

대장균의 내열성장독소 측정법개발을 위한 단세포균항체의 생산

서울대학교 의과대학 미생물학교실 및 암연구소

장우현 · 이우곤 · 김석용 · 박정범

= Abstract =

Production of the Monoclonal Antibodies to the *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin

Woo-Hyun Chang, Woo-Kon Lee, Suck-Yong Kim and Jung-Bum Park

Department of Microbiology and Cancer Research Institute, College of Medicine, Seoul National University

Monoclonal antibody to the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin(ST) was produced to develop a rapid and convenient diagnostic method to the ST. The toxin was purified from culture supernatant of enterotoxigenic *E. coli* O148H28(ST⁺/LT⁺) and conjugated to bovine serum albumin (BSA). The ST-BSA conjugate was used to immunize BALB/c mice and the immune spleen cells from these mice were fused with P3x63 Ag8.V653 plasmacytoma cells. Hybridomas were screened by ELISA and positive hybridomas were cloned by limiting dilution. Finally, one stable clone (AS36) specific to ST was selected for further growth and characterization.

Antibody titers of culture supernatant and ascitic fluid from BALB/c mice were 1:1,024 and 1:20,480 respectively in ELISA.

The isotype and subclass of monoclonal antibody was IgG1 in sandwich ELISA.

To test the neutralizing effect of monoclonal antibody on toxin activity of ST, mixture of ascitic fluid and ST was assayed by infant mouse assay and this monoclonal antibody was proved to be a neutralizing antibody. The titer of ascitic fluid which completely neutralized biological activity of 4 units of ST was 1:4.

Purified ST was quantitatively measured by competitive ELISA and minimum amount of ST detectable by this assay was 250pg, which was an amount six-fold smaller than that detectable by infant mouse assay. Four reference strains of enterotoxigenic *E. coli* from WHO were detected by competitive ELISA and highly specific, sensitive and reproducible result was obtained.

Key Words: Enterotoxigenic *E. coli*, Heat-stable enterotoxin, Monoclonal antibody, Neutralizing antibody, Competitive ELISA.

서론

영유아 설사 및 여행자 설사와 신생가축 설사의 원인균인 장독성 대장균(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)은 두가지 형의 장독소, 즉 이열성장

* 본 연구는 1986년도 한국과학재단 연구비로 이루어졌음.

독소(heat-labile enterotoxin, LT) 및 내열성장독소(heat-stable enterotoxin, ST)를 생산함으로써 설사를 유발한다^{23,27,44,45,46}. 내열성장독소(이하 ST라 함)는 18개^{9,13,49} 또는 19개⁵의 아미노산으로 구성된 작은 펩타이드로서 보고자에 따라 분자량이 1,900,⁴⁷ 2,000^{5,13,49}, 2,500³⁶ 등으로 다양하며, 면역원성이 매우 낮은 것으로 알려져 있다^{5,36,44}. ST의 장점막세포 수용체나

ST에 의한 설사의 명확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않지만 ST가 장점막세포의 염소이온 흡수를 억제하고¹⁷⁾, 장점막세포내의 guanylate cyclase를 활성화시켜 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)의 농도를 증가시킴으로써 수분 및 전해질이 장관내로 배출되어 분비형 설사가 유발된다고 보고되고 있다^{14, 22, 40)}. 최근에 와서 Burgess등⁸⁾이 돼지 또는 소에서 분리된 장독성 대장균의 한 균주에서 활성이 서로 다른 두가지 형태의 ST가 생산된다고 보고함에 따라 ST는 생물학적 및 생화학적 성상이 부분적으로 다른 STa와 STb의 두종류가 존재한다는 것이 밝혀졌는데, STa는 methanol에 가용성이며 젓먹이 마우스, 신생자돈 그리고 송아지에서 설사를 일으키는데 반해, STb는 methanol에 불용성이고 이유자돈 및 토끼의 결찰된 장(ligated ileal loop)에서 설사를 일으키며 젓먹이 마우스에서는 설사를 유발하지 않는 것으로 알려져 있다^{8, 42)}. 지금까지 사람에서 분리된 장독성 대장균중에서는 아직 STb를 생산하는 균주가 발견되지 않고 있으며¹⁾, STb의 설사유발기전은 cAMP나 cGMP의 상승과는 무관하다고 보고되어 있고^{14, 21)} 그 정확한 기전이 아직 밝혀져 있지 않다. 한편 DNA 접합(hybridization)실험에 의하면 젓먹이 마우스에서 설사를 유발하는 ST간에도 이종의 분자들이 존재하는 것으로 알려져 있는데³⁹⁾, 이러한 사실은 이 ST들이 아미노산 서열은 약간씩 상이하지만 생물학적 활성을 갖는 매우 유사한 또는 동일한 아미노산기를 공유하고 있다는 것을 암시한다^{9, 48)}.

장독성 대장균은 LT나 ST를 생산하는 성질 이외에 생화학적 성상등으로는 다른 비병원성 대장균과 구별되지 않는다. 따라서 장독성 대장균을 동정하기 위해서는 이균의 장독소 생산유무를 검사하는 것이 가장 적합하다. 그러나 이제까지 ST의 측정에는 실험동물을 이용한 가토회장시험(rabbit ileal loop test)¹²⁾이나 infant mouse assay^{11, 19)}등 주로 생물학적 독소측정법에 의존해왔는데, 이 생물학적 독소측정법은 그 결과의 가변성이외에도 매우 번거롭고 많은 노력과 시간이 요구될 뿐만 아니라 알맞은 실험동물의 지속적인 공급등에 어려움이 있으며, 숙련된 기술과 많은 비용이 필요하다는 점에서 일반적인 임상검사방법으로 적용하기에는 많은 문제점을 안고 있다. 이러한 이유때문에 근래에 와서는 점차 생물학적 방법의 사용을 지양하고 있

는 추세이며, 보다 간편한 면역학적 독소측정방법을 개발하는 방향으로 연구가 이루어지고 있다.

LT의 경우 우수한 항원성을 가지므로 항체생산이 비교적 용이하며, 콜레라 독소에 대한 항체와 교차반응을 나타내는 점등을 이용하여 reverse passive latex agglutination, 수동면역 용혈법(passive immune hemolysis)¹⁵⁾, 방사면역 측정법(radioimmunoassay)²¹⁾ 효소면역 측정법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)⁵⁾ 등 다양한 면역학적 방법들이 개발되어 사용되고 있다. 그러나 ST는 분자량이 매우 작아서 분리정제가 용이하지 않을 뿐더러, 그 자체만으로는 항원성이 거의 없기때문에 항체를 생산하는데 여러가지 난점이 있다. 다행히 최근에 와서 Staples등⁴⁹⁾과 Saeed등^{4, 7)}에 의해 ST의 순수분리정제가 이루어지면서 이정제된 ST를 각종 carrier 단백질과 결합시켜 면역에 필요한 높은 항원성을 획득할 수 있게 되었고, 더 나아가 항체를 이용한 ST 측정법의 개발이 가능해졌다. 이에 따라 Giannella등²⁰⁾과 Frantz와 Robertson¹⁸⁾이 염소에 면역하여 얻은 항ST 항혈청을 이용하여 기종의 infant mouse assay에 비해 민감도나 재현성이 탁월한 방사면역측정법을 개발함으로써 새로운 전기를 이루게 되었다. 그러나 이 방사면역측정법 역시 방법이 까다롭고 방사성 동위원소를 취급해야 하는 위험이 있으며 값비싼 기계를 필요로 하는 단점이 있어 일반적인 ST측정방법으로는 부적합하며, 최근에는 이러한 단점을 보완하면서 민감도와 특이도 및 재현성이 우수한 방법으로서 효소면역측정법의 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

한편, 지금까지 이러한 면역학적 독소측정법에서 사용되어온 항체를 살펴보면 모두가 면역한 동물에서 얻은 항혈청을 그대로 또는 정제하여 항체로 사용하고 있다. 그러나 항혈청내에는 항체성분 이외에도 알부민등을 비롯한 다른 많은 혈청성분이 존재하며, 항체성분내에도 다른 비특이적 항체가 섞여있기 마련이어서 민감도와 특이성에 있어서 어느정도 한계성을 감수하지 않을 수 없다. 특히 완전히 정제되지 않은 항원을 면역에 사용하였을 경우에 원하는 항원성분 이외의 물질에 대해서도 항체의 생산이 이루어지게 되고, 특히 ST와 같이 항원성이 매우낮은 물질을 carrier 단백질과 결합하여 면역에 사용하는 경우에도 carrier 단백질에 대한 항체가

생성되므로 항혈청을 이용하는데 있어 문제점이 가중된다. 이러한 한계성을 극복하기 위해서는 단일특이성(monospecificity)이 있는 항체성분이 필요하다.

이에 대하여 근래 Kohler와 Milstein³¹⁾이 개발한 림프잡종세포종(hybridoma) 기법을 이용하여 얻은 단세포항체(monoclonal antibody)는 이러한 문제들을 해결할 수 있는 획기적인 기틀을 마련하였다. 단세포항체는 항원성분 중 하나의 항원 결정기에 대한 특이한 항체를 생산하는 하나의 세포군(cell clone)의 산물이므로 항원에 대한 결합력이 동질성이고 단일특이성이다. 또한 무한증식하는 잡종세포로부터 대량의 항체를 지속적으로 생산할 수 있어 이를 각종 항원진단에 응용하면 적은 비용으로 높은 특이성 및 재현성을 획득할 수 있으므로 많은 분야에서 이를 위한 연구가 이루어지고 있다.

이러한 추세에 따라 최근 Thompson 등⁵²⁾과 Brandwein 등⁷⁾ 및 Svennerholm 등⁵⁰⁾이 차례로 ST에 대한 단세포항체를 생산하여 보고하였고 이를 이용한 효소면역측정법의 개발에 발판을 마련하였다. 이에 저자는 ST동정을 위한 간편하고 신뢰성 높은 효소면역측정법의 개발에 도움을 주고자 이등⁴⁾의 방법에 따라 인형장독성 대장균으로부터 생산된 ST를 순수분리정제하였고, 이를 carrier 단백질로 우혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)과 결합시켜 마우스에 면역한 후 림프잡종세포종 기법을 이용하여 ST특이 단세포항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 얻었다. 이어 이 단세포항체를 이용하여 Thompson 등⁵²⁾이 보고한 경쟁효소면역측정법(competitive ELISA)으로 ST를 검정한 결과, 높은 민감도 및 재현성을 확인하였다.

실험재료 및 방법

1. 균주 및 세균배양

WHO Collaborating Center for Phage Typing and Resistance of Enterobacteria, Division of Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory, London, U.K에서 분양받은 인형장독성대장균의 표준균주인 *Escherichia coli* O148H28(ST⁺/LT⁺)과 *E. coli* O78H(ST⁺/LT⁻)를 ST양성균주로, *E. coli* O15H11(ST/LT⁺)과 *E. coli* O1H7(ST⁻/LT⁻)을 ST음성 대조균주

로 각각 실험에 사용하였다. 독소생산 배지는 Evans 등¹⁶⁾에 따라 Casamino acid yeast extract salts(CYES-2) 배지를 사용하였으며, ST정제를 위한 다량의 독소생산 배지로는 양등³⁾과 김등²⁾이 고안한 succinate salts 배지를 사용하였다.

배양은 4°C에 보관한 nutrient agar 사면배지상의 균주를 증균용 CYES-2 배지에 계대배양한 후 이를 CYES-2 또는 succinate salts 배지에 접종한 다음 37°C에서 18시간 진탕배양하였다(New Brunswick Rotatory Shaker, 120 rpm).

2. ST의 정제

Succinate salts 배지 10리터 또는 20리터에 *E. coli* O148H28 균주를 대량배양한 후, 이를 10, 400xg에서 10분간 고속냉각원침하여 배양상청액을 모으고 다시 4°C에서 Seitz filter로 여과하여 상청액내의 균입자를 제거한 다음 이등⁴⁾의 방법에 따라 Amberlite XAD-2 adsorption chromatography, DEAE-Sephacel ion-exchange chromatography, Sephadex G-25 gel filtration chromatography 과정을 통해 ST를 분리정제하였으며 정제된 ST는 냉동건조하거나 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 항원제작 및 면역

1) 항원의 제작

ST의 면역성을 높이기 위해 Lockwood 등³⁴⁾과 Thompson 등⁵²⁾ 및 Kauffman 등²⁸⁾의 방법을 바탕으로 ST에 carrier 단백질로서 우혈청알부민(bovine serum albumin, BSA, Sigma)을 결합시켜 이를 항원으로 사용하였다.

정제된 ST 6.5mg을 YM-2 ultrafiltration membrane(M.W. cut-off 1,000, Amicon)을 통해 100mM phosphate buffer(pH 5.5)로 투석한 후 여기에 ST대 BSA의 분자비율이 30:1이 되도록 7.2mg의 BSA(RIA grade, Sigma)를 첨가하여 녹이고, 다시 conjugating agent로 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide(EDCI, Sigma)를 64mg 녹여 총단백질량대 EDCI의 분자비율이 1:100이 되도록 조정후 이 혼합액을 실온에서 천천히 교반하면서 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 용액을 투석막(M.W. cut-off 6,000-8,000, Spectrapor 1)을 통해 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS pH7.2) 2리터로 4°C에서 2회 투석후,

이 ST-BSA conjugate 용액을 냉동건조하거나 또는 -70°C에 보관하면서 항원으로 사용하였다.

2) 면역

면역대상은 일본 동경동물연구소로부터 분양받아 서울대학교 의과대학 미생물학교실에서 번식중인 생후 6-8주된 순계 BALB/c 마우스(F)를 사용하였다. 최초면역은 ST-BSA conjugate를 complete Freund adjuvant(CFA, Difco)와 동량 혼합하여 마우스당 10ug(ST content)씩 복강내로 주사하였고, 그후 각각 한달 간격으로 두번에 걸쳐 incomplete Freund adjuvant(IFA, Difco)와 혼합한 동량의 항원을 복강내로 주사하여 추가면역하였으며, 세포융합 3일전에 멸균된 PBS로 희석한 ST 10ug을 꼬리정맥내로 주사하여 마지막 면역을 실시하였다.

4. 세포융합 및 융합세포의 선택

1) 형질세포종 세포주(myeloma cell line)의 배양

미국 국립보건원에서 분양받아 서울대학교 의과대학 미생물학 교실에서 계대배양하여 유지하고 있는 P3X63A8.V653의 돌연변이 세포주를 사용하였다. 이 세포는 면역글로불린을 생산하지 못하고 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT)가 없으므로 8-azaguanine(20ug/ml)에 내성을 나타낸다³⁰⁾.

따라서 이 세포주를 배양하기 위하여 8-azaguanine(20ug/ml), 우태아혈청 (fetal bovine serum, 10%) 및 gentamicin(50ug/ml)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Flow Lab.)을 배지로 사용하였고, 2~4일에 한번씩 원심침전하여 새로운 배지로 갈아주면서 계대배양하여 세포를 유지시켰다. 세포융합에 사용할 형질세포종 세포는 새로운 배지에서 24시간 동안 배양한 후 혈청성분이 없는 DMEM으로 3회 이상 세척하여 준비하였다.

2) 면역된 림프구의 준비

최종면역후 세포융합 하루전에 마우스의 안와 정맥총에서 모세관을 이용하여 채혈한 후 혈청을 분리하여 효소면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)으로 항체의 역가를 검사하였다. 최종면역 3일후, 전날의 항체역가가 가장 높았던 마우스를 선택하여 희생시킨 다음 복강을 열고 비장을 적출하였다. 이를 DMEM 내에서 뾰족한 핀셋으로 찢어 비장세포를 분리하고 실온에서 15분간 정치한 뒤, 부유된 세포성

분을 Tris-NH₄Cl 용액(Tris 20.6g/l, NH₄Cl 8.3g/l)으로 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 이 세포성분을 3회 이상 DMEM으로 세척하여 생존세포수를 측정후 세포융합에 사용하였다.

3) 세포융합조작과 융합세포의 선택

세포융합방법은 Kohler와 Milstein³¹⁾이 개발한 방법을 토대로 시행하였다. 10⁷개의 형질세포종 세포와 10⁶개의 비장림프구를 50ml 시험관에서 섞고 이 혼합세포를 DMEM으로 3회 세척하였다. 마지막 세척후 상청액을 제거하고 얻어진 침전혼합세포 (cell pellet)를 37°C로 유지하면서 여기에 1ml의 50%(w/v) polyethylene glycol 1,000(PEG 1,000, Sigma)을 한방울씩 1분간에 걸쳐 잘 흔들면서 첨가하였다. 여기에 계속해서 약 5분간 15ml의 DMEM을 첨가하여 polyethylene glycol을 희석하면서 융합반응을 지속시켰다. 융합이 끝난 세포를 400xg에서 10분간 원심하여 모으고 이를 우태아혈청이 20%로 첨가된 DMEM에 부유시킨뒤, 96well 배양판에 well당 50ul씩 분주하여 5-10% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

융합된 세포만을 선택하기 위하여 Littlefield³³⁾가 고안한 HAT(50μM hypoxanthine, 0.4μM aminopterin, 16μM thymidine) 배지를 융합후 1, 3, 5, 및 7일에 각각 well당 50μl씩 첨가하고, 융합 10일 후에는 150ul씩 배지를 교환한 후 14일까지 배양을 계속하면서 융합세포의 증식여부를 역위상차현미경으로 관찰하였다.

4) 단세포군 배양(cell cloning)

융합후 11-14 일째에 분열증식하는 융합세포에서 집락의 크기가 1mm 이상 되는 것을 선택하고, 이들로부터 ST에 대한 항체가 생산되는지의 여부를 검색하기 위해 효소면역측정법(이하 ELISA라 함)으로 융합세포가 증식하는 각 well의 배양상청액을 screening하였다. 그 결과, 항체의 역가가 높고 세포의 상태가 지속적으로 좋은 well의 융합세포를 선택하여 24well 배양판에 옮기고 계속 증식배양하였다.

24well에서 증식한 세포로부터 단세포군을 얻기 위해 McKearn³⁸⁾의 방법을 이용하여 무한대 희석법으로 cloning을 시행하였다. Cloning할 세포를 배지 1ml당 10개가 되도록 희석하여 96well 배양판에 well당 100ul씩 분주하고 배양하였다(1세포/well). 일주일간 배양한 후 현미경으로 관찰하여 1개의 세포에 의해 세포집락이 형성된 well을 선택하고, 항체생성여부를 다시

ELISA로 검색하여 ST에 대한 하이브리도마(hybridoma)를 최종선택하였다.

5. 마우스 생체내의 단세포군 항체 생산

마우스 복강내에서 종양세포가 쉽게 증식할 수 있도록 pristane(2, 6, 10, 14-tetramethyl-pentadecane, Aldrich Chemical Co.)을 0.5ml씩 BALB/c마우스 복강내로 주사하여 전처리하고, 1주일 후 ST에 대한 단세포군항체를 분비하는 림프잡종세포를 DMEM으로 세척하여 마우스당 10^7 세포/0.2ml로 주사하였다. 세포를 주사한 마우스에서 10-14일 후 복강이 부풀어 오르면 희생시켜 복수(ascitic fluid)를 채취하고 이를 400xg에서 10분간 원침하여 세포성분을 제거한 다음 그 상청액을 -70°C 에 보관하면서 항체로 사용되었다.

6. ELISA에 의한 항체의 검색

ST로 면역한 마우스의 항혈청 및 마우스의 복수내에 포함된 항체를 측정하기 위해, 그리고 세포융합 후 ST에 대한 항체분비융합세포의 선별을 위해 ELISA를 시행하였다. 그 과정을 간략하면 정제된 ST를 항원으로 사용하여 20mM carbonate buffer (pH 9.6)에 3mg/ml이 되게 희석한 뒤 polystyrene EIA plate(Costar Serocluster, 96well)에 well당 50ul씩 분주하고 4°C 에서 하룻밤 정치하여 항원을 부착시켰다. 다음날 항원이 부착된 plate를 Tween 20용액이 0.05%로 첨가된 phosphate buffered saline (PBS-Tw20)으로 3회 세척하고, 3% BSA가 포함된 PBS-Tw20용액으로 3회 세척하여 밀봉포장한 후 4°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

항체측정시 항혈청이나 복수액 또는 세포배양상청액을 0.1% BSA-PBS-Tw20용액으로 알맞게 희석하여 well당 50ul씩 첨가하고 37°C 에서 1시간 반응시켰다. 다음 PBS-Tw20용액으로 3회 세척한후, peroxidase conjugated rabbit antimouse IgG(heavy & light chain, Cappel Lab.)를 0.1% BSA-PBS-Tw20에 1:2,000으로 희석하여 각well에 50ul씩 첨가한 뒤 다시 37°C 에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS-Tw20용액으로 다시 5회 세척한뒤 발색제로 orthophenylene diamine(OPD, Sigma)을 10ml phosphate citrate buffer(PCB, pH5.0)에 0.04%(w/v)로 녹이고, 여기에 30% H_2O_2 를 20ul 첨가한 기질용액을 만들어 well당 50ul씩 첨가한 다음 실온

에서 30분간 효소-기질반응을 진행시켰다. 30분후 2M H_2SO_4 용액을 50ul씩 첨가하여 반응을 정지시키고 automatic ELISA reader (Titertek Multiscan, Flow Lab.)로 492nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

흡광도가 0.30이상이고 음성대조보다 0.10이상 높은 것을 양성으로 판정하였다.

7. 단세포군 항체의 isotype검색

ST에 대한 단세포군항체의 isotype을 결정하기 위하여 sandwich ELISA를 시행하였다. Rabbit anti-mouse IgM(Cappel Lab.)과 rabbit anti-mouse IgG₁, 2a, 2b, 3 (Miles Lab.)를 각각 polystyrene EIA plate(Costar Serocluster)에 부착하고, 전술한 ELISA방법과 마찬가지로 세포배양액 및 peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG(Cappel Lab.)를 순서대로 첨가하여 반응시킨 후 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 단세포군 항체에 의한 ST독성의 증화

ST에 대한 단세포군항체가 ST의 독성을 증화시키는 증화항체인지의 여부를 확인하기 위해 infant mouse assay를 시행하였다. 하이브리도마세포를 BALB/c 마우스 복강내에 주사하여 얻은 복수를 PBS로 2배 계단희석하고 여기에 PBS로 희석한 ST 4 units 또는 8 units를 각각 동량씩 첨가한 후, 4°C 에서 18시간 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 각각의 ST활성을 infant mouse assay로 측정하였다. 이때 항체 대조군으로서 형질세포종세포를 BALB/c 마우스에 접종하여 얻은 복수와 ST를, 독소대조군으로 PBS와 ST를 섞어 각각 동일한 조건으로 반응시키고 ST활성을 측정하였다.

9. 단세포군 항체의 정제

1) Ammonium sulfate 침전

Hurrell²⁵⁾의 방법을 토대로 ammonium sulfate 침전법을 이용하여 마우스 복수내의 항체를 정제하였다. 먼저 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1kg을 증류수 1리터에 녹인 후 pH를 7.2로 조정하여 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액을 제작하고, 마우스 복수는 생리식염수로 3배 희석하여 준비하였다. 희석된 복수용액 30ml에 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액 24.5ml을 지속적으로 교반하면서 점적으로 가하여 최종농도가 45% 되도록 하였다. 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액을 첨가한 후

실온에서 30분간더 교반시킨 다음, 1000xg에서 15분간 원심침전하여 침전물을 모으고, 이를 다시 20ml의 45% 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액에 재부유한 뒤 동일한 방법으로 원심침전하였다. 이 침전물을 30ml의 PBS에 다시 용해하여 최종농도 40%가 되도록 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액을 가하여 재침전시키고, 다시 동일한 방법으로 20ml의 40%포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액으로 침전물을 세척하였다. 이어 최종적으로 얻어진 침전물을 3ml의 50mM Tris-HCl buffer(pH8.0)에 녹인후 투석막(M.W. cut-off 12,000, Union Carbide)을 통해 2회에 걸쳐 동일한 buffer로 4°C에서 투석하였다.

2) DEAE-Sephacel ion exchange chromatography

50mM Tris-HCl buffer(pH8.0)로 투석한 ammonium sulfate 침전 항체분획을 DEAE-Sephacel (Pharmacia Fine Chemicals) anion exchanger가 들어있는 column(2.6 by 30cm)에 통과시키고, 2bed volume(300ml)의 50mM Tris-HCl buffer(pH8.0)로 column을 세척한 후, 같은 buffer 1000ml로 0mM에서 300mM의 NaCl 농도구배를 두고 시간당 36ml의 속도로 용출하였다.

용출후 각분획을 ELISA로 검색하여 ST에 특이한 항체의 분획만을 모아 PM-10 ultrafiltration membrane(M.W. cut-off 10,000, Amicon)을 통해 농축하고 Lowry³⁵⁾의 방법으로 단백질을 정량한 후 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

10. 경쟁효소면역측정법(Competitive ELISA) 의한 ST검색

Thompson과 Giannella⁵³⁾가 개발한 competitive ELISA를 이용하여 ST를 검색하였다. 그 방법을 요약하면, 마우스 면역시 항원으로 사용하였던 ST-BSA를 22mM carbonate buffer(pH9.6)로 2,000배 희석하여 polystyrene EIA plate (Costar Seroccluster, 96well)에 50ul씩 분주하고 4°C에서 18시간 정치하여 항원을 부착하였다. 항원이 부착된 plate를 PBS-Tw20용액으로 3회 세척하고 1% BSA-PBS용액을 각 well당 200ul씩 첨가한 후 37°C에서 1시간 정치하여 blocking시켰다.

정제된 단세포균항체를 0.4ug/ml이 되도록 0.1% BSA-PBS용액으로 희석하고, 검색할 ST용액 또는 *E. coli*의 CYES-2 배양상청액도 0.1% BSA-PBS용액으로 알맞게 희석한 뒤, 시험관

(12mm×75mm) 내에서 각각의 희석된 ST용액과 희석된 단세포균항체용액을 동량 혼합한 후 즉시 이 혼합액 50ul를 항원이 부착된 well에 첨가한 다음 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이때 각 plate마다 대조군으로 ST대신 0.1% BSA-PBS용액을 항체와 혼합하여 첨가한 well을 두고 함께 반응시켰다. 반응이 끝난후 PBS-Tw20용액으로 4회 세척하고, 여기에 peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG(heavy & light chain, Cappel Lab.)를 0.1% BSA-PBS용액으로 1,000배 희석하여 50ul/well로 첨가한 뒤 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. 다음 PBS-Tw20용액으로 5회 세척한 후, 10ml의 100mM citrate buffer(pH4.0)에 발색제로 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolinesulfonic acid) (ABTS, Sigma) 5.5mg을 녹이고 여기에 30% H_2O_2 용액을 10 μ l첨가한 기질용액을 만든뒤, well당 100ul씩 첨가하여 실온에서 20분간 효소-기질반응을 진행시켰다. 20분뒤 0.05% sodium azide용액을 25ul씩 각 well에 첨가하여 반응을 중단시키고 automatic ELISA reader(Titertek Multiscan, Flow Lab.)로 405 nm에서 흡광도를 측정된 후 ST검체가 첨가된 well에서 반응이 억제되는 정도를 대조군 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비율(%)로 환산하였다. ST양성의 판정은 측정하는 ST검체의 흡광도가 대조군 흡광도의 65%이하를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

성 적

1. ST의 정제

ST생산균주인 *E. coli* 0148H28을 succinate salts배지에 대량 배양한 후 원침하여 모은 50리터의 배양상청액을 Amberlite XAD-2 adsorption chromatography, DEAE-Sephacelion exchange chromatography 및 Sephadex G-25 gel filtration chromatography의 정제과정을 통해 ST를 분리정제한 결과 Table 1과 같은 성적을 얻었다. ST는 약 120배 정제되었고 희수율은 약 17%정도로 나타났으며 생물학적 최소단위량(minimum effective dose, MEM)은 1.6ng에 달하였다.

2. 항체를 분비하는 융합세포의 선택

ST-BSA conjugate의 최종면역 후 세포융합 하루전에 마우스로부터 소량의 혈액을 채취하여

Table 1. Data for purified ST from 50 liter batch of bacterial culture supernatant

Total activity* (units)	Total protein** (mg)	Specific activity (units/mg)	MED*** (ng)	Purification Fold	Recovery (%)
5,360,000	8.5	630,588	1.6	120	17

* Measured by infant mouse assay

** Measured by Lowry method

*** Minimum effective dose to an infant mouse

Table 2. Frequency of hybrids secreting antibodies to ST selected by HAT medium after cell hybridization

Total number of wells for cell mixture	Wells with growing hybrid in HAT medium	Wells with hybrids secreting antibodies to ST in the medium*
576	274 (47.6%)**	4 (0.7%)**

* Measured by ELISA (positive: >0.300 in absorbance at 492nm)

** Percent to the total number of wells

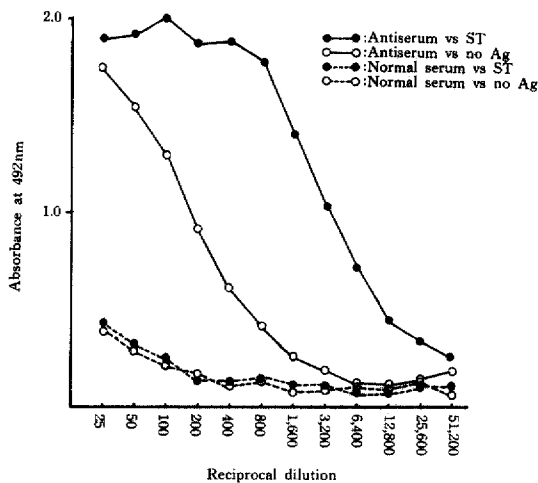


Fig. 1. Titration curves of anti-ST antibody in the serum from the immunized and normal BALB/c mouse, measured by ELISA.

혈청을 분리한 다음 ST에 대한 항체생성여부를 ELISA로 검색한 결과, ST에 대한 항혈청의 역가는 Fig.1에서와 같이 1 : 12,800에 달하여 마우스가 ST에 면역 되었음을 확인하였다.

세포융합이 끝난 후 세포부유액을 96well 배양판에 576well 분주하였는데 이중 융합된 세포가 증식한 well은 Table 2와 같이 274well로서 분주한 총 well수의 47.6%를 나타내었다. 이들 중 ST에 대한 항체생성이 ELISA로 확인된 well

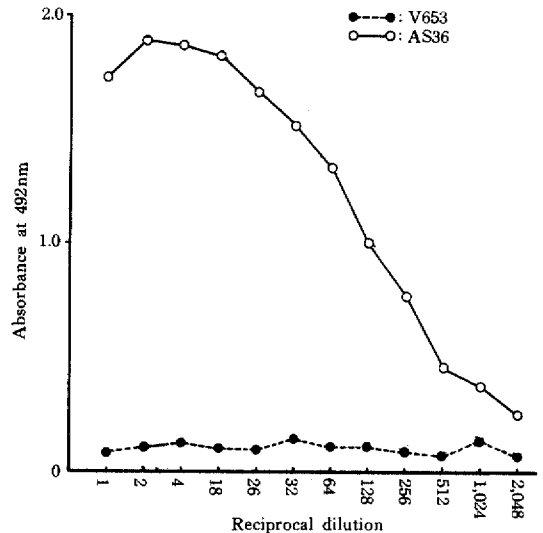


Fig. 2. Titration curves of anti-ST monoclonal antibody in the culture supernatant of the AS36 hybridoma clone and V653, measured by ELISA.

은 모두 4well로서 전체분주well의 0.7%였다. 이 4well의 융합세포를 각각 cloning하고 5주 이상 계대배양하면서 항체의 역가가 가장 높고 항체생성 및 세포활성 상태가 지속적으로 좋은 AS36세포주를 최종선택하여 실험에 사용하였다.

3. ELISA에 의한 항체역가의 측정

ST로 면역한 BALB/c마우스 혈청내의 항체

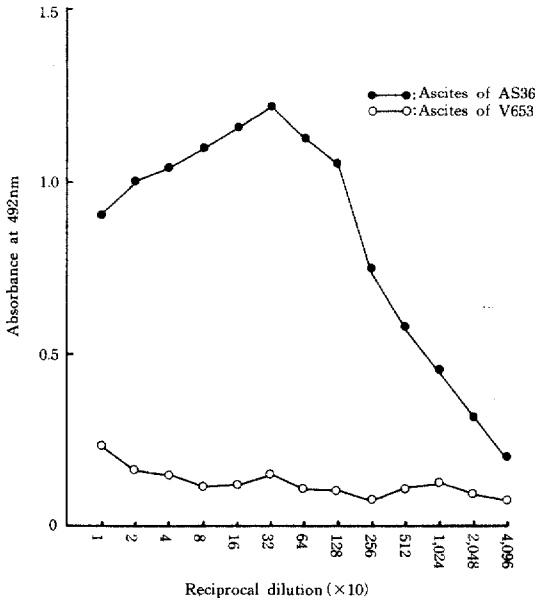


Fig. 3. Titration curves of anti-ST monoclonal antibody in the ascites from the BALB/c mice inoculated with the AS36 hybridoma clone and V653, measured by ELISA.

역가를 ELISA로 측정하여 Fig. 1의 결과를 얻었다.

그런데 ELISA과정에서 항원부착시 부착항원으로는 면역에 사용된 ST-BSA대신 정제된 ST (free ST)를 사용하였는데, 이때 동일한 ELISA plate내에 항원을 부착한 well과 항원을 부착하지 않은 well을 각각두고 양 well에서 동시에 항혈청의 역가를 측정할 결과, 항원을 부착한 well에서는 항혈청의 역가가 1:12,800으로 나타났으며 항원을 부착하지 않은 well에서도 1:800의 항체역가가 관찰되었다. 이로써 면역된 마우스의 체내에 ST에 대한 항체뿐만 아니라 carrier 단백질로 사용된 BSA에 대해서도 동시에 항체가 생성됨으로써 blocking에 사용된 BSA와 이 항체가 반응하였다는 것을 알 수 있다. 이러한 사실은 세포융합후 융합세포주의 항체생성여부를 검색하는 과정에서도 확인되었으며, 이에 따라 세포배양액을 검색하는 과정에서도 앞서 혈청의 역가측정과 동일하게 각 시료마다 항원을 부착한 well과 부착하지 않은 well을 동시에 두고 ELISA를 시행하여, 두 well에서 모두 반응이 나타나는 것은 제외하고 항원을 부착한 well에서만 반응이 나타나는 것을 ST에 대한 항체로 선택하였다. 한편 최종선택한 융합

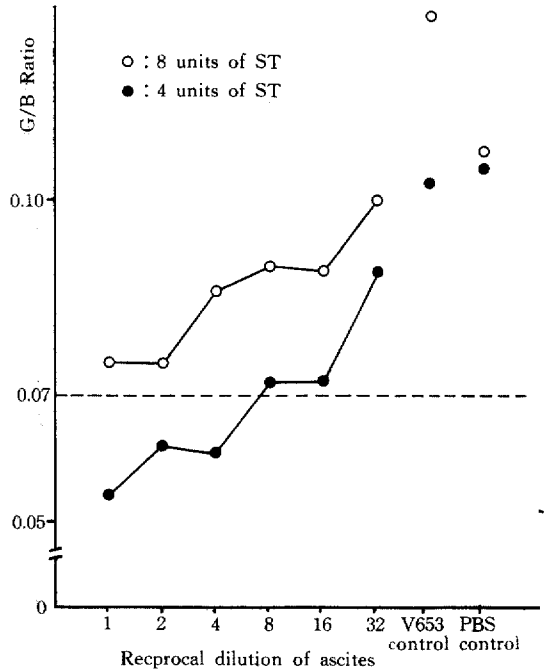


Fig. 4. Neutralization of ST toxicity by anti-ST monoclonal antibody in the ascites of AS36. The controls indicate the ascites of P3x63Ag8, V653 and PBS.

세포주인 AS36의 배양상청내 항체역가를 ELISA로 측정한 결과 Fig. 2와같이 1:1,024였으며, 이 AS36 세포주를 BALB/c마우스 복강에 주사하여 얻은 복수내의 항체역가는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 1:20,480였다.

4. 단세포군 항체의 isotype결정

AS36세포주가 분비하는 단세포군항체의 isotype또는 IgG의 subclass를 검색하기 위하여 rabbit anti-mouse IgM 및 rabbit anti-mouse IgG1, 2a, 2b, 3를 이용하여 sandwich ELISA를 시행한 결과, 이 단세포군 항체는 IgG1임을 알 수 있었다.

5. 단세포군 항체에 의한 ST독성의 중화

AS36세포주에서 분비되는 단세포군 항체가 ST의 독성을 중화하는 중화항체인지의 여부를 확인하기 위하여 AS36의 복수를 8units및 4units의 ST와 반응시킨후 중화항체의 역가를 infant mouse assay로 측정하였다(Fig. 6). 그 결과 1:1에서 1:32까지 2배 계단희석된 AS36의 복수는 8units의 ST를 완전히 중화하지는 못하였으

Table 3. Detection of ST in the CYES-2 culture supernatants of the WHO reference strains by competitive ELISA and infant mouse assay

WHO reference strains	In competitive ELISA		G/B ratio in Infant Mouse Assay
	Absorbance at 492 nm	Percent to the control (%)	
<i>E. coli</i> O148H28 (ST ⁺ /LT ⁺)	0.199 ± 0.021*	22	0.096 ± 0.017*
<i>E. coli</i> O78H ⁻ (ST ⁺ /LT ⁻)	0.426 ± 0.030	47	0.077 ± 0.012
<i>E. coli</i> O15H11 (ST ⁻ /LT ⁺)	0.821 ± 0.050	90	0.055 ± 0.004
<i>E. coli</i> O1H7 (ST ⁻ /LT ⁻)	0.832 ± 0.043	91	0.056 ± 0.003
Control**	0.091 ± 0.053	100	-

* Mean ± standard deviation

** CYES-2 medium

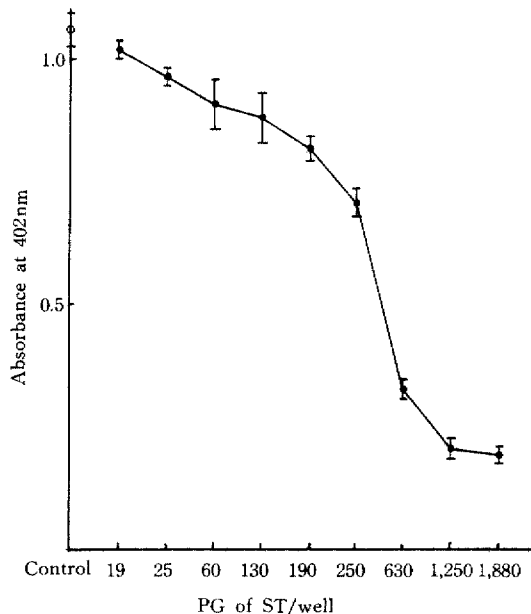


Fig. 5. Standard curve of competitive ELISA for quantitation of ST.

나, 1:16까지 부분적인 중화효과를 나타내었다. 그러나 4units의 ST에 대해서는 1:4까지 완전 중화를 나타내었고, 1:16까지 부분적인 중화효과를 나타내었다. 따라서 AS36으로부터 생산된 단세포균 항체가 ST에 대한 중화항체라는 것을 확인할 수 있었고, 4units의 ST에 대하여 완전 중화효과를 나타내는 복수의 항체역가는 1:4였다.

6. Competitive ELISA에 의한 ST의 검색

Ammonium sulfate 침전 및 DEAE-Sephacel

ion exchange chromatography를 통해 정제된 단세포균 항체(4.9mg/ml)를 이용하여 ST의 검색을 위한 competitive ELISA를 시행하였다.

먼저 ST검색을 위한 competitive ELISA의 조건설정 및 검색가능한 ST농도의 정량을 위하여 표준곡선(standard curve)을 구하였다. 정제된 ST를 75, 50, 25, 10, 7.5, 5, 2.5, 1 및 0.75ng/ml로 각각 희석하고 이를 0.4ug/ml로 희석한 단세포균 항체와 각각 동량 혼합한 후 competitive ELISA를 시행하여 Fig. 5의 결과를 얻었다.

ST를 경쟁항원(competitor antigen)으로 첨가하지 않은 대조군의 흡광도는 405nm에서 1.089 ± 0.040 이었고, 이 대조군 흡광도의 65%이하를 나타내는 ST를 양성으로 판정하였다. 이에 따라 양성으로 나타난 ST의 최소농도는 10ng/ml의 ST로서 0.702 ± 0.019 의 흡광도를 보였으며 이는 대조군 흡광도의 약 64%였다. 그런데 검색을 위해 실제 각 well에 첨가된 양은 25ul씩이므로 이를 well당으로 환산하면, 본 실험을 통해 competitive ELISA로 검색할 수 있는 ST의 최소량은 Fig. 5에서 관찰되는 바와 같이 약 250pg이었다. 또한 표준곡선에 나타난 바와 같이 ST가 약 1ng이상일 때는 항체가 완전히 흡수되어 음성의 흡광도를 나타내었고, ST의 양이 감소함에 따라 흡광도는 점차 증가하였으며 19pg의 ST에서는 대조군의 흡광도와 유사하여 반응의 억제효과를 거의 관찰할 수 없었다.

이어 표준화된 competitive ELISA의 조건에 따라 인형장독성 대장균의 WHO 표준주인 *E. coli* O148H28 (ST⁺/LT⁺), *E. coli* O15H11 (ST⁻/LT⁺), *E. coli* O78H (ST⁺/LT⁻) 및 *E. coli* O1H7

(ST/LT)의 ST생산여부를 측정하기 위해 각균을 CYES-2배지에 배양하여 얻은 배양상청액으로 ELISA를 시행하였다. 배양상청액 대신 CYES-2배지를 항체와 반응시킨 대조균의 흡광도는 Table 3에 나타난 바와 같이 0.910 ± 0.053 이었고, ST 양성균주인 *E. coli* O148H28과 *E. coli* O78H는 각각의 흡광도가 0.199 ± 0.021 및 0.426 ± 0.030 으로서 대조균 흡광도의 22% 및 47%로 나타나 ST양성임이 확인되었다. 반면 *E. coli* O15H11과 *E. coli* O1H7의 경우 각각의 흡광도가 0.821 ± 0.050 및 0.832 ± 0.043 로서 대조균과 유의한 차이가 없어 ST음성균주임을 확인할 수 있었으며, 대조균에 대한 각각의 흡광도 비율은 90%와 91%였다. 이러한 결과는 각균주의 배양상청액을 infant mouse assay로 측정된 결과와 비교해보아도 ST생산균주 및 비생산균주와 일치하였다(Table 3).

한편 ST양성균주간의 흡광도를 비교해 보면 ST와 LT가 모두 양성인 *E. coli* O148H28의 경우, ST만을 생산하는 *E. coli* O78H에 비해 절반이하의 흡광도를 나타내어 이균주가 더 많은 양의 ST를 생산한다는 것을 알 수 있었고, 이를 확인하기 위해 각각의 배양상청액을 생리식염수로 2배 계단희석하여 동일한 ELISA방법으로 ST의 역가를 측정된 실험에서도 *E. coli* O148H28이 1:16을 나타낸 반면, *E. coli* O78H는 1:2를 나타냄으로써 확인되었다. 또한 infant mouse assay의 결과에서도 *E. coli* O148H28이 더 높은 G/B ratio값을 보임으로써 다시 한번 확인할 수 있었다.

고 찰

어떤 단일물질울 동물에 주사하여 그 물질에 특이한 항체를 얻고자 할때 만족스러운 항체역가를 획득하기 위해서는 몇가지 사항---항원의 특성, 항원의 순도(purity), 면역대상동물, 항원주입경로, 항원의 양 및 면역기간등---을 고려할 필요가 있다특히 그 물질이 수용성 항원일 경우, 그물질의 화학적 구조와 분자의 크기가 그 물질이 가지는 항원성을 결정해 주게되므로 항원의 특성이 가장 먼저 고려되어야 한다. 단백질이나 polypeptide같이 분자량이 크고 복잡한 구조를 이루는 물질은 면역반응을 쉽게 자극하나, 분자량 5,000이하인 peptide등의 경우 작은 분자량 때문에 항원으로 인지되는데 필요한 명확한 3차

구조를 갖지 못하므로 항원성이 거의 없다²⁶⁾.

따라서 이러한 hapten을 항원으로 사용하기 위해서는 분자량이 큰 carrier단백질과 결합시켜 항원성을 부여한 후 면역에 사용하는 것이 보통이다. 본 실험에서 ST는 분자량 2,000내외의 작은 peptide로서 그 자체만으로는 항원성이 거의 없기 때문에 ST에 대한 항체를 얻기 위해서는 이미 언급한 바와 같은 사항이 고려되어야 한다.

우선 항원으로서 ST의 순도(purity)가 고려되어야 하는데 정제되지 않았거나 부분정제된 ST를 면역에 사용하였을 경우, ST에 대한 항체보다도 오히려 다른 성분에 대한 비특이적 항체가 형성될 가능성이 매우 높다. 따라서 순수정제된 ST를 항원으로 사용해야하며 저자는 이등⁴⁾이 보고한 정제과정에 따라 ST를 분리정제하였다. 먼저 정제를 위한 ST생산균주로는 *E. coli* O148H28 균주를 선택하였는데, 이는 ST와 LT를 모두 생산하지만 ST만을 생산하는 균주인 *E. coli* O78H에 비해 단위균중식당 ST의 생산량(ST unit/absorbance)이 많기 때문에 정제에 매우 유리하며(Table 3), 또한 ST는 균체외로 유리되지만 LT는 대부분이 균체내부에 존재한다는 사실을 감안하면^{10, 24)}이 균주의 배양상청액을 ST정제에 이용하는 것이 효율적이다.

정제를 위한 ST생산용 배지는 양등³⁾이 보고한 succinate salts 배지를 사용하였다. 이제까지 장독소생산용 배지로는 주로 CYES배지나 syncase배지등 균의 증식이 매우 왕성한 복합배지가 사용되어 왔는데, 이러한 배지에 균을 배양할 경우 ST이외에도 다량의 균대사산물이 생산되므로 그 배양상청액을 정제에 이용하기에는 매우 부적당하다. 따라서 세균성장에 필요한 다수의 기본적인 염류에 몇가지 아미노산이나 당류를 첨가한 합성배지를 사용하면 균의 발육을 되도록 억제하면서 대량의 독소생산을 유도할 수 있으며, 이러한 목적으로 개발된 succinate salts 배지는 기본염류와 탄소원 및 에너지원으로서 sodium succinate만으로 구성된 단순합성배지이다. 한편 본실험에서 대장균 표준균주의 ST생산여부를 검색하기 위한 세균배양시 CYES-2배지를 사용하였는데, 실제 *E. coli* O148H28 균주의 경우 CYES 2배지에 비해 succinate salts 배지를 사용하였을 때 2배 이상의 ST생산을 보임으로써³⁾ ST의 정제뿐만 아니라 검색에 있어서도 유리한 조건을 얻을 수 있으나, 본 실험에

사용된 4종의 균주가 succinate salts 배지에서 동일한 증식정도를 나타내지 못하였으며 특히 *E. coli* O1H7의 경우 다른 균주에 비해 2배 이상 증식이 억제됨으로써 ST검색을 위한 동일한 조건을 맞출 수 없었다. 이에 따라 저자는 장독성 대장균의 배양에 가장 보편적으로 사용되어온 CYES-2 배지에 검색할 대장균을 배양하였다.

정제된 ST의 항원성을 높이기 위해서는 carrier 단백질과의 결합(conjugation)이 불가피하다. 일반적으로 hapten과 carrier를 결합시키고자 할때, 결합후 hapten의 구조변화가 일어나지 않아야 하며 carrier와의 연결부분이 hapten의 항원결정기에 포함되지 않아야 하므로 carrier의 선택에 신중을 기해야 한다²⁶⁾.

또한 carrier는 면역대상동물에 이물질로 인식되는 단백질이어야 하므로 이러한조건에 적합한 carrier로서 가장 널리 사용되는 것은 thyroglobulin과 keyhole limpet hemocyanin 및 각종동물의 혈청알부민등을 들수 있다. 여러 연구자들이 ST를 각종 carrier와 결합시켜 면역을 시도하였는데 그들이 사용한 carrier 단백질을 보면 bovine IgG²⁰⁾, porcine IgG²⁹⁾, 인혈청알부민(human serum albumin),³⁴⁾ hemocyanin,¹⁸⁾ 토끼혈청 알부민(rabbit serum albumin)²⁸⁾ 및 우혈청알부민^{6, 7, 34)} 등이 있으며 conjugating agent에 있어서도 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide(EDCI)^{7, 18, 20, 26)}와 glutaraldehyde⁶⁾ 및 dimethyl suberimidate(DMS)³⁴⁾ 등이 다양하게 사용되었다. 뿐만 아니라 ST와 carrier 단백질의 분자비율 및 총단백질량에 대한 conjugating agent의 분자비율, 그리고 사용되는 완충액 및 반응시간등의 각종 조건이 보고자에 따라 모두 상이하고 그 결과 또한 매우 다양하여, 아직까지 ST를 carrier와 결합시키는 알맞은 방법이 설정되고 있지 않음을 알 수 있다. 따라서 저자는 ST의 carrier로 이미 가장 많이 사용되었고 또한 일반적으로도 가장 많이 사용되는 BSA를 선택하였고, 이를 EDCI로 ST와 결합시켰다. Conjugation의 제반 조건은 본문에 기술한 바와 같이 Kauffman²⁸⁾ 및 Thompson 등³²⁾의 방법과 McGuigan³⁷⁾의 일반적인 방법을 토대로 설정하였다.

이상과 같이 제작된 항원을 6주-8주령 BALB/c마우스에 주사하여 면역하였고, 면역된 마우스로부터 세포융합 하루전에 채혈하여 항혈청의 역가를 측정하였다. 그런데 혈청의 역가측정시

항원부착과정에서 ST를 분주한 well대신 coating buffer만을 분주한 well을 각각두고 동일한 과정으로 항원을 부착한 후 희석된 항혈청을 양 well에 동시에 첨가하여 ELISA를 시행하였다. 그 결과, ST를 부착한well의 항체역가는 1;12800이었고 ST를 부착하지않은 well에서도 1:800의 항체역가를 보였다. 따라서 ST를 부착하지 않은 well에서 반응을 나타낸항체가 carrier로 사용된 BSA에 대한 항체이며 이것이 ELISA과정에서 blocking에 사용된 BSA와 반응을 나타냈다는 것을 알 수 있었다. 이에 따라 ST를 항원으로 부착한 well 역시 동일하게 BSA blocking을 거쳤다는 점을 감안하면 실제 ST에 대한 항혈청의 역가는 1:12800보다 낮을 것으로 추정된다. 한편 세포융합후 융합세포 선별과정에서도 앞서 시행한 ELISA와 동일한 방법으로 항체의 생성여부를 검색하였는데, ST를 부착한 well과 부착하지 않은 well에서 모두 반응을 나타낸 경우 BSA에 대한 항체이거나 또는 ST와 BSA를 공유하는 항원 결정기에 대한 항체일 것이므로 이를 제외하고, ST를 부착한 well에서만 반응을 나타내는 항체를 anti-ST 항체로 선별하였다.

융합세포중 ST에 대한 항체를 생산하는 4well을 선택하여 각각 cloning한 후 AS11, AS36, AS41 및 AS47로 명명하고 5주 이상 계대배양하면서 각각으로부터 생산된 단세포군 항체의 특성을 규명하였다.

AS11단세포군 항체의경우 ELISA로 측정한 배양상청액의 항체역가가 나머지 다른 3종의 단세포군항체에 비해 10배 이상 훨씬 낮았다. 그러나 부착항원으로 free ST 대신 ST-BSA conjugate를 사용하여 동일한 조건으로 ELISA를 시행한 결과, AS11 단세포군 항체의 역가가 극적으로 상승하여 다른 단세포군 항체의 역가와 거의 같은 수준을 나타내었다. 따라서 이와 같은 현상은 AS11단세포군 항체가 ST conjugation 과정에서 ST의 구조가 일부 변형된 부위의 항원결정기에 대하여 생성된 항체일 것이라는 가능성을 제시해 주었으며, 또 한편으로는 ST-BSA에서는 제대로 노출되어 있는 ST의 항원 결정기가 free ST를 항원으로 사용할 경우 그부위가 well에 부착되어 충분히 항체에 노출되지 못함으로써 나타난 현상일 가능성도 있었다.

한편 이들 융합세포주의 배양상청액내 항체역가는 AS36이 1:1024 이상이었고 나머지 AS41

및 AS47은 1 : 512, AS11은 1 : 32 정도였으며, 이들 단세포균 항체가 ST의 독성을 중화할 수 있는지의 여부를 검색한 결과 AS36 단세포균 항체만이 중화항체로 판명되었다. 이상이 실험 결과를 토대로, 세포의 활성 및 항체생성이 지속적으로 높고 ST에 대한 중화항체를 생산하는 AS36 하이브리도마 세포주를 최종선택하여 실험에 사용하였다.

단세포균 항체에 의한 ST독성의 중화효과를 관찰하기 위하여 먼저 AS36 배양상청액을 PM-10 ultrafiltration membrane(M.W. cut-off 10,000, Amicon)으로 5배 가량 농축하여 4 units의 ST와 반응시킨 후 infant mouse assay로 측정 한 예비실험결과, 부분적인 중화효과를 관찰할 수 있었다. 이에 따라 AS36의 복수를 원액부터 1 : 32까지 2배 계단희석하여 중화항체의 역가를 검색하였다(Fig. 4). 대조군으로 V653 복수와 PBS를 각각 ST와 동일하게 반응시켜 G/B ratio를 측정한 결과 8units와 4units의 ST에 대해 V653대조군은 0.129와 0.103을, PBS대조군은 0.106 및 0.105를 각각 나타내었다. 한편 8units의 ST와 반응시킨 AS36의 복수는 G/B ratio가 모두 양성으로 나타났는데 1 : 32에서는 0.100으로 PBS 대조군과 유의한 차이가 없었고, 1 : 16에서 0.089를 나타냄으로써 여기까지 부분적인 중화효과를 관찰할 수 있었다. 4units의 ST에 대해서는 1 : 4에서 0.060으로 G/B ratio값이 음성이었고, 1 : 32에서는 0.088로서 대조군에 비해 유의하게 낮았다. 따라서 4units의 ST에 대해서는 1 : 4까지 완전중화효과를 관찰할 수 있었으며 1 : 32에서도 부분적인 중화효과를 관찰하였다. 이상의 결과에서 AS36 복수의 중화항체 역가가 ST 4units에 대하여 1 : 4로서 비교적 낮다고 생각되는 수치이나 이등⁴¹⁾이 ST로 면역한 BALB/c 마우스의 항혈청에서 측정된 중화항체가 2units의 ST에 대하여 1 : 4였던 점을 비교하면 두값에 큰 차이가 없다. 또한 다른 연구자들의 결과를 살펴봐도 Lallier 등³²⁾이 염소와 토끼에 ST를 면역하여 얻은 항혈청의 중화항체를 ST 6units에 대하여 각각 1 : 8과 1 : 4로 보고하였고, Okamoto 등⁴¹⁾이나 Takeda 등⁵¹⁾의 보고에서도 기니픽 과 토끼에서 얻은 항혈청의 역가가 4units의 ST에 대해 1 : 8 또는 1 : 4로 나타나 저자의 결과와 매우 유사하며 이러한 사실로 미루어 일반적으로 ST에 대한 중화항체 역가가 높지 않음을 알 수 있었다. 그

리나 이 중화항체는 ST의 생물학적 활성을 연구하는데 여러가지 도움을 줄 수 있고, 이를 이용한 새로운 ST측정법 개발의 가능성도 생각할 수 있으며 더 나아가 유행성 설사질환을 치료하기 위한 목적에도 그 유용성이 매우 높을 것으로 사료된다.

Competitive ELISA는 1983년 Friguier 등이 *E. coli*의 tryptophan synthase에 대한 단세포균 항체를 얻어 이들이 동일한 항원결정기에 대한 항체인지를 검색하기 위하여 두가지 항체를 서로 경쟁시키는 ELISA 방법을 고안해냄으로써 개발되었다. 이후 Thompson 등⁵²⁾이 이를 응용해서 ST에 대한 단세포균 항체에 대하여 부착항원인 ST와 검색할 ST를 경쟁시키는 새로운 competitive ELISA 방법을 개발하였다. 이는 일정량의 부착항원에 대한 일정량의 항체 반응성이 경쟁항원이 첨가됨에 따라 억제되는 정도, 즉 경쟁항원에 의해 항체의 일부가 흡수되는 정도를 측정하여 검색하고자 하는 항원을 정성적 또는 정량적으로 분석할 수 있는 방법으로서 보통 indirect ELISA에 비해 민감성이 월등하게 뛰어나다고 알려져 있다⁵³⁾. Thompson 등은 사람과 돼지 그리고 소에서 분리된 대장균의 ST 생산여부를 검정하기 위해 각 균주의 배양상청액으로 competitive ELISA를 시행한 뒤, 검체가 들어있지 않은 대조군 흡광도에 대하여 65% 이하의 흡광도를 나타내는 검체를 ST양성으로 판정하였으며 이에 따른 결과는 방사면역측정법과 infant mouse assay로 ST를 측정 한 결과와 비교할 때 완전히 일치하였다고 보고하였다. 그리고 방사면역측정법과 민감도를 비교하여 competitive ELISA가 약 2배 이상 민감도를 나타냈다고 보고하였는데 이는 방사면역측정시 ST에 동위원소를 표지하는 과정에서 항원 결정기의 일부가 변형되어 단세포균 항체가 충분히 결합되지 못하기 때문에 순수한 ST를 사용하는 ELISA에 비하여 민감도가 떨어지는 것이라고 설명하고 있다. 또한 Thompson 등은 그들이 개발한 방법의 민감도를 측정하고 ST의 정량에 필요한 표준곡선을 구하기 위해 정제된 ST를 이용하여 competitive ELISA를 시행한 결과, ST 양성으로 나타난 검색가능한 ST의 최소량은 250pg이라고 보고하였다.

한편 Lockwood 등³⁴⁾ 및 Ronnberg 등⁴³⁾도 competitive ELISA를 이용하여 ST를 측정하였다고 보고하였는데 이들은 단세포균항체신 토끼

에서 얻은 항혈청을 사용하여 ELISA를 시행하였다. 이들의 방법을 살펴보면, Lockwood등은 glutaraldehyde로 conjugation시킨 ST-BSA를 부착항원으로 사용하였으며, 민감도를 높이기 위하여 avidin-biotin system을 ELISA에 적용하였다. 따라서 ST와 항혈청을 반응시킨 후 2차 항체로서 biotin conjugated IgG 및 peroxidase conjugated avidin을 발색제로 사용하여 ST를 측정하였다. 이들은 ST양성의 판정기준을 대조군 흡광도의 90%이하로 정하고 이에 따라 ST 10pg까지 검색이 가능하였다고 보고하였다. 또한 Ronnberg등은 competitive ELISA를 이용하여 대장균 분리균주 및 대변검체의 CYES 배양상청액으로부터 ST를 검색하였다. 이들은 부착항원으로 ST-BSA대신 정제된 free ST를 사용하였고 Lockwood등과 마찬가지로 검체의 흡광도가 대조군의 90% 이하를 나타낼때 양성으로 판정하였으며, 이에 따라 competitive ELISA와 infant mouse assay의 ST측정결과를 비교하여 분리균주는 100%, 대변검체는 85%에서 두 방법의 결과가 일치하였다고 보고하였다.

그러나 대조군 흡광도의 90%를 양성판정기준으로 정한 Lockwood등이나 Ronnberg등의 방법은 65%를 양성기준으로 정한 Thompson등의 방법과 비교할 때 매일 매일, 또는 plate간(inter-plate)이나 plate내(intra-plate)에서 발생할 수 있는 ELISA의 오차를 감안하면 높은 재현성을 기대하기 어려우며 위양성이나 위음성이 나타날 가능성이 많다. 또한 Lockwood등의 방법은 avidin-biotin system을 사용함으로써 ELISA의 과정에서 한단계를 더 거쳐야 하기 때문에 이에 따른 번거로움과 아울러 알맞는 ELISA의 조건을 유지하는데 그만큼 더 어려움이 따를뿐, 실제 민감도면에 있어서는 양성기준을 65%로 바꾸어 환산할 경우 검색가능한 ST의 최소량이 100-250pg 정도로 Thompson등의 방법과 차이가 없었다. Ronnberg등의 방법은 부착항원으로 free ST를 사용함에 따라 ST와 BSA를 결합시키는 불편을 덜 수 있으나 다소 민감도가 떨어지는 것을 감수해야 하는 단점이 있으며, 이는 저자의 예비실험결과에서도 ST만을 부착항원으로 사용한 경우 ST-BSA를 사용하였을 때보다 민감도가 12배 이상 감소함으로써 확인할 수 있었다. 또한 양자의 방법모두가 ST에 대한 항체로 면역혈청을 사용하기 때문에 지속적으로 일정한 항체가를 얻기가 어렵고 비특이적 항체반응이

일어날 수 있는 점등을 고려하면 단세포균 항체를 이용하는 Thompson등의 방법이 우수한 민감도와 재현성을 획득하는데 적절하리라 사료된다. 이에 따라 저자는 Thompson등⁵²⁾ 및 Thompson과 Giannella⁵³⁾의 방법을 토대로 보다 간편하고 신속한 방법의 개발에 도움을 주고자 competitive ELISA의 각종조건을 설정하였다.

먼저 민감도와 특이도를 높이기 위하여 ammonium sulfate 침전 및 DEAE-Sephacel ion exchange chromatography를 통해 단세포균 항체를 정제하였으며, 이 단세포균 항체를 8ug/ml에서 0.4ug/ml의 일정배율로 희석하여 competitive ELISA를 시행한 결과 0.4ug/ml의 항체농도에서 적절한 조건을 잡을 수 있었다. 단세포균 항체의 농도가 이보다 증가하면 민감도는 반대로 감소하였으며 부착항원에 대한 포화농도를 초과한 후에는 경쟁항원에 의한 항체의 흡수효과를 관찰할 수 없었다. 한편 부착항원인 ST-BSA의 농도를 1:500-1:4,000으로 2배 계단희석하여 ELISA를 시행한 결과 1:2,000에서 가장 민감도가 높았고 항원농도의 증감에 따라 나타나는 반응양상은 단세포균 항체의 경우와 유사하였으며, 항원농도 1:2,000이하에서는 민감도가 더 증가하는 경향을 보였으나 전체적인 흡광도가 낮아짐에 따라 육안적으로 반응이 억제되는 정도를 판별하기가 어려웠다. ELISA과정은 Thompson과 Giannella가 ST검체의 반응시간을 4°C에서 18시간으로 설정한 반면 저자는 37°C에서 1시간동안 반응시켜 ST를 측정하였다. 그결과 저자의 방법에서 측정 가능한 ST의 최소량은 Fig. 5에 나타난 바와 같이 250pg으로서 Thompson등⁵²⁾의 결과와 동일하였으며, 이에 따라 저자의 방법은 기존의 competitive ELISA 방법에서 하루가 더 소요되는 번거로움과 시간적 낭비를 배제하였고, 일반적인 ELISA 방법과 같이 신속한 ST의 검색을 가능하게 하였다.

한편 저자의 실험결과를 통해 생물학적 독소 측정법인 infant mouse assay와 competitive ELISA의 민감도를 비교하면 정제된 동일한 ST에 대해 infant mouse assay가 1.6ng의 생물학적 최소단위량(minimum effective dose, MED)을 나타낸데 비해 competitive ELISA를 이용할 경우 250pg의 ST까지 측정이 가능하여 후자의 방법에서 6배 이상의 높은 민감도를 관찰할 수 있었다.

이상의 본 연구에서 저자는 간편하고 신속한

ST의 측정법 개발을 위해 ST에 특이한 단세포 균항체를 생산하였으며, 이를 이용하여 민감도와 특이도 및 재현성이 우수한 competitive ELISA의 조건을 설정하였고 이를 정제된 ST 및 표준 장독성 대장균으로 검정하였다. 따라서 이 방법을 이용하면 ST의 동정을 위한 일반적이고 간편한 임상검사나, 대량의 검체를 처리해야 하는 역학조사 등에 획기적인 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 한편 본 연구의 추후과제로서 보다 더 간편하고 신속한 ST의 동정을 위해 검체의 배양과정과정을 생략하고 대변검체에서 직접 ST를 검색할 수 있도록 현재보다 이 방법의 민감도 및 특이도를 더 향상시키는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

대장균 내열성장독소(ST)의 측정법 개발을 위하여 ST에 특이한 단세포균 항체를 생산하였다. 인형 장독성 대장균인 *E. coli* O148H28(ST⁺/LT⁺)로 부터 생산된 내열성장독소를 순수정제하여 우혈청알부민과 결합시킨 후 BALB/c 마우스에 면역하였고, 면역된 마우스의 비장 림프구와 P3x63Ag8.V653 형질세포종 세포를 PEG 1000을 사용하여 융합하였다. 융합세포주의 항체생성 여부를 효소면역측정법으로 검색하였으며 ST에 특이한 단세포균 항체를 생산하는 융합세포를 골라 클로닝한 후 AS36 하이브리도마 세포주를 최종선택하였다.

AS36 배양상청액과 이를 BALB/c 마우스에 접종하여 얻은 복수의 항체를 효소면역측정법으로 측정한 결과, 각각 1:1,024 및 1:20,480 이었다.

단세포균 항체의 isotype 및 subclass를 sandwich ELISA로 검색한 결과 IgG1 이었다.

단세포균 항체가 ST의 독성을 중화하는지의 여부를 검색하기 위해 마우스의 복수와 ST를 반응시킨 후 infant mouse assay로 검색하여 중화항체를 확인하였으며, 4units의 ST에 대한 중화항체의 역가는 1:4였다.

Ammonium sulfate 침전 및 DEAE-Sephacel ion exchange chromatography를 통해 정제된 단세포균 항체(0.4ug/ml)를 이용하여 competitive ELISA로 ST를 정량한 결과 ST 250pg까지 검색이 가능하여 infant mouse assay에 비해 6배 이상의 민감도를 나타내었으며, 이어 co-

mpetitive ELISA로 장독성 대장균의 WHO 표준균주를 검정하여 높은 민감도와 특이도 및 재현성을 획득하였다.

참 고 문 헌

- 1) 고광옥, 서정기, 장우현, 김문교, 양남용, 최명식: 장독성 대장균에 의한 소아설사의 빈도에 관한 연구. 소아과학회지 26: 949, 1983.
- 2) 김익상, 홍태의, 이우근, 장우현: 대장균의 내열성장독소 생산조절기전: I. 장독성 대장균의 내열성장독소생산에 인산염, 암모니아, 포도당 및 포도당 대사산물이 미치는 영향. 대한미생물학회지 20: 55, 1985.
- 3) 양남용, 김익상, 장우현, 이승훈: 대장균의 내열성장독소 생산에 관여하는 조건. 서울의대 학술지 25: 139, 1984.
- 4) 이우근, 김익상, 장우현, 차창용, 이광호: 장독성대장균의 내열성장독소의 정제. 대한미생물학회지 20: 199, 1985.
- 5) Aimoto S, Sakeda T, Shimonishi Y, Hara S, Takeda T, Takeda Y and Miwatani T: Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *E. coli*. *Eur. J. Biochem.* 129:257, 1982.
- 6) Alderete JF and Robertson DC: Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 19:1021, 1978.
- 7) Brandwein H, Deutsch A, Thompson M and Grannella R: Production of neutralizing monoclonal antibodies to *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 47:242, 1985.
- 8) Burgess MN, Bywater RJ, Cowley CM, Mullan NA and Newsome PM: Biological evaluation of a methanol soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21: 526, 1978.
- 9) Chan SK and Giannella RA: Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for man. *J. Biol. Chem.* 256:7744, 1981.
- 10) Clements JD and Finkelstein RA: Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxin with high specific activity from *Escherichia coli*

- cultures. *Infect. Immun.* 24:760, 1979.
- 11) Deans AG, Ching Y, Williams RG and Harden LB: *Test for Escherichia coli enterotoxin using in infant mice: Application in a study of diarrhea in children in Honolulu.* *J. Infect. Dis.* 125:407, 1972.
 - 12) De SN, Bhattacharya K and Sarkar JK: *A study of the pathogenicity of strains of Bacterium coli.* *J. Pathol. Bacteriol.* 71:201, 1956.
 - 13) Dreyfus LA, Frantz JC and Robertson DC: *Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic Escherichia coli of different host origins.* *Infect. Immun.* 42:593, 1983.
 - 14) Dreyfus LA, Friedmann LT and Robertson DC: *Characterization of the mechanism of action of Escherichia coli heat-stable enterotoxin.* *Infect. Immun.* 44:493, 1984.
 - 15) Evans DG, Evans DJ and DuPont HL: *Virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli.* *J. Infect. Dis.* 136:S118, 1977.
 - 16) Evans DL and Evans DG: *Three characteristics associated with enterotoxigenic Escherichia coli isolated from man.* *Infect. Immun.* 8:322, 1973.
 - 17) Field M, Graf LH, Laid WT and Smith PL: *Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: In vitro effect on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:2800, 1978.
 - 18) Frantz JC and Robertson DC: *Immunological properties of Escherichia coli heat-stable enterotoxin: Development of a radioimmunoassay specific for heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity.* *Infect. Immun.* 33:193, 1981.
 - 19) Giannella RA: *Suckling mouse model for detection of heat-stable Escherichia coli enterotoxin: Characteristics of the model.* *Infect. Immun.* 14:95, 1978.
 - 20) Giannella RA, Drake KW and Luttrell M: *Development of radioimmunoassay for Escherichia coli heat-stable enterotoxin.* *Immun.* 33:186, 1981.
 - 21) Greenberg HB, Sack DA, Rodriguez W, Sack RB, Wyatt RG, Kalica AR, Horswood RL, Chanock RM and Kapikian AZ: *Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin.* *Infect. Immun.* 17:541, 1977.
 - 22) Guerrant RL, Hughes RL, Chang B, Robertson DC and Murad F: *Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: Studies of tissue specificity, potential receptors and intermediates.* *J. Infect. Dis.* 142:220, 1980.
 - 23) Gyles CL: *Heat-stable forms of the enterotoxin from E. coli strains enteropathogenic for pigs.* *Ann. NY Acad. Sci.* 176:314, 1969.
 - 24) Hirst TR, Randall LL and Hardy SJS: *Cellular location of heat-stable enterotoxin in Escherichia coli.* *J. Bacteriol.* 1157:637, 1984.
 - 25) Hurrell JGR: *Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and applications.* CRC Press, Florida: 51, 1982.
 - 26) Hurn BAL and Chantler SM: *Production reagent antibodies. In Immunochemical techniques. Part A, vol. 1, Academic Press, New York:104, 1980.*
 - 27) Joklik KW, Willet HP and Amos DB: *Zinsser Microbiology. 18th ed, Appleton-Century-Croft, New York 139, 1984.*
 - 28) Kauffman PE: *Production and evaluation of antibody to the heat-stable enterotoxin from a human strain of enterotoxigenic Escherichia coli.* *Appl. Environ. Microbiol.* 42:611, 1981.
 - 29) Klipstein FA, Egnert RF and Houghten RA: *Properties of synthetically produced Escherichia coli heat-stable enterotoxin.* *Infect. Immun.* 39:117, 1983.
 - 30) Kohler G, Howe CS and Milstein C: *Fusion between immunoglobulin secreting and nonsecreting lines.* *Eur. J. Immunol.* 6: 292, 1976.
 - 31) Kohler G and Milstein C: *Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.* *Nature.* 256:495, 1975.
 - 32) Lallier R, Lariviere S and Pierre S: *Escherichia coli heat-stable enterotoxin: Rapid method of purification and some characteristics of the toxin.* *Infect. Immun.* 28:469, 1980.
 - 33) Littlefield JW: *Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants.* *Science.* 145:709, 1964.
 - 34) Lockwood DB and Robertson DC: *Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Escherichia coli heat-stable enterotoxin (STa).* *J. Immunol. Methods.* 75:295,

- 1984.
- 35) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
 - 36) Madson GL and Floyd CK: *Physicochemical properties of heat-stable enterotoxin produced by Escherichia coli of human origin*. *Infect. Immun.* 28:1051, 1980.
 - 37) McGuigan JE: *Immunological studies with synthetic human gastrin*. *Gastroenterol.* 54:1005, 1968.
 - 38) McKearn JJ: *Cloning of hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase*. In *Monoclonal antibodies, hybridoma: A new dimension in biological analysis*. Plenum Press, New York, London:374, 1980.
 - 39) Moseley SL, Echeverria P, Seriwatana J, Tirapat, Chaicumpa W, Sakuldaieara T and Falkow S: *Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by colony hybridization using three enterotoxin gene probes*. *J. Infect. Dis.* 145: 863, 1982.
 - 40) Newsome PM, Burgess MN and Mullan NA: *Effect of E. coli heat-stable enterotoxin on cyclic GMP levels in mouse intestine*. *Infect. Immun.* 23:290, 1978.
 - 41) Okamoto K, Miyama A, Takeda T, Takeda Y and Miwatani T: *Cross-neutralization of heat-stable enterotoxin activity of enterotoxigenic Escherichia coli and Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 16:85, 1983.
 - 42) Olsson E and Soderlind O: *Comparison of different assay for definition of heat-stable enterotoxigenicity of Escherichia coli porcine strains*. *J. Clin. Microbiol.* 11:6, 1980.
 - 43) Ronnberg B, Soderlind O and Wadstrom T: *Evaluation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for porcine Escherichia coli heat-stable enterotoxin*. *J. Clin. Microbiol.* 22:893, 1985.
 - 44) Sack RB: *Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* 29:333, 1975.
 - 45) Sack RB, Gorbach SL, Banwell JG, Jacobs B, Chatterjee BD and Mitra RC: *Enterotoxigenic E. coli isolated from patients with severe cholera like disease*. *J. Infect. Dis.* 123:378, 1971.
 - 46) Sack RB, Sack DA, Mehlman IJ, Orskov F and Orskov I: *enterotoxigenic Escherichia coli isolated from food*. *J. Infect. Dis.* 135:313, 1977.
 - 47) Saeed AMK, Sriranganathan N, Cosand W and Burger D: *Purification and characterization of heat-stable enterotoxin from bovine enterotoxigenic Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40:701, 1983.
 - 48) So M and McCarthy BJ: *Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic Escherichia coli strains*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:4011, 1980.
 - 49) Staples SJ, Asher SE and Giannella RA: *Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of E. coli pathogenic for man*. *J. Biol. Chem.* 255:4716, 1980.
 - 50) Svennerholm AM, Wikstrom M, Lindblad M and Holmgren J: *Monoclonal antibodies against Escherichia coli heat-stable toxin (STa) and their use in a diagnostic ST ganglioside GM1-enzyme-linked immunosorbent assay*. *J. Clin. Microbiol.* 24:585, 1986.
 - 51) Takeda T, Takeda Y, Aimoto S, Takeda T, Ikemura H, Shimonishi Y and Miwatani T: *Neutralization of activity of two different heat-stable enterotoxin (STh and STp) of enterotoxigenic Escherichia coli by homologous and heterologous antisera*. *FEMS Microbiol. Lett.* 20:357, 1983.
 - 52) Thompson HR, Brandwein H, Racke ML, and Giannella RA: *Simple and reliable enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies for detection of Escherichia coli heat-stable enterotoxins*. *J. Clin. Microbiol.* 20:59, 1984
 - 53) Thompson MR and Giannella RA: *Escherichia coli heat-stable enterotoxins*. In *Method of enzymatic analysis*. 3rd ed, vol. 11, VCH, Weinheim: 63, 1986.
 - 54) Yolken RH, Greenberg HB, Merson MH, Sack RB and Kapikian AZ: *Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin*. *J. Clin. Microbiol.* 6:439, 1977.