

Edwardsiellosis의 진단을 위한 정성적 ELISA법

김명석 · 황은아 · 허민도 · 정현도[†]

부경대학교 수산과학대학 수산생명의학과

어류의 edwardsiellosis를 진단하기 위한 solid phase ELISA법에 대한 최적화 분석을 실시하였다. 부분 정제한 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청을 sodium bicarbonate 완충용액에 50 µg/ml 농도로 희석하여 overnight 반응시켜 주었을 때 polystyrene bead 표면의 항체 immobilization이 최적화되었다. 50 µg/ml의 biotin 표지화 항체와 1:2000으로 희석된 extravidin-peroxidase를 차례로 처리하였을 때 최적의 반응을 나타내었으며 이렇게 최적화시킨 정성적 solid phase ELISA법은 EDTA 추출법으로 조제된 항원에 대해서는 1×10^5 cells/ml, 열 추출법으로 조제된 항원에 대해서는 5×10^5 cells/ml의 검출한계를 나타내었다. *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청을 이용한 본 연구의 solid phase ELISA법은 우리나라 양어장의 넙치 병어로부터 분리한 여러 한국형 *E. tarda* 균주와도 높은 교차반응을 나타내었다. 이러한 것은 본 기법을 다른 지역에서 분리한 여러 strain의 *E. tarda*에 대한 진단을 위하여 본 실험의 항혈청을 사용하여도 가능하다는 것을 보여 주었다.

Key words: Solid phase ELISA, Edwardsiellosis, Diagnosis, Optimization, EDTA extracted antigen, Heat extracted antigen

어류에 발생하는 모든 질병들은 물이라는 생활 환경의 특징으로 인하여 짧은 기간에 높은 폐사율을 나타내므로 신속한 대책이 수립되어지지 않는다면 엄청난 피해를 초래한다. 따라서 대책 수립을 위해 선행되어야 하는 신속, 정확한 진단법이 다양하게 연구되어 졌으며, 이미 사람과 가축에 널리 사용되고 있는 항원·항체의 특이적 결합을 바탕으로 한 면역혈청학적 기법인 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), FIA(Fluorescence-Immunoassay), RIA(Radio-Immunoassay), hemagglutination assay, coagglutination test, immunodot blot assay 등은 수산생물의 질병 진단에도 다수 개발되어 사용되고 있다(Burreson and Fritzell, 1986; Kawahara and Kusuda, 1987; Hsu and Leong, 1985; Yoshimizu and Kimura, 1985; Hsu et al., 1989). 특히 이들 방법 중 ELISA는 정량적이고 신속, 정확, 경제적이며 많은 수의 sample을 한꺼번에 진단할 수 있는 장점뿐만 아니라 검출한계 또한 매우 낮아서 어류의 기생충성, 세균성 그리고 바이러스성 질병의 항원·항체 검출에 광범위하게 사용되어 지고 있다(Sitja-Bobaldilla and

Woo, 1994; MacPhee et al., 1995; Whittington et al., 1994).

그러나 ELISA는 전문적 지식과 특정 장비를 필요로 하는 실험실적인 기법이며 수산용으로 상업화되어 있는 시약이나 제품이 전혀 없으므로 양식 현장에서 직접 질병을 진단하기에는 많은 어려움이 따르므로 단순한 과정과 특정 장비를 필요로 하지 않는 정성적 진단법의 개발이 시도되어 졌다. 기존의 ELISA법을 변형하여 항원, 항체를 coating시키는 solid phase로써 96 well plate 대신에 plastic stick(knives, cocktail stirrers, tongue depressor), nitrocellulose membrane, nylon pegs(dipstick)와 같은 사용이 편리한 기구를 이용하였으며(Austin et al., 1986; 酒井 et al., 1986; Sakai et al., 1987; Davis et al., 1994), 반응 결과의 판독도 ELISA reader기로 읽어서 정량적으로 분석하는 것이 아니라 solid phase 자체의 색깔 변화를 통한 정성적 분석을 실시하였다(酒井 et al., 1986; Sakai et al., 1987; Davis et al., 1994).

이런 시도의 하나로 본 연구는 국내에서는 아직 대중화되어 있지 않는 면역 혈청학적인 이론을 현장에 밀접하게 접근시키기 위하여 96 well

[†]Corresponding author

plate 대신에 Matsubara 등(1985)이 어류 항체량 측정을 위하여 사용한 바 있고 Freed 등(1982)과 Morissette 등(1991)이 음식물에 있는 Stahylococcal enterotoxins을 검출하는데 사용한 바 있는 polystyrene bead를 어류 감염 세균의 항원 검출을 위한 solid phase로 사용하고 insoluble 기질을 처리하여 bead 자체의 색깔 변화를 유도하여 특수장비 없이 보다 간편하게 edwardsiellosis를 진단하고자 하였다.

이 방법의 반응성과 민감성을 향상시키기 위해서 각 주요 단계의 분석적인 진행을 통해서 면역 혈청학적 진단법을 최적화 하였으며 다른 어병 세균과의 교차반응을 통해서 specificity를 평가하고, 다른 혈청형이 존재하는 현장 적용의 가능성을 알아보기 위해서 양식 현장 병어로 부터 분리한 여러 균주들과의 교차반응 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

항원

일본에서 분리한 *Edwardsiella tarda* Edk-2 표준균주와 우리나라 동해안과 남해안 양식장의 넙치 병어로부터 분리한 *E. tarda* H-4, YE1, RE8, RE11, RE17, EE1, NY2 분리균주를 사용하였다.

항원의 제작

항원은 FKC(Formalin-killed cells), 열 추출 항원(Heat extracted antigen), 그리고 EDTA 추출 항원(EDTA extracted antigen)을 제작하였다. FKC는 상법(Itami *et al.*, 1989)에 따라 조제하였으며 열 추출 항원은 0.1 M sodium bicarbonate (NaHCO₃) 완충용액에 100 mg/ml의 농도로 현탁하여 100°C에서 30분간 증탕 처리하여 상등액을 취하였다(Austin and Austin, 1989). EDTA 추출 항원은 50 mg/ml의 농도로 20 mM EDTA(pH 7.2) 용액에 현탁하고 45°C 항온수조에서 30분간 교반시킨 다음 10% power level(Vibra Cell, 375 W Sonicator, medium tip)에서 1분간 초음파 처리 후 상등액을 취하여 pH 8.0, PBS에 48시간 투석하여 준비하였다.

항체 제작

토끼에 *E. tarda* Edk-2 FKC를 FCA(Freund's

complete adjuvant)와 1:1로 혼합하여 각 개체당 20 mg씩 피하주사하였다. 3주와 5주 후 동량의 항원으로 FIA(Freund's incomplete adjuvant)와 1:1로 혼합하여 동일한 방법으로 재면역 시켰으며 그 후 2주뒤에 심장으로부터 전체혈하여 상등액을 분리하였다. 분리된 항혈청에 포화 (NH₄)₂SO₄를 23%로 가하여 단백질을 침전시킨 후 상등액에 다시 (NH₄)₂SO₄를 가하여 45%가 되게 하여 항체를 침전시켰다. 원심분리한 단백질을 48시간 PBS 완충용액에서 투석하였으며 이후 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질량을 분석하고 응집항체가의 측정에 의하여 항체여가를 분석하였으며, SDS-PAGE를 실시하여 부분 정제된 항체의 순수 정도를 평가하였다. 침전 처리한 항체의 일부는 immobilization용 항체로 사용하였고, 일부는 DMSO-(Dimethyl sulfoxide)에 녹인 biotin-N-hydroxysuccinimide ester를 항체 1 mg에 대하여 50 µg씩 가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 다음 pH 8.0, PBS 완충용액에서 48시간 투석시킨 후 biotin 표지화 항체로 사용하였다.

최적화, 표준화 실험

Immobilization(Peroxidase saturation method) : 부분 정제된 항체를 각기 다른 농도로 0.15 M PBS(pH 7.2)와 0.01 M sodium bicarbonate(pH 9.6) 완충용액에 희석하여 25°C에서 3시간 또는 overnight 동안 반응시킨 후 1:1000으로 희석된 extravidin-peroxidase(264 purpurogallin units/ml, Sigma Chem. Co.)를 상온에서 3시간 동안 반응시킨 후 250 µl의 기질(0.014% urea hydrogen peroxide와 0.2 µg/ml 2,2'-Azino-bis가 함유된 0.05 M phosphate-citrate 완충용액) 용액에서 30분간 test tube에서 반응시킨 후 반응액 200 µl를 취하여 발색 정도를 405 nm(Bio-Tek EL312E)에서 측정하였다(tube ELISA).

전처리 고정법 비교 : Polystyrene bead의 항체 부착 능력을 비교하고자 immobilization하기 전에 0.25% glutaraldehyde 또는 95% ethanol에 3시간 동안 상온에서 반응시키는 2가지 방법과 각각의 고정액에 1시간동안 상온에서 반응시킨 후 항체와 25°C에서 1시간 반응시키고 다시 상온에서 동일한 고정액으로 30분간 처리하는 2가지 방법을 실시하였다. 이와 같은 총 4가지 전처리 고정법을 실시하

는 것과 함께 증류수에 간단히 세척만 한 후 immobilization하는 방법에 대해서도 tube ELISA법을 실시한 후 판별지수로써 비교하였다.

표지화 항체와 효소의 농도 : Avidin-biotin system을 사용하는 본 방법의 적절한 biotin 표지화 항체와 extravidin-peroxidase의 농도를 알아보고자 12.5 µg/ml과 50 µg/ml 농도의 biotin 표지화 항체를 처리하고 각각에 대해서 희석배수가 다른 extravidin-peroxidase를 반응시키고 tube ELISA법을 실시하여 판별지수를 비교하였다.

Solid phase ELISA법

Polystyrene bead(1/4인치, Wako Pure Chem. Industries)를 증류수에 간단히 세척한 후 침전 처리한 *E. tarda* Edk-2 대한 토끼 항체를 50 µg/ml의 농도로 0.01 M sodium bicarbonate(pH 9.6) 완충용액으로 희석하여 습윤상자에서 25°C에서 overnight 동안 immobilization 시켰다. Immobilization된 bead를 PBS 완충용액에 녹인 2% BSA로 25°C, 3시간 동안 반응시켜 immobilization되지 않은 부분을 blocking한 후에 pH 7.2, 0.2% NaN₃를 첨가된 PBS 완충 용액에 냉장 보관하였다. EDTA 추출 항원 5 µg/ml과 50 µg/ml 농도의 biotin 표지화 항체를 차례로 습윤상자에서 37°C, 30분간 반응시키고, 1:2000으로 희석한 extravidin-peroxidase는 상온에서 30분간 반응시켰다. 0.1% BSA가 첨가된 PBS 완충용액을 항원과 extravidin-peroxidase의 희석액으로 사용하였고 이 희석액에 3% PEG 6000을 첨가하여 biotin 표지화 항체 희석시 사용하였다. 기질반응은 DMF(dimethylformamide, Sigma Chem. Co.)에 녹인 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole, Sigma chem. Co.)를 0.014% urea hydrogen peroxide가 첨가된 0.05 M phosphate-citrate 완충용액(Sigma chem. Co.)과 섞은 기질에 5분간 처리하고 bead를 증류수로 간단히 세척하여 육안으로 관찰할 수 있게 하였다. 동일하게 처리된 bead를 0.014% urea hydrogen peroxide와 0.2 µg/ml 2,2'-Azino-bis(3-Ethyl-benzthiazoline-6-Sulfonic acid)가 함유된 0.05 M phosphate-citrate 완충용액 250 µl에 5분간 반응시킨 후 상등액 200 µl를 취하여 flat bottom의 96 well plate에 첨가하고 ELISA reader(Bio-Tek EL312E)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하는 tube ELISA법으로 판별지수를

구하였다.

판별지수

본 실험의 면역반응을 평가하기 위하여

$$\frac{(\text{positive O.D.치} - \text{negative control O.D.치})}{\text{negative control O.D.치}} \times 100 = \%$$

로 구해진 판별 지수(discriminaton index : DI)가 50% 이상일 때 양성반응으로 판정하였다

결 과

Solid phase ELISA법의 최적화 및 표준화

Bead 표면의 항체 immobilization법들의 효율 비교 : 항체의 농도, solid phase와의 반응 시간과 항체 희석용 완충용액을 달리하여 항체로 immobilization을 실시한 후 bead 표면에 남아있는 공간의 정도 확인을 위하여 peroxidase를 처리하고 bead에 결합한 효소의 역가가 최소로 되게하는 최적의 항체 immonilization 조건을 분석하였다. 항체 희석 완충용액으로는 0.01 M sodium bicarbonate(pH 9.6)를 그리고 bead와의 반응시간은 overnight 동안 실시하였을 때 항체의 고정 부분이 최대화되어 이후 처리된 peroxidase의 binding이 가장 최소로 되는 것으로 나타났다. 항체 농도의 증가와 함께 O.D.치가 급격히 감소하다가 50 µg/ml 이상의 농도부터는 완만한 감소를 나타내어 50 µg/ml의 항체량이면 충분히 bead의 표면을 immobilization시킬 수 있는 포화 농도임을 알 수 있었다(Fig. 1).

Glutaraldehyde와 ethanol에 각각 1회 또는 2회 처리하는 4가지 전처리 고정법을 실시한 것과 아무런 전처리를 거치지 않고 immobilization하였을 때 polystyrene bead에 항체의 부착 능력을 비교하였다. 항체 고정화 후 5 µg/ml EDTA 추출 항원을 처리한 positive 결과와 희석액만을 처리한 negative control의 차이를 나타내는 판별 지수에서 0.25% glutaraldehyde를 2회 처리한 것이 394%, 1회 처리한 것이 382%, 전처리 고정법을 실시하지 않고 sodium bicarbonate 완충용액에 immobilization한 것이 396%으로 분석되었다. 따라서 고정법을 사용하여도 peroxidase 포화법과 판별지수에 있어서 전처리 하지 않은 경우와 유사한 결과를 보

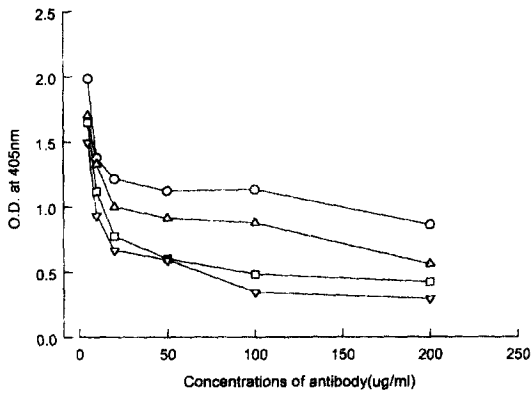


Fig. 1. Saturation level on bead with increasing concentration of antibody under different immobilization buffers and incubation times. Antibody was immobilized : ○, in pH 7.2 PBS buffer at 25°C for 3hrs; □, in pH 7.2 PBS buffer at 25°C for overnight; △, in pH 9.6 sodium bicarbonate buffer at 25°C for 3hrs; ▽, in pH 9.6 sodium bicarbonate buffer at 25°C for overnight.

였다(Table 1). 이후의 모든 실험에서는 복잡한 전처리 과정을 실시하지 않고 bead를 증류수에 간단히 세척만 하여 항체를 immobilization 시켰다.

Extravidin-peroxidase 적정 농도 결정 : 항원이 처리된 bead에 biotin 표지화 항체를 12.5 µg/ml과 50 µg/ml의 농도로 처리하고 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000으로 희석한 extravidin-peroxidase를 처리하여 판별지수를 구하였다. 12.5 µg/ml biotin 표지화 항체를 처리한 것은 반응이 전체적으로 미약하였고, 50 µg/ml biotin 표지화 항체를 사용하였을 때 extravidin-peroxidase를 1:500으로

희석 사용시 positive O.D.치가 0.601로 가장 높았으나 negative control O.D.치 또한, 0.273으로 높았기 때문에 낮은 판별지수를 나타내었다. 1:1000과 1:2000으로 희석하여 사용하였을 때 판별지수 상으로는 140%와 139%로 유사하였으나 negative control의 O.D.치가 0.241과 0.196이었으므로 이후의 모든 실험에서는 biotin 표지화 항체는 50 µg/ml의 농도로 처리하고 extravidin-peroxidase는 1:2000으로 희석하여 사용하였다(Fig. 2).

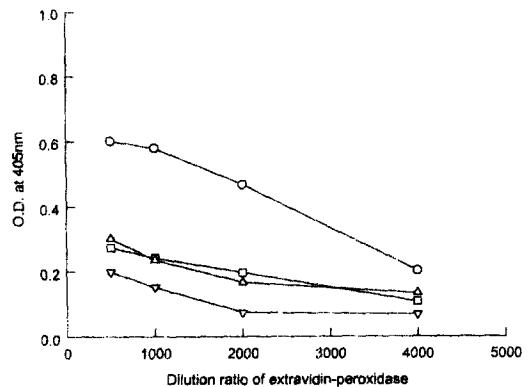


Fig. 2. Effect of the concentrations of extravidin-peroxidase and biotinylated rabbit anti-*E. tarda* antibody on the positive and negative control of solid phase ELISA on bead. ○, used 50 µg/ml biotinylated anti-*E. tarda* antibody as positive control; □, used 50 µg/ml biotinylated anti-*E. tarda* antibody as negative control; △, used 12.5 µg/ml biotinylated anti-*E. tarda* antibody as positive control; ▽, used 12.5 µg/ml biotinylated anti-*E. tarda* antibody as negative control

Table 1. Immunoreactivity of antibody-coated bead evaluated by the comparison of a positive control and a negative control

	Fixing methods					
	PBS ^a	Carbonate ^b	G1 ^c	G2 ^d	E1 ^e	E2 ^f
Positive ¹	1.014	1.107	1.109	1.096	1.013	0.839
Negative ²	0.285	0.223	0.230	0.222	0.240	0.253
Discrimination index (%)	256	396	382	394	323	232

^a used in 0.15M PBS(pH 7.2) without fixing step

^b used in 0.01M sodium bicarbonate buffer(pH 9.6) without fixing step

^c treated with 0.25% glutaraldehyde once

^d treated with 0.25% glutaraldehyde twice

^e treated with 95% ethanol once

^f treated with 95% ethanol twice

¹ treated with 5 µg of EDTA extracted antigen per ml on immobilized bead for immunoreaction

² treated with PBS instead of antigen on immobilized bead for immunoreaction

* O.D. value at 405 nm

EDTA 추출 항원과 열 추출 항원의 검출 한계 비교

Whole cell을 사용하여 열 추출시킨 항원과 EDTA 추출 항원에 대한 본 ELISA법의 검출한계를 비교 분석하였다. 판별지수가 50% 이상인 positive 결과를 나타내는 검출한계는 열 추출 항원은 5×10^5 cells/ml이었고, EDTA 추출 항원은 1×10^5 cells/ml이하로 나타나 EDTA 추출법에 의하여 조제된 항원이 보다 높은 반응성을 보여주었다(Fig. 3 & 4).

***E. tarda*간의 교차반응 정도 분석**

일본에서 분리된 *E. tarda* Edk-2 항원에 대한 토끼 항혈청을 이용하는 본 진단법이 넘치 병어에

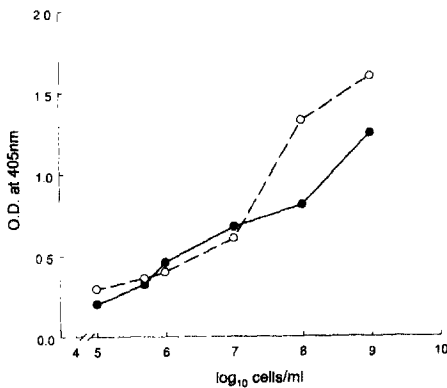


Fig. 3. Detection level of solid phase ELISA on bead against *E. tarda* antigens prepared different ways. ○, EDTA extracted antigen; ●, heat extracted antigen. ※ O.D. value of negative control : 0.196

Fig. 4. Detection level of solid phase ELISA on bead against *E. tarda* antigens prepared different ways. HE, heat extracted antigen; EDTA, EDTA extracted antigen; C, negative control.

서 직접 분리한 한국형 *E. tarda*를 항원으로 하였을 때 나타나는 교차반응 정도를 열 추출 항원을 사용하여서 알아보았다. 한국형 *E. tarda* 7종 중 4종은 10^6 cells/ml 정도를 검출해 낼 수 있는 반응도를 나타내었으며 10^7 cells/ml에서는 7종 모두가 명확한 양성 결과를 보여 주었다(Table 2).

고 찰

ELISA법은 지금까지 어류 질병의 진단시 조직 내 항원을 직접 검출하기 위한 방법으로 많이 보고된 바 있지만 전문적 지식과 특수장비가 필요하므로 양식 현장에서 어병 진단시 이 방법을 적용하기에는 많은 어려움이 따랐다. 본 실험에서는 polystyrene bead라는 solid phase상에서의 ELISA법을 표준화하고 최적화시켜 어류의 항원을 분석하는 연구를 실시하였다.

응집항체가 1 : 51,200인 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청의 적절한 immobilization 항체 농

Table 2. Cross-reaction of solid phase ELISA on bead against isolated *E. tarda* strains in Korea

Strains	Number of bacteria for heat extracted antigen(cells/ml)			
	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5
H-4	0.488*(149 [†])	0.441(125)	0.380(94)	0.227(16)
YE1	0.735(275)	0.624(218)	0.366(87)	0.258(32)
RE8	0.715(265)	0.550(180)	0.270(37)	0.248(27)
RE11	0.741(278)	0.536(173)	0.309(58)	0.200(2)
RE17	0.683(248)	0.556(184)	0.287(46)	0.202(3)
EE1	0.693(253)	0.620(216)	0.398(103)	0.209(7)
NY2	0.747(281)	0.451(130)	0.261(33)	0.196(0)
EDK-2	0.810(313)	0.677(245)	0.458(134)	0.200(2)

* O.D. value at 405nm

[†] Discrimination index(%)

※ O.D. value of negative control : 0.196

도를 알아본 결과, 50 µg/ml이 포화농도로 결정되었고, immobilization시 사용하는 완충용액은 salt 농도가 높은 PBS보다는 sodium bicarbonate 완충용액이 bead와 항체 결합을 용이하게 하는 것으로 보이며, 충분한 반응 시간을 주는 것이 bead 표면에 항체를 immobilization하는데 중요하다는 것을 확인하였다(Fig. 1). 0.25 % glutaraldehyde와 95% ethanol을 사용한 전처리 고정법을 실시하였지만 Morissette 등(1990)과 Divis 등(1994)의 보고에서 고정효과가 있다는 보고와 달리 본 실험에서는 유사한 판별지수를 나타내었으므로 복잡한 절차를 거치는 고정법을 사용하지 않고 bead를 증류수에 간단히 세척한 즉시 항체를 immobilization 시켰다(Table 2). 이것은 peroxidase 포화법에서 보여주듯이 50 µg/ml의 농도가 어떤 전처리 고정법에도 영향을 받지 않는 포화농도이기 때문일 것이며 이보다 더 낮은 항체농도를 사용한다면 차이를 보일 수 있는 가능성도 있다.

Avidin-biotin system을 사용한 ELISA법을 사용하는 만큼 background 문제를 고려하여 biotin 표지화 항체와 extravidin-peroxidase의 적정 사용 농도를 결정하였다. Biotin 표지화 항체 농도를 50µg/ml 농도로 하고 extravidin-peroxidase를 1:1000과 1:2000으로 희석하여 사용하였을 때 140 %와 139 %의 유사한 판별지수를 나타내었지만 낮은 negative control의 O.D.치 때문에 1:2000으로 희석한 농도를 적정 농도로 결정하였다(Fig. 2).

앞의 모든 표준화된 방법을 시행한 결과 본 실험의 면역학적 진단법은 검출한계가 EDTA 추출 항원에서는 1×10^5 cells/ml이었고 열 추출 항원에서는 5×10^5 cells/ml로 EDTA 추출 항원이 5배 정도 높은 것으로 나타나 항원의 제작 방법에 따라 항체와 반응할 수 있는 표면 항원의 양이나 질에 상당한 변화가 있을 수 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3 & 4). 그리고 종이 다른 어병세균인 *Vibrio anguillarum* LS-174, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Yersinia ruckeri* 11-4, *Aeromonas salmonicida* MT004, *Pseudomonas* sp.와 *Streptococcus* sp.를 1×10^8 cells/ml 고농도로 반응시켜도 교차반응이 나타나지 않아 본 방법의 specificity를 확인 할 수 있었으며(data not shown) 일본에서 분리된 Edk-2 항원에 대한 토끼 항혈청의

한국형 *E. tarda* 분리 균주에 대하여 높은 교차반응을 나타내어 각기 다른 항원성의 *E. tarda*가 감염될 수 있는 현장 적용에서도 폭 넓게 사용되어 질 수 있는 것으로 생각된다(Table 2). 더구나 EDTA 추출 항원 보다는 감도는 낮으나 조제하기가 쉬운 열처리 항원을 사용한 결과이므로 그 응용성은 더 크다고 할 수 있다. EDTA 추출 항원을 사용한다면 감도가 더욱 증가되면서 결과는 본 실험과 유사하게 나타날 것으로 추정된다.

흥미로운 것은 응집반응법으로 항체의 cross-reaction을 조사해 보면, 면역원이 되는 *E. tarda* Edk-2에 대해서 1:51,200의 항체역가를 나타내고 bead immobilization 항체로 사용한 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청이 한국형 *E. tarda* 균주에 대해서는 1:320~640의 응집항체역을 나타내어 약 100배 정도의 낮은 교차반응을 보여주어(data not shown) 본 연구의 ELISA 방법을 실시한 결과와 상당한 차이를 보였다. 이것은 Romestand 등이 1993년에 vibriosis를 진단한 보고에서 serotype I형인 *V. anguillarum* V62 균주에 대한 polyclonal 토끼 항혈청으로 실시한 indirect ELISA법 결과와 유사하였다. 이 보고에서도 같은 농도의 항원이 존재하는 조직을 연속적으로 희석하면서 반응시켰을 때 homologous 항원을 검출하는 것은 serotype III형의 항원을 검출하는 것과 비교하여 10배 정도밖의 차이를 보이지 않았지만 응집 실험에서는 교차반응이 일어나지 않았다. 이것은 affinity에 의한 차이로 응집시에는 정확한 epitope에 강한 affinity를 가진 항체들만이 응집 반응에 관여 하지만 ELISA법에서는 유사 균주의 유사 epitope에 약한 affinity를 가진 항체들도 반응을 하여 높은 교차반응 보이는 것으로 생각되어진다.

본 연구에서는 현장적용 실험의 결과를 보여 주지 않았으나 edwardsiellosis의 임상적 증상을 보이는 어류에 존재하는 *E. tarda*균의 수는 약 10^8 cells/g tissue이므로 이 진단법은 감염어류의 조직에 대해서 직접 적용하여도 충분한 감도가 있을 것으로 추정된다. 그러나 현장에서 좀더 쉽고 편리하게 질병을 진단할 수 있도록 항체, 효소, 그리고 기질 처리 단계 등을 좀더 간단하게 처리할 수 있게 할 수 있는 방법이 모색되어야 할 것이다.

결론적으로 polystyrene bead를 이용한 본

ELISA법은 각 단계별로 피펫을 이용하여 시약을 첨가하여 soluble 기질의 발색반응을 ELISA reader로 읽는 방법을 벗어나 bead를 각 단계별 시약에 담그고 insoluble 기질을 처리하므로써 bead 표면의 색깔 변화를 육안적으로 관찰하므로써 현장에서 간단히 질병을 진단할 수 있는 방법이라 할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 부경대학교 해양식량자원개발 특성화 사업단의 3차년도 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Austin, B. and Austin, D. A. : Methods for microbiological examination of fish and shellfish; Antigen analysis and preparation, pp. 103-104. Ellis Horwood Lim., England, 1989.
- Austin, B., Bishop, I., Gray, C., Watt, B. and Dawes, J. : Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farms. *J. Fish Dis.*, 9 : 469-474, 1986.
- Burreson, E. and Fritzell L. J. : The seasonal antibody response in juvenile summer flounder(*Paralichthys dentatus*) to the haemoflagellate *Trypanosoma bulllocki*. *Vet Immunol. and Immunopathol.*, 12 : 394-402, 1986.
- Davis, P. J., Laidier, L. A., Perry, P. W., Rossington, D. and Alcock, R. : The detection of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic carrier fish by an integrated cell-culture and ELISA technique. *J. Fish Dis.*, 17 : 99-110, 1994.
- Freed, R. C., Evenson, M. L., Reiser, R. F. and Bergdoll, M. : Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in food. *A. Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 1349-1355, 1982.
- Hsu, Y. L. and Leong, J. C. : A comparison of detection methods for infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, 8 : 1-12, 1985
- Hsu, Y. L., Chiang, S. Y., Lin, S. T., and Wu, J. L. : The specific detection of infectious pancreatic necrosis virus in infected cells and fish by the immuno dot blot method. *J. Fish Dis.*, 12 : 561-571, 1989.
- Itami, T., Takahashi, Y. and Nakamura, Y. : Efficiency of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns. *Penaeus japonicus*. *J. Aqua. Animal Health.*, 1 : 238-242, 1989.
- Kawahara, E. and Kusuda, R. : Direct fluorescence antibody technique for diagnosis of bacterial disease in eel. *Nippon Suisan Gakkaishi Bull.*, 53 : 393-399, 1987.
- MacPhee, D. D., Ostland, V. E., Lumsden, J. S. and Ferguson, H. W. : Development of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) to estimate the quantity of *Flavobacterium branchiophilum* on the gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, 21 : 13-23, 1995.
- Matsubara, A., Mihara, S. and Kubada, R. : Quantitation of yellowtail immunoglobulin by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51 : 921-925, 1985.
- Morissette, C., Goulet, J. and Lamourex, G. : Production of avid rabbit antibodies against staphylococcal enterotoxins A and B. *J. Food Prot.*, 53 : 782-785, 1990.
- Morissette, C., Goulet, J. and Lamourex, G. : Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 : 836-842, 1991.
- Romestand, B., Dragesco, A., Breuil, G., Coste, F. and Bouix, G. : An ELISA technique for rapid diagnosis of vibriosis in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Org.*, 15 : 137-143, 1993.
- Sakai, M., Koyama, G., Atsuta, S., and Kobayashi, M. : Detection of *Renibacterium salmoninarum* by a modified peroxidase-antiperoxidase(PAP) procedure. *Fish Pathol.*, 22(1) : 1-5, 1987.
- Sitja-Bobaldilla, A. and Woo, P. T. K. : Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibodies against the pathogenic haemoflagellate, *Cryptobia salmositica* Katz, and protection against cryptobiosis in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum), inoculated with a live vaccine. *J. Fish Dis.*, 17 : 399-408, 1994.
- Whittington, R. J., Philbey, A., Reddacliff, G. L. and Macgown, A. R. : Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus(EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum) : findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *J. Fish Dis.*, 17 : 205-218, 1994.
- Yoshimizu, M. and Kimura, T. : A coagglutination test with antibody-sensitized Staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial and viral diseases of fish. *Fish Pathol.*, 20 : 243-261, 1985.
- 酒井正博, 石井俊哉, 厚田静男, 小林正典 : ニトロセルロース膜を用いた酵素抗法について. *魚病研究.*, 21(2) : 131-132, 1986.

Qualitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Diagnosis of Edwardsiellosis

Myoung Sug Kim, Eun A Hwang, Min-Do Huh and Hyun Do Jeong

*Department of Aquatic Life Medicine,
College of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Pusan 608-737*

Optimization and standardization of solid phase enzyme immunoassay were done for the diagnosis of edwardsiellosis in fish. The analyzed degree of immobilized antibody on surface of solid phase with peroxidase saturation method showed the optimized result by using partially purified 50 µg/ml of rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 antibody in sodium bicarbonate buffer for overnight incubation to cover the surface of polystyrene beads. Optimized immunoreaction was observed in the treatment of 50 µg/ml of biotin conjugated antibody followed extravidin-peroxidase diluted 1 : 2,000 in PBS. The detectable concentrations of the this method were 1×10^5 cells/ml and 5×10^5 cells/ml expressed as the source of antigen amount for EDTA extraction and heat extraction, respectively. High cross-reaction of solid phase ELISA with the prepared rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 was observed against *E. tarda* strains isolated from flounder suffering from edwardsiellosis in aquatic farms of Korea. It suggested that the potential of this solid phase of ELISA technique is very powerful for the application to different strains of *E. tarda* isolated in farms of many different areas.

Key words : Solid phase ELISA, Edwardsiellosis, Diagnosis, Optimization, EDTA extracted antigen, Heat extracted antigen