

Vibrio furnissii로부터 세포외 용혈소의 정제 및 특성

허 문 수
제주대학교 해양생산과학부

Purification and Characterization of the Extracellular Hemolysin of *Vibrio furnissii*

Moon-Soo HEO
Faculty of Applied Marine Sciences, Cheju National University,
Jeju 690-756, Korea

The extracellular hemolysin produced by pathogenic *Vibrio furnissii* was isolated and purified by ammonium sulfate precipitation and followed by DEAE-Sephadex A-50 (1st and 2nd) ion-exchange and Sephadex G-100 gel permeation chromatography. The molecular weight of the purified hemolysin was 61 kDa. The enzyme activity was inactivated by heating at 60 for 5 min, and inhibited by additions of Cu^{2+} , Zn^{2+} and a high concentration of cholesterol. Lysis of human erythrocytes by the enzyme was temperature dependent, and optimal temperature of the enzyme was 37°C. The purified hemolysin was unstable at pH 6.0, 6.5 and 10.0. The optimal concentration of human erythrocytes on hemolysins was about 1.5%. The purified hemolysin was active for erythrocytes from three animal species including mouse, rabbit and rat, and was the most active against rabbit erythrocytes. B blood group of human erythrocytes also showed a high sensitivity to the enzyme.

Key words: *Vibrio furnissii*, Extracellular hemolysin

서 론

*Vibrio fluvialis*는 Furniss et al. (1997)에 의해 1977년 심한 설사환자의 분변으로부터 분리되었으며 그 생화학적 성상이 *Vibrio* 혹은 *Aeromonas*와 비슷하긴 하지만 어느 쪽으로도 동정이 불가능하여 "group F *Vibrio*"라 분류되었다. 또한 Huq et al. (1980)은 같은 성상을 지닌 균을 Bangladesh의 설사환자 분변에서 분리하고 group EF 6라고 분류하였다. 그 후 Lee et al. (1981)에 의해 1981년 각종 가검물 유래의 154개의 균주의 성상이 검토되어 *Vibrio fluvialis*라고 명명되었다. *V. fluvialis*는 포도당 발효에 있어 가스를 생성하는 aerogenic 균주와 가스를 생성하지 않는 anaerogenic 균주 등 두 개의 biogroups으로 나뉘어졌으며, 1981년 Brenner et al.은 DNA 유연관계를 밝혀 aerogenic strain은 *V. fluvialis*와는 별도의 종이라는 것을 확인하고 따로 *V. furnissii*라 명명하였다.

*V. fluvialis*와 *V. furnissii*는 자연환경에서 분리가 가능하였지만 임상에서 분리되는 균은 *V. fluvialis*뿐이었다. 그러나 1983년 급성 위장염 환자로부터 *V. furnissii*도 분리되자 병원성균으로 지목되었고 설사에 있어서 그 기능은 *V. fluvialis*와 유사할 것이라고 보고되었다 (Bonner et al., 1983).

병원성 *Vibrio* spp.중 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. metchnikovii*, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. cholera* 등에서 추정되는 병원성인자들로서는 용혈소 (hemolysin 또는 cytolysin), proteases, phospholipases와 siderophores 등 여러 가지가 있으며, 이 가운데 용혈소는 공통인자로 중요시되어

왔다 (Kreger and Lockwood, 1981; Shandera et al., 1983; Testa et al., 1984; Kreger, 1984; Harshman and Sugg, 1985; Honda et al., 1985; Ju and Kim, 1988; Yasami, 1988). 또한 *V. alginolyticus*를 제외하고는 병원성의 증상이 설사, 복통, 메스꺼움, 구토 등으로 거의 유사하다 (Blake et al., 1979; Brake et al., 1980).

지금까지 *V. furnissii*는 임상환자에서의 분리 보고 예는 있지만 용혈소에 관한 연구는 *V. fluvialis*의 용혈소 생산에 관한 보고만 있을 뿐 *V. furnissii*에 대한 연구 보고가 아직 없다 (Donald, 1982). 따라서 본 논문은 *V. fluvialis*와 유사한 *V. furnissii*의 용혈소를 분리 정제하여 그 물리화학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

V. furnissii NCTC 11328 균주를 일본 국립예방위생연구소의 T. Shimada 박사로부터 분양받아 사용하였다.

균의 배양과 용혈소 정제

(1) 사용배지 및 배양

7% 면양적혈구를 가한 혈액한천 배지 (Green Cross Co.)를 전 배양 배지로 사용하였으며, 1% NaCl을 가한 HI (Heart Infusion, Difco, USA) 액체배지를 대량배양 배지로 사용하였다. 사용균주의 보존은 1% NaCl을 가한 HI 액체배지 10 mL에 *V. furnissii*를 1 백금씩 각각 접종한 후, 30°C에서 하루밤 진탕 배양한 배양액을 동량의 glycerol과 혼합하여 최종농도 40% (v/v)되게 하여 -70°C에서 보존하였다.

배양은 보존되어 있는 균주의 미량을 평판배지에 접종한 후 회

Corresponding author: msheo@cheju.cheju.ac.kr

수하여 1% NaCl용액으로 세척한 후, 혈액한천 배지에 도말, 37°C에서 18~24시간 정치 배양하였다. 640 nm에서 흡광도 약 0.8~1.0 되게 조정하여 2% (v/v)가 되게 접종하여 30°C, 200 rpm 조건으로 진탕 배양하였다.

(2) 용혈 활성 측정

용혈소와 2% 사람 적혈구 부유액을 동량 혼합하여 37°C에서 2시간 반응 시킨 후 원심분리하여 상등액을 540 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 이 때 반응액의 회석시에 0.1% BSA (bovine serum albumin)을 함유한 PBS (0.067 M Na₂HPO₄, 0.077 M NaCl pH 7.0)를 사용하였다 (Testa et al., 1984). 각 반응시에 1% Triton X-100에 의한 적혈구 용혈의 흡광도를 100% 용혈로 정하였으며, 본 실험에서 용혈소 한 단위 (1 HU)는 20% 용혈의 값으로 정하였다. 단백질 정량은 Bradford et al. (1976) 미량 정량법으로 실시하였다.

(3) 황산 암모늄 침전

회수한 배양액 (A₆₄₀=1.2~1.5)을 원심분리 (15,000×g, 30 min)한 후, 상등액을 취하여 황산암모늄을 40%가 되게 가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리 (15,000×g, 20 min)하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물을 0.1 M NaCl을 가한 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) 완충액에 녹여서 동일 완충액으로 2~3일간 투석시키면서 수 차례 완충액을 교환하였다.

(4) Ion exchange chromatography

충분히 투석한 황산암모늄 침전물을 원심분리 (25,000×g, 20 min)하여 불용성 침전물을 제거시킨 후, DEAE-Sephadex A-50 column (2.7×30 cm) 크로마토그래피를 실시하였다. 0.1 M NaCl을 가한 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5)으로 DEAE-Sephadex A-50 column을 평형화시킨 후, 시료를 주입하였다. 동일 완충액으로 비흡착 단백질을 충분히 세정한 다음, 완충액 0.1 M NaCl로 0.1 M~1 M 농도의 직선구배를 걸어 흡착 단백질을 용출시켰다. 용출 후 활성부위를 모아 2차 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. 먼저 활성부위를 모아 완충액을 교환해가며 충분히 투석한 후, 원심분리 (25,000×g, 20 min)하여 불용성 물질을 제거하고 1차와 동일한 조건으로 2차 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. 이 때 유속은 시간당 25 mL로 하였으며 1개의 분획은 4~5 mL로 하였다.

(5) Gel permeation chromatography

2차 이온 교환 크로마토그래피로부터 활성 부위를 모아 0.1 M NaCl을 가한 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) 완충액으로 충분히 투석시킨 후, 원심분리하여 동일 완충액으로 평형화 시킨 Sephadex G-100 column (2.6×90 cm)에 첨가하여 동일 완충액으로 용출시켰다. 이 때 유속은 시간당 12 mL로 하였으며 1개의 분획은 6 mL로 하였다.

용혈소의 물리화학적 특성

Davis법 (Davis, 1964)에 준하여 정제 확인을 실시하였다. SDS-PAGE는 Laemmli법 (Laemmli, 1970)으로 실시하였고, 분자량의 측정은 Andrew법 (Andrews, 1970)을 사용하였다.

동물 혈구 감수성 시험

정제 용혈소의 혈구 감수성 시험을 위하여 토끼, 마우스, 랫트와 사람의 4가지 혈액형의 혈구를 사용하여 용혈 활성을 측정하였다.

결 과

용혈 현상

7% 면양 적혈구를 가한 혈액한천 배지상에 공시균주를 접종하여 18~24시간 배양한 결과, 불투명한 용혈대를 형성하여 불안전 용혈을 일으켰다 (Fig. 1).

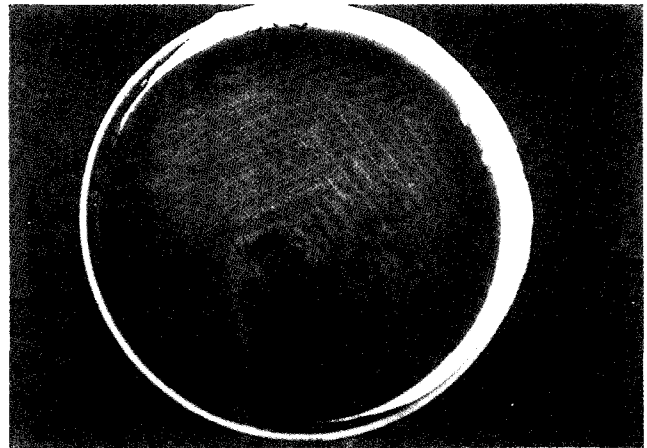


Fig. 1. Hemolysis on the 7% sheep erythrocyte blood agar plate after 18~24 hours incubation.

용혈소의 정제

(1) 배양 및 황산 암모늄 침전

발효조에서 640 nm에서 균의 생육도가 흡광도 1.2~1.5가 될 때까지 배양시킨 뒤, 원심분리 (15,000×g, 30 min)하여 상등액을 회수하였고, 회수한 배양 상등액에 황산암모늄을 각각 40%가 되게 가하여 교환하면서 4°C에서 18~24시간 방치시켜 완전히 녹였다. 이때, 3,750 mL의 배양 상등액으로부터 48 mL의 황산암모늄 침전물을 얻었으며 총 단백질량은 2,600 mg이었고, 용혈소의 활성은 1.7×10⁶ HU였다 (Table 1, Fig. 2).

(2) 1차 DEAE ion exchange chromatography

황산암모늄 침전물을 0.1 M NaCl을 가한 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) (이하 TBS) 완충액으로 2~3일간 완충 용액을 수 차례 교환해 가며 투석시킨 후, 원심분리 (25,000×g, 10 min)하여 불용성 물질을 제거하여 TBS로 평형화된 DEAE-Sephadex A-50 column (2.7×30 cm)에 흡착시켜 1차 이온교환크로마토그래피를 실시하였다. 이 때의 유속은 25 mL/h로 하였고 1개의 분획은 5 mL로 하였다. 흡착시킨 후 column 부피의 2~3배에 해당하는 TBS로 충분히 통과시킴으로써 비흡착단백질 및 불순물을 제거한 다음, 0.1 M과 1 M의 NaCl을 가한 TBS로 직선구배를 걸어 흡착 단백질을 용출시켰다. 용출된 단백질의 흡광도 및 활성을 측정시켜 활성 부위를 모았다.

Table 1. Purification of hemolysin from *Vibrio furnissii*

Purification step	Vol. (mL)	Total Protein (mg)	Total Activity (HU)	Specific Activity (HU/ μ g)	Relative Activity	Yield (%)
Culture supernatant	3,750	3.5×10^4	4.6×10^6	0.13	1	100.0
Ammonium sulfate precipitation	48	2.6×10^3	1.7×10^6	0.65	5	37.0
DEAE-Sephadex (1st)	150	43.0	4.3×10^5	10	77	9.3
Concentration after 2nd DEAE-Sephadex	6	10.9	3.9×10^5	36	277	8.5
Sephadex G-100 gel permeation	54	2.5	2.4×10^5	96	366.0	5.2

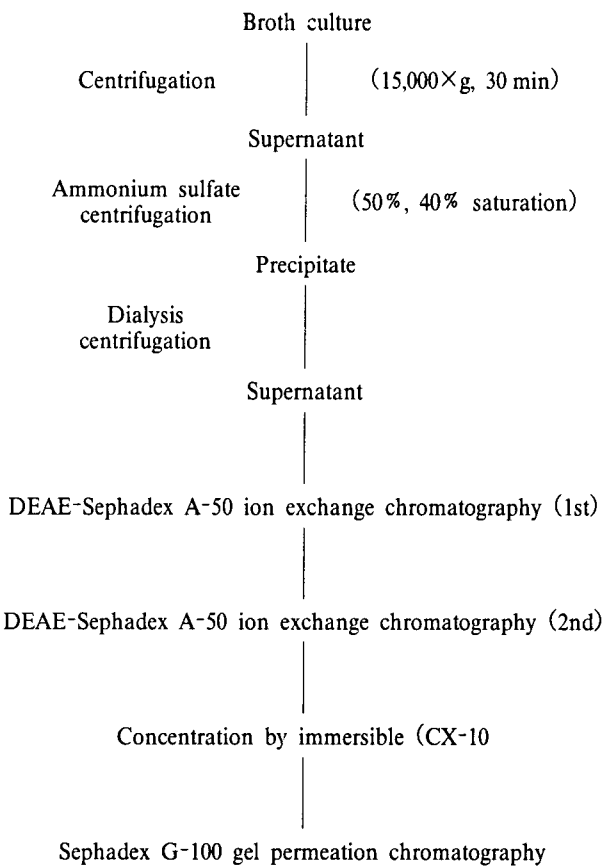


Fig. 2. Flow diagram of the purification of hemolysin from *V. furnissii*.

150 mL의 활성부위를 회수하여 43 mg의 단백질을 얻었으며, 용혈소의 활성은 4.3×10^5 HU였다 (Fig. 3, Table 1).

(3) 2차 DEAE ion exchange chromatography

1차에서 얻은 활성부위를 TBS로 2~3일간 투석한 후, 2차 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. 1차 때와 동일한 흡착 및 용출 조건으로 하였다. 220 mL의 활성부위를 회수하였다 (Fig. 4, Table 1).

(4) Immersible CX-10에 의한 농축

2차 ion exchange chromatography로부터 회수한 활성부위를 gel permeation에 의한 immersible CX-10으로 농축시켜 220 mL에서 6 mL를 얻었다. 총 단백질량은 10.9 mg이었고, 용혈소의 활성은 3.9×10^5 HU로 나타났다 (Fig. 4, Table 1).

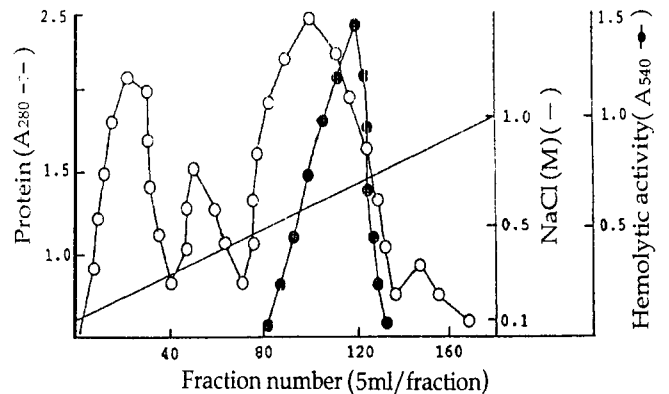


Fig. 3. Elution profile of ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 (1st).

Ammonium sulfate preparation was applied on column of DEAE-Sephadex A-50 which was equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer containin 0.1 M NaCl. Elution was carried out by the application of linear gradient of 0.1~1 M NaCl.

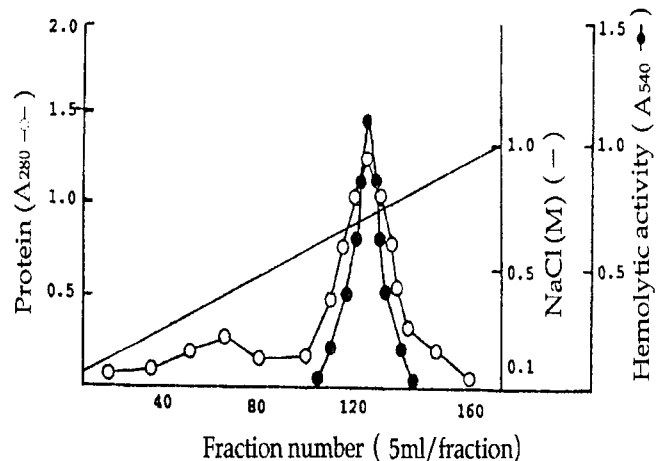


Fig. 4. Elution profile of ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 (2nd).

Preparations from its ion-exchange chromatography was applied on a column of DEAE-Sephadex A-50 equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.1 M NaCl.

(5) Sephadex G-100 gel permeation chromatography

2차 ion exchange chromatography 후의 농축된 시료를 TBS로 충분히 평형화된 Sephadex G-100 column (2.6x90 cm)에 첨가하

여 gel permeation chromatography를 실시하였다. 6~7 mL의 시료를 첨가하였으며, 이 때 유속은 12 mL/hr으로 하였고 1개의 분획은 6 mL로 하였다. *V. furnissii*의 용혈소 9개의 분획에 걸쳐 용혈활성을 나타내었는데, 총 단백질량은 2.5 mg, 용혈 활성은 2.4×10^5 HU였다. Gel permeation의 단계에서 96배 정제되었으며, 회수율은 5.2%로 나타났다 (Fig. 5, Table 1).

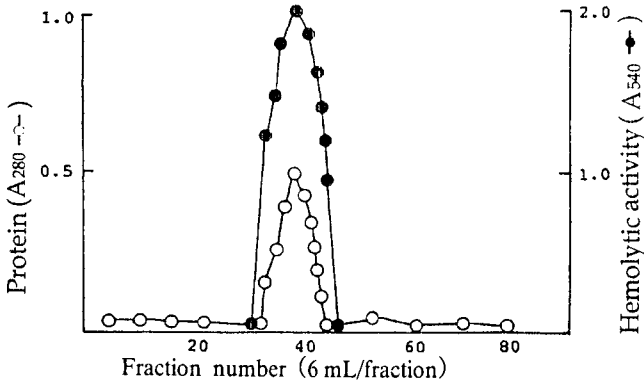


Fig. 5. Gel permeation of Sephadex G-100. Hemolysin solutions from *V. furnissii* was applied on a column equilibrated with 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) buffer containing 0.1 M NaCl.

정제 용혈소의 물리화학적 성질

정제 용혈소의 순도 검정을 위하여 전기영동을 실시한 결과 용혈소가 단일 밴드를 나타내어 정제되었음을 확인하였다 (Fig. 6). 정제 용혈소를 SDS gel 전기영동하여 확인한 결과 *V. furnissii*의 용혈소의 분자량이 63 kDa이었으며, subunit는 존재하지 않아 monomer인 것으로 사료되었다 (Fig. 7).

정제 용혈소의 분자량을 Sephadex G-100 gel permeation에 의해 구한 결과, *V. furnissii*의 용혈소의 분자량은 61 kDa으로 나타났다 (Fig. 8).

불활성 시험에서의 정제 용혈소는 60°C, 5분에서 활성이 100% 소실되었으므로 이열성 용혈소로 나타났다 (Table 2). 0.2~1.2 mM의 Cu^{2+} , Zn^{2+} 의 첨가시 본 용혈소의 활성은 모두 저해되었으며 cholesterol의 경우 1~10 µg/mL의 농도에서 저해되었다 (Table 2). 정제 용혈소의 용혈기작은 있어 온도의존성 용혈로 나타났다 (Fig. 9). 용혈의 적정 온도는 37°C~47°C로 나타났다. 37°C에서 5 HU의 용혈소에 의해 5분 후부터 용혈이 일어나기 시작하여 50분 후에 100% 용혈되었다. 18°C에서는 60분 후에 약 8.8%의 용혈이 일어나기 시작했다. 또한 용혈 활성에 있어서 혈구 농도에 따른 효과 실험에서 적혈구의 농도가 증가할수록 용혈의 정도는 감소되었으며 적혈구 농도는 1.0~2.0%에서 가장 높은 용혈을 나타내었다 (Fig. 10). 용혈에 있어 pH 6.0, 6.5, 10.0 (4°C, 24시간)에서 불안정하였다 (Fig. 11). 용혈소를 가하지 않은 대조군에서는 60분 항온시킨 결과 용혈이 일어나지 않았다.

동물 혈구 감수성

토끼, 마우스, 랫트와 사람의 4가지 혈액형을 사용하여 혈구 감

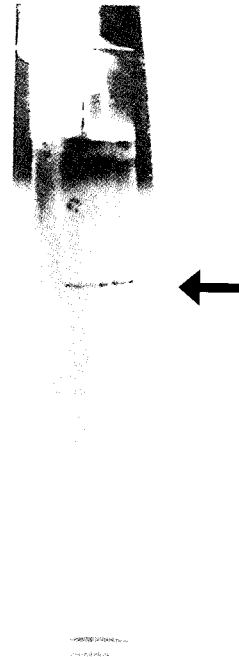


Fig. 6. Disc polyacrylamide gel electrophoresis of the purified hemolysin of *V. furnissii*.

수성 시험을 행한 결과, 토끼에서 가장 높은 감수성을 나타냈으며, 사람 혈액형에서는 B형 혈액형에서 다소 높은 감수성은 나타내었다 (Table 3).

고 찰

*V. furnissii*의 감염에 의한 임상 증상은 심한 설사, 복통, 구토, 발열로써 잠복시간은 확실하지 않지만 8~16시간으로 추정되며, 오염 균수와 오염식품의 섭취량 혹은 숙주의 요인에 따라 다른 것으로 보고되어있다 (Hickman et al., 1984). 본 균의 병원성에 관한 연구는 1981년 Lee et al.에 의한 YI 세포 (adrenal tumor cell)에 대해 세포변성과 세포괴사성의 두 가지 활성을 나타내는 독소 생산 보고가 있었다. 이 같은 결과는 국내에서 이 (1991)가 보고한 것과 유사하다. *V. furnissii*는 glucose 발효시 가스를 생성하는 차이로 *V. fluvialis*의 biotype으로 불리다가 Brenner et al. (1983)에 의해 *V. furnissii*로 명명되었고, 식중독환자중의 급성위장염 환자로부터 분리되어져 왔으므로 이러한 증상 원인의 규명을 위한 연구의 필요성을 시사한 바 있다. 그러나 1983년 *V. furnissii*의 명명 이후 지금까지 본균의 독소생산에 관한 보고는 적어도 필자의 문헌조사에 의하면 찾아볼 수 없었다. Brenner et al. (1983)은 설사의 원인으로서 *V. furnissii*의 역할은 *V. fluvialis*와 유사할 것이라는

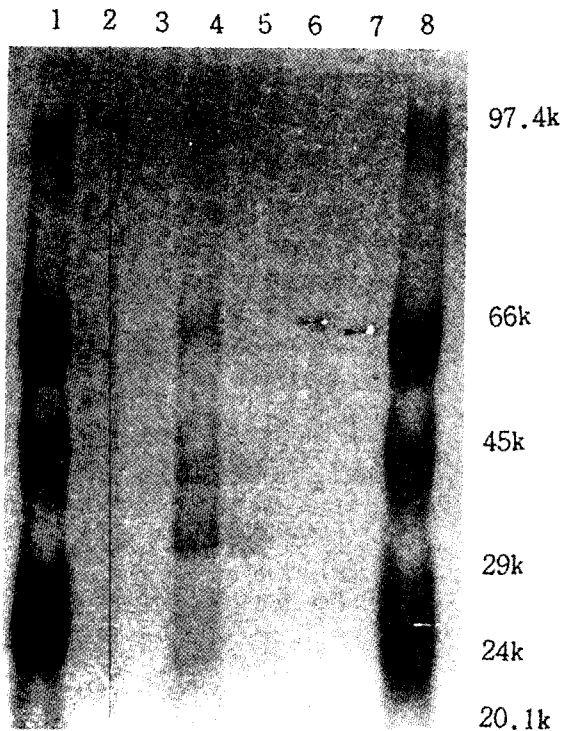


Fig. 7. SDS-PAGE of the purified hemolysin. Lanes: 1 and 8, molecular weight markers; 2, culture supernatant; 3, supernatant of ammonium sulfate precipitated fraction; 4, precipitate of ammonium sulfate-precipitated fraction; 5, DEAE (2nd) fraction; 6, G-100 fraction (*V. fluvialis*); 7, G-100 fraction (*V. furnissii*); 2, 3, 4 and 5; in case of *V. fluvialis*.

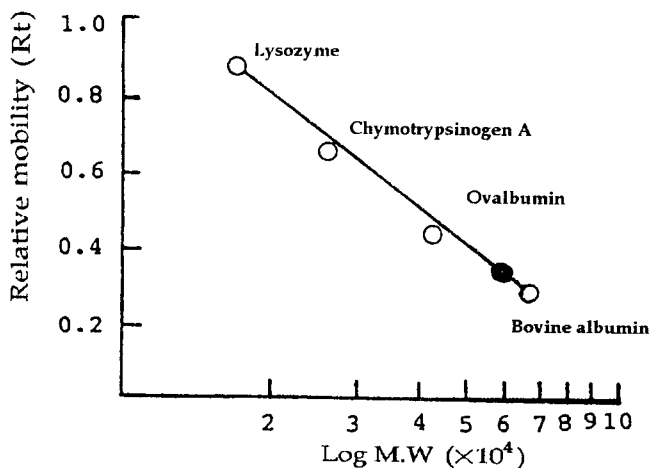


Fig. 8. Estimation of molecular weight of hemolysin by the method of Andrews. (●); *V. furnissii*.

보고를 한 바 있다. *V. furnissii*는 여러 종류의 독성 물질을 생산하며 이들은 병원성에 중요한 역할을 할 것으로 생각되어진다. 이러한 독성 물질로서는 유사 장관독소, 용혈소, protease, cytotoxin 등이 있다 (Honda et al., 1985; Testa et al., 1984).

Table 2. Inactivation of the purified hemolysin by heat, cholesterol and divalent cations

Treatment	Residual activity (%)
None ^{a)}	100.0
37°C, 30 min	100.0
60°C, 5 min	0
100°C, 1 min	0
Cholesterol (μg/mL) ^{b)}	
100.0	13.4
10.0	45.0
1.0	92.0
CU ²⁺ ^{c)}	
1.0	0
0.2	0
Zn ²⁺ (mM)	
1.2	5.5
0.6	85.6

a); No heat treatment.

b); Final concentration of cholesterol in hemolysin solution.

c); A concentration of 100 ng of hemolysin per mL and an equal volume of the indicated concentrations of the reagents were mixed and immediately subjected to the hemolytic activity assay.

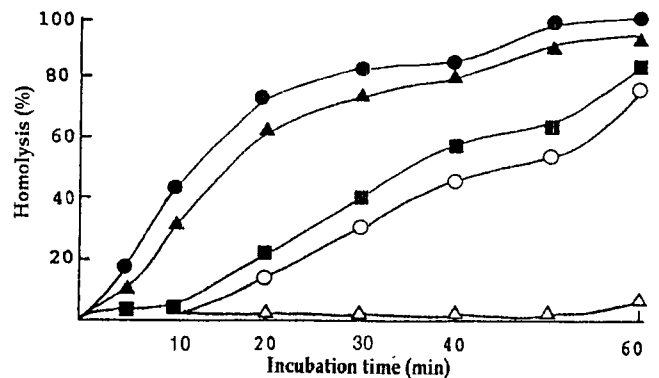


Fig. 9. Kinetics of erythrocyte lysis by hemolysin as a function of temperature.

Samples (1 mL) of a suspension (2% v/v) of washed human erythrocytes were incubated hemolysin of 5 HU for 5 to 60 min at 18°C (Δ), 30°C (■), 37°C (●), 43°C (▲) and 47°C (○) and absorbance of the supernatant fluids was determined at 545 nm and compared with that of control.

지금까지 많은 병원성 비브리오 균 종의 병원성 인자들로 추정되는 것 가운데 용혈소는 제외되지 않았으며, *V. furnissii*의 용혈소의 정제에 관한 보고는 지금까지 없었다. 본 논문의 연구결과 *V. furnissii*의 용혈소는 Sephadex G-100 gel permeation 단계에서 각각 117 HU/μg과 96 HU/μg의 비활성을 나타내었으며 11.6%와 5.2%의 회수율로 각각 정제되었다. 또한 용혈소의 최대 생산은 본 배양 후 약 5~6시간 후에 이루어졌다. 정제의 마지막 단계인 gel permeation 단계에서 *V. furnissii*의 용혈소는 분자량이 61 kDa으로 나타났다. 이는 이 (1991)가 보고한 용혈소와 분자량이 일치함

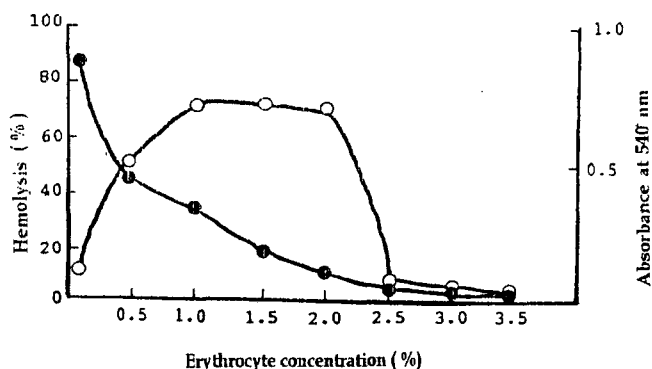


Fig. 10. Effect of erythrocyte concentration on hemolysis by hemolysin.

Samples (1 mL) suspensions of washed human erythrocytes were incubated with 1 mL of 50 ng of purified hemolysin per mL (5 HU) at 37°C for 30 min. Then, the mixtures were centrifuged and the A_{540} of the supernatant (○) was determined. The percent hemolysis (●) was also calculated. Lysis of 100% was taken as that of the supernatant of each concentration of erythrocytes treated with 1% Triton X-100.

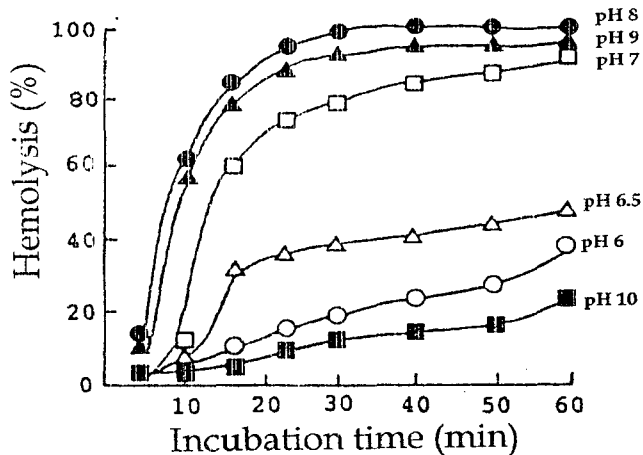


Fig. 11. Kinetics of erythrocyte lysis by hemolysin as a function of pH.

Samples (1 mL) of a washed human erythrocytes suspension (2% v/v) in PBS (adjusted to pH 6, 6.5, 7, 8, 9, and 10) were incubated with purified hemolysin (5 HU in 1 mL of PBS-BA (Bovine Albumin) at pH 6, 6.5, 7, 8, 9, and 10) for 5 to 60 min, and the supernatant fluids of the mixtures were obtained and the absorbance was compared with that of control, 1% Triton X-100-lysed erythrocyte suspension.

을 볼 수 있었다. 또한 ammonium sulfate 침전에 있어서 40%와 50%에서 용혈소가 최대로 회수되었다. 또한 정제용혈소는 Disc 및 SDS 겔 전기영동상에서 단일한 밴드를 보여 정제되었음을 확인하였고, subunit는 존재하지 않아 monomer인 것으로 사료되었다. 이는 이 (1991)가 보고한 것과 일치함을 볼 수 있었다.

Table 3. Specific activities of the purified hemolysin for lysis of erythrocytes from various animal species

Source of erythrocyte	Specific activity (HU/ μ g of Hemolysin)
Human blood group	
A	25
B	40
AB	27
O	15
Mouse	64
Rabbit	120
Rat	90

정제된 용혈소는 열에 불안정한 이열성 용혈소 (Table 2)였는데, 0.1% bovine serum albumin의 첨가에도 불구하고 60°C, 5분의 열처리시 용혈활성이 100% 소실되었다. 이는 *V. metschnikovii*의 용혈소와 같은 성질을 나타내었다 (Yasami, 1988). 이 용혈소는 2가 양이온인 Cu^{2+} , Zn^{2+} 에 의해 용혈활성이 저해되었는데, 이러한 양이온들의 저해효과는 용혈소의 적혈구 결합 단계가 아니라 적혈구와의 결합 후 상해 단계에서의 저해와 양이온의 가역적 결합에 의한 lipid bilayer의 위치 변경의 결과로서 막유동성의 고정 또는 저해로 인한 것으로 설명되어질 수 있겠다 (Avigad and Bernheiner, 1976; Harshman and Sugg, 1985). 일반적으로 thiol-activated 용혈소는 cholesterol에 의해 저해되는데, 이 용혈소 역시 cholesterol에 의해 용혈활성이 저해되었으며, 저해에 필요한 cholesterol의 양은 일반적인 thiol-activated 용혈소를 저해하는 데 사용되는 양의 약 100배로서 이는 *V. metschnikovii* 용혈소와 유사하다 (Cohen et al., 1940; Avigad and Bernheiner, 1978). 정제 용혈소의 용혈기작에 있어서 본 용혈소는 온도의존성 용혈기작으로 나타났다 (Fig. 9). 정제 용혈소의 각종 동물 혈구의 감수성 시험 결과 토끼의 혈구가 가장 감수성이 높았으며 랫트, 마우스, 사람 혈액의 순서대로 감수성이 높았는데, 사람 혈액형의 혈구 감수성이 비교적 낮은 것은 *V. metschnikovii*의 용혈소와 유사하다 (Harshman and Sugg, 1985). 한편 사람혈액형의 혈구에 있어서는 B형 혈액형에서 가장 감수성이 높았으며 O형 혈액형에서 가장 감수성이 낮았는데 이는 응집원 B의 선택적 감수성이 기인하는 것으로 생각되어진다 (Table 3). 또한 본 연구에서 항체 생산시 황산암모늄 침전물을 토끼에게 주사했을 때, 주사 부위에서 염증, 화농, 심한 설사를 동반하였는데 이는 이 (1991)가 보고한 증상과 일치하였으나 본 실험에서는 심한 설사를 동반하였다. 용혈소 생성에 관여하는 유전자는 염색체에서 기인되는 것으로 여겨지며, 본 용혈소가 장관독소로 작용하는지 또는 본 균의 병원성에 직접적이고 결정적인 인자로 작용하는지는 추측되는 다른 병원성 인자들과의 상호관련성을 검토한 후에 결론지어져야 된다고 사료된다.

요 약

병원성 비브리오 속인 *Vibrio furnissii*의 용혈소를 분리정제하고 그 물리화학적 특성, 생물학적인 그리고 면역학적인 상호관련성을

검토하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

용혈소의 정제는 ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-50 (1st와 2nd)와 Sephadex G-100 gel permeation chromatography를 거쳐 738배로 정제되었으며 회수율은 각각 11.6%와 5.2%로 나타났다. 전기영동법으로 용혈소의 정제를 확인한 결과 단일 밴드의 형성을 관찰할 수 있었다. 분자량은 61 kDa이었으며 또한 SDS-PAGE 결과 subunit는 존재하지 않았다. 정제된 용혈소는 열에 불안정한 이열성 용혈소이며 Cu^{2+} , Zn^{2+} 와 cholesterol에 의해 용혈활성이 모두 저해되었다.

용혈기작에 있어서는 온도의존성 용혈기작으로서 최적 용혈의 온도는 37°C ~ 47°C 로 나타났다. 정제용혈소의 pH 안정성은 pH 6.0, 6.5, 10.0에서 각각 불안정하였다.

용혈활성에 있어서 최적 혈구 농도는 1.0~2.0%였다. 또한 각종 동물 혈구의 감수성 시험 결과 두 용혈소 모두 토끼에서 가장 감수성이 높았으며 사람의 혈구에서는 B형 혈액형에서 다소 높은 감수성을 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 두뇌한국 21 사업에 의하여 지원되었음.

참 고 문 헌

- Andrews, P. 1970. Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. *Methods Biochem. Anal.*, 18, 1~12.
- Asao, T., Y. Kinoshita, S. Kozaki, T. Uemura and G. Sakaguchi. 1984. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.*, 46, 122~132.
- Avigad, L.S. and A.W. Bernheimer. 1976. Inhibition by zinc of hemolysis induced by bacterial and other cytolytic agents. *Infect. Immun.*, 13, 1378~1388.
- Avigad, L.S. and A.W. Bernheimer. 1978. Inhibition of hemolysis by zinc and its reversal by L-histidine. *Infect. Immun.*, 19, 1101~1112.
- Blake, P.A., H.A. Merson, R.E. Weaver, D.G. Hollis and P.L. Heublein. 1979. Disease caused by marine *Vibrio*, clinical characteristics and epidemiology. *N. Engl. J. Med.*, 300, 1~12.
- Bradford, M.H. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248~260.
- Bonner, J.R., A.S. Coker, C.R. Berryman and H.M. Pollock. 1983. Spectrum of vibrio infections in a gulf coast community. *Ann. Intern. Med.*, 99, 464~476.
- Brake, P.A., R.E. Weaver and D.G. Hollis. 1980. Diseases of human (other than cholera) caused by vibrios. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34, 341~354.
- Brenner, D.J., F.W. Hickman-Brenner, J.V. Lee, A.G. Steigerwalt, G.R. Fanning, D.G. Hollis, J.J. Farmer, R.E. Weaver, S.W. Joseph and R.J. Seidler. 1983. *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*). A new species isolated from human feces and the environment. *J. Clin. Microbiol.*, 18, 816~828.
- Cohen, B., M.E. Perkins and S. Putterman. 1940. The reaction between hemolysin and cholesterol. *J. Bacteriol.*, 39, 59~71.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404~416.
- Donald, E.L. 1982. Detection of toxins produced by *Vibrio fluvialis*. *Infect. Immun.*, 35, 702~714.
- Furniss, A.L., J.V. and T.J. Donovan. 1977. Group F, A new vibrio. *Lancet*, 11, 565~578.
- Harshman, S. and N. Sugg. 1985. Effect of calcium ions on staphylococcal alpha-toxin-induced hemolysis of rabbit erythrocytes. *Infect. Immun.*, 47, 37~49.
- Hickman-Brenner, F.W., D.J. Brenner, A.G. Steigerwalt, M. Schreiber, S.D. Hohmberg, L.M. Baldy, C.S. Lewis, N.M. Pickens and J.J. Farmer. 1984. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from a stool sample of one patient. *J. Clin. Microbiol.*, 20, 125~137.
- Honda, I., M. Arita, T. Takeda, M. Yoh and T. Miwatani. 1985. Non-O1 *Vibrio cholerae* produced by two newly identified toxins related to *Vibrio parahaemolyticus* hemolysis and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Lancet*, 11, 163~168.
- Huq, M.I., A.K.M.J. Alam, D.J. Brenner and G.D. Morris. 1980. Isolation of vibrio-like group, EF-6, from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 11, 621~634.
- Ju, J.W. and Y.H. Kim. 1988. Purification of hemolysin of *Vibrio parahemolyticus* 02:K3. *J. Korea Soc. Microbiol.*, 23, 46~468.
- Kreger, A. and D. Lockwood. 1981. Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, 33, 583~595.
- Kreger, A. 1984. Cytolytic Activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.*, 44, 326~335.
- Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680~687.
- Lee, J.V., P. Shread, A.L. Furniss and T.N. Bryant. 1981. Taxonomy and description of *V. fluvialis* sp. nov. (synonym Group F Vibrios, Group EF6). *J. Appl. Bacteriol.*, 50, 73~80.
- Shandera, W.X., J.M. Hohnston, B.R. Davis and P.A. Blake. 1983. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. Clinical characteristics and epidemiology. *Ann. Intern. Med.*, 99, 169~179.
- Testa, J., L.W. Daniel and A.S. Kreger. 1984. Extracellular phospholipase A and lysophospholipase produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, 45, 458~460.
- Yasami miyake. 1988. Purification and Characterization of *Vibrio metschnikovii* cytolytin. *Infect. Immun.*, 56, 954~967.
- 이미현. 1991. *Vibrio fluvialis*와 *Vibrio furnissii*의 세포외 용혈소에 관한 연구. 부산대학교 박사학위 논문.

2001년 7월 7일 접수

2001년 9월 3일 수리