈청형 분류에는 교차응집원 흡착에 의한 현미경응집시험이 널리 사용되고 있으며 WHO의 규정에 따라 표준균주와 분리균주로 각각의 면역혈청을 교차로 흡수하고 흡수후에 해당균주에 대한 잔류항체가 두 면역혈청중 하나에서 10% 이상인 것이 반복실험으로 증명되면 서로 다른 혈청형으로 분류한다.

그러나 현미경응집시험은 많은 혈청형에 해당하는 균주를 배양하고 각 혈청형의 면역혈청을 준비해야 하는 등 실제적으로 상용하기가 쉽지 않다. 그러므로 렙토스피라균의 혈청형을 분류하기 위한 많은 연구가 이루어져 왔다. 균체내 DNA의 염기조성 또는 lipase 등 효소의 특징을 비교하거나 균주의 axial filament 항원을 면역확산법으로 분석함으로써 혈청형을 분류하고자 시도하였으나 이들 방법도 현미경응집시험에 비하여 용이한 방법으로 인정되지 못하였다.

Yanagawa와 Adachi⁹는 겔상에서 침강항체 흡착시험 (precipitin absorption test)을 이용하여 혈청형의 분류를 연구하였으나 이는 교차응집원 흡착시험의 결과와 일치하였다고 하였다. Marshall 등¹⁰은 각 균주를 restriction-endonuclease로 처리하고 특징적인 "finger-print"를 비교하여 렙토스피라균의 분류에 매우 유용한 방법이라고 하였다. Kobayashi et al¹¹은 monoclonal antibody를 이용하여 혈청형 특이항원과 공통항원을 분별하고 혈청형의 분류가 가능함을 시사하였다.

혈청학적 진단법의 개발, 항원의 면역학적 역할 및 세균의 분류를 위하여 항원을 분석하는 것은 매우 중요하다. 렙토스피라균의 특이항원 및 공통항원을 분리하고 분석하기 위하여 많은 연구가 이루어졌다.¹²

Shinagawa와 Yanagawa¹⁶는 hebdomadis 혈청형의 Kyoto 균주를 90% 페놀로 추출하고 에탄올로 정제하여 Kyoto

균주의 항혈청에만 특이적으로 반응하는 type-specific main(TM)antigen을 분리하였으며 그 항원성분은 주로 lipopolysaccharide로 구성되어 있다고 하였다.^{12~15}

Faines et al¹⁷은 초산 및 에탄올로 침전한 항원을 알카리처리하여 serotype-specific lipopolysaccharide antigen(F4)을 분리하였으며 그 항원은 같은 혈청군내에서만 교차반응한다고 하였다. 그러나 Adler와 Faine¹⁸은 수동혈구응집법을 이용하여 F4 항원을 비교하였을 때 혈청군이 다른 균주간에도 교차반응을 나타낸다고 하였으며, 이와같은 교차반응은 표준 렙토스피라 분류법의 교차반응 형태와 다르다고 하였다. Palit와 Harrison¹⁹은 *canicola* 혈청형의 균주를 50%에탄올 또는 sodium dodecyl sulphate로 추출한 외막항원은 F4 항원과 탄수화물 조성이 유사하다고 보고하였다.

렙토스피라균 분류의 기초가 되는 특이항원의 항원결정기를 분리하기 위한 많은 연구가 있었으나^{8,20}, 혈청형 특이항원의 분리과정이 복잡하고 복합항체로는 특이항원을 검출하기가 쉽지 않았다.

Terpstra et al²¹은 혈청형 *icterhaemorrhagiae*, *canicola*, *arboresae* 및 비병원성 혈청형 *patoc*균주를 초음파처리하여 가용성 항원을 분리하고 crossed immunoelectrophoresis를 이용하여 항원적 상관관계를 비교한 결과 *icterhaemorrhagiae*와 *canicola* 혈청형간에는 매우 밀접한 항원관계가 있다고 하였으며 crossed immunoelectrophoresis로 진단학적으로 중요한 가치가 있는 공통항원을 분리하였다고 하였다.

Nunes-Edwards et al²²은 *hardjo* 혈청형의 균주에 (³⁵S) methionine을 radiolabeling한 다음 SDS-PAGE 및 Fluorography 하였을 때 병원성 혈청형간에는 단백항원이 매우 유사하다고 하였으며, radioimmunoprecipitation으로 단백항원을 분석한 결과 병원성 혈청형간에는 대부분의 단백항원이 교차반응하였지만 비병원성 혈청형과는 교차반응하지 않았다고 하였다.

Nukura²³는 *copenhageni* 혈청형 *Shibaura* 균주중 병원성균과 비병원성균간의 균체표면 단백항원을 비교하여 SDS-PAGE로는 차이를 발견할 수 없었으나 immunoblotting으로 분자량 32Kd의 병원성균 특이적인 항원분획을 확인할 수 있었다고 하였다.

병원성 혈청형간에 단백항원이 유사하며 많은 공통항원이 있으나 혈청형간에 교차면역이 성립하지 않으며, 혈청형간 응집시험 및 응집원 흡착시험에서 차이를 나타내는 것은 단백항원외에 다른 항원성분에서 차이가 있을 것을 고려하여 혈청형별 가용성 항원중 당단백항원과 당지질항원을 비교하거나 항원 분획별 항원성의 차이를 비교하는 것은 혈청형의 구

명에 매우 중요한 의의가 있다.

본 연구는 우리나라에서 분리하였거나 혈청반응에서 양성으로 나타나는 icterohaemorrhagiae, canicola, pomona 및 hardjo 혈청형을 대상으로 이들 가용성 항원중 단백질, 당단백, 당지질성항원을 분석하고 혈청형에 따른 항원특이성을 규명하기 위하여 SDS-PAGE, crossed immunoelectrophoresis 및 immunoblotting을 이용하여 실험하였다.

재료 및 방법

사용균주 : 사용균주는 미국 NVSL(National Veterinary Service Laboratory)로부터 분양하여 안양가축위생연구소에서 계대배양하고 있는 *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae(strain RGA), serovar canicola(strain Hond Utrecht IV), serovar pomona(strain Pomona) 및 serovar hardjo(strain Hardjoprajtino)를 사용하였다. 각 균주를 BSA-Tween 80 배지에 접종한 다음 29~30°C에서 7~10일간 배양하였으며, 가용성 항원을 얻기 위하여 2,000ml의 BSA-Tween 80배지를 넣은 4개의 5L 배양병에 각 균주를 접종하여 29~30°C, shaking incubator에서 대량배양하였다.

항원제조 : BSA-Tween 80 배지에서 배양하여 증식 극기에 도달한 균체를 7,000g에서 30분간 원심하여 침전시킨 다음, PBS로 3회 세척하였다. 세척한 균체 1g당 15ml의 PBS로 균부유액을 만들어 얼음속에 유지하면서 ultrasonicator(Vibracell, Sonics & Materials Co. USA)를 사용하여 20,000Hz(0.5 sec. interval)로 20분간 초음파처리하였다.

초음파처리한 균부유액은 40,000g에서 90분간 원심하여 상청액을 취하고 Lowry method로 단백질량한 다음 -70°C에 보관하면서 가용성 항원으로 사용하였다.

면역혈청 제조 : 각 균주별로 제조한 가용성 항원을 2~4mg/ml의 양으로 조절하여 Harboe와 Ingild²⁴의 방법에 따라 Freund incomplete adjuvant와 동량희석한 다음 각 균주별로 3마리씩의 Newzealand white 잡종 토끼의 견부에 0.1ml씩 피내접종하였다. 초회접종후 7, 21, 35, 49, 79일째 같은 양의 항원을 추가접종하고 마지막 접종후 7일만에 전혈을 채혈하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 포화 황산암모늄용액을 사용하여 면역글로불린을 침전시킨 다음 PBS로 투석하면서 황산암모늄을 제거한 것을 각 균주에 대한 면역혈청으로 사용하였다. 면역접종 전 각 토끼의 혈액을 채혈하여 분리한 혈청은 대조혈청으로 사용하였다. 각 균주의 면역혈청은 효소면역측정법을 이용하여 동형의

가용성 항원에 대한 항체가를 1 : 32,000~64,000으로 조절한 다음 보존하여 사용하였다.

SDS Polyacrylamide gel electrophoresis : 가용성 항원중 단백질, 당단백, 당지질성항원을 분석하기 위하여 SDS-PAGE 하였다. 겔은 0.75mm 두께의 3.0 및 13.5% SDS-polyacrylamide gel을 사용하였으며 각 균주의 가용성 항원을 well당 단백질량으로서 60µg을 주입하고, 15~30mA의 전류로 3~4시간 전기영동하였다. molecular weight markers로는 SDS-PAGE standards, low range (Bio-Rad Lab., USA)를 사용하였다.

SDS-PAGE한 항원분획의 염색

단백분획의 염색(protein staining) : 전기영동으로 분획된 단백질 분획을 염색하기 위하여 SDS-PAGE한 겔을 0.2% Coomassie blue R-250 용액으로 4~5시간 염색한후 20% methanol, 10% acetic acid의 탈색용액으로 2~3시간 탈색한 다음 겔건조기를 사용하여 건조하였다.

당단백분획의 염색(glycoprotein staining) : 전기영동으로 분획된 당단백항원 분획을 염색하기 위하여 SDS-PAGE한 겔을 40% methanol, 10% acetic acid 용액으로 4시간 고정후 7% acetic acid 용액으로 reswelling시켰다. 다음 1% periodic acid 용액에 담구어 어두운 곳에서 1시간 반응시킨후 다시 Schiff's reagent를 사용하여 4°C에서 1시간 처리한 다음 0.1M 염산에 sodium metabisulfite를 1%로 녹인 용액을 사용하여 탈색하였다.

N-acetylglucosamine을 함유한 당지질성 항원분획의 염색 : 가용성 항원중 N-acetylglucosamine을 함유한 항원분획을 확인하기 위하여 SDS-PAGE한 겔을 transfer buffer(25mM tris, 192mM glycine, 20% methanol)에 담구어 37°C에서 교반하면서 30분간 침지시켰다. SDS-PAGE한 겔과 nylon membrane 및 grid를 cathode grid-sponge-Watman paper-nylon membrane-SDS-PAGE gel-Watman paper-sponge-anode grid 순으로 조립하여 50 V의 전압으로 하룻밤동안 transfer 하였다. 다음 nylon membrane을 0.5% blocking solution(blocking reagent, BM Biochemica Co., W.Germany)에서 3시간 반응시킨후 TBS (Tris buffered saline ; Tris-HCl, 150m mol ; NaCl, 50m mol ; pH 7.5)로 2회 세척하고 buffer 1 (TBS ; MgCl₂, 1m mol, MnCl₂, 1m mol ; CaCl₂, 1m mol ; pH 7.5)으로 1회 세척하였다. 다음 buffer 1에 Lectin DSA, biotin labeled (BM Biochemica Co., W.Germany)를 10ug/ml 농도로 조절한 용액으로 1시간 반응시킨후 TBS로 3회 세척하였다. 다음 buffer 2(TBS ;

Tween-20, 0.1% ; blocking reagent, 0.5% ; pH 7.5)에 Streptavidin POD conjugate(BM Biochemica Co., W.Germany)를 1,000U/ml 농도로 조정된 용액에서 nylon membrane을 1시간 반응시킨후 buffer 3(TBS ; Tween-20, 0.1%, pH 7.5)으로 3회 세척하였다. 그리고 30% H₂O₂와 4-chloro-1-naphtol을 사용하여 발색하였다.

Crossed immunoelectrophoresis : 각 균주간 교차반응에 의한 항원적 특이성을 비교하기 위하여 Axelsen et al²⁵의 방법에 준하여 crossed immunoelectrophoresis를 실시하였다. 1% agarose(-mr=0.13±0.02) 7ml를 50×75mm glass plate에 분주하고 gel puncher로 만든 직경 2mm의 well에 각 가용성 항원을 주입한 다음 0.025M barbital buffer를 전계용매로 하여 2.5V/cm의 전압으로 2~3시간 1차 전기영동하였으며 이때 항원 분획의 이동을 증가시키기 위하여 agarose gel에 Triton X-100을 1% 첨가하였다. 1차 전계가 끝난후 항원이 전개된 15×75mm의 젤판 남기고 나머지는 제거하여 그 부위에 동형 및 이형의 면역혈청을 섞은 1% agarose를 분주하고 1차 전계에 대하여 직각의 방향으로 2.0V/cm의 전압으로 하룻밤동안 2차 전개하였다. 2차 전계가 끝난후 glass plate는 압착-세척-압착-건조의 과정을 거쳐 0.5%의 Coomassie blue 용액으로 30분간 염색한 다음, 40% methanol, 10% acetic acid 용액으로 탈색하였다. 다음 agarose gel을 완전히 건조시킨후 각 glass plate에 나타난 침전선(precipitin line)의 수를 산정하여 비교하였다.

Immunoblotting : 가용성 항원중 항원성이 있는 분획 및 혈청형 특이항원을 규명하기 위하여 immunoblotting을 실시하였다. 각 혈청형의 가용성 항원을 단백질량이 60μg 되게 주입하여 SDS-PAGE한후 nylon membrane 대신 nitrocellulose paper를 사용하여 당지질성항원 분석에서와 같은 방법으로 항원분획들을 transfer하였다. 다음 nitrocellulose paper를 blocking solution (PBS ; BSA, 3% ; goat serum, 10%)으로 2~3시간 반응시킨후 1차 항체로서 각 가용성 항원에 대한 토끼 면역혈청을 일정량씩 첨가하여 1시간 반응시켰다. 다음 PBST용액(PBS ; Tween-20, 0.5%)으로 3회 세척한후 2차 항체로서 goat anti-rabbit IgG, POD conjugate(BM Biochemica Co., W.Germany)를 첨가한 blocking solution에서 1시간 반응시켰다. 다음 PBST용액으로 nitrocellulose paper를 3회 세척한후 30% H₂O₂와 4-chloro-1-naphtol을 사용하여 발색하였다.

Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae, canicola, pomona 및 hardjo 균주의 가용성 항원중 단백질항원, 당단백항원 및 당지질성의 N-acetylglucosamine 함유 항원을 비교 분석하고 각 혈청형간 교차반응 및 항원 특이성을 규명하기 위하여 SDS-PAGE, crossed immunoelectrophoresis 및 immunoblotting을 이용하여 실험하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

SDS-PAGE에 의한 균주별 단백질항원 : 가용성 항원중 단백질항원을 분자량에 따라 비교하고 균주별 특이 단백질항원을 규명하기 위하여 가용성 항원을 SDS-PAGE한 다음 Coomassie blue로 단백질염색하였다(Fig 1).

각 균주는 분자량 14.4Kd 으로부터 97.4Kd 범위에서 37~41개의 단백질항원이 분획되었다. 특히 이들 단백질항원 분획의 대부분은 분자량 30Kd에서 97.4Kd사이에 있었으며 균주간 차이는 구분할 수 없었다. 그러나 분자량 14.4Kd 으로부터 30Kd의 범위에는 1~2개의 각 균주 특이 단백질항원을 분별할 수 있었다.

각 균주의 가용성 항원중 총단백항원 분획의 수와 특이단백항원의 분자량은 Table 1과 같다.

SDS-PAGE에 의한 균주별 당단백항원 : 가용성 항원중 당단백항원을 검출하기 위하여 가용성 항원을 SDS-PAGE한 다음 PAS 염색하였다(Fig 2).

가용성 항원을 50% 아세톤으로 처리하여 침전한 항원을 SDS-PAGE한 다음 PAS 염색하여 확인한 항원은 당단백항원인 것으로 판별하였다. 각 균주의 가용성 항원중에는 분자량 27Kd내지 40Kd의 당단백항원이 하나씩 있었으며, 특히 *L. pomona*의 당단백항원은 다른 균주의 당단백항원에 비하여 적은 분자량을 가지고 있었다. 균주별 당단백항원의 분자량은 Table 2와 같다.

혈청형별 N-acetylglucosamine을 함유한 당지질성 항원 : 가용성 항원중 N-acetylglucosamine을 함유한 당지질성 항원을 비교하기 위하여 각 가용성 항원을 SDS-PAGE한후 nylon membrane에 각 항원분획들을 transfer하고 lectin DSA를 사용하여 발색하였다(Fig 3).

각 균주의 가용성 항원에는 97.4Kd의 분자량을 가지는 N-acetylglucosamine함유 항원이 있었으며 *L. canicola*는 특이하게 82Kd와 92Kd의 분자량을 가지는 항원도 N-acetylglucosamine을 함유한 것이 확인되어 다른 균주와 구별되었다(Table 3).

Crossed immunoelectrophoresis를 이용한 균주간 교차침전항원 비교 : 각 균주의 가용성 항원을 각 면역혈청으로 교차로 반응시키면서 crossed immunoelec-

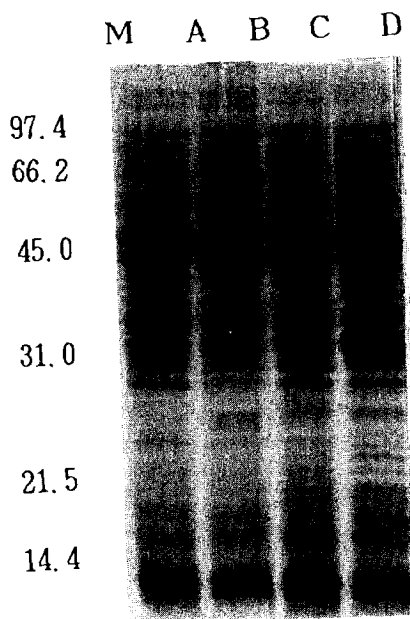


Fig 1. Comparison of protein antigen profiles of 4 serovars of *Leptospira* spp. by SDS-PAGE and Coomassie blue staining.
Lane : M. molecular weight markers ; A. *L. icterohaemorrhagiae* ; B. *L. canicola* ; C. *L. pomona* ; D. *L. hardjo*.

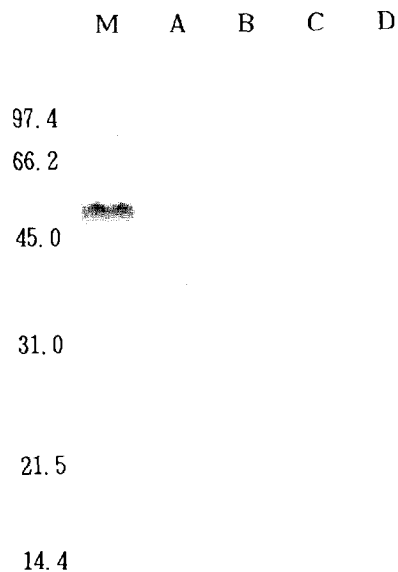


Fig 3. Comparison of antigen profiles containing N-acetylglucosamine of 4 serovars of *Leptospira* spp. by SDS-PAGE, blotting and lectin DSA.
Lane : M. molecular weight markers ; A. *L. icterohaemorrhagiae* ; B. *L. canicola* ; C. *L. pomona* ; D. *L. hardjo*.

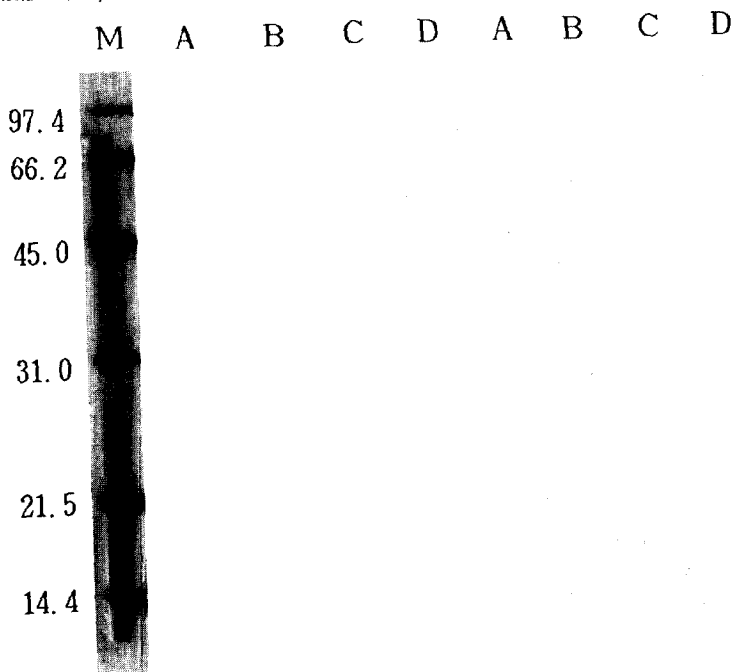


Fig 2. Comparison of glycoprotein antigen profiles of 4 Serovars of *Leptospira* spp. by SDS-PAGE and PAS staining.
Lane : M. molecular weight markers ; A. *L. icterohaemorrhagiae* ; B. *L. canicola* ; C. *L. pomona* ; D. *L. hardjo*. 1. total soluble antigens. 2. precipitate treated with 50% acetone. 3. supernatant treated with 50% acetone.

Table 1. Numbers of protein antigens and serovar-specific protein antigens determined by SDS-PAGE and Coomassie blue staining of soluble antigens prepared from *L interrogans* serovars icterohaemorrhagiae, canicola, pomona and hardjo

Serovars of <i>L interrogans</i>	Total numbers of protein antigens	Molecular weight of serovar specific protein antigens
ict	41	24,18Kd
can	40	25,17Kd
pom	39	26Kd
har	37	23,22Kd

ict=*L icterohaemorrhagiae*; can=*L canicola*;
pom=*L pomona*; har=*L hardjo*

Table 2. Distributions of glycoprotein antigens determined by SDS-PAGE and PAS staining of soluble antigens prepared from *L interrogans* serovars icterohaemorrhagiae, canicola, pomona and hardjo

serovars of <i>L interrogans</i>	Molecular weight of glycoprotein antigens
ict	30-34 Kd
can	29-33 Kd
pom	25-29 Kd
har	28-32 Kd

ict=*L icterohaemorrhagiae*; can=*L canicola*;
pom=*L pomona*; har=*L hardjo*

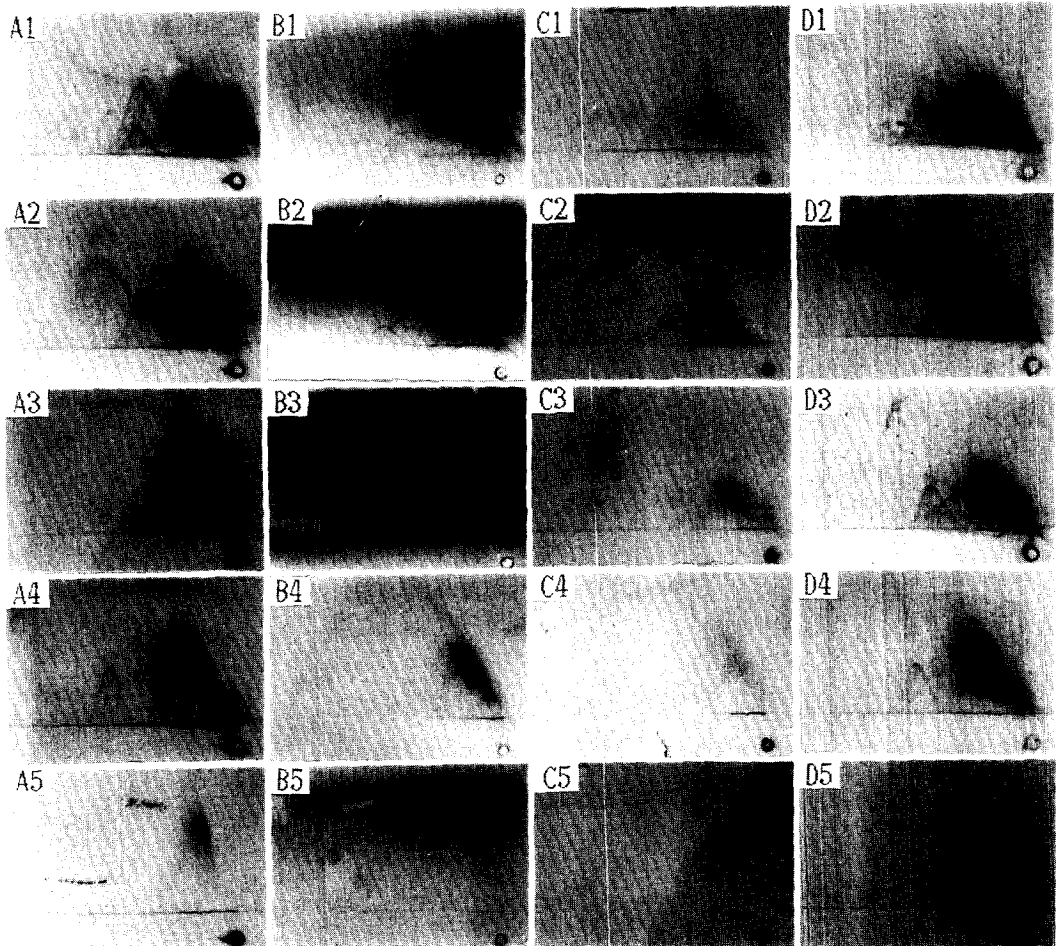


Fig 4. Serological comparison of 4 serovars of *Leptospira* spp. by crossed immunoelectrophoresis.

The antigens were: (A) *L icterohaemorrhagiae*, (B) *L canicola*, (C) *L pomona*, (D) *L hardjo*. The antisera were: (1) *L icterohaemorrhagiae*, (2) *L canicola*, (3) *L pomona*, (4) *L hardjo*, (5) normal rabbit serum. First-dimension electrophoresis with anode to the left and second-dimension electrophoresis with anode to the top.

Table 3. Molecular weights of antigens containing N-acetylglucosamine, determined by SDS-PAGE, blotting and lectin DSA, of soluble antigens prepared from *L interrogans* serovars icterohaemorrhagiae, canicola, pomona and hardjo

serovars of <i>L interrogans</i>	Molecular weight of antigens containing N-acetylglucosamine
ict	97.4 Kd
can	97.4, 92, 82 Kd
pom	97.4 Kd
har	97.4 Kd

ict=*L icterohaemorrhagiae*; can=*L canicola*;
pom=*L pomona*; har=*L hardjo*

Table 4. Numbers of precipitin lines determined by crossed immunoelectrophoresis of soluble antigens prepared from *L interrogans* serovars icterohaemorrhagiae, canicola, pomona and hardjo in homologous and heterologous rabbit antisera

Antiserum	Soluble antigens			
	ict	can	pom	har
ict	29	21	21	21
can	26	23	21	18
pom	17	14	10	12
har	18	13	9	19

ict=*L icterohaemorrhagiae*; can=*L canicola*;
pom=*L pomona*; har=*L hardjo*

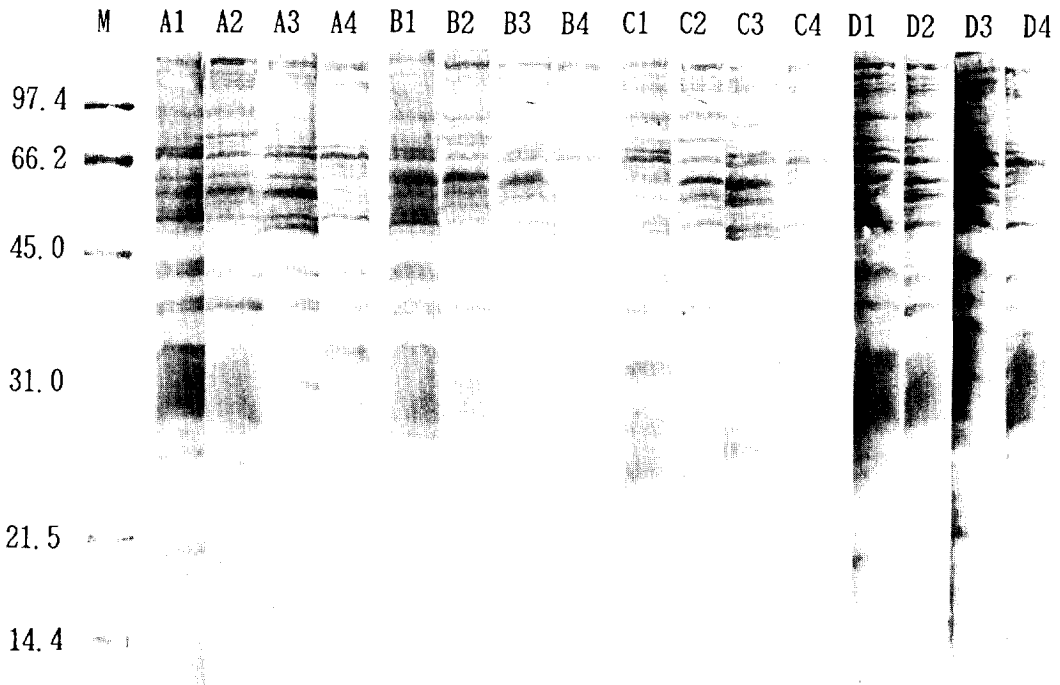


Fig 5. Serological comparison of 4 serovars of *Leptospira spp.* by immunoblotting.

The antigens were: (A) *L icterohaemorrhagiae*, (B) *L canicola*, (C) *L pomona*, (D) *L hardjo*. The antisera were: (1) *L icterohaemorrhagiae*, (2) *L canicola*, (3) *L pomona*, (4) *L hardjo*. (5) normal rabbit serum. Goat anti-rabbit IgG biotin labeled was used by second antibody.

rophoresis하여 나타나는 모든 침전선 (precipitin lines) 의 수를 산정하여 비교하였다(Fig 4).

가용성 항원을 동형 및 이형의 면역혈청과 상호반응시킨 결과 각 균주간에는 교차반응에 의한 9개 이상의 침전선이 확인되어 *L interrogans* 혈청형간에는 많은 교차침전항원이 있음을 알 수 있었다.

*L icterohaemorrhagiae*와 *L canicola* 균주간에는 21개 이상의 항원이 서로 교차반응하는 것으로 나타나 이들 두 균주간에는 항원적으로 상호 공통성이 많다는 것을 알 수 있었다(Table 4).

Immunoblotting에 의한 항원분획별 항원성 및 특이항원: 가용성 항원중 항원성이 있는 항원분획을

Table 5. Numbers of total antigens and serovar-specific antigens of *L. interrogans* serovars icterohaemorrhagiae, canicola, pomona and hardjo detected by immunoblotting with homologous rabbit antisera

Serovars of <i>L. interrogans</i>	Total antigens	Serovar-specific antigens
ict	22	1 (45 Kd)
can	21	2 (92, 82 Kd)
pom	23	1 (31 Kd)
har	24	1 (24 Kd)

ict=*L. icterohaemorrhagiae*; can=*L. canicola*;
pom=*L. pomona*; har=*L. hardjo*

확인하고 각 균주 특이항원을 규명하기 위하여 immunoblotting하였다(Fig 5).

SDS-PAGE에 의하여 분획된 각 균주의 가용성 항원중 동형의 면역혈청으로 immunoblotting하여 확인한 항원분획은 항원성이 있는 것으로 판별하였으며 각 균주는 21~24개의 항원성이 있는 항원분획이 있었다.

항원성이 있는 분획중에서 이형의 면역혈청과는 반응을 나타내지 않는 각 균주의 특이항원은 *L. icterohaemorrhagiae*에서 분자량 45Kd의 단백질, *L. canicola*는 분자량 82Kd, 92Kd의 당지질성항원, *L. pomona*는 분자량 31Kd의 단백질, *L. hardjo*는 분자량 24Kd의 단백질 등이었다(Table 5).

항원성이 있는 항원분획들의 분자량에 따른 분포 양상은 각 균주별로 뚜렷한 차이를 보였는데 이는 같은 분자량의 항원분획이지만 균주별로 항원성이 다르다는 것을 알 수 있었다.

SDS-PAGE에 의하여 확인한 균주 특이 단백질은 면역혈청으로는 확인되지 않았다. 당단백항원은 동형의 면역혈청과 강한 반응을 보여 항원성이 있음을 알 수 있었으며, 균주간에도 교차반응하였다.

*L. icterohaemorrhagiae*와 *L. canicola*의 면역혈청은 각 균주 공통의 분자량 97.4Kd의 당지질성항원과 반응을 나타내었으나 *L. pomona*와 *L. hardjo*의 면역혈청은 반응을 나타내지 않았다.

가용성 항원중 분자량 30Kd에서 70Kd사이의 항원들간에는 균주간 교차반응하는 항원들이 많았으며 특히 40Kd, 45Kd, 70Kd의 항원은 이들 균주간에 강한 교차반응을 나타내는 공통항원이었다.

고 찰

*Leptospira interrogans*는 동일혈청형이나 같은 혈청군에 속하는 균주로 제조한 백신에 의해서만 방어면

역이 이루어지므로⁷ 렙토스피라증의 예방을 위하여 발생지역에서 분리한 균주의 혈청형을 규명하는 것은 의의가 크다.

혈청형으로 분류하기 위해서는 기초가 되는 혈청형 특이항원을 분리하거나^{16,17} 각 혈청형의 항원 특이성을 규명하는 것이 매우 중요하다.

본 실험은 우리나라에서 사람 또는 가축으로부터 분리하였거나 혈청검사에서 양성으로 나타나는 *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae, canicola, pomona 및 hardjo 균주를 대상으로 이들 혈청형의 가용성 항원중 단백질, 당단백, 당지질성 항원 및 N-acetylglucosamine을 함유한 당지질성의 항원을 분석하여 혈청형별 특이항원을 규명하고 혈청형간의 교차반응 및 항원 특이성을 알아보기 위하여 SDS-PAGE, crossed immunoelectrophoresis 및 immunoblotting을 이용하여 실험하였다.

현재까지 혈청형의 특이항원을 분석하기 위하여 많은 연구가 이루어 졌으며^{13,14,16,17,26}, 렙토스피라균의 항원을 분석하기 위한 방법으로 crossed immunoelectrophoresis²¹, radioimmunoprecipitation²², immunoblotting²³ 및 monoclonal antibody et al^{11,27,28} 등이 이용되고 있다.

L. interrogans serovar icterohaemorrhagiae, canicola, pomona 및 hardjo 균주를 초음파처리 하여 얻은 가용성 항원을 SDS-PAGE한 다음 균주별 단백질 분획을 비교한 결과 분자량 30Kd이상인 단백질들은 혈청형간에 매우 유사하였다. 이는 Nunes-Edwards et al²²이 hardjo, pomona, balcanica 혈청형의 단백항원을 비교한 결과 병원성 혈청형간에는 단백질이 매우 유사하였다는 보고와 같다.

각 균주에서 분자량 30Kd이하의 단백질중에는 혈청형에 따라 특이성 있는 1~2개의 단백질이 있었으며 이들 항원의 분자량 차이로 균주를 분별할 수 있었다. 그러나 30Kd이하의 균주 특이단백항원들은 immunoblotting에서 동형의 면역혈청과 반응을 나타내지 않았으므로 항원성은 낮은 것으로 생각되었다.

*L. interrogans*의 혈청형간에는 단백질의 조성이 유사하지만 현미경응집시험 및 교차응집시험 결과 균체응집능의 차이로 인하여 다른 혈청형으로 구분되며, 혈청형간 교차면역이 성립하지 않는 것은⁷ 단백질외에 당단백항원이나 당지질항원 또는 각 항원성분들의 항원성 차이에 의한 것으로 생각된다.

가용성 항원을 SDS-PAGE한 다음 PAS 염색으로 확인한 당단백항원은 균주별로 분자량에 차이를 보였으며 특히 pomona 혈청형의 당단백항원은 다른 혈청형에 비하여 적은 분자량을 가지고 있었으므로 SDS-

PAGE상에서 쉽게 분별할 수 있었다. 당단백항원은 immunoblotting에서 균주간에 강한 교차반응을 나타내었으므로 각 균주의 당단백항원은 공통의 항원결정기를 가지고 있는 것으로 생각되었다.

혈청형 특이항원으로 당지질성항원인 TM 항원¹⁶과 F4 항원¹⁷이 잘 알려져 있으며, TM 항원은 당구성분으로서 N-acetylglucosamine을 포함하고 있다. Vinh et al²⁹은 copenhageni 혈청형의 당지질을 분석한 결과 당지질성분중에는 약 7.5%의 N-acetylglucosamine을 함유하고 있다고 하였다.

본 실험에서는 각 균주의 가용성 항원중 당지질성항원을 확인하기 위하여 N-acetylglucosamine에 특이적으로 결합하는 lectin DSA를 사용하였다. 각 균주는 분자량 97.4Kd의 당지질성항원을 공통으로 가지고 있었으며, immunoblotting 결과 icterohaemorrhagiae와 canicola 혈청형의 당지질성항원은 항원성이 있으나 pomona와 hardjo 혈청형의 당지질성항원은 항원성이 없는 것으로 나타났다. canicola 혈청형의 경우에는 분자량 92Kd, 82Kd인 항원도 당지질성항원인 것으로 나타나 다른 혈청형들과 차이가 있었으며 이들은 동형의 면역혈청에서만 반응하는 canicola 혈청형 특이 당지질성항원이었다.

이상의 결과로 볼 때 랩토스피라균의 가용성 항원을 SDS-PAGE한 다음 혈청형 특이적인 단백질, 당단백항원 또는 당지질성항원을 확인함으로써 혈청형의 규명이 가능할 것으로 생각된다.

Axelson et al²⁵은 복잡한 세균의 항원분석에 crossed immunoelectrophoresis를 적용할 수 있다고 하였다. 각 균주간 교차침전반응에 의한 항원적 관련성을 비교하기 위하여 crossed immunoelectrophoresis를 이용하여 실험하였다.

가용성 항원이 동형의 면역혈청과 반응하여 나타난 침전선의 수와 이형의 면역혈청과 교차반응하여 나타난 침전선의 수를 비교한 결과 혈청형간에는 많은 교차침전항원이 있는 것으로 나타났으며 특히 icterohaemorrhagiae와 canicola 혈청형간에는 90% 이상의 항원이 교차침전반응하는 것으로 나타나 이들 두 혈청형은 항원적으로 매우 밀접한 관계가 있다는 것을 알 수 있었으며 이것은 Terpstra와 Schoone²¹에 의한 결과와 유사하다. 겔상에서 분획된 각 혈청형 특이항원을 규명하기 위해서는 tandem-crossed immunoelectrophoresis 등의 실험이 추가로 수행되어야 할 것이다.

가용성 항원들중 항원성이 있는 분획 및 혈청형 특이적인 항원을 규명하기 위하여 각 면역혈청을 교차로 반응시키면서 immunoblotting하였다. immunob-

lotting에 의하여 SDS-PAGE로 확인한 각 혈청형의 가용성 항원들중 약 60%의 분획은 항원성이 있음을 알 수 있었으며 항원성이 있는 분획들중에서 동형의 항혈청에만 반응하는 혈청형 특이적인 항원을 확인할 수 있었다. 혈청형별 특이적인 단백질인 단백질은 icterohaemorrhagiae 혈청형에서 분자량 45Kd, pomona 혈청형에서 분자량 31Kd, hardjo 혈청형에서 분자량 24Kd이었다. canicola 혈청형은 분자량 90Kd, 82Kd의 당지질 항원이 특이항원이었다. 각 혈청형에서 분자량 41Kd, 45Kd, 70Kd의 항원들은 혈청형간에 강한 교차반응을 보여 4가지 혈청형의 공통항원임을 알 수 있었다. 각 혈청형에서 동형의 면역혈청과 반응하는 항원들의 분포양상과 이형의 면역혈청과 반응하는 항원들의 분포양상은 분명한 차이를 보여 같은 분자량을 가지는 항원이지만 혈청형에 따라 항원성의 차이가 있음을 알 수 있었다.

이와같이 각 혈청형 특이항원이나 항원성의 차이로 인하여 혈청형에 따라 혈청반응양상이 다르고 균체 융집능 등의 차이를 유발하는 것으로 고려할 수 있으나 혈청형 특이항원에 관한 분석은 더욱 추가되어야 할 것이다.

결 론

사람 및 동물에 대하여 감염을 일으키는 랩토스피라균중 국내에서 분리하였거나 한우 및 돼지에서 혈청반응에 의하여 양성으로 나타난 *L. interrogans* icterohaemorrhagiae, canicola, pomona 및 hardjo 균주의 가용성 항원을 분석하고 혈청형간 항원적 특이성을 비교하기 위하여 SDS-PAGE, crossed immunoelectrophoresis 및 immunoblotting을 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 각 균주는 분자량 14.4Kd 으로부터 31Kd 사이에 특이 단백질항원을 1~2개 가지고 있었다.
2. 각 균주는 분자량 27Kd에서 40Kd사이의 당단백항원을 가지고 있었으며 분자량은 균주에 따라 차이가 있었다.
3. 각 균주는 분자량 97.4Kd의 N-acetylglucosamine 분획을 가지고 있었으며 *L. canicola*는 분자량 82Kd, 90Kd의 N-acetylglucosamine 분획을 가지고 있어서 다른 균주와 구별되었다.
4. *L. icterohaemorrhagiae*와 *L. canicola*는 대부분의 항원이 상호교차침전반응을 나타냄으로써 항원적으로 서로 밀접한 관계가 있었다.
5. 분자량이 같은 항원이라도 균주에 따라 항원성의

유무는 다르게 나타났으며 균주별 특이항원은 *L ictero-haemorrhagiae*의 분자량 45Kd, *L pomona*의 분자량 31Kd 및 *L hardjo*의 분자량 24Kd인 단백항원과 *L canicola*의 분자량 82Kd, 90Kd인 당지질성항원이었다.

참 고 문 헌

1. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. *Wld Hlth Org* 1982.
2. Johnson RC, Faine S. Bergy's manual of systemic bacteriology 1984.
3. Galton MM, Powers DK, Hale AD, et al. A rapid microscopic slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. *Am J Vet Res* 1958 ; 99 : 235~238.
4. Cole Jr JR, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Applied Microbiology* 1973 ; 25 : 976~980.
5. Ryu E, Suh IS. The leptospiral agglutinin of Korean dogs and wild rats by employing filter paper and rapid microscopic agglutination test. *Int J Zoon* 1974 ; 1 : 25~31.
6. Kim HH, et al. Microbiological studies on animal reservoirs for leptospirosis in Korea. *과학기술처* 1987 ; pp 99~153.
7. Arimitsu Y, Mori M, Akama K. Cross antigenicities of leptospira interrogans serovar copenhageni Shibaura strain for preparing biological products in Japan. *Japan J Med Sci Biol* 1980 ; 33 : 223~229.
8. Adachi Y, Yanagawa R. Nature of antigenic determinant of serovar-specific antigen of *Leptospira interrogans* serovar hebdomadis. *Microbiol Immunol* 1977 ; 22 : 523~533.
9. Yanagawa R, Adachi Y. Identification of some Japanese Leptospiral strains as serotypes copenhageni and icterohaemorrhagiae by precipitin-absorption test in gel. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A* 1977 ; 237 : 96~103.
10. Marshall RB, Wilton BE, Robinson AJ. Identification of *Leptospira* serovars by restriction-endonuclease analysis. *J Med Microbiol* 1981 ; 14 : 163~166.
11. Kobayashi Y, Tamai T, Oyama T. Characterization of monoclonal antibodies against etiological agent of Weil's disease. *Microbiol Immunol* 1984 ; 28(3) : 359~370.
12. Rothstein N, Hiatt CW. Studies of the immunochemistry of *Leptospira*. *J Immunol* 1956 ; 77 : 257.
13. Schrickler RL, Hansen LE. Precipitating antigens of *Leptospira*. 1. Chemical properties and serologic activity of soluble fractions of *Leptospira pomona*. *American Journal of Veterinary Research* 1963 ; 24 : 854~860.
14. Schrickler RL, Hansen LE. Precipitating antigens of *Leptospira*. 2. Serologic study of soluble fractions from 4 serotypes. *American Journal of Veterinary Research* 1963 ; 24 : 861.
15. Myers DM, Coltorti EA. Broadly reacting precipitating and agglutinating antigen of leptospirae. *Journal of Clinical Microbiology* 1978 ; 8 : 580~590.
16. Shinagawa M, Yanagawa R. Isolation and characterization of a leptospiral type-specific antigen. *Infection and Immunity* 1972 ; 5 : 12~19.
17. Faine S, Adler B, Palit A. Chemical, serological and biological properties of a serotype-specific polysaccharide antigen in leptospira. *AJEBAK* 1974 ; 52 : 311~319.
18. Adler B, Faine S. Serological cross-reactions of leptospiral lipopolysaccharide(F4) antigen. *Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt Orig* 1979 ; 244 : 291~301.
19. Palit A, Harrison PM. Serological and chemical interrelationship of antigens from *Leptospira interrogans* serovar canicola. *Journal of General Microbiology* 1980 ; 117 : 141~146.
20. Kawaoka Y, Naiki M, Yanagawa R. Isolation of the antigen-active components from leptospiral serovar-specific lipopolysaccharide antigen by mild acid hydrolysis. *Japan. J Vet Sci* 1982 ; 44 : 473~478.
21. Terpstra WJ, Schoone GJ. Analysis of leptospira antigens by crossed immunoelectrophoresis. *Scand J Immunol* 1983 ; 18 : 113~121.
22. Nunes-Edwards PL, Thiermann AB, Bassford Jr PJ, et al. Identification and characterization of the protein antigens of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infection and immunity* 1985 ; 48 : 492~497.
23. Nhkura M. Comparison of antigens and protein profiles of virulent and avirulent clones of leptospira interrogans serovar copenhageni strain Shibaura. *Jpn J Vet Res* 1986 ; 34 : 144.
24. Harboe N, Ingild A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. pp 161~164 in Axelson, N. H., Kroll, J. and Weeke.

- B.(eds), A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications. *Scan J Immunol* 1973 ; 2, (Suppl. No. 1).
25. Axelson NH, Kroll J, Weeke B. A manual of quantitative immunoelectrophoresis, Methods and applications. *Scand. J Immunol* 1973 ; 2. (Suppl. No. 1).
26. Adler B, Faine S, Yanagawa R. Comparative studies on two antigens(F4 and TM) extracted from *Leptospira*. *Journal of Clinical Microbiology* 1980 ; 12 : 7~9.
27. Ono E, Naiki M, Yanagawa R, Isolation of an antigenic oligosaccharide fraction from *Leptospira interrogans* serovar *canicola* with a monoclonal antibody. *Journal of General Microbiology* 1984 ; 130 : 1429~1435.
28. Ono E, Kakase H, Naiki M, et al. Purification, characterization and serological properties of a glycolipid antigen reactive with a serovar-specific monoclonal antibody against *Leptospira interrogans* serovar *canicola*. *Journal of General Microbiology* 1987 ; 133 : 1329~1336.
29. Vinh T, Adler B, Faine S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *Journal of General Microbiology* 1986 ; 132 : 103~109.
-