

어류분리 *Vibrio anguillarum* 용혈소의 정제

김 영 희†

동의대학교 미생물학과

Purification of Hemolysin from *Vibrio anguillarum* Isolated from Fish

Young-Hee Kim

Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

A marine microbe, *Vibrio anguillarum* was isolated from fish and studied for its concerning pathogenic substance of hemolysin. Purification of hemolysin was achieved by the procedure of ammonium sulfate precipitation from culture filtrate, DEAE-cellulose chromatography, and G-200 gel filtration with 36 fold of purification and 2.3% yield. The molecular weight of the purified hemolysin was 38,000 dalton by SDS-PAGE. The purified hemolysin was stable at pH 6-9, below 45°C, and up to 1% of NaCl, respectively. Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ and FeCl₃ inhibited the hemolytic activity whereas EDTA and Mg²⁺ did not.

Key words : *Vibrio anguillarum*

서 론

*Vibrio anguillarum*은 비브리오증을 유발하는 대표적 세균으로서 담수어와 해수어에 중요한 독성 미생물¹⁾로 알려져 있으며 질병의 양상은 어류의 지느러미 부분에서 대량 출혈, 장내 염증, 전형적인 패혈증을 유발하는등의 혈관 출혈과 조직괴사를 일으켜 치사율이 매우 높으며 감염된 어류의 내장이나 감염된 어류의 체강내에서 분리된다^{1,2,3)}.

*V. anguillarum*은 이미 유럽 및 동남아시아, 태평양 연안의 양식업에 막대한 경제적 손실을 야기하는 세균이나⁴⁾ 아직까지 유전적, 생화학적으로 어떻게 독성을 일으키는지 정확한 자료는 나오지 않고 있으며 O항원의 구조에 따라 10 혈청형으로 나누어 분류하고⁵⁾ 기회주의적인 병원성을 야

기하는 병원체이고 지리적인 분포도나 발생양상이 매우 다양하며 발병기전의 주요인자인 외독소에 관한 보고가 몇몇 종에서 밝혀지고 있다^{6,7,8)}. 아직까지는 이 외독소가 본 균에 의한 독력 가능성의 주요 물질로 간주하고 비브리오증의 발병인자로 추정하고 있다^{8,9)}.

어류 *Vibrio*들은 여러 세포의 대사산물을 방출하는데 그 종류에는 용혈소, proteolytic enzyme, cytotoxin, toxic materials 그리고 hemagglutinin 등이⁸⁾ 있으며 이들 물질이 어류에 치명적 독성물질인지는 더 많은 연구를 필요로 한다. 그러나 이들중 *V. anguillarum* 만이 용혈소를 생산하는 것으로 알려져 있고 병원성 역할은 확실하지 않다. 세계 여러나라에서 이미 본 균에 의한 피해 사례 및 예방대책에 대한 요구는 있으나¹⁰⁾ 확실한 방법은 정립된 것이 없으며

† Corresponding author

방법위한 역학조사를 통하여 피해를 최소화 할 수 있는 방법이 강구되어야 할 것으로 보인다.

본 연구에서는 우리나라의 어류에서 분리된 *V. anguillarum*을 대상으로 본 균이 생산하는 외독소의 일종인 용혈소를 분리하고 정제 및 물리학적 특성을 검토하여 얻은 약간의 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서는 어류에서 분리한 *V. anguillarum* KS410를 표준균주와 비교하고 API 자동동정system으로 동정한후 사용하였다. 균주의 보관은 1.5% NaCl이 함유된 peptone 반 고체배지에 접종한후 실온에 보관하여 사용하였다.

용혈소 생산조건

용혈소 정제를 위하여 Tryptic soy broth에 1.5%의 NaCl를 첨가하고 28°C에서 48시간 진탕배양한 후 상등액을 회수하여 정제를 위한 조 용혈소액으로 사용하였다.

용혈소 정량

용혈소의 정량은 단백질 정량법인 Lowry¹¹⁾법으로 하였으며 각 단계의 회복물은 280nm에서 흡광도로 측정하였다.

용혈소 활성측정

용혈소의 활성은 용혈소와 2% 어류 적혈구 부유액을 1:4의 비율로 섞어 총량을 1ml이 되게 한후 30°C에서 30분 반응시킨후 10,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 대조구로는 용혈소를 넣지 않은 2% 적혈구 부유액만을 동일 조건하에서 방치한 후 원심분리하여 그 상등액만을 회수하여 540nm에서의 흡광도를 측정하여 용혈소를 첨가한 값과 비교하였다. 각 반응시에는 반응시킨 양 만큼의 적혈구 부유액을 0.02% SDS에 완전 용혈시킨후 540nm에서의 흡광도를 측정하여 그 값을 100%로 정하였으며 본 실험에서의 용혈소 한 단위(HU₅₀) 값은 2% 적혈구를 50% 용혈시킨 값으로 정하였다.

용혈소의 정제

정제를 위한 전 배양은 접종후 36-48 시간내에 대량

배양을 시행한후 상등액만을 회수한 후 황산암모늄을 60%로 포화시켜 4°C에서 하룻밤 방치후 원심분리하여 침전물만 회수하였다. 회수된 침전물은 10mM 인산 완충액(pH 7.0)으로 녹이고 4°C에서 같은 완충액으로 4회 투석시키고 원심분리하여 다시 상등액만 회수 하였다. 인산 완충액으로 충분히 평형화 시킨 DEAE-cellulose column(1.6x15cm)에 0에서 0.5M NaCl 의 농도 기울기를 이용하여 투석 상등액을 36ml/hr 의 유속으로 용출시켰다. 용출후 활성부위만을 모아 황산 암모늄을 80%로 포화시켜 4°C에 방치한후 침전물만을 회수하여 충분히 투석 시킨후 Sephadex G-200 column(1.6x89cm)으로 gel 여과를 6ml/hr 의 유속으로 실시하였다.

SDS polyacrylamide gel 전기영동

SDS polyacrylamide 전기 영동은 Laemmli법¹²⁾에 따라 12% acrylamide gel을 사용하였으며 염색은 Coomassie brilliant blue을 사용하였다. 표준 단백질로는 midrange molecular weight marker(Promega)를 사용하였다.

용혈소활성에 대한 NaCl의 영향

용혈소의 식염에 대한 영향을 알아보기 위하여 NaCl를 1-10%까지 다양하게 하여 용혈소의 활성을 검토하였다.

용혈소활성에 대한 온도 및 pH의 영향

용혈소의 활성에 영향을 미치는 온도는 인산 완충액에서 온도를 10°C에서 50°C 및 80°C에서 100°C까지를 조절한 후 각 온도에서 10분간 반응시킨후 잔존 활성을 측정하였다.

용혈소활성에 대한 금속이온의 영향

용혈소의 활성이 금속이온에 영향을 받는지를 검토하기 위하여 5mM의 CaCl₂, CuSO₄, MgSO₄, ZnCl₂, FeCl₃ 등의 금속을 첨가하여 용혈소 활성을 비교하였다.

결 과

용혈소의 정제

V. anguillarum 용혈소를 정제하기 위해 표 1과 같은 방법으로 정제를 시도하였다. 배양 상등액을 회수하여 그 비

Table. 1. Purification of hemolysin from *Vibrio anguillarum* KS410

| Purification Step | Total Activity (HU ₅₀) | Total Protein (mg) | Specific Activity (HU ₅₀ /mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|----------------------------------|------------------------------------|--------------------|--|---------------------|-----------|
| Culture broth | 2,625 | 1,384 | 1.89 | 1 | 100 |
| 60% Ammonium sulfate precipitate | 1,183 | 161 | 7.35 | 3.9 | 45 |
| DEAE-Cellulose | 415.8 | 44 | 9.45 | 5 | 15.8 |
| 80% Ammonium sulfate precipitate | 199 | 6 | 33.2 | 17.5 | 7.6 |
| Sephadex G-200 gel filtration | 61.2 | 0.9 | 68 | 36 | 2.3 |

활성을 측정된 결과 1.89HU₅₀/mg이었으며 각 정제 단계의 회수율은 배양 상등액의 용혈소를 100으로 하여 비교하였다. 그림 1과 같이 DEAE-Cellulose column chromatography로 용출한 결과 27~41번까지의 활성이 나타나 이를 모아 황산암모늄 침전을 행한 후 비활성을 측정된 결과 33.2HU₅₀/mg이었고 회수율이 7.6%였으며 17.5배의 정제 효과를 볼 수 있었다.

다음단계인 Sephadex G-200으로 gel 여과 column chromatography를 행한 결과는 그림 2에 나타내었다. 그 결과 활성 부위 중 59~61번만을 모아 비활성을 측정된 결과 68HU₅₀/mg이고 정제도는 36배 이었으며 회수율은 2.3%였다.

분자량

Sephadex G-200 gel 여과에서 활성 부위만을 SDS-

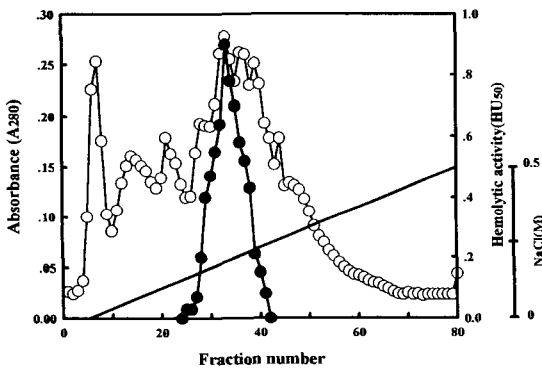


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography(1.6×15 cm) with a linear gradient of 0 to 0.5M NaCl. —○— : absorbance at 280nm, —●— : hemolytic activity(HU₅₀).

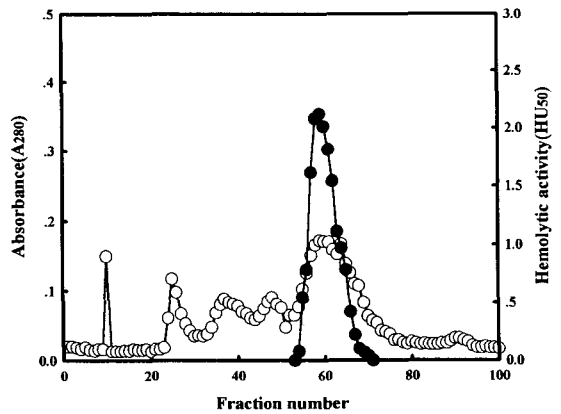


Fig. 2. Sephadex G-200 gel filtration(1.6×89cm) chromatography. —○— : absorbance at 280nm, —●— : hemolytic activity(HU₅₀).

PAGE상에서 midrange molecular weight standard(Pro-mega社) marker와 함께 전기영동하여 단일 band를 그림 3에서 확인 할 수 있었고, Rf치를 구하여 표준곡선에 의한 분자량을 계산하여 측정하였다.

온도에 대한 용혈소의 활성

정제된 용혈소의 활성은 온도에 대해 그림 4에서 보는 바와 같이 15, 25, 37, 45℃에서는 안정하나 55℃에서는 활성이 저하되고 80℃와 100℃에서는 활성이 없었다.

NaCl에 대한 용혈소의 활성

정제된 용혈소 활성의 NaCl에 대한 결과는 그림 5에서와 같이 1%에서 가장 활성이 높았고 NaCl농도가 높을수록 용혈소 활성이 감소되는 것이 관찰되었다.

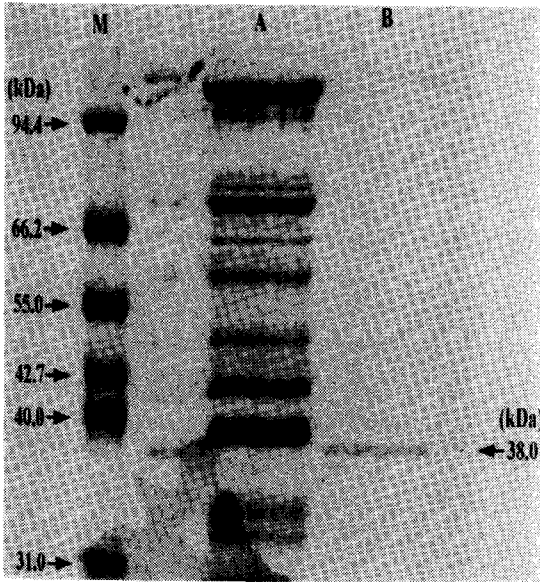


Fig. 3. Molecular weight of the purified hemolysin on SDS-PAGE.
M : Mid-range molecular weight marker protein,
A : Culture broth, B : Purified hemolysin.

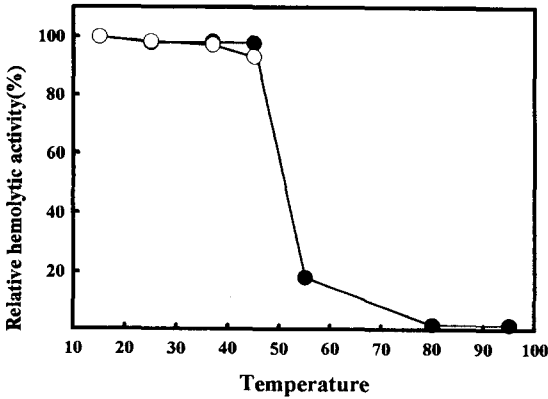


Fig. 4. Effect of temperature on hemolysin from *Vibrio anguillarum* KS410.
● : temperature stability,
○ : optimum temperature.

pH에 대한 용혈소의 활성

그림 6에서 보는 바와 같이 용혈소의 pH에 대한 결과는 pH 4와 pH 5에서는 활성이 저 하되고 pH 6~8까지 비

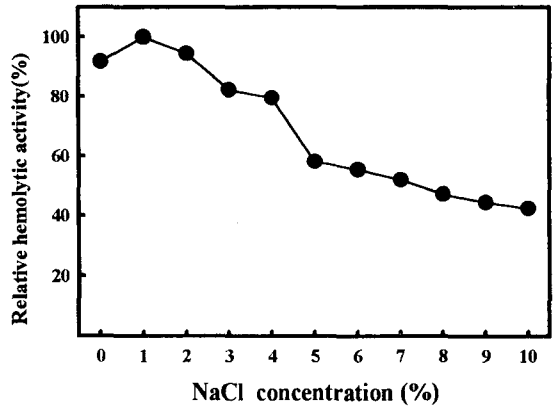


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on hemolysin from *Vibrio anguillarum* KS410.

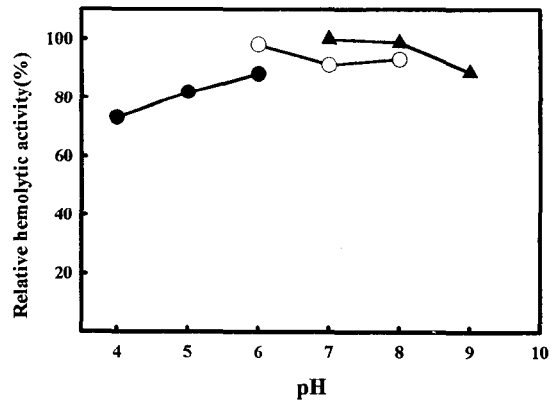


Fig. 6. Effect of pH on hemolysin from *Vibrio anguilla-*
rum KS410.

● : Citrate-phosphate buffer(add 0.85% NaCl)
○ : Phosphate buffer(add 0.85% NaCl)
▲ : Tris-HCl buffer(add 0.85% NaCl)

교적 안정한 것으로 나타났다.

금속이온에 대한 용혈소의 활성

각종 금속이온에 대한 용혈소의 활성은 그림 7에서 보는 바와 같이 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} 에서 강한 저해를 보이고 그의 이온에 대해서는 큰 저해효과가 없었다.

EDTA, $FeCl_3$ 의 각 농도별에 따른 용혈소의 활성

EDTA와 $FeCl_3$ 의 농도에 따른 결과는 그림 8에서와 같

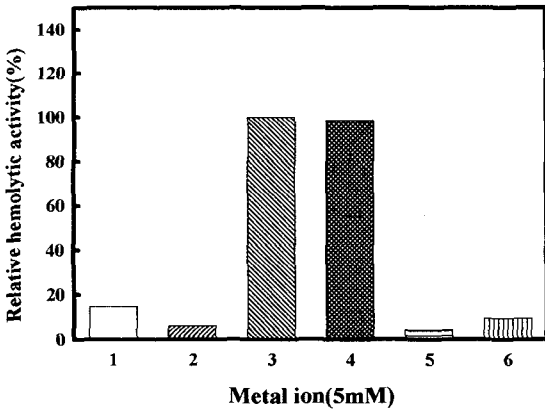


Fig. 7. Effect of various metal ions on hemolysin from *Vibrio anguillarum* KS410.
 1. CaCl₂ · 2H₂O, 2. CuSO₄ · 5H₂O, 3. KCl
 4. MgSO₄ · 7H₂O, 5. ZnCl₂, 6. FeCl₃ · 6H₂O.

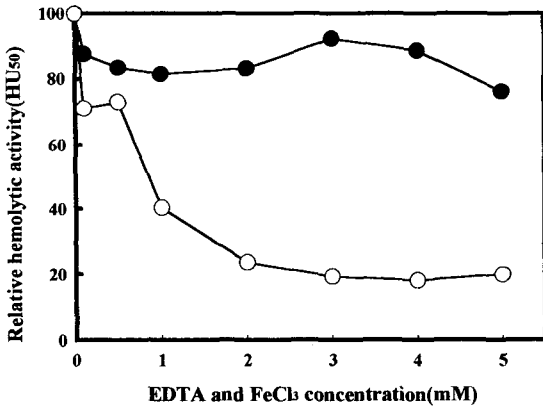


Fig. 8. Effect of EDTA and ferric chloride concentration on hemolysin from *Vibrio anguillarum* KS410.
 -●- : EDTA, -○- : FeCl₃.

이 EDTA에서는 모든 농도에서 강한 활성을 관찰할수 있었고 FeCl₃에서는 농도가 증가될수록 활성에 저해를 받는 것이 관찰되었다.

고 찰

*Vibrio anguillarum*의 어류에 대한 피해는 많이 보고되고 있으나 아직까지 확실한 제어법은 없으며 독성물질의 발현

에 대한 자료도 충분하지 못하다.

본 연구에서는 우리나라 어류에서 분리된 균주를 사용하여 본 균의 용혈소의 특성을 검토하기 위해 정제를 행한 결과 최종적으로 2.3%의 수율과 36배의 정제 효과를 얻을 수 있었다. 이렇게 정제된 용혈소를 SDS-PAGE를 행하여 분자량을 계산한 결과 분자량이 38,000 dalton정도인 것으로 계산되어졌고, 이것은 Hiroshi등⁹⁾이 부분 정제한 결과와 비교해 보면 분자량 33,000-40,000 dalton에서 독성을 나타낸다는 보고와 약간의 차이가 있었는데 지리적인 분포도나 발생양상에 따른 다양성때문일 것으로 보고 여러 시료에서 분리된 균주로 용혈소의 특성을 비교해 보는 과정이 필요할 것으로 사려된다.

정제된 용혈소의 안정성은 온도가 45°C까지는 비교적 안정하였고 최대 반응 온도 또한 45°C였으며 50°C 이상에서는 급격한 실활이 나타났는데 다른 *Vibrio* 종⁶⁾에서 분리된 용혈소가 100°C 에서의 가열에서도 활성을 유지하는 것과⁶⁾ 비교할 때 본 *V. anguillarum*의 용혈소는 이열성인 것으로 판단되었다. NaCl의 농도에 대해서는 1%에서 가장 안정하였는데 본균이 해수 서식 균주임을 감안할 때 다양한 농도의 NaCl에서도 활성이 유지되는 것으로 보아졌다. pH에 대한 용혈소는 넓은 pH 안정성이 있었으나 pH 6,7,8에서 안정하였다. 금속이온에 대한 안정성을 조사해 본 결과 Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺의 첨가의 경우 용혈소의 활성이 감소하는 것으로 보아 이들 금속이온은 용혈소의 활성을 약화시키는 인자인 것으로 보여졌다. EDTA와 FeCl₃의 각 농도에 대한 용혈소의 안정성은 EDTA에 대해서는 별 영향을 받지 않았지만, FeCl₃의 농도가 증가할수록 용혈소의 활성이 감소하는 것이 관찰되었다. 따라서 Fe는 용혈소의 활성에 대해서는 활성을 저해하는 물질로 사료되어졌다.

앞으로도 어류 *Vibrio* 중 *V. anguillarum*만이 용혈소를 생산하므로 여러 다른 검사대상물로부터 본 균을 분리하여 용혈소를 정제하고 어류조직 및 생체에 투여하여 직접적인 독성의 결과를 계속 비교 검토하여야 할 것으로 사료된다.

요 약

1. 어류에서 분리한 *V. anguillarum* KS410의 용혈소를 분리하여 배양 상등액, 황산암모늄 침전, DEAE-cellulose column chromatography, Sephadex G-200 gel 여과 등의

과정을 통하여 36배 정제하였고 최종 회수율은 2.3% 였다.

2. 정제된 용혈소의 SDS-PAGE상의 전기영동 결과는 38 Kda의 분자량을 보유하고 있다.

3. 온도에 대한 정제 용혈소는 45°C까지는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 급격히 실활되어 이열성인 것으로 나타났다.

4. NaCl 농도에 따른 *V. anguillarum* 용혈소의 안정성은 1%가 가장 안정하였고 4% 이상 에서는 안정성이 감소하였다.

5. 정제된 용혈소의 pH 안정성은 6-9 사이였다.

6. 금속이온에 대한 정제 용혈소는 Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} 첨가시에는 실활되었으나 Mg^{2+} 첨가에는 영향을 받지 않았다.

7. 정제용혈소는 EDTA에 대하여 전혀 활성에 저해를 받지 않았으나 $FeCl_3$ 에서는 저해를 받았다.

참 고 문 헌

1. Pacha, R. E., E. D. Eiehn : Characterization and relatedness of marine *Vibrio* pathogenic to fish : Physiology, serology, and epidemiology. *J. Bacteriol.*, 100, 1242-1257(1969).
2. Norqvist, Anders, Ake Hagstrom, Hans Wolf-watz : Protection of rainbow trout aganist vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(6), 1400-1405(1991).
3. Myhr, Egil, Jens Laurits Larsen : Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(9), 2750-2757(1991).
4. Larsen, J. Lauritis, Henrik Berg Rasmussen : Study

of *Vibrio anguillarum* strains from different sources with emphasis on ecological and pathological properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(9), 2264-2267 (1988).

5. Crosa, H. Jorge Michael H : Evidence for plasmid contribution to the virulence of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*, *Infection and Immunity*, 18(2), 509-513(1977).
6. 김영희 : *Vibrio parahaemolyticus* O2 : K3가 생성하는 용혈소의 정제, *대한미생물학회지* 23(4), 461-471 (1988).
7. Choe young choon, Gajin Jeong : Identification of hemolysin as one of the important virulent factors in *Vibrio anguillarum* V7, *J. Microbiol.*, December, 539-544(1994).
8. Hiroshi, Kodama, Mohamed Moustafa, Takeshi Mikami, Hisao Izawa : Partial purification of extracellular substance of *Vibrio anguillarum* toxigenic for rainbow trout and mouse, *Fish Pathology*, 20(2/3), 173-179(1985).
9. Hiroshi, Kodama, Mohamed Moustafa, Shinryo Ishiguro, Takeshi Mikami, Hisao Izawa : Extracellular virulence factors of fish *Vibrio* : Relationships between toxic material, hemolysin, and proteolytic enzyme, *Am. J. Vet. Res.*, 45(10), 2203-2207(1983).
10. Horne, M. T., M. Tather, S. Mcderment, C. Agius : Vaccination of rainbow trout, Richardson, at low temperatures and the long-term persistence of protection, *Journal of Fish Diseases*. 5, 343-345(1982).
11. Lowry, O. H. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275(1951).
12. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4, *Nature*, 227, 680(1970).