

## 원심분리법을 이용한 혈청 내 내독소의 개선된 측정방법 연구

최형좌<sup>1</sup>, 임유정<sup>1</sup>, 이은희<sup>2</sup>, 박진연<sup>1</sup>, 미글레나<sup>1</sup>, 박형순<sup>2</sup>, 강영선<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 의생명과학과

<sup>2</sup>다이하텍 코리아

Received : February 1, 2013 / Revised : April 9, 2013 / Accepted : April 11, 2013

**Development of an Improved Endotoxin Detection Method Using Centrifugation. Choi, Hyeong Jwa<sup>1</sup>, Yoo Jung Lim<sup>1</sup>, Eun Hee Lee<sup>2</sup>, Jin Yeon Park<sup>1</sup>, Miglena G. Prabagar<sup>1</sup>, Hyung Soon Park<sup>2</sup>, and Young Sun Kang<sup>1\*</sup>.** <sup>1</sup>Department of Biomedical Science & Technology, Institute of Biomedical Science & Technology (IBST), Konkuk University, Seoul 143-701, Korea, <sup>2</sup>Diatech Korea Co., LTD., Seoul 138-826, Korea

Endotoxins are part of the outer membrane of the cell wall of gram-negative bacteria and are continuously released during bacterial growth. Endotoxins typically induce severe sepsis and septic shock, which cause more than 50% of mortalities. Endotoxins are easily measured in the serum by the limulus amoebocyte lysate (LAL) test. However, a nonspecific result is obtained, because the high concentration of serum proteins disturbs the enzyme reaction of the LAL test. In order to solve this problem, the LAL test was performed in this study after the centrifugation of the boiled serum samples to remove the impurities. As a result, among the various conditions examined, endotoxin measurement with the LAL test was the most accurate and repeatable after centrifugation of the boiled serum at 100°C. Moreover, the endotoxin was accurately and repeatedly measured from the prepared sera of mice that had been administered an intraperitoneal injection of purified lipopolysaccharides (LPS) or *E. coli*. Therefore, the application of centrifugation to remove impurities from boiled serum gives an accurate measurement of endotoxins in the sera of normal subjects or patients, and this will lead to the improved diagnosis and prevention of diseases caused by endotoxins. In addition, the centrifugation of boiled serum samples should be considered and included in the development of endotoxin test kits.

**Keywords:** Endotoxin, sepsis, LAL test, centrifugation, serum

내독소는 그람 음성균의 외벽 구성 물질로 외부 세포막, 즉 세포벽에 존재하며 세균 표면적의 75%를 차지하고 있으며, 박테리아가 증식하거나 사멸될 때 세포의 벽이 깨지면서 외부로 방출된다[9]. 내독소는 신체 내 감염되어 증식중인 그람 음성균으로부터 분비되어 이것이 혈류 내로 유입되어 순환하면서 면역반응을 일으킨다. 내독소는 혈액 속으로 두 가지 방법으로 유입된다. 하나는 생체 외부에서 그람 음성균이 체내로 직접 감염되는 경우이고, 나머지 하나는 외상과 같은 systemic insults에 의해서 장 막의 투과성이 증가함에 의해 생체 내의 그람 음성균이나 그 파편들이 혈액 내로 이동하는 경우이다[21]. 내독소는 200-1,000 kDa 정도로 매우 크기가 크고, 단백질이 변성되는 고온(100°C 내외)에서도 활성이 유지 되는 등 생물학적으로 매우 안정적인 물질이다[19]. 따라

서 내독소의 활성을 파괴하기 위해서는 200°C 이상의 고온이나 강산 또는 강염기 조건에서 몇 시간 이상 반응 시켜야 한다. 이와 같은 구조적 안정성을 통해 내독소는 패혈증, 수막염균혈증(meningococemia) 그리고 장내 세균 전이로 인한 합병증 등과 같이 다양하고 심각한 임상 증상을 나타낸다[21].

내독소에 의한 증상은 숙주의 면역계통, 응고계통, 신경호르몬계통 등 신체의 다양한 기능계통에 영향을 주어 이와 관련된 전신반응으로 나타나기 때문에 복잡하고 다양한 임상 반응을 보인다[12]. 패혈증은 중증 패혈증(severe sepsis)과 패혈성 쇼크(septic shock) 그리고 복합 장기부전 등으로 진행되고 사망률이 50% 이상에 이르는 심각한 질환이며 많은 경제적 부담을 증가시키고 있다[6]. 비인두에 자연적으로 서식하고 있는 그람 음성균인 *N. meningitidis*에 의해 발생된 내독소는 신경계 조직에 손상을 주어 뇌수막염을 일으켜 높은 사망률을 보인다[4]. 내독소는 inflammatory bowel disease [23], 알코올성 간 질환, 간경변, 황달 환자들에서 LPS level이 높아져 있고, 내독소가 여러 간 질환 및 합병증

### \*Corresponding author

Tel: +82-2-2049-6023, Fax: +82-2-446-9001

E-mail: kangyo67@konkuk.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

을 일으키는 원인으로 알려져 있다[3, 18]. 남성 섬유증 환자들은 *Pseudomonas aeruginosa*와 같은 그람 음성균에 의한 폐 감염이 유발되고 내독소에 노출되어 천식에 걸렸을 때와 비슷한 호흡기적 증상을 보이며, 지속적인 내독소의 노출에 의해 호흡계의 기능이 감소한다[13]. *E. coli* O157:H7은 신부전증, 용혈성 빈혈, 혈소판 감소증, 출혈성 장염등으로 특징지어지는 생명을 위협하는 용혈성 요독 증후군을 일으킨다[11]. 외상으로 인한 심각한 출혈은 쇼크를 일으키고 이는 복부 장기에 혈액 부족으로 인한 국소 빈혈로 장기 내 정상 세균무리가 다른 장기로 파급 되 장내 세균전위가 일어나며[17], 패혈증이나 다발성 장기부전의 주요 원인인 그람 음성균과 부산물인 내독소가 급격하게 생성된다[1]. 또한 심혈관계 수술이나 화상의 경우에도 장내 세균전위로 인한 비정상적인 염증 반응을 일으키고 회복 시간을 더디게 하여 패혈증으로 진행될 수 있다. 이 외에도 음식물, 물, 특정 백신 등 도처에 존재하는 내독소는 자가면역질환의 발달과 지속에 관련이 있을 것으로 추측된다.

현재 내독소에 의한 다양한 임상적 질환의 치료를 위해 즉각적인 소생법과 항생제 주사 등 단순한 생명유지 방법만이 수행되고 있다. 그러나 이는 근본적인 치료가 되지 않고 있으며, 그 원인으로는 내독소에 의한 패혈증 및 합병증이 매우 다양하고 여러 질병에 걸쳐 나타나기 때문이다. 이러한 내독소에 의한 다양한 임상적 질환의 치료를 위해서는 무엇보다도 조기진단 및 치료가 가장 우선시 되고 있다[12]. 특히, 패혈증의 근본 원인인 내독소의 정확한 진단이 가장 중요하다. 현재 내독소를 검사하기 위해 널리 쓰이고 있는 방법으로는 여러 가지 방법이 있지만 그 중에서도 LAL test 방법이 가장 널리 사용되고 있다. LAL test는 투구계의 순환 혈액세포 추출물이 내독소와 반응하면 겔을 형성하는데 이때 형성된 겔을 겔화법(gel clot), 비탁법(KTA: kinetic turbidimetric assay), 비색법(KCA: kinetic chromogenic assay)으로 측정 및 분석하는 방법이며[9], 사람 혈장 또는 혈청에서 내독소의 측정에 널리 이용되고 있다. 겔화법은 가장 간단한 측정 방법이지만 감도는 최대 0.03 EU/ml까지 측정 가능하며, 세가지 LAL test 중 가장 감도가 낮다. 비탁법은 LAL 시약과 내독소 과의 clotting 반응에 의한 탁도 변화를 340 nm에서 광학분석장치로 측정하는 방법으로 LAL test에서 가장 감도가 좋은 시험방법이다. 비색법은 chromogenic substrate가 endotoxin-activated clotting enzyme에 의해 분해되면서 노란색을 발색하는데 이를 405 nm에서 발색 정도를 측정하는 방법이다.

LAL test는 사용하기 간편하고 내독소와 특이적으로 반응한다는 장점이 있지만, 사람 혈청에 존재하는 내독소를 측정하려 할 때 혈청 내 고농도의 구성 단백질들이 LAL과 내독

소의 반응을 방해 해 비 특이적인 결과를 얻게 된다는 문제점이 있다. 특히 내독소는 흡착력이 좋아 라이소자임[15], 락토페린[8] 및 트랜스페린[2]에도 잘 결합하는 것으로 알려져 있기 때문에 혈청 내에 존재하는 내독소를 여러 구성단백질들로부터 효과적으로 분리하여 그 양을 정확하게 측정하기가 쉽지 않다. 본 연구에서는 단백질 변성 온도에서 먼저 단백질들을 변성 시킨 후 간단한 원심분리를 이용한 단백질침강법을 이용해 혈청에서 단백질들을 제거시키고, 그 추출액과 LAL 반응을 시킬 경우 보다 정확하고 반복적인 내독소의 검사가 가능함을 생체 내 외에서 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 실험동물

LAL test용 시약은 표준곡선을 작성하기 위해 *E. coli* 055:B5에서 분리한 control standard endotoxin (CSE)과 LAL reagent를 용해시키기 위해 사용되는 LAL reagent water (LRW), 그리고 분말 형태의 amebocyte lysate (LAL reagent)를 다이아텍 코리아에서 구입하여 사용하였다. 인간 혈청을 희석시키기 위해서는 dispersing agent (BD100 buffer)를 사용하였다. LAL test에 이용되는 96 well plate, micro tube, micro tips 등은 모두 pyrogen free (Axygen, USA) 제품을 사용하였다. LAL의 측정은 turbidimetric assay 방법을 사용하였으며, 분석 장치로는 Spectra MAX 190 (Molecular devices, USA)을 이용하였다. *In vivo* 실험을 위해 13주 된 암컷의 C57BL/6종의 마우스를 사용하였다. *E. coli* 055:B5종에서 분리한 LPS (L2880, Sigma, USA)를 사용하였고, 사용하였고, *E. coli*는 DH5 $\alpha$  종을 배양하여 각각 마우스에 주사하였다.

모든 동물실험 절차는 건국대학교 실험동물위원회(The Institutional Animal Care and Use Committee, Permit Number : KU11107)의 승인 하에 실험동물 보호 및 사용에 대한 가이드를 준수하여 실험하였다.

### 내독소 측정방법

내독소를 측정하는 여러가지 방법 중 LAL 방법을 사용하였다[16]. 혈청을 dispersing agent로 1/10 희석하고, CSE를 0.5, 0.05, 0.005 EU/ml이 되도록 처리하였다. 각각을 80°C, 100°C에서 10분 동안 가열 및 끓이고, 16,100 xg에서 10분 동안 원심분리한 후 그 중 100  $\mu$ l만 96 well plate로 옮겼다. LAL reagent를 100  $\mu$ l씩 각각 넣고 37°C에서 1시간 동안 교반 없이 반응시켜 340 nm에서 0.05 optical density에 도달하는 시간을 측정하는 방법인 kinetic turbidimetric assay 방법으로 측정하였다.

**LPS 주사 및 혈청분리**

13주령 C57BL/6 마우스에 *E. coli* O55:B5 종에서 분리한 LPS (L2880, Sigma, USA) 100 µg을 복강주사 하고 12시간, 60시간 후에 희생시킨 후 심장에서부터 대량 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈청을 얻어 LAL test로 측정하였다.

***E. coli* 주사 및 혈청분리**

*E. coli* (DH5α)를 Luria-Bertani (LB) 배지 상에서 37°C, 300 rpm의 조건으로 진탕배양기에서 12시간 배양하였다. 새로운 LB 배지에 2차 배양 후 spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서 흡광도 값이 0.4-0.6이 나오도록 1시간 마다 측정하였다. 2,000 xg에서 원심분리 하여 *E. coli*를 배지와 분리 후 가라앉은 *E. coli*를 PBS로 세척한 후에 1 × 10<sup>6</sup>개/400 µl 가 되도록 세균 수를 계산하여 PBS에 희석하였다. 13주령 C57BL/6 마우스에 400 µl의 PBS에 희석한 1 × 10<sup>6</sup>개 *E. coli*를 복강 내 주사하고, 12시간, 40시간 후 안와정맥에서 혈액을 채취 한 후 원심분리하여 혈청을 얻고 이것을 LAL test로 측정하였다.

**결과 및 고찰**

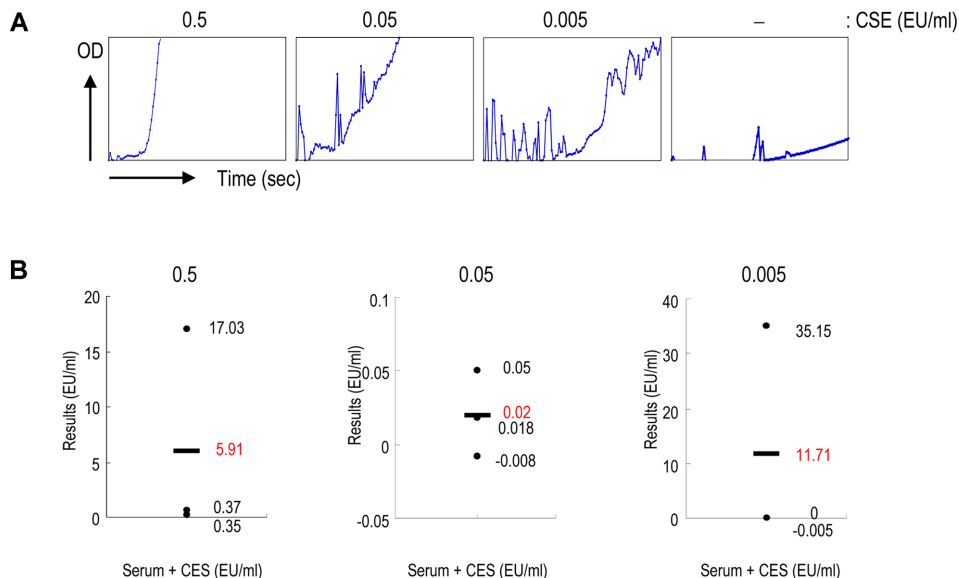
**원심분리를 하지 않은 경우 혈청 내 내독소의 LAL 측정값이 불안정하다.**

우선 LAL test법을 이용한 기존의 내독소를 측정방법에 어떠한 문제점이 있는지를 규명하기 위해 혈청에 알려진 양

의 LPS를 첨가하고 기존의 LAL test법을 통해 내독소의 양을 측정하였다. 혈청에 존재하는 여러 구성 단백질들이 LAL 반응을 방해하므로 이들 혈청 내 구성단백질을 제거하기 위해서는 혈청을 1/10로 희석한 후 끓이는 방법이 가장 효과적임이 여러 연구를 통해서 규명되었다[5, 7, 10, 20, 22]. 이에 따라서 혈청에 알려진 양의 LPS를 첨가하고 80°C에서 10분간 시료를 가열하고 LAL test를 수행하였다. 그 결과 kinetic 그래프가 일정하지 않고 불안정함을 확인하였다(Fig. 1A). 그 결과를 더욱 정확하게 분석하기 위해 분산형 그래프로 표시한 결과 내독소 측정값이 매우 부정확함이 재확인 되었다(Fig. 1B). 또한 대조군으로 1/10 희석한 혈청만 넣은 LRW에서도 0.02-0.03 EU/ml 정도의 내독소 측정값을 나타내기 때문에 기존의 LAL test 방법으로는 혈청 내 정확한 내독소 양의 측정이 불가능함이 확인되었다. 이 결과들을 통해 혈청시료를 끓이는 과정 만으로는 혈청에 존재하는 LAL 반응 저해효과를 유발하는 여러 구성단백질들을 효과적으로 억제 및 제거하지 못함을 확인하였다.

**원심분리를 통해 혈청 내 내독소 측정의 정확성이 향상되었다.**

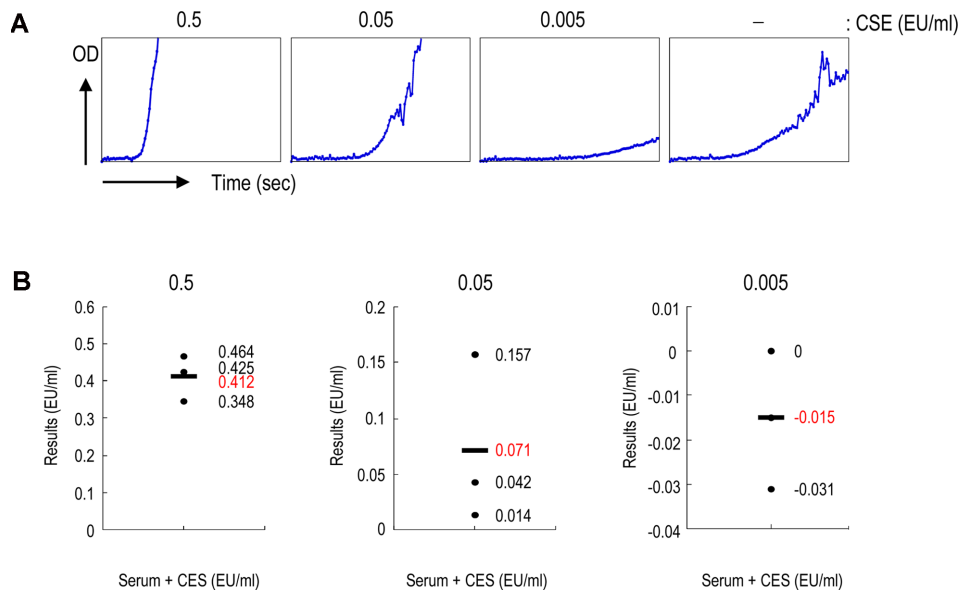
80°C 이상에서 가열하는 방법에서는 혈청 내 구성단백질들에 의한 LAL 측정 방해를 막기 위해 원심분리 방법이 꼭 필요함이 제안되었다[14]. 따라서 이에 알려진 내독소 양이 첨가된 혈청 시료를 80°C에서 10분 동안 가열한 후 16,100 xg에서 10분 동안 원심분리를 하고 그 상층액만 이용해 LAL test를 실시하였다(Fig. 2). 실험결과, 원심분리 없이 80°C에



**Fig. 1. Endotoxin detection by using boiled serum at 80°C without centrifugation.** The sera were diluted with a dispersing agent into 1 to 10, and 0.5, 0.05, or 0.005 EU/ml of CSE was added. After boiling the serum samples at 80°C for 10 min, the endotoxin in the samples was analyzed by using the LAL test. The results are shown as a kinetic graph (A) and scatter graph (B).

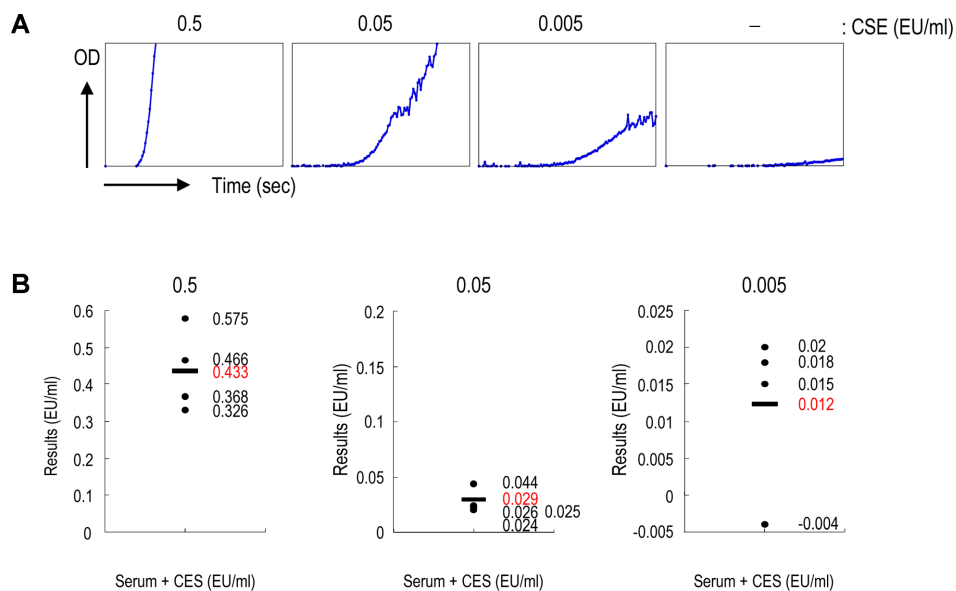
서 가열하기만 한 시료를 이용하는 경우와는 달리, 원심분리를 한 혈청시료의 경우 LAL kinetic 그래프가 불규칙하지 않고, 결과값 또한 비교적 일정함을 확인할 수 있었다. 이를 통해 혈액 내 구성단백질들에 의한 LAL test저해를 막기 위해서는 혈청시료의 원심분리가 필수적임을 확인할 수 있었다.

하지만 내독소가 비교적 낮은 0.05 EU/ml, 0.005 EU/ml의 농도에서는 결과값의 차이가 심하고, 대조군에서도 여전히 0.01-0.03 EU/ml 정도의 값을 나타낸다. 따라서 80°C에서 혈청시료를 가열하고 원심분리를 한 경우에도 내독소의 양을 정확하게 측정하기에는 부족한 것으로 규명되었다.



**Fig. 2. Endotoxin detection by using boiled serum at 80°C with centrifugation.**

The sera were prepared as described in Fig. 1 and then centrifuged at 16,100 ×g for 10 min. The supernatants of the serum samples were then analyzed with the LAL test to measure the endotoxin. The results are shown as a kinetic graph (A) and scatter graph (B).



**Fig. 3. Endotoxin detection by using boiled serum at 100°C with centrifugation.**

The sera were diluted with a dispersing agent into 1 to 10, and 0.5, 0.05, or 0.005 EU/ml of CSE was added. After boiling the serum samples at 100°C for 10 min and centrifuging at 16,100 ×g, the endotoxin was analyzed with the LAL test. The results are shown as a kinetic graph (A) and scatter graph (B).



**혈청시료를 100°C에서 끓인 경우 혈청 내 내독소 측정이 가장 정확하였다.**

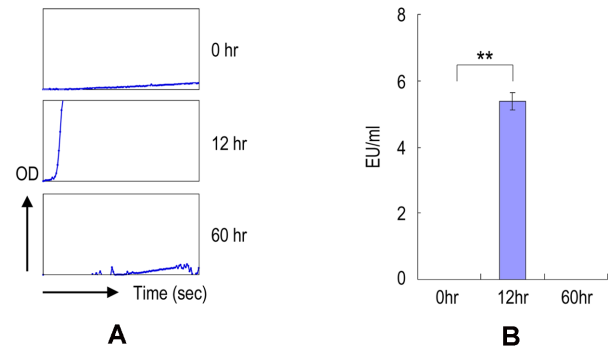
혈청 내 구성단백질들에 의한 LAL test 저해효과를 감소시키고 내독소를 더욱 효과적으로 분리해 내기 위해 알려진 양의 내독소가 첨가된 혈청시료를 100°C에서 끓이고 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 상층액을 이용하여 LAL test를 수행한 결과 80°C에서 혈청시료를 가열 한 후 원심분리를 했을 때 보다, 더 정확한 kinetic 그래프와 결과값을 확인하였다(Fig. 3). 무엇보다도, 대조군인 LRW군에서 0-0.009 EU/ml 정도의 가장 낮은 결과값을 나타냈으며(Fig. 3A), 결과값을 분산형 그래프로 그린 결과에서도 가장 안정적인 그래프가 그려짐을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이를 통해 혈청시료를 끓인 후 곧바로 LAL test를 시행할 경우 혈청 내 구성단백질들이 LAL 저해기능을 상실할 뿐 오히려 LAL reagent와 반응하여 내독소 측정에 영향을 미칠 수 있으며 단백질 변성 후에 이들을 제거하는 과정이 꼭 필요함을 규명하였다.

**LPS 감염 생쥐 실험동물의 혈청을 이용해 정확한 내독소 측정을 위해서 원심분리법이 필요함을 재확인하였다.**

내독소의 정확한 측정을 위해서는 혈청시료를 100°C에서 끓인 후 원심분리가 필수적임이 확인되었다. 따라서 이 방법을 LPS 또는 *E. coli*가 투여된 생쥐의 혈청시료에 적용하였을 때에도 정확하게 *E. coli*의 내독소를 검출해 낼 수 있는지 확인하였다. 우선, C57BL/B6 생쥐에 LPS를 100 µg 복강 내 주사하고 12, 60시간 후에 생쥐 혈액을 채취하고 혈청을 분리하였다. 혈청들을 dispersing agent와 1/10로 희석한 후 혈청시료를 100°C에서 끓이고 16,100 ×g 10분 동안 원심분리 한 다음 LAL test를 수행하였다. 12시간 후 혈청시료에서 유의성 있게 내독소가 검출되기 시작하였으며(Fig. 4A), 60시간 후에는 내독소가 검출되지 않았다. 이 결과를 확인하기 위해 4마리 생쥐에서 동일한 실험을 수행하였으며, 측정된 내독소의 양을 그래프로 작성한 결과, 12시간 후에 대부분 내독소가 다량 검출됨이 재확인되었다(Fig. 4B).

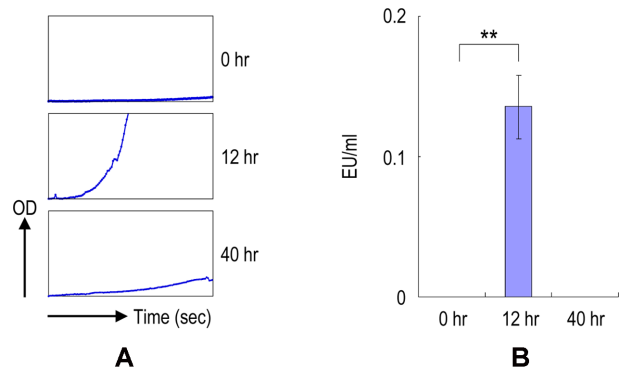
***E. coli* 감염 생쥐 실험동물의 혈청에서도 원심분리법을 통해 정확한 내독소 측정이 가능하였다.**

*E. coli* (DH5α)를 LB 배지에서 배양 후, 600 nm에서 흡광도 값이 0.4-0.6이 되는 시기에 PBS로 세척하고 원심분리하여 *E. coli* 만을 회수하였다. 1 × 10<sup>6</sup>개의 *E. coli*를 400 µl의 PBS에 희석한 후 생쥐에 복강 내 주사하고, 12 및 40시간 후 혈액을 채취하였다. 혈액으로부터 혈청을 분리한 후 dispersing agent와 1/10으로 희석하고 희석된 혈청시료를 100°C에서 끓이고 16,100 ×g으로 10분 동안 원심분리 한 다음 LAL test를 수행하였다. LPS의 생체 내 실험에서와 유사하게 *E. coli*



**Fig. 4. *In vivo* endotoxin detection from mice sera after intraperitoneal injection of LPS.**

Mice were intraperitoneally injected with 100 µg of LPS for 12 and 60 h, and the sera were then prepared from the blood collected by retro-orbital bleeding. The sera were diluted with a dispersing agent into 1 to 10, and boiled at 100°C for 10 min, followed by centrifugation at 16,100 ×g for 10 min. The supernatants of the serum samples were analyzed for LPS by using the LAL test (A). The data of the results are shown as a bar graph (n = 4 mice per group, \*\*p > .001 as determined by Student's unpaired t-test) (B).



**Fig. 5. *In vivo* endotoxin detection from mice sera after intraperitoneal injection of *E. coli*.**

Mice were intraperitoneally injected with *E. coli* (1 × 10<sup>6</sup>) for 12 and 40 h and then sera were prepared from the blood collected by retro-orbital bleeding. The sera were diluted with a dispersing agent into 1 to 10, and boiled at 100°C for 10 min, followed by centrifugation at 16,100 ×g for 10 min. The supernatants of the serum samples were analyzed for LPS by using the LAL test (A). The data of the results are shown as a bar graph (n = 4 mice per group, \*\*p > .001 as determined by Student's unpaired t-test) (B).

감염생쥐의 혈액으로부터도 12시간 후 혈청으로부터 내독소를 검출할 수 있었으나, 40시간 후에는 내독소가 현저히 감소하였다(Fig. 5A). *E. coli* 감염 실험동물의 혈청을 이용한 내독소 측정 결과를 재확인하기 위해 4마리 생쥐에 *E. coli*를 감염시키고 동일한 실험을 수행하고 내독소의 양을 그래프로 작성한 결과, 12시간 후에 내독소가 다량 검출되고 40시간 후에는 그 양이 감소됨이 재확인되었다(Fig. 5B).

내독소는 단백질이 변성되는 고열에서 안정하다는 특성을 이용하여 1/10으로 희석된 혈청시료를 80°C에서 가열한 후 LAL test로 일반적으로 측정한다. 그러나 기존 방법은 혈청시료를 끓여서 단백질 활성만 제거하였지 그것을 내독소로부터 제거하지 않았기 때문에 LAL test 시에 간섭 영향을 주어 정확한 측정이 가능하지 않았다. 또한, 혈청에 존재하는 매우 다양한 구성단백질들이 내독소와 결합하고 있을 뿐만 아니라, LAL 반응을 저해하기 때문에 정확한 내독소를 측정하기 위해서는 혈청 내 단백질을 제거하는 과정이 필수적인 것으로 제안되고 있다. 따라서 본 실험에서는 끓인 혈청시료의 원심분리를 통해 간편하게 혈청내의 내독소로부터 불활성된 단백질을 분리한 후 정확한 내독소의 측정이 가능함을 살펴보았다.

우선, 알고 있는 LPS양이 첨가된 혈청시료를 80°C에서 가열한 후 원심분리를 하지 않은 상태에서 LAL test를 수행한 결과, 내독소 양에 대한 측정값이 정확하지도 않았을 뿐만 아니라 반복적이지도 않았다(Fig. 1). 또한 LPS가 첨가되지 않은 대조군에서도 내독소가 존재하는 결과를 얻었다(Fig. 1A, 맨 오른쪽 결과). 따라서 혈청시료로부터 내독소를 정확하게 측정하기 위해서는 반드시 원심분리법이 필요함을 확인하였다. 이번에는 알고 있는 LPS양이 첨가된 혈청시료를 80°C에서 가열하고 원심분리한 후 LAL test를 수행하였다. 그 결과, 보다 안정적이고 정확한 내독소 양을 측정할 수 있었다(Fig. 2). 그러나 내독소 농도가 낮게 첨가된 혈청시료에서는 측정값의 편차가 심하고 여전히 내독소가 첨가되지 않은 대조군 혈청시료에서도 내독소가 존재하는 것으로 측정되었기 때문에(Fig. 2A 맨 오른쪽 결과), 보다 개선된 조건이 필요함을 확인하였다. 따라서, LPS를 혈액 내 구성단백질로부터 더욱 효과적으로 분리해 내기 위해 혈청시료를 100°C에서 끓인 후 원심분리하고 LAL test를 수행하였다. 그 결과, 가장 정확하고 반복적인 내독소 측정값을 얻을 수 있었다(Fig. 3). 이를 통해 혈청시료로부터 내독소의 양을 정확하게 측정하기 위해서는 80°C에서 가열하는 것 보다는 100°C에서 시료를 끓이고 반드시 원심분리를 통해 불순물을 제거할 필요가 있음을 규명하였다.

끓인 혈청시료의 원심분리를 통한 내독소 측정값의 정확성이 생체 내 혈액시료를 이용해서도 반복되는지 확인하여, 새롭게 설정된 내독소 측정방법이 임상에서도 응용가능한지 확인해보았다. LPS 또는 *E. coli*가 복강 내로 투여된 실험용 생쥐의 희석된 혈청시료를 100°C에서 끓인 후 원심분리하고 LAL test를 수행한 결과, 생체 외 실험에서와 동일하게 정확한 내독소 측정값을 얻을 수 있었다(각각 Fig. 4와 5). 특히, *E. coli*가 감염된 실험용 생쥐 혈액으로부터도 정확하게 내독소 양을 측정할 수 있기 때문에 이번 연구에서 개선된 내독소 측정방법은 정상인 및 환자 혈액의 내독소 검사를 위

해서 사용될 수 있음을 확인시켜 주었다. 또한 희석된 혈청을 100°C에서 끓인 후 원심분리를 하면 변성된 단백질들의 덩어리로 추정되는 침전물이 생기는데 이를 제거해야만 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 이들 침전물들을 분리 분석하여 LAL test 시에 간섭 영향을 주는 혈청 단백질들이 증명된다면, 혈청시료를 이용한 내독소 측정 시 원심분리 과정이 왜 중요한지를 규명할 수 있을 것이다.

본 연구결과를 통해 사람의 혈액으로부터 내독소를 측정하기 위해 기존의 끓인 혈청시료에 대한 LAL test를 수행하되 원심분리하는 과정을 거침으로서 보다 정확한 내독소의 양을 측정할 수 있을 것이며, 이를 통해 내독소와 질병과의 상관관계를 규명하고 관련 질병의 예방도 가능할 것이다. 더 나아가 이 기술을 응용하여 단백질침전 kit를 포함한 임상에서 사용 가능한 내독소 검사 kit의 개발 시 시료의 원심분리를 통한 불순물의 제거가 반드시 고려되어야 할 것으로 사료된다.

## Acknowledgment

This work was supported by a Diatech Korea Co., Ltd and by the research Grant from Konkuk university in 2012.

## References

- Berg, R. D. 1999. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv. Exp. Med. Biol.* **473**: 11-30.
- Berger, D. and H. G. Beger. 1988. Comparison of the endotoxin-binding capacity of human transferrin and a human applicable immunoglobulin preparation. *Arzneimittelforschung* **38**: 817-820.
- Bode, C., H. Fukui, and C. J. Bode. 1993. 'Hidden' endotoxin in plasma of patients with alcoholic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **5**: 257-262.
- Brandtzaeg, P., P. Kierulf, P. Gaustad, A. Skulberg, J. N. Bruun, S. Halvorsen, and E. Sorensen. 1989. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J. Infect. Dis.* **159**: 195-204.
- Brandtzaeg, P., O. Oktedalen, P. Kierulf, and P. K. Opstad. 1989. Elevated VIP and endotoxin plasma levels in human gram-negative septic shock. *Regul. Pept.* **24**: 37-44.
- Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**: 885-891.
- Danner, R. L., R. J. Elin, J. M. Hosseini, R. A. Wesley, J. M. Reilly, and J. E. Parillo. 1991. Endotoxemia in human septic shock. *Chest.* **99**: 169-175.
- Elass-Rochard, E., A. Roseanu, D. Legrand, M. Trif, V. Salmon, C. Motas, J. Montreuil, and G. Spik. 1995. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* O55B5 lipopolysaccharide. *Biochem. J.*

- 312(Pt 3): 839-845.
9. Hurley, J. C. 1995. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 268-292.
  10. Jacob, A. I., P. K. Goldberg, N. Bloom, G. A. Degenshein, and P. J. Kozinn. 1977. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* **72**: 1268-1270.
  11. Kaplan, B. S., T. G. Cleary, and T. G. Obrig. 1990. Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes. *Pediatr. Nephrol.* **4**: 276-283.
  12. Lee, C. Y. 2010. Current insights into sepsis treatments. *The Korean Soc. Critical Care Med.* **25**: 207-211.
  13. Milton, D. K., D. Wypij, D. Kriebel, M. D. Walters, S. K. Hammond, and J. S. Evans. 1996. Endotoxin exposure-response in a fiberglass manufacturing facility. *Am. J. Ind. Med.* **29**: 3-13.
  14. Novitsky, T. J. 1994. Limulus amoebocyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood. *J. Endotoxin Res.* **1**: 253-263.
  15. Ohno, N. and D. C. Morrison. 1989. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **264**: 4434-4441.
  16. Pearson, F. C., J. Dubczak, M. Weary, G. Bruszer, and G. Donohue. 1985. Detection of endotoxin in the plasma of patients with gram-negative bacterial sepsis by the Limulus amoebocyte lysate assay. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 865-868.
  17. Saadia, R., M. Schein, C. MacFarlane, and K. D. Boffard. 1990. Gut barrier function and the surgeon. *Br. J. Surg.* **77**: 487-492.
  18. Schafer, C., B. Greiner, J. Landig, E. Feil, E. T. Schutz, J. C. Bode, and C. Bode. 1997. Decreased endotoxin-binding capacity of whole blood in patients with alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* **26**: 567-573.
  19. Sharma, S. K. 1986. Endotoxin detection and elimination in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**: 5-22.
  20. Shenep, J. L. and K. A. Mogan. 1984. Kinetics of endotoxin release during antibiotic therapy for experimental gram-negative bacterial sepsis. *J. Infect. Dis.* **150**: 380-388.
  21. Silverman, M. H. and M. J. Ostro. 1998. Bacterial endotoxin in human diseases, XOMA. Princeton corporate center. Berkeley, CA, USA.
  22. van Deventer, S. J., W. Pauw, J. W. ten Cate, M. E. Janssen, H. R. Buller, and A. Sturk. 1987. Clinical evaluation in febrile patients of an optimized endotoxin assay in blood. *Prog. Clin. Biol. Res.* **231**: 489-499.
  23. van Deventer, S. J., J. W. ten Cate, and G. N. Tytgat. 1988. Intestinal endotoxemia. Clinical significance. *Gastroenterology* **94**: 825-831.