

## 철 결핍 조건에서 배양한 *Edwardsiella tarda*의 면역학적 특성

최현숙 · 이덕찬\* · 박수일\*\*†

목포지방해양수산청 완도해양수산사무소, \*국립수산과학원 병리연구팀, \*\*부경대학교 수산생명의학과

## Immunological characteristics of *Edwardsiella tarda* grown under iron-restricted condition

Hyun Suk Choi, Deok Chan Lee\* and Soo Il Park\*\*†

Wando Maritime & Fisheries Office Fisheries Management Division, Jeonnam 537-800, Korea

\*Pathology Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

\*\*Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

The immunogenicity of *Edwardsiella tarda* was surveyed under two different culture conditions. In SDS-PAGE patterns of the outer membrane proteins (OMPs) extracts of *E. tarda*, grown under Tryptic soy broth (TSB) and TSB supplemented iron chelate 2,2'-dipyridyl iron-restricted condition, were examined. The results showed that the iron-regulated outer membrane protein (IROMPs) with molecular masses of 68 and 73 kDa were expressed by bacteria grown in iron-chelate TSB.

The pathogenicity was examined by intraperitoneal injection with live *E. tarda* grown under TSB, iron-chelate TSB and iron-supplemented TSB. The result of pathogenicity test showed significantly high mortality in the group of live *E. tarda* grown under iron-chelate TSB.

The effect of formalin killed cell (FKC) of TSB cultured bacteria and 2,2'-dipyridyl FKC (DP-FKC) of cultured bacteria on the iron-chelate TSB on the development of protective immunity in olive flounder was studied. The level of immune response was evaluated with immunized fish at 1, 2, 3 and 4 weeks after immunization. The numbers of specific antibody secreting cells (SASCs) showed significantly increased level at 2 week after immunization in each group. The agglutination titre of immunized fish was significantly high level at 3 weeks after immunization.

The level of protection in olive flounder at 1, 2, 3 and 4 weeks after vaccination was examined by intraperitoneal challenge test with live *E. tarda*.

**Key words:** *Edwardsiella tarda*, iron-restricted condition, outer membrane proteins (OMPs), iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs), 2,2'-dipyridyl

오늘날 양식 산업이 발달함에 따라 대규모 양식 시설 투자와 대량 생산을 위한 고밀도 사육 기술 개발로 연안 어장의 오염이 심각해지면서 어류 양식장 환경도 악화되어 다양한 질병의 감염율이 높아지고 있다. 이러한 질병들 중에서도 세균성 질병이 발생률이나 피해량의 많은 부분을 차지하고 있어서 세균성 질병에 대한 대책의

마련이 절실히 요구되고 있는 실정이다 (최, 1989). 양식 넘치의 질병 대책으로 1980년대 초부터 에드워드병의 예방에 대한 적극적인 대책의 하나인 백신 개발에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다 (Song and Kou, 1981; Salati *et al.*, 1983; Salati and Kusuda, 1985; Gilda and Wakabayashi, 1986; Salati *et al.*, 1987; Mekuchi *et al.*,

†Corresponding Author : Soo Il Park, Tel : 051-620-6141,  
Fax : 051-628-7430, E-mail : parksi@pknu.ac.kr

1995). 이들의 실험에 사용된 vaccine의 항원은 균체 자체나 초음파에 의하여 추출된 항원, 세균 세포벽으로부터 분리된 lipopolysaccharide (LPS)와 세포외 생성물 (ECPs) 등이 사용되었다 (Salati *et al.*, 1983; Gutierrez and Miyazaki, 1994).

세균의 세포 표면은 일정치가 않으며 이것은 세균이 숙주 체내에서 살아남기 위한 in vivo 조건의 변화에 따라 달라진다 (Brown *et al.*, 1988). 많은 포유류 (Davies *et al.*, 1994a)와 어류 (Gardun *et al.*, 1993a, b)에서 in vivo 배양조건에 따른 병원성 요인과 항원성에 대한 연구가 있었는데 iron-regulated condition에서 분리한 iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs)의 독성을 확인하였고 항원으로 사용하였을 때 방어적인 면역반응을 나타내었다 (Duncan *et al.*, 1998). 이미 세균의 major outer membrane proteins (OMPs)에 대한 병원성과 방어적 항원성에 대한 연구는 많이 보고되어 왔다. Tu and Kawai (1998 & 1999)의 연구에서 *Edwardsiella tarda*의 37 kDa OMPs를 항원으로 백장어에 투여한 실험에서 방어적 항원성을 확인하였고, Rahman *et al.*(2002)의 연구에서 *Flavobacterium psychrophilum*의 FKC 항원과 outer membrane fraction을 항원으로 하여 rainbow trout에 투여하고 4주 후에 공격 실험한 결과에서도 동일한 결과를 나타내었다. 그리고 Hirst *et al.* (1994)은 *Aeromonas salmonicida*의 OMPs와 IROMPs를 Atlantic salmon에 투여하여 공격실험으로 그 면역원성을 입증하였다.

그러므로 본 연구에서는 iron-regulated condition에서 배양한 *E. tarda*의 IROMPs에 대한 방어적 항원성 (Hirst *et al.*, 1994; Duncan and Sorum, 1998)을 이용하여, 매년 어류 양식장에서 문제가 되는 *E. tarda* 병원체에 대한 효율적이고 경제적인 vaccine을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 *E. tarda*를 iron-regulated condition에서 배양하여 넙치에 대한 독성 조사를 실시하였고, 어류에 있어서 높은 면역원성을 가지는 OMPs의 발현 특성을 조사하였다. 즉, iron-chelate (2,2'-dipyridyl) 첨가 배지에 배양한 균체로부터

IROMPs를 분리하였고, 이러한 조건에서 주요한 방어적 항원이 되는 새로운 단백질의 생성을 조사하였다. 그리고 FKC 항원과 2,2'-dipyridyl 첨가 FKC (DP-FKC) 항원에 대한 각각의 면역 반응의 변화를 조사하였으며 아울러 생균 공격에 의한 상대 생존율 및 생존율을 파악하여 에드워드병의 예방을 위한 효과적인 vaccine 개발의 기초 자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

제주도 소재의 넙치 양성장으로부터 분양받은 15-17 cm, 30-32 g의 넙치를 6개의 FRP 사육조에 30마리씩 수용하였으며, 한 실험구 당 2개의 사육조를 사용하였다. 수온은 실험기간 동안 20 ± 1°C로 유지하였다.

### 실험균주

포항 소재의 양어장에서 에드워드병에 감염된 넙치로부터 2000년 7월에 분리한 *E. tarda*로서 예비 실험 결과 독성이 가장 높은 균주를 사용하였다. 분리 후 -80°C에서 보존하였으며, 세균의 계대는 1.5% NaCl이 첨가된 Tryptic soy agar (TSA, Difco)에서 27°C, 24시간 동안 배양하였고 모든 실험에는 균주를 3회에 걸쳐 어체를 통과시킨 다음 실험에 사용하였다.

### 배양 조건에 따른 *E. tarda*의 병원성 조사

*E. tarda*를 iron-regulated condition에 따라 배양하여 병원성을 조사하였다. 실험균주인 *E. tarda*를 Tryptic soy broth (TSB, Difco), 2,2'-dipyridyl (Sigma Chem. Co.)을 100 µM 되게 첨가한 TSB 및 Fe 이온의 농도가 10 µM 농도가 되도록 FeCl<sub>3</sub>를 첨가한 TSB에 각각 접종하여 27°C, 24시간 배양하였다. 각각 다른 조건에서 배양한 *E. tarda* 생균을 원심 분리 (10,000 × g, 4°C, 10min; Sorvall Instruments, USA)하여 멸균 생리식염수로 3

회 세척한 후 동일 용액에 현탁하여  $1 \times 10^4$  cfu/ml로 조절한 후 넘치 한 마리당 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 수온은  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지시켰으며 11일 동안의 누적 폐사율을 기록하였다. 대조구는 동일한 조건하에서 멸균 생리 식염수를 같은 방법으로 복강 내 주사하였다. 각 실험구 당 5마리의 넘치를 사용하였으며, 실험 중 폐사어에 대해서는 원인균의 재분리 검사를 실시하였다.

### Vaccine 투여와 시험어 채취

*E. tarda* 배양액에 각각의 iron-regulated condition에서 제작된 0.5% (v/v) formalin을 처리한 불활화 *E. tarda* formalin killed cells (FKC)와 DP-FKC를 각각 멸균 생리식염수에 현탁하여  $A_{540} = 0.8$ 의 흡광도 (Packard Bioscience Company)로 조정하여 넘치 한 마리당 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 대조구는 멸균 생리 식염수를 같은 방법으로 복강 내 주사하였다. 면역 후 1, 2, 3 및 4주째에 각 그룹의 어류를 채포하여 vaccine 투여에 대한 면역반응을 조사하였다.

### OMP의 분리와 전기 영동

*E. tarda*의 배양조건에 따른 OMPs와 IROMPs를 비교하기 위하여 Laemmli (1970)의 방법에 따라 전기영동을 실시하였으며, OMPs와 IROMPs의 분리는 Luywyche *et al.* (1995) 등의 방법에 따라 수행하였다. *E. tarda*를 TSB와 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB를 사용하여  $25^\circ\text{C}$ , 24시간 배양한 세균을  $10,000 \times g$ , 10분간 원심 분리하여 20mM Tris/HCl sol. (pH 8.0)으로 3회 세척한 후 pellet을 다시 같은 용액에 현탁하여 초음파 분쇄기 (Vibracell, Sonics & Materials, USA)에 30초간 3반복하여 처리하였다. 이 현탁액은  $4,000 \times g$ , 10분간 원심 분리한 후 상징액을 취하여 다시  $43,000 \times g$ , 30분간 원심 분리하였다. 원심 분리된 pellet을 detergent Sarkosyl (protein/detergent ratio of 1:6, mg/ml)로 현탁하여  $32^\circ\text{C}$ , 30분간 반응시켰다. 이 현탁액은 다시  $43,000 \times g$ , 30분간

원심 분리하여 pellet을 20mM Tris/HCl sol. (pH 7.4)로 3회 세척하고 재현탁하여 OMPs를 제작하였다.

제작된 OMPs와 IROMPs는 5×SDS sample buffer (10% SDS, Tris, 20% glycerol, 5mM 2-mercaptoethanol)와 혼합하여  $100^\circ\text{C}$ , 10분간 boiling하고,  $10,000 \times g$ 에서 10초간 원심 분리한 후 12% SDS-Polyacrylamide gel에 loading하여 60mA에서 1시간 전기영동 하였다. Molecular weight marker로 low range SDS-PAGE standards (Bio-Rad)를 사용하였다. Loading이 완료된 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 Coomassie destain 용액으로 탈색하여 band를 확인하였다.

### 응집항체가의 측정

응집항체가의 측정은 Roberson (1991)의 방법에 따라 수행하였다. 어류는 각 실험구 당 3마리씩 사용하였으며, 미부 정맥을 통하여 채혈된 혈액을  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight하여 정치시킨 후 원심 분리 ( $8,000 \times g$ , 5 min)하여 항혈청을 분리하였다. 응집항체가는 96-well round bottom plate를 사용하여 microtiter법으로 측정하였다.

### 특이 항체 생성 세포의 검출

미부 혈관으로부터 채혈하여 하 등 (1999)의 방법에 따라 특이항체 생성세포수를 분석하였으며, 항체생성세포분석에는 신속하게 적출한 신장 조직을 단일 세포화하여 사용하였다. 세포의 준비는 각 실험구 당 어류를 3마리씩 사용하였다.

Nitrocellulose membranes가 부착된 96 well polystyrene microtiter plate의 각 well에 ethylenediamine tetra-acetic acid (20mM, pH 7.2)로 추출한 *E. tarda* FKC 항원을  $50 \mu\text{g}/\text{well}$ 로 분주한 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight하여 coating시켰다. 이후 모든 단계의 반응이 끝날 때마다 0.1% Tween 20이 첨가된 washing buffer (T-PBS)로 3번씩 세척하였다. 세척 후 각 well에 3% BSA를  $200 \mu\text{l}$ 씩 첨가

하여 37°C, 1시간 동안 반응시켜 coating 되지 않은 부분을 blocking 하였다. L-15 medium에서 현탁하여 준비된 두신 세포를 각 well 당  $10^6$ ,  $10^5$  및  $10^4$  cell의 농도로 첨가하여 항체 생성을 유도하기 위해 CO<sub>2</sub> incubator (CO<sub>2</sub>, 5%)에서 20°C, 6시간동안 배양하였다. 세척 후 25 µg/ml의 농도의 rabbit anti-flounder Ig를 75 µl씩 첨가하여 반응시키고 alkaline phosphate peroxidase (Sigma Chem. Co.)를 1:1000으로 희석하여 75 µl씩 첨가하여 반응시켰다. 기질로 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT, Sigma Chem. Co.)를 사용하여 100 µl씩 well에 첨가하여 10분간 발색이 되도록 반응시킨 후 T-PBS로 세척하고 증류수를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 결과는 형성된 spot을 해부 현미경 (SZ-PT, Olympus)으로 계수하였다.

### 공격실험

공격 시험에 사용한 균액은 미리 어체를 3회 통과시킨 후 분리해 둔 *E. tarda*를 TSB 배지에서 20°C, 24시간 배양하여 평균 생리식염수에 현탁하여  $1 \times 10^6$  cfu/ml로 조절한 후 넘치 한 마리당 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 대조구는 평균 생리 식염수를 동일한 방법으로 복강 내 주사하였다. 각 실험구 당 10마리씩 어류의 복강에 주사하여 2주간 관찰하였고 결과는 생존율 및

상대 생존율로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 배양 조건에 따른 *E. tarda*의 병원성 조사

Iron-regulated conditions에 따라 배양한 *E. tarda*의 넘치에 대한 병원성을 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. 2,2'-dipyridyl 첨가 배지에 배양한 *E. tarda*를 주사한 넘치는 주사한지 11일 만에 100% 폐사하여 독성이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 철이 첨가된 배지에 배양한 *E. tarda*는 같은 기간에 40%의 폐사율을 나타내어 독성이 낮은 것으로 나타났다.

### OMP의 SDS-PAGE profile의 비교

TSB에 배양한 균체로부터 분리된 OMPs과 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB에서 배양한 균체로부터 분리된 IROMPs를 사용하여 SDS-PAGE를 실시하였다 (Fig. 1). 두 가지 시료 모두 *E. tarda*의 MOMP인 약 37과 40 kDa 크기의 주요 항원을 공통적으로 나타냈으며, 68 및 73 kDa protein profiles은 OMPs에서 보다 IROMPs에서 더 많이 발현되었다.

OMP를 비롯한 cell surface protein은 Gram-negative bacteria에서 중요한 독성 요소로 작용한다 (Zierler and Galan, 1995; Ahmed and New-

**Table 1.** Pathogenicity test of live *Edwardsiella tarda* grown under iron-regulated conditions

Treatment ( $1 \times 10^3$ cfu/fish)	No. of tested fish	Days after post injection							% Mortality
		5	6	7	8	9	10	11	
Control <sup>1</sup>	5	0	1	0	0	0	0	0	20
TSB- <i>E. tarda</i> <sup>2</sup>	5	0	1	0	1	1	0	0	60
DP- <i>E. tarda</i> <sup>3</sup>	5	0	1	0	1	2	1	0	100
Fe- <i>E. tarda</i> <sup>4</sup>	5	0	1	0	0	1	0	0	40

<sup>1</sup>, injected PBS only.

<sup>2</sup>, *E. tarda* cultured in the TSB.

<sup>3</sup>, *E. tarda* cultured in the TSB supplemented iron chelator 2,2'-dipyridyl.

<sup>4</sup>, *E. tarda* cultured in the TSB supplemented FeCl<sub>3</sub>.

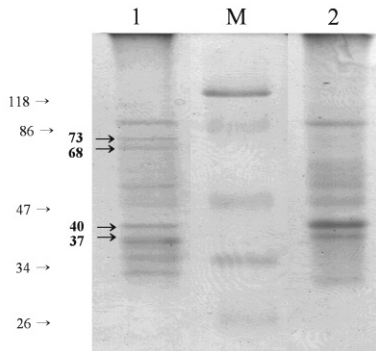


Fig. 1. SDS-PAGE profiles of *Edwardsiella tarda* outer membrane proteins (OMPs) on 10% acrylamide gel. The proteins were stained with coomassie brilliant blue R-250. M, molecular weight marker proteins; 1, iron-restricted outer membrane proteins of *E. tarda* (IROMPs); 2, outer membrane proteins of *E. tarda* (OMPs).

ton, 2001). Suzuki *et al.* (1994)과 Suzuki *et al.* (1996)은 *Vibrio anguillarum*에서 MOMP의 병원성과 항원성을 보고하였으며, Lutwyche *et al.* (1995)은 무지개송어에서 분리한 *Aeromonas salmonicida*의 28 kDa MOMP에 방어적 항원성이 있다고 보고하였다. Duncan and Sorum (1998)은 iron-restricted condition과 같은 in vivo 배양 환경에 따라 독성과 관련된 OMPs 유사 항원이 다양하게 형성되며, 이것은 일반적인 배양 환경에서보다 효과적인 면역 반응을 일으킨다고 보고하였다. 이것은 세균세포 외막에 존재하는 pore-forming proteins (porins)과 siderophore receptor proteins이 있으며 특이적 영양소의 이동과 세균의 특이적 영양 상태에서 생성되는데 (Davey *et al.*, 1998), 철은 세균의 항원 발현과 siderophore 생성에 영향을 주게 된다. 그러므로 본 연구에서 iron-chelator에 의한 외막의 profile 성분의 변화와 독성 차이가 siderophore receptor proteins의 생성에 의한 것으로 생각된다. 또한 iron-restricted condition의 배양 조건에서 더 진하게 나타난 68과 73 kDa OMPs는 세균이 iron을 얻기 위한 receptor로써 사용하는 것이라고 여겨진다. 철이 충분히 존재하는 조건에서는 약하게 존재하던 68과 73 kDa OMPs이 철 결핍 조

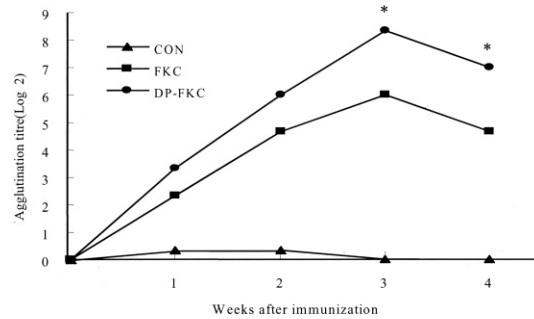


Fig. 2. Agglutination titers in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, at 1, 2, 3 and 4 weeks post immunization with FKC (■) and 100  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl-FKC (DP-FKC, ●), respectively. Control fish was injected with physiological saline (CON, ▲). \* significant difference between FKC and DP-FKC,  $P < 0.05$ .

건에서는 siderophore receptor로서 작용하여 숙주의 high affinity iron-binding protein과 경쟁적 관계에서 iron-uptake mechanism이 개시되고 이것이 독성 factor로 작용하게 되는 것으로 사료되며, 본 연구의 독성 실험의 결과와 관련하여 추정하면 TSB 나 Fe를 첨가한 TSB에서 배양한 *E. tarda*가 IROMPs를 발현시킴으로 높은 독성을 나타내는 것으로 생각된다.

#### 혈청 내 특이 항체의 변화

FKC 항원과 DP-FKC 항원 투여 후 1, 2, 3 및 4 주째에 응집항체를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 두 가지 실험구 모두에서 응집항체가 점차 증가하다가 3주째에 최고 수준에 도달하였다. 이 때 FKC 항원 투여구의 응집 항체가는 64이었으며 DP-FKC 항원 투여구의 응집항체가는 256~512로 FKC 항원 투여구의 응집항체가 보다 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 Hirst *et al.* (1994)과 Durbin *et al.* (1999)의 연구에서 iron-chelate인 2,2'-dipyridyl을 첨가하여 배양한 세균의 IROMPs를 분리하여 이것을 면역원으로 주사하였을 때 나타난 응집 항체가의 결과와 유사하게 나타났다.

### 특이 항체 생성 세포 수의 변화

항원 투여 후 특이 항체 생성 세포 수의 변화는 Fig. 3에 나타내었다. 특이 항체 생성 세포 수의 검출은 두 실험구 모두 1주째부터 spot이 관찰되기 시작하여 2주째에 최고 수준에 도달한 후 감소하기 시작하였고, 이는 혈청 내 특이 항체량의 변화 곡선과 유사한 pattern을 나타내었다. 이 결과에서도 FKC 항원 투여구보다 DP-FKC 항원 투여구에서 특이 항체 생성 세포의 수가 2주째에서부터 4주째까지 유의적으로 더 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

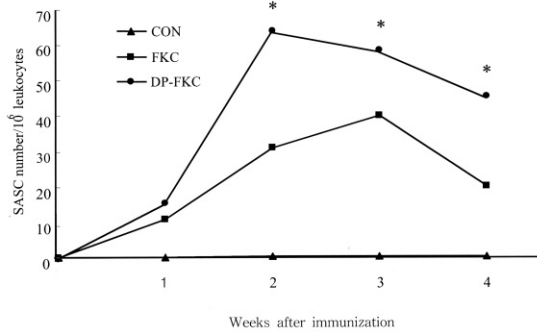


Fig. 3. Mean number of specific antibody secreting cells (SASCs) against *Edwardsiella tarda* in the head kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, following 1, 2, 3 and 4 weeks immunization with FKC (■) and 100  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl-FKC (DP-FKC, ●), respectively. Control fish was injected with physiological saline (CON, ▲). \* significant difference between FKC and DP-FKC :  $P < 0.05$ .

항체 생성 세포 수가 2주 째에 최고 수준을 보인 것에 비하여 응집 항체는 3주 째에 최고 수치를 나타내었다. 이것은 외부 항원이 어체 내로 유입되게 되면 lymphoid organ 내의 lymphocyte가 자극되어 항체를 생성하는 세포로 되어 분화와 증식의 과정을 거치게 되고 혈청 내 순환 항체는 lymphoid organ 내의 이러한 항체 생성 세포가 분비한 항체가 혈액에서도 출현하는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서의 실험 결과 FKC (or DP-FKC) 항원을 넘치에 투여하였을 때 항체 생성 세포와 혈청 내 특이 항체량의 변화 관계를 추정할 수 있었으며, 특히 DP-FKC의 사용은 일반적인 제작법에 따른 FKC에 비하여 유의적 효과가 나타나는 것으로 판단된다. 이는 iron-restricted condition에서 발현되는 DP-FKC 항원 내의 IROMPs를 자극하여 면역원성 효과를 증가시켜 주는 것으로 여겨진다.

### 공격 실험에 대한 생존율의 변화

FKC 항원과 DP-FKC 항원 투여 후 1, 2, 3 및 4주째에  $1 \times 10^6$  cfu/ml의 *E. tarda* 생균을 복강 주사하여 생존율과 상대 생존율을 조사하였다 (Table 2 및 Fig. 4, 5, 6, 7). 대조구에 비하여 항원을 투여한 두 실험구 모두에서 더 높은 생존율을 나타내었다. 항원 투여 후 1주 째 공격 주사한 결과 대조구보다 높은 상대 생존율인 22%를

Table 2. Mortality and relative percentage survival (RPS) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, challenged with  $1 \times 10^6$  cells/ml of viable *Edwardsiella tarda* at 1, 2, 3 and 4 weeks after vaccination

Treatment	Mortality (%)				RPS (%) <sup>a</sup>			
	Weeks				Weeks			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Control	90	90	90	90	-	-	-	-
FKC	70	70	50	60	22	22	44.4	33
DP-FKC	70	50	20	30	22	44.4	77.7	66.6

<sup>a</sup>, RPS (%) =  $[1 - (\% \text{ mortality of vaccinated} / \% \text{ mortality of control})] \times 100$ .

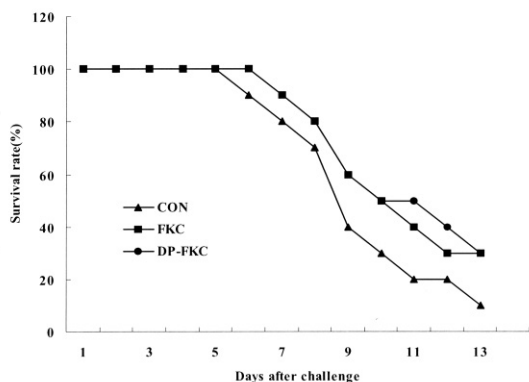


Fig. 4. Survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, vaccinated with formalin killed cells of *Edwardsiella tarda* grown in TSB (FKC, ■) or in 100  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl supplemented TSB (DP-FKC, ●). The fish was challenged by intraperitoneal injection with  $1 \times 10^6$  cells/ml of *E. tarda* at 1 week after vaccination. Control fish was injected with physiological saline (CON, ▲).

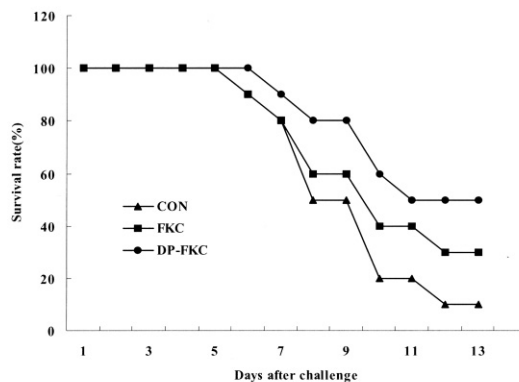


Fig. 5. Survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, vaccinated with formalin killed cells of *Edwardsiella tarda* grown in TSB (FKC, ■) or in 100  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl supplemented TSB (DP-FKC, ●). The fish was challenged by intraperitoneal injection with  $1 \times 10^6$  cells/ml of *E. tarda* at 2 weeks after vaccination. Control fish was injected with physiological saline (CON, ▲).

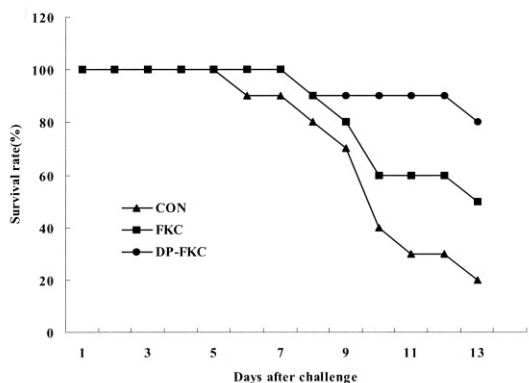


Fig. 6. Survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, vaccinated with formalin killed cells of *Edwardsiella tarda* grown in TSB (FKC, ■) or in 100  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl supplemented TSB (DP-FKC, ●). The fish was challenged by intraperitoneal injection with  $1 \times 10^6$  cells/ml of *E. tarda* at 3 weeks after vaccination. Control fish was injected with physiological saline (CON, ▲).

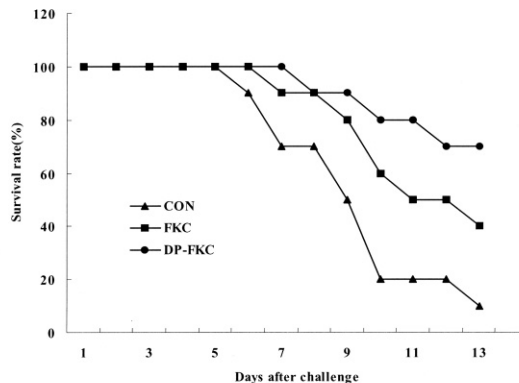


Fig. 7. Survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, vaccinated with formalin killed cells of *Edwardsiella tarda* grown in TSB (FKC, ■) or in 100  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl supplemented TSB (DP-FKC, ●). The fish was challenged by intraperitoneal injection with  $1 \times 10^6$  cells/ml of *E. tarda* at 4 weeks after vaccination. Control fish was injected with physiological saline (CON, ▲).

나타내었으나, 항원의 종류에 따른 실험구 사이의 생존율에는 차이를 볼 수 없었다. 2주째에 공격 주사한 결과는 FKC 항원을 처리한 실험구에서 30%의 생존율을 나타낸 것에 비하여, DP-FKC 항원을 투여한 실험구에서는 50%의 생존율을 나타내면서 두 실험구 사이의 생존율의 차

이가 나타나기 시작하였다. 항원 투여 후 3주째에 공격 시험한 결과는 FKC 항원을 처리한 실험구에서 50%의 생존율을 나타내었고 DP-FKC 항원을 투여한 실험구에서는 80%의 생존율을 나타내어 상당히 높은 생존율을 나타내었다. 마지막으로 4주째에 FKC 항원을 처리한 실험구에

서는 40%, DP-FKC 항원을 투여한 실험구에서는 70%의 생존율을 나타내었다. Vaccine 처리 후 4주 동안에 어제 방어력 조사 결과는 공격 주사 후의 생존율에서 3주째에 DP-FKC 항원을 투여한 실험구가 가장 높았다.

상대 생존율 조사 결과도 DP-FKC 항원 투여구가 FKC 항원 투여구보다 더 높게 나타났고 항원 투여 후 3주째에 최고 수준에 도달하였다.

이상의 결과를 종합해 보면, 동일한 양의 항원을 사용한 경우 FKC 항원을 사용하였을 때보다 2,2'-dipyridyl을 첨가하여 제작한 DP-FKC 항원을 사용한 경우 protein profile 변화가 나타나며 넘치에 vaccine으로 처리한 경우 면역원성에서도 차이가 나타났다. 이러한 결과는 iron chelate가 siderophore receptor로 작용하는 IROMPs의 발현을 더 강하게 자극하기 때문인 것으로 사료된다. 앞으로의 연구에서는 본 실험에서 나타난 IROMPs 각각의 역할과 기능에 대한 보다 다양하고 깊이 있는 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

*E. tarda*의 독성 비교를 위하여 일반 TSB, iron-chelate인 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB 및 Fe 첨가 TSB의 세 가지 조건에서 *E. tarda*를 배양하였다. 독성시험의 결과는 iron-chelate 첨가 시험구의 *E. tarda*에서 가장 낮은 독성을 나타내었다. 그리고 각각의 OMPs와 IROMPs을 분리하여 SDS-PAGE로 항원성을 비교한 결과, iron-chelate 첨가 시험구의 *E. tarda* IROMPs에서 68, 73 kDa 크기의 분자들이 더 많이 발현된다는 것을 확인할 수 있었다.

두 가지 vaccine 투여구 중에서 2,2'-dipyridyl 첨가 배지로 배양한 균체로 제작한 DP-FKC 항원 투여구가 응집 항체가 더 높게 나타났다. 면역반응의 변화를 알기 위한 응집 항체가 조사에서는 FKC 항원과 DP-FKC 항원 투여구에서 모두 대조구보다 높은 값을 나타내었고, 3주 째에 최고치를 나타내었다. ELISPOT을 이용한 항

체 생성 세포 수의 검출에서도 응집 항체가와 유사한 pattern을 나타내었는데, 두 가지 vaccine 투여구에서 2주 째에 가장 많은 항체 생성 세포 수를 나타내었다. 공격실험에서는 3주 째에 FKC 항원 투여구가 50%, DP-FKC 항원 투여구에서는 80%의 생존율을 나타내었다. 전체적으로 DP-FKC 항원 투여구의 생존율이 높게 나타났다.

이상의 결과로부터 넘치에 대한 *E. tarda*의 vaccine으로는 현재 연구되고 있는 FKC vaccine보다 철 결핍 조건에서 배양된 균체의 항원인 DP-FKC vaccine이 동일한 조건으로 사용하였을 때 더 나은 방어력을 가진다는 것을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Ahmed, M. D. and Joseph, C. N.: Effect of incubation temperature and salinity on expression of outer membrane protein profile of *Edwardsiella tarda*. J. Aquat. Anim. Health, 13: 269-275, 2001.
- Brown, M. R., Hosmin, A. and Costerton, J. W.: Surface antigens in vivo: a mirror for vaccine development. Can. J. Microbiol., 34: 494-498, 1988.
- Davey, M. L., Hancock, R. E. W. and Mutharia, L. M.: Influence of culture conditions of expression of the 40-kilodalton porin protein of *Vibrio anguillarum* serotype O2. Appl. Environ. Microbiol., 138-146, 1998.
- Davies, R. L., Gibbs, H. A., McLuskey, J., Coote, J. G., Freer, J. H. and Parton, R.: Development of an intraperitoneal implant chamber for the study of in vivo grown *Pasteurella haemolytica* in cattle. Microbial Pathogenesis, 16: 423-433, 1994.
- Duncan, J. C. and Sorum, H.: Outer membrane protein expression during in vivo cultivation of



- Vibrio salmonicida*. Fish & Shellfish Immunol., 8: 367-377, 1998.
- Durbin, M. and McLuskey, D.: Immunization against furunculosis in rainbow trout with iron-regulated membrane protein vaccines: relative efficacy of immersion, oral, and injection delivery. J. Aquat. Anim. Health, 11: 68-75, 1999.
- Gardun, R. A., Thornton, J. C. and Kay, W. W.: Fate of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* in the peritoneal cavity of rainbow trout. Can. J. Microbiol., 39: 1051-1058, 1993a.
- Gardun, R. A., Thornton, J. C. and Kay, W. W.: *Aeromonas salmonicida* grown in vivo. Infect. Immun., 61: 3854-3862, 1993b.
- Gilda, L. P. and Wakabayashi, H.: Immuno-response in tilapia *Sarotherodon niloticus* vaccinated with *Edwardsiella tarda* by hyperosmotic infiltration method. Vet. Immunol. Immunopathol., 12: 351-357, 1986.
- Gutierrez, M. A. and Miyazaki, T.: Responses of Japanese eels to oral challenge with *Edwardsiella tarda* after vaccination with formaline-killed cells or lipopolysaccharide of the bacterium. J. Aquat. Anim. Health, 6: 110-117, 1994.
- Hirst, I. D. and Ellis, A. E.: Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. Fish & Shellfish Immunol., 4: 29-45, 1994.
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685, 1970.
- Luywyche, P., Exner, M. M., Hancock, R. E. W. and Trust, T. J.: A conserved *Aeromonas salmonicida* porins provides protective immunity to rainbow trout. Infect. Immun., 63: 3137-3142, 1995.
- Mekuchi, T., Kiyokawa, T., Honda, K., Nakai, T. and Muroga, K.: Vaccination trials in the Japanese flounder against Edwardsiellosis. Fish Pathol., 30: 251-256, 1995.
- Rahman, M. H., Kuroda, A., Dijkstra, J. M., Kiryu, I., Nakanishi, T. and Ototake, M.: The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. Fish & Shellfish Immunol., 12: 169-179, 2002.
- Roberson, B. S.: Baterial agglutination. In Techniques of fish immunology (eds., Stolen, J. S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and van Muiswinkel, W.B.), SOS publications, Fair Haven, USA, 81-86, 1990.
- Salati, F., Hamaguchi, M. and Kusuda, R.: Immune response of red seabream to *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Pathol., 22: 93-98, 1987.
- Salati, F., Kawai, K. and Kusuda, R.: Immune response of eel against *Edwardsiella tarda* antigen. Fish Pathol., 18: 135-141, 1983.
- Salati, F. and Kusuda, R.: Chemical composition of lipopolysaccharide. Fish Pathol., 19: 187-192, 1985.
- Song, Y. L. and Kou, C. H.: The immuno-response of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studies by the immersion methods. Fish pathol., 15: 249-255, 1981.
- Suzuki, S., Kuroe, K. and Kusuda, R.: Characteristics of porins-like major outer membrane proteins of *Listonella anguillarum* serotypes J-O-1, -2 and -3. Biochem. Molecul. Biol. Internat. 32: 605-613, 1994.
- Suzuki, S., Kuroe, K., Yasue, K. and Kusuda, R.: Antigenicity and N-terminal amino acid sequence of a 35kDa porin-like protein of

- Listonella (Vibrio) anguillarum*: comparison among different serotypes and other bacterial species. Lett. Appl. Microbiol., 23: 257-260, 1996.
- Tu, X. and Kawai, K.: Isolation and characterization of major outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 33: 481-487, 1998.
- Tu, X. and Kawai, K.: Antigenic profile and protective role of a 37kDa major outer membrane protein of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 34: 59-64, 1999.
- Zierler, M. K. and Galan, J. E.: Paradigms in bacterial entry into host cells. J. Roth, C. Bolin, 21-45, 1995.
- 최혜승: 양식 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 병원성. 수진연보, 45: 197-205, 1989.
- 하재이, 박준효, 강명석, 정준기, 정현도: 수산생물의 생산과 관리에 관한 기초연구: ELISPOT 기법을 이용한 넙치의 항체 생성 세포 분석. J. Korean Fish Soc., 32: 420-426, 1999.

---

Manuscript Received : February 17, 2006

Revision Accepted : March 30, 2006

Responsible Editorial Member : Jung-Woo Park  
(Ulsan Univ.)