

## SDS 처리한 브루셀라 항원과 *Yersinia enterocolitica* O:9주의 혈청학적 교차반응 연구

임윤규 양기천 이경갑 박전홍 이두식  
박용호\* 강승원\* 목지원\*\* 이영순\*\*\*

\*농촌진흥청 가축위생연구소,

\*\*국립보건안전연구원, \*\*\*서울대학교 수의과대학

### Serological Cross-Reaction with *Brucella abortus* Antigen Extracted by Sodium Dodecyl Sulfate and *Yersinia enterocolitica* O:9

Yoon-kyu Lim, Ki-chun Yang, Kyung-kap Lee,  
Jun-hong Park, Doo-sik Lee, Yong-ho park\*, Seung-won  
Kang\*, Ji-won Mok\*\* and Yong-soon Lee\*\*\*  
Department of Veterinary Medicine, Cheju National  
University

Veterinary Research Institute, RDA\*  
National Institute of Safety Research\*\*  
College of Veterinary Medicine, Seoul National  
University\*\*\*

### ABSTRACT

*Brucella abortus* cell wall antigen was extracted from *Brucella abortus* 1119-3 by ultrasonication and followed by Sodium Dodecyl Sulfate(SDS) treatment. In order to confirm whether this preparation is serologically cross reactive with *Yersinia enterocolitica* O:9, Western blot analysis with mouse anti-*Brucella abortus*1119-3 and with mouse anti-*Yersinia enterocolitica* O:9 was performed. ELISA results from using those *Brucella* antigen and *Yersinia* antigen were assessed whether they had correlation.

According to the results of western blot analysis and ELISA, there was no evidence of cross reactivity between the *Brucella abortus* 1119-3 antigen preparation and *Yersinia enterocolitica* O:9. Therefore the SDS treated antigen prepared in this study could be suitably used as specific ELISA antigen without confusion in the

interpretation of serological tests for brucellosis in cattle.

### 서론

브루셀라병은 1955년에 미국으로부터 수입된 젖소 124두에 대한 혈청학적 검사결과 30두가 양성반응우로 판정된 것이 최초의 공식 보고이다<sup>1)</sup>. 우리나라에서는 이병을 법정전염병으로 지정하여 모든 축우를 대상으로 정기적인 검진을 실시하고 양성축을 도태시켜 이병을 근절시키고자 노력을 하고 있다<sup>2)</sup>. 그러므로 브루셀라병 감염여부를 간편하고도 정확하게 그리고 더욱 조기에 진단할 수 있는 감도높은 검사법의 실용화가 요구되고 있다. 현재 이용되고 있는 공정진단법은, Rose Bengal 방법으로 screening 후 보체결합반응법(CF test)으로 확정진단하는 방법을 택하고 있다.<sup>3)</sup>

근래에 널리 이용되는 ELISA법은 기존의 일반적인 혈청학적인 검사법보다 민감도와 특이도가 양호한 것으로 알려져 있으므로 축우에서의 브루셀라병 감염 진단에 ELISA법을 적용시킨다면 이 병의 방역사업에 유용할 것으로 생각된다. 한편 브루셀라균과 혈청학적인 교차반응이 성립하는 균주 중 자연계에 상재하는 *Yersinia enterocolitica* O:9주는 특히 중요한 것으로 알려져 있으며<sup>4,5)</sup>, 응집반응을 이용한 브루셀라병 감염진단시 비특이적인 가양성반응을 야기시킬 우려가 있어 국내에서도 안 등<sup>6)</sup>에 의하여 감별진단의 방법론을 보고한 바 있다.

이 연구에서는 브루셀라병 감염진단을 위한 감도높은 ELISA법을 개발함에 있어서 필요한 특이항원을 제조하기 위하여 *Brucella abortus* 1119-3배양균을 초음파처리로 분쇄한 후 sodium dodecyl sulfate(SDS)로 처리하여 준비하여 보았으며, 이렇게 준비된 항원이 *Yersinia enterocolitica* O:9과 혈청학적인 교차반응이 일어나는가의 여부를 Western blot의 방법으로 확인하였다. 또한 *Brucella abortus*1119-3주의 처리항원과 *Yersinia enterocolitica* O:9주의 처리항원으로 ELISA를 실시하여 반응값간에 상호 관련을 보이는가의 여부를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 항원의 준비:

1) 브루셀라항원: 농촌진흥청 가축위생연구소에서 분양받은 *Brucella abortus* 1119-3 주와 제주도의 감염우에서 분리한 *Brucella abortus* biotype1 주를 brucella agar에 배양 수확하여, Jagannath 와 Sehgal의 방법<sup>7)</sup>을 응용하여 준비하였다. 즉, 냉 아세톤으로 냉장온도 (4°C) 에서 18시간 처리하여 침전된 균체를 생리식염수로 세척하여 10% (w/v) 부유액으로 만든 후, ice bath 내에서 초음파 분쇄하였다 ( 120 W X 20 min., Ohtake Works, Japan). 초음파 처리한 균체액은 원심분리 ( 20,000 X g for 20 min. at 4°C ) 하여 상층액을 회수하여 SONI 항원(초음파 분쇄항원) 이라 칭하였다. 침전물은 생리식염수로 세척한 후 SDS를 0.01% 되게 용해하여 30 °C 에서 1 시간 정치시킨 다음 원심분리(60,000 x g for 20 min.)하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액 중 잔여의 SDS는 phosphate buffered saline (PBS)으로 평형된 Column PD 10 (Pharmacia, Sweden)을 사용하여 제거하였으며 이는 SDS 항원(SDS처리 후 항원)이라 칭하였다.

2) *Yersinia enterocolitica*O:9 항원: 가축위생연구소에서 분양받은 *Yersinia enterocolitica* O:9 주를 trypticase soy agar에 37°C로 배양하여 오염이 없음을 확인하고, trypticase soy agar에 다시 도말하여 37°C에 3일간 배양을 하였다. 배양된 균은 생리식염수로 부유시켜 수확한 후 5°C, 2500rpm에서 30분씩 6회 세척하고 브루셀라균의 항원제조와 동일한 방법으로 제조하였다.

**항혈청제조:** Western blot 분석에 사용하기 위하여 *Brucella abortus* 1119-3주 및 *Yersinia enterocolitica* O:9 주를 마우스에 접종하여 항혈청을 얻었다.

1) 마우스: 제주대학교 동물과학연구소에서 분양받은 8주령의 ICR 마우스 스킷 각 6수씩 12수를 사용하였다.

2) 면역: 위에서 배양하여 수확한 *Brucella abortus*1119-3 주 및 *Yersinia enterocolitica* O:9주를 packed volume으로 약 10% 되게 생리식염수에 부유시키고 동량의 complete Freund adjuvant(CFA)로 유탁액을 만들었다. 각 마우스에 이 유탁액 0.1ml씩을 복강내로 주사한 후, 1주일 간격으로 균부유액을 0.1ml씩 복강내로 추가접종(Booster immunization)하였다. 접종 4주 후에 모든 마우스를 이더(ether) 로 마취하고 심장을 통하여 전채혈을 실시하여 혈청

을 분리한 후 Western blot 분석에 사용하였다.

#### Western Blot:

1) 시료의 단백질량 계산: Bicinchoninic acid protein assay kit을 사용하여 측정하였다.

2) SDS polyacrylamide gel 전기영동: 전기영동에 사용한 항원으로는 *Brucella abortus*1119-3의 각 처리별 항원과 *Brucella abortus* biotype 1의 SDS처리항원, *Yersinia enterocolitica* O:9의 각 처리별 항원이었다. BioRad에서 제조한 MINIPROTEIN II cel과 Power supply (BioRad 200/2.0)를 사용하여 실시하였다. 실시한 조건은 다음과 같다. 즉, Stacking gel은 5%로, Separating gel은 10%로 사용하였고, Sample volume은 약 10 $\mu$ g/10 $\mu$ l/well되게하여 한시간 동안 100V, 20mA에서 영동하였다. Spacer는 0.75mm짜리를 사용하였으며 Marker는 biotinylated materials을 사용하였다. Gel은 Coomassie brilliant R로 염색하였다

3) Blotting: 전기영동이 끝나고 transfer buffer에 15분간 gel을 평형시킨 후 NC paper에 transblotting을 실시하였다. Running condition은 100V, 0.36A에서 1시간 동안 실시하였다.

4) Immunoassay: 전기영동 후 immunoassay는 마우스 anti-*Brucella*혈청과 마우스 anti- *Yersinia*혈청을 각각 사용하여 염색 양상을 비교하였다. Blotting이 끝난 NC paper를 1% BSA PBS에 담그고 37°C에서 1시간동안 정치하여 blocking 한 다음 물기를 제거하고, 4000배로 희석한 anti-*Brucella* 및 anti-*Yersinia* 혈청을 NC paper 전면과 고투 부어 입히고 37°C에 1시간 반응시켰다. 세척과정은 각 단계마다 PBS를 사용하여 5분씩 4회 실시하였다. Avidin - Biotin 용액은 미리 30분전에 만들어 두고, 세척 후 이 액에 30분간 반응시켰다. 세척 후 Stainig 용액(diaminobenbenzidine tetrahydrochloride(DAB) 10mg + 0.2 M Tris-HCl, pH 7.2, 15ml)을 준비하고, 30%의 과산화수소수를 60 $\mu$ l 부은 용액에 NC paper를 반응시키며 적당한 반응이 나타나면 즉시 PBS에 행군 후 흡수지에 끼워 말렸다.

**배고 ELISA:** 각 축우들에 있어서 *Brucella abortus*에 대한 항체와 *Yersinia enterocolitica* O:9에 대한 항체간의 상

관관계를 알아보기 위하여, 브루셀라의 각 항원과 *Yersinia enterocolitica* 항원을 사용하여 ELISA를 실시하였다. 흡작에 사용한 항원은 브루셀라의 경우 SONI ag 와 SDS ag를 사용하였고, 옐시니아의 경우는 SONI ag와 SDS ag를 합한 Whole cell component preparation을 사용하였다.

1) 항원의 흡작: ELISA plate (Nunc-Immuno Module, Polysorb U16, Denmark)의 각 well에 흡작용완충액 (50 mM Carbonate buffer, pH 9.6, containing 0.02% sodium azide) 으로 희석한 항원을 100  $\mu$ l 씩 분주하고 냉장온도에서 약 16 시간동안 정지한 후 PBS 용으로 세척하고, 0.5%의 BSA 로 실온에서 30분간 봉쇄하고 PBS 로 세척한 다음 건조시켜 냉장 desiccator에 넣고 보관하며 실험에 사용하였다.

2) ELISA: 적정조건을 찾기 위하여 임 뜻<sup>10</sup>의 ELISA조건을 기본으로 다소 변형시켜가며 실험하였다. 즉, 동물혈청을 1% BSA와 0.05% Tween 20이 함유된 PBS로 20 내지 100 배 희석하여 100  $\mu$ l 씩 각 well 에 가하고 37 $^{\circ}$ C 에서 1시간 동안 반응시켰다. 5회의 세척 후, Horse radish peroxidase (HRP)가 표지된 protein G를 100  $\mu$ l 씩 well에 가하고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 5회 세척하였다. 발색제로는 ABTS (2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid))를 사용하였다. 반응완료 후 0.005% sodium azide액 100 $\mu$ l로 반응을 정지시키고, reader(SLT 400ATC, Austria)를 사용하여 파장 405 nm에서 492 nm의 대조 파장을 대입하여 흡광도를 측정하였다.

3) 검사대상혈청: 제주도에서 방역사업의 일환으로 채혈한 소 혈청 중 1993년도에 검진하여 판정한 28건의 혈청을 대상으로 실시하였다.

## 결 과

*Brucella abortus*항원과 *Yersinia enterocolitica* O:9균주간의 항원성 교차반응: 두 균주간의 공통된 항원성의 유무를 검증하기 위하여 Western blot을 실시한 결과는 Figure 1, 과 2에 나타내었다.

마우스 anti-*Brucella*혈청으로 Immunoassay를 실시할 때 (Figure 3), *Brucella* 균의 각 정제 단계별 항원들의 열(제 2, 3, 4, 5열)에서는 분자량 약 25kDa 부터 50kDa 사이에

넓게 위치한 특이항원의 분포가 보였으며, biotype 1의 경우 (제 5열)에는 비교적 더 넓은 분포를 나타내었다. *Yersinia* 균의 정제단계별 항원열(제 6, 7, 8열)에서는 분자량 약 15, 20, 30 및 40kDa의 위치에서 반응한 band가 약하게 나타났다.

한편 anti-*Yersinia*혈청으로 Immunoassay를 실시한 결과는 Figure 2.에서와 같이, *Yersinia*항원(제 1, 2, 3열)과는 뚜렷한 반응을 보이고 있는 반면에, 대조적으로 *Brucella* 항원(제 4, 5, 6, 7열)과는 반응한 증거가 나타나지 않았다.

브루셀라 및 옐시니아 항원을 사용한 비교 ELISA 부부셀라 SDS항원과 SONI항원을 각각 사용하여 측정된 ELISA 반응값의 상관관계를 검증하기 위해 단순회귀분석한 결과는 Figure 3.에 나타난 것과 같이 대단히 높은 상관관계

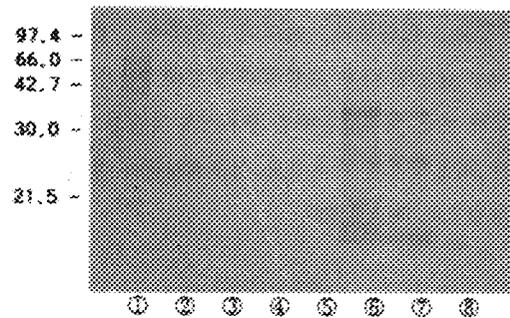


Figure 1. Western blot analysis with mouse anti-*Brucella abortus* 1119-3 of *Brucella abortus* ag and *Yersinia enterocolitica* ag fractions.

- Lane 1: Biotinylated Markers
- Lane 2: Whole cell component preparation of *Brucella abortus* 1119-3
- Lane 3: SONI ag of *Brucella abortus* 1119-3
- Lane 4: SDS ag of *Brucella abortus* 1119-3
- Lane 5: SDS ag of *Brucella abortus* biotype 1
- Lane 6: Whole cell component preparation of *Yersinia enterocolitica* O:9
- Lane 7: SONI ag of *Yersinia enterocolitica* O:9
- Lane 8: SDS ag of *Yersinia enterocolitica* O:9

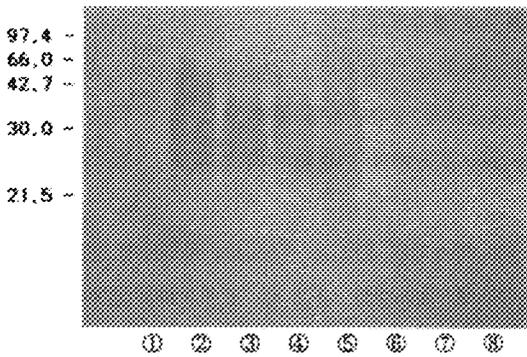


Figure 2. Western blot analysis with mouse anti-*Yersinia enterocolitica* O:9 of *Brucella abortus* ag and *Yersinia enterocolitica* ag fractions.

- Lane 1: Biotinylated Markers
- Lane 2: Whole cell component preparation of *Brucella abortus* 1119-3
- Lane 3: SONI ag of *Brucella abortus* 1119-3
- Lane 4: SDS ag of *Brucella abortus* 1119-3
- Lane 5: SDS ag of *Brucella abortus* biotype 1
- Lane 6: Whole cell component preparation of *Yersinia enterocolitica* O:9
- Lane 7: SONI ag of *Yersinia enterocolitica* O:9
- Lane 8: SDS ag of *Yersinia enterocolitica* O:9

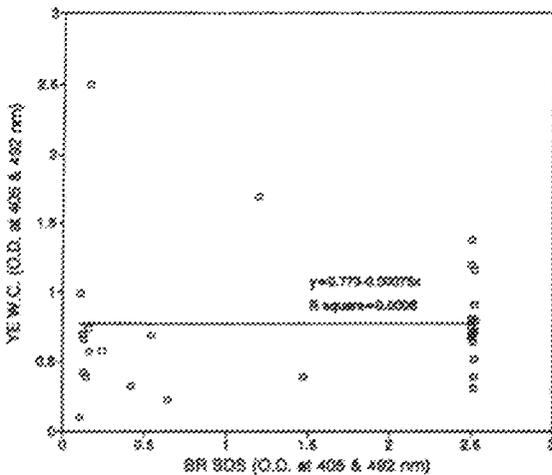


Figure 3. Correlation between ELISA results. *Brucella* SDS antigen and SONI antigen were used as plate coating antigen.

를 보이고 있었다( $y=0.012+0.921x$ ,  $R^2=0.917$ ). 한편, SDS 항원으로 측정할 때 최대치(OD= 2.5)를 보이는 혈청들 중

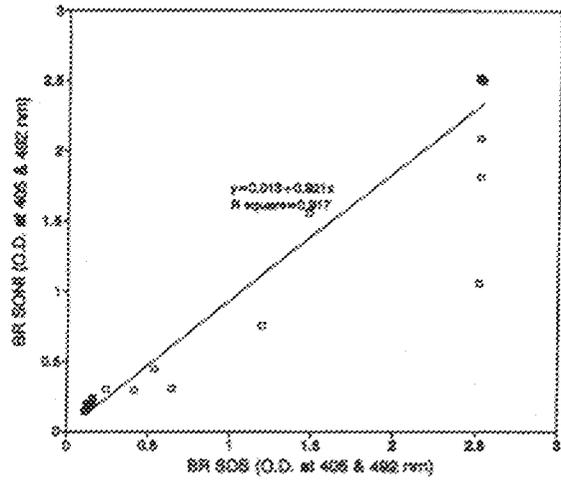


Figure 4. Correlation between ELISA results. *Brucella* SDS antigen and *Yersinia* whole cell antigen were used as plate coating antigen.

SONI 항원으로 측정하였을 때에는 다양한 반응치(OD= 1.0 - 2.5)를 보이고 있으며, 다소 낮은 반응치(OD= 1.0)를 보이는 예도 있었으므로 이 후의 브루셀라 정종을 ELISA 항원으로는 SDS항원을 사용하기로 하였다.

브루셀라 SDS항원과 *Yersinia* whole cell항원을 사용한 ELISA반응값 간에는 Figure 4에서 보듯이 전혀 상관관계를 인정할 수 없었다( $y=0.773+0.00075x$ ,  $R^2=0.0006$ ).

마찬가지로 브루셀라 SONI항원과 *Yersinia* whole cell항원 간에도 브루셀라 SDS항원의 경우와 유사하여 서로간에 상관관계를 보이지 않았다( $y=1.059-0.1392x$ ,  $R^2=0.036$ ).

고 찰

*Brucella abortus* 감염진단을 위한 혈청학적인 방법을 이용할 때 함원적인 교차반응을 보이는 기타의 다른 감염증이 존재한다면 판정에 많은 혼란을 야기시킬 우려가 있다. 이 들중에는 Francisella, Pasteurella, Salmonella, Camphylobacter 균 등이 있으며 이 들은 브루셀라 감염의 진단에 큰 문제는 되지 않는 것으로 알려져 있다. 그러나 *Yersinia enterocolitica* O:9주는 브루셀라균과 강력한 혈청학적인 교차반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>2,10</sup> 그러므로 브루셀라감염의 혈청학적인 진단을 위한 시약을 개발하기 위해서는 엘시니아균과의 교차반응 여부를 반드시

확인하여야 할 것이다.

본 연구에서는 소에서의 브루셀라 감염 진단을 위한 ELISA 방법을 개발하고자 먼저 *Yersinia enterocolitica* O:9주와 혈청학적인 교차반응이 없는 브루셀라균 특이의 항원을 정제하기 위하여 초음파 분쇄 및 SDS처리 등의 과정을 거쳐 세포벽 항원을 준비하였으며 이들과 *Yersinia enterocolitica* O:9주 간에 혈청학적인 교차반응의 여부를 관찰하기 위한 실험을 실시하였다.

Anti-Brucella 혈청과 *Yersinia enterocolitica* O:9주의 항원 분획에서는 약하지만 항원함재 결합반응이 나타났으나 (Figure 1.), anti-*Yersinia* 혈청과 *Brucella abortus* 1119-3주의 항원분획간에는 아무런 반응이 나타나지 않았다 (Figure 2.).

Figure 1.의 결과는 두가지 균주 유래의 항원간에 교차성이 인정되는 것으로 해석되며, 반면에 Figure 2.의 결과는 두 균주간에 항원적인 교차성이 인정되지 않는다는 결론에 도달하게 된다.

이러한 상반된 결론이 야기되는 원인은, 아마도 브루셀라 항원을 제조할 때, *Yersinia enterocolitica* O:9과 교차반응을 보이는 부분이 완전하게 제거되었을 경우이거나, 혹은 두 균주들 간에 공통적인 항원기가 없는 때문으로 추론할 수 있겠다.

그러나 Figure 2.의 제 2열은 브루셀라의 Whole cell을 초음파로 처리한 부유액을 그대로 SDS로 처리한 항원이기 때문에 사실상 특정한 분획만 정제된 상태가 아니며, 또한, 각 처리별 항원들의 경우도 전기영동상의 pattern 으로 미루어 볼 때, 분리정제가 완벽한 상태라고 볼 수는 없다. 그러므로 교차반응을 보이는 부분을 완전하게 제거했기 때문은 아닐 것이다.

한편, *Yersinia enterocolitica*는 주위 환경에 상재되어 있는 병원균으로 알려져 있다. 그러므로 항혈청 생산에 사용된 마우스가 이 균에 노출되었을 가능성은 충분하다. 만일 이 마우스들이 *Yersinia enterocolitica* O:9에 노출되어 있었다면, *Brucella abortus*균을 접종하여 항혈청을 얻어내었을 때, 이 anti-Brucella 항혈청에는 다소간에 anti-*Yersinia* antibody도 형성되어 있을 가능성이 있으며, 그렇다면 이러한 anti-*Yersinia* antibody가 Western blot상의 교차반응을 야기시킨 것이 아닌가 생각할 수 있으며, 이러한 가정은

*Yersinia* 항체가 없는 동물의 혈청을 대상으로 확인시험을 하여야 할 것으로 생각된다.

브루셀라 SDS 항원을 사용한 ELISA값과 옐시니아 항원을 사용한 ELISA값과의 상관관계를 살펴보기 위한 Figure 4.에서는 반응값의 분포에서 어떠한 상관관계도 인정되지 않았다.

또한, 브루셀라 양성혈청 21건을 *Yersinia* 항원으로 ELISA를 실시하였을 때 흡광도의 평균 및 표준편차는  $0.720 \pm 0.357$  이었으며, 브루셀라 음성혈청 7건을 *Yersinia* 항원으로 ELISA를 실시하였을 때  $0.938 \pm 0.657$  을 나타내어 (Data 생략), 브루셀라 항체의 양성 혹은 음성에 따른 상관관계를 보이지 않았으며, 이들 값간의 편차 또한 상당히 큰 것으로 나타났다.

따라서 본 연구에서 준비한 SDS처리 항원을 사용하여 브루셀라 감염진단을 위한 ELISA를 실시할 때, *Yersinia enterocolitica* O:9과의 반응에 의한 위양성반응(false positive)을 야기시키지 않을 것으로 생각된다.

## 결론

*Brucella abortus* 1119-3주를 초음파처리한 후 SDS로 처리하여 *Brucella abortus* 세포벽항원을 제조하였다. 이렇게 준비한 항원이 *Yersinia enterocolitica* O:9주와 항원적인 교차반응을 보이는가 여부를 확인하기 위하여 마우스 유래의 anti-*Brucella abortus* 1119-3 항혈청과 또한, anti-*Yersinia enterocolitica* O:9 항혈청을 각각 사용하여 Western blot 분석을 하였다. 또한, *Brucella abortus* SDS처리항원과 *Yersinia enterocolitica* O:9주를 각각 사용하여 소 혈청들을 대상으로 ELISA를 실시하고, 그 결과들 간에 상관관계가 나타나는가 비교하여 보았다.

Western blot의 결과 및 ELISA의 결과는, 두 균주 유래의 항원간에 교차반응이나 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 그러므로 본연구에서 제조하여 사용한 SDS 처리 *Brucella abortus* 세포벽 항원은 축우의 브루셀라감염 진단용 ELISA 시약에 적용시켜도 적합할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 농촌진흥청 가축위생연구소. 한국의 가축위생연구(가축위생연구소 80년사). 박근식 발행. 박정문 편집. 도서출판 상록. 1991. pp77-82.
2. 농림수산부예규 제 142호 제 10조 - 제 15조 1988.1.11.
3. 농림수산부예규 제160호. 결핵병 및 부루셀라병 방역실시요령중 개정. 1991.
4. Mittal KR and Tizard I. Serological cross-reaction between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotype O9. *Vet.Bulletin* 1981; 51(7):501-505.
5. Mittal KR and Tizard I. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica IX* and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res.Vet.Sci* 1980; 28:311-314.
6. 안수환, 김금화, 박용호, 김동성. 부루셀라병과 *Yersinia enterocolitica* 감염의 혈청학적 감별진단에 관한 연구. *농시보* 1982; 24(축산.가위):106-111.
7. Jagannath C and Sehgal S. Enhancement of the antigen-binding capacity of incomplete IgG antibodies to *Brucella melitensis* through Fc region interactions with staphylococcal protein A. *J.Immunol.Methods* 1989; 124:251-259.
8. 임윤규, 우희중, 이영순. Protein G 효소표지면역반응법에 의한 Sendai Virus 항체검출. *한국실험동물학회지* 1991; 7(2):53-61
9. 임윤규, 이두식, 박전홍, 양기천, 김승호, 김우택, 현관중, 김공식, 이영순. 축우 부루셀라병의 ELISA 진단법에 관한 연구. *대한수의학회지* 1993; 33(1):131-135.