

Biotin 표지법에 의한 질트리코모나스의 표면 항원 분리

우남식¹⁾ · 민득영^{1)*} · 임미혜¹⁾ · 최영길²⁾

한양대학교 의과대학 기생충학교실¹⁾ 및 자연과학대학 생물학과²⁾

국문초록: 질트리코모나스(*Trichomonas vaginalis*)의 항원성 변이를 관찰하기 위해 원충의 표면 항원(surface antigen)을 N-hydroxysuccinimide-biotin(NHS-biotin)으로 표지하고 표지된 표면 단백질과 토끼의 항혈청으로 면역침전(Immunoprecipitation: IP)시켰으며 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)와 전기영동이적법을 시행하였다. 살아있는 원충을 NHS-biotin으로 표지하여 표면 단백질을 분리하고 이를 질트리코모나스에 면역된 토끼 항혈청과 면역침전시켰던 바 46, 60, 68, 90, 130 그리고 220 kDa에서 6개의 단백질이 항원성을 나타내었으며 질트리코모나스의 분리주인 HY-1, HY-15 및 ATCC 50148 주간에 차이는 없어 이들 6개 분획이 표면 항원성 발현에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

서 론

기생원충의 표면 항원은 부착인자(attachment factor) 또는 virulence factor로 작용하거나 면역 억제나 항원 변이를 통해 숙주의 면역 반응을 피하게 하는데 있어 매개 역할을 하며 또한 숙주의 면역학적 방어기전을 활성화시켜 증체를 파괴하거나 분열을 억제하기도 한다(Scott and Snary, 1979).

질트리코모나스(*Trichomonas vaginalis*) 감염의 경우 질트리코모나스의 표면 항원이 숙주의 질점막에 있는 여러 가지 단백질과 당단백질에 결합하여 숙주의 점막 표면과 결합함으로써 감염이 진행된다(Kreiger et al., 1985). 이러한 질트리코모나스의 질 상피세포 부착은 질트리코모나스의 표면에 있는 proteinaceous adhesin에 의해 매개되는 것으로 이 원충의 표면 항원이 숙주-기생충간의 반응에서 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다(Alderete et al., 1988). 또한 질트리코모나스는 충주(strain) 또는 지역에 따라 이질성(heterogeneity)을 형성하며, 이러한 이질성은 숙주의 면역반응을 피하거나 재감염을 유발하는 데 중요한 역할을 하게 되는데 이때 표면 항원의 항원 변이가 이질성의 주 원인으로 알려져 있다(Alderete et al., 1985).

이 실험에서는 살아있는 세포에서 세포막을 통과

하지 않고 단지 세포막만을 선택적으로 표지하는 것으로 알려진 N-hydroxysuccinimide-biotin(NHS-biotin)(Cole et al., 1987)을 이용하여 질트리코모나스의 표면 단백질을 분획하고 면역침전반응(immunoprecipitation)시켜 질트리코모나스에 대한 항혈청에 반응하는 표면 항원을 찾아보았으며 몇개 분리주간의 표면 항원을 비교하여 항원 변이와 표면 항원과의 관계를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 질트리코모나스의 배양 및 수확

질트리코모나스는 한양대학병원 산부인과에 내원한 질염 환자로부터 분리, 마우스에 접종하여 나타난 피하농양으로 병원성을 확인한 분리주 HY-1 및 HY-15와 American Type Culture Collection으로부터 구입한 ATCC 50148주를 Diamond(1968)의 TPS-1 배지에 넣어 37°C 항온기에 무균적으로 배양하여 사용하였다.

2. 면 역

질트리코모나스 HY-1주에 대한 항혈청을 얻기 위하여 Alderete et al.(1983a)의 방법으로 3.5 kg 되는 New Zealand 흰 토끼를 질트리코모나스 HY-1 주로 면역시켜 혈청을 분리, 항체가를 확인하여 사용하였다. 대조군으로는 면역시키기 전의 흰 토끼 혈청을 사용하였다.

· 논문접수 1992년 12월 28일, 수정재접수 1993년 1월 26일.

* 별책 요청 저자

3. Biotin의 표지

Andrews and Bjorvatn(1991)의 방법에 따라 1 mM N-hydroxysuccinimide-biotin(NHS-biotin; Bio-Rad, Calif.)을 1×10^7 /ml의 살아있는 질트리고모나스 현탁액에 첨가하여 0°C에서 30분간 반응시켰으며(biotinylation) 4°C PBS로 3회 세척하여 반응을 정지 시켰다.

4. 질트리고모나스 단백질의 용출

Lima and Villalta(1989)의 방법에 따라 살아 있는 질트리고모나스를 biotinylation시킨 후 단백질을 용출시켰다. 먼저 50 mM Tris/HCl(pH 8.3)완충용액에 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.8% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS; Sigma, Mo.), 그리고 antiprotease로서 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF; Sigma, Mo.), 1 mM p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone(TLCK; Sigma, Mo.), 그리고 50 µg/ml N-σ-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone(TPCK; Sigma, Mo)을 첨가하여 lysis buffer를 만들었다. 4°C PBS로 세척된 5×10^7 의 질트리고모나스를 lysis buffer 1 ml에 넣어 얼음 상자 속에서 30분 동안 반응시켰으며, 반응 후 tight dounce homogenizer(AA, Thomas, NJ)에 넣어 serrated pestle(AA, Thomas, NJ)로 세포를 파괴시켰다. 파괴된 원충용액은 10,000 × g에서 30분간 원침시켰으며 상청액을 취해 centricon(cut off value: 10 KDa; Amicon, MA)으로 투석시켜 수용성 단백질로 사용하였다. 이들 수용성 단백질의 함량은 micro BCA assay(Smith et al., 1985)의 방법으로 측정하였다.

5. 면역침전법(Immunoprecipitation)

NHS-biotin으로 표지한 질트리고모나스 표면 단백질을 항원으로 사용하여 항원과 항혈청을 반응시켜 면역침전법(immunoprecipitation; Anderson and Blobel, 1983)을 실시하였다. 즉 단백질 용출액 125 µl(675 µg)와 항혈청 50 µl를 섞어 4°C에서 18시간 반응시켰으며 50% (v/v) Protein A-Sepharose(Pharmacia, Wis)를 이용하여 항원-항체의 복합체를 4°C 진탕 배양기에서 1시간 동안 흡착시킨 다음, 0.4% CHAPS가 든 lysis buffer로 2회, 0.04% CHAPS가 든 lysis buffer로 1회 그리고 lysis buffer 만으로 1회 세척하였다. Protein A로부터 항체와 반응한 항원을 유리시키기 위하여 세척된 항원-항체의 복합체에 전기영동용 sample buffer를 넣고 30분간 끓인 후 760 × g에서 10분간 원침시켜 상청액을 항체에 반응하는 막 단백질의 분획으로 사용하였다.

이때 살아있는 원충에 biotinylation시킨 후 면역

혈청을 반응시킨 실험군의 대조군으로 biotinylation된 단백질에 정상토끼 혈청을 반응시키거나 원충을 파괴한 다음 biotinylation시켜 얻은 단백질에 토끼의 항혈청을 반응시켜 관찰하였다.

6. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 및 전기영동 이적(electroblotting)

Biotinylation 및 면역침전법으로 추적한 질트리고모나스의 막 분획을 Laemmli(1970)의 방법으로 SDS-PAGE하여 Towbin et al.(1979)과 Tsang et al.(1983)의 방법에 따라 전기영동 이적시켰으며 단백질이 전이된 nitrocellulose paper는 amido black으로 염색하거나 antibiotin-peroxidase(Vector, Calif)로 반응시켜 기질용액 내에서 항원-항체 반응을 관찰하였다.

결 과

1. 면역침전법(Immunoprecipitation)에 의한 항원대의 관찰

1 mM과 10 mM의 NHS-biotin으로 표지한 항원을 질트리고모나스에 면역된 토끼혈청과 섞어 각각 반응시켰던 바 1 mM의 NHS-biotin을 반응시킨 항원의 경우 항원 원액과 항혈청을 반응시켰을 때에만 4개의 분획이(Fig. 1A, small arrows) 희미하게 관찰되었으며, 1 mM의 NHS-biotin 농도에서는 어떤 항원의 농도에서도 거의 면역침전되지 않았다. 그러나 농도를 높여 10 mM의 NHS-biotin을 반응시킨 경우 항원 원액과 항혈청을 반응시켰을 때 46, 60, 68, 90, 130 그리고 220 kDa에서 반응성을 나타내는 분획이 관찰되었다(Fig. 1B).

2. Biotinylation된 살아 있는 질트리고모나스 원충 및 lysate의 수용성 단백질 비교

질트리고모나스를 NHS-biotin으로 표지할 때 biotinylation의 효율성을 관찰하기 위하여 원충을 파괴한 다음 원충의 전체 단백질을 biotinylation시킨 군(L)과 살아있는 원충에 biotinylation을 시킨 군(B)을 비교했을 때 SDS-PAGE상에서 두 군의 전체 단백질 전개 양상은 차이가 없는 것으로 나타나 두 방법에서 단백질 용출은 동일하게 이루어졌음을 알 수 있었다(Fig. 2A). 그러나 L군과 B군을 antibiotin으로 반응시켰을 때에는(Fig. 2B) B군에서 반응을 나타내는 분획이 현저하게 감소하였으며 이를 면역침전시켰을 때에도(Fig. 2C) 유사한 결과가 관찰되어 B군에서 표면 단백질만 분리되었음을 알 수 있었다.

3. 질트리고모나스 분리주간의 비교

질트리고모나스 분리주들(HY-1, HY-15 및

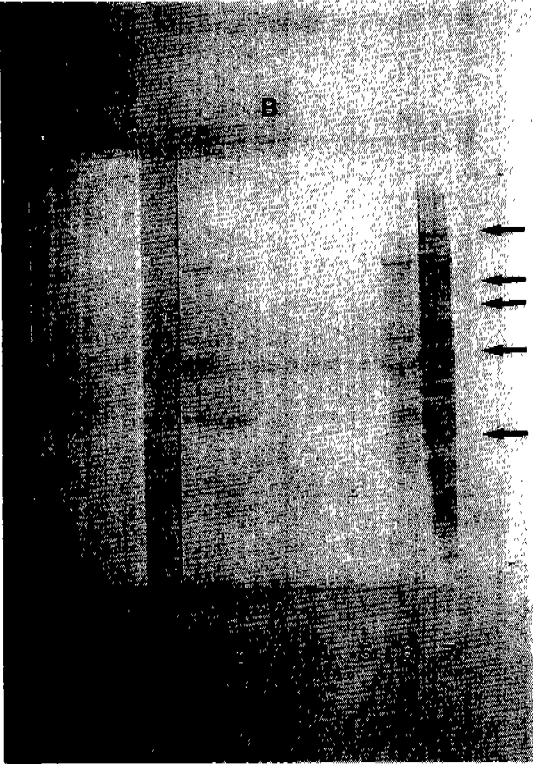


Fig. 1. Immunoprecipitation of biotinylated *T. vaginalis*. 120 μ l aliquots of trichomonal proteins labelled at concentrations of 1 mM (A) or 10 mM (B) NHS-biotin were incubated with 50 μ l of normal (lane 5) and immune rabbit serum in the presence of 0 (lane 1), 125 (lane 2), 450 (lane 3) or 1075 μ l (lane 4) lysis buffer respectively. Immunoprecipitated complexes were separated by SDS-PAGE and electroblotting and labelled proteins were detected by anti-biotin-HRP.

ATCC 50148)간의 전체 단백질 전개양상 및 표면 단백질의 항원성을 비교했던 바 분리주간에 차이가 없었다 (Fig. 3).

고 찰

최근 avidin-biotin system이 개발됨으로써 생물학적으로 중요한 고분자 (macromolecule)를 분석하는 데 많은 진전을 보고 있는 바 ELISA (Kendall *et al.*, 1983)와 Western blot 상에서 항원-항체 복합체의 확인이나 표면 항원의 순수분리등 (Finn *et al.*, 1984)에서 광범위하게 활용되고 있다. 특히 Hurley *et al.* (1985)은 소의 백혈구 표면 단백질의 lysine 잔기 (residue)에만 표지되는 NHS-biotin을 반응시켜 전기영동 이적법을 시행하면 avidin-HRP를 이용하여 표면 단백질 분획이 가시화될 수 있음

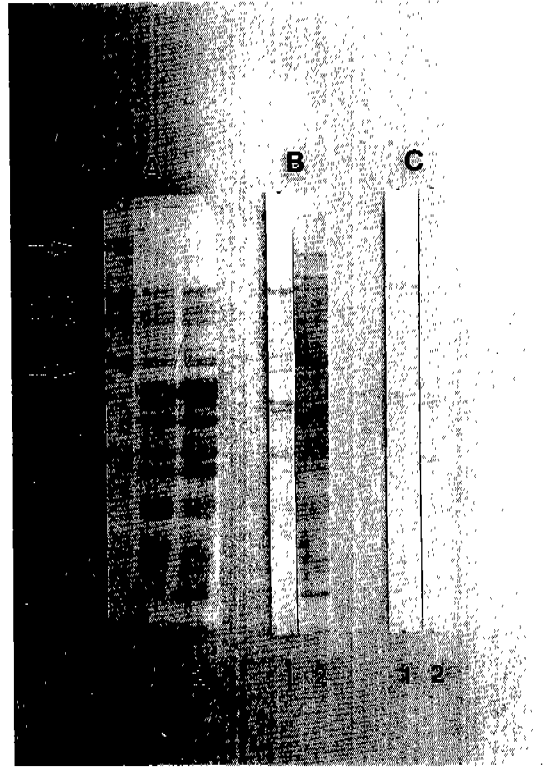


Fig. 2. Western blots of biotin-labelled proteins of *T. vaginalis* HY-1 obtained from intact cells (lane 1) and from control cells disrupted prior to labelling (lane 2). A: Amido black staining. B: Anti-biotin detection of biotinylated proteins. C: Immuno-precipitated proteins labelled by NHS-biotin and detected by anti-biotin-HRP.

을 보고하였던 바 Andrew and Bjorvatn (1991)은 NHS-biotin을 이용하여 특이적으로 표지된 표면 단백질에 protein A를 매개로한 면역침전법을 이용하여 메바 (*Entamoeba histolytica*) 표면 항원의 분석에 처음으로 시도하여 기생충의 표면 항원을 분석함에 있어서 중요한 수단이 됨을 제시하였다.

이 실험에서는 Andrews and Bjorvatn (1991)이 제시한 바 있는 biotinylation과 면역침전법을 이용한 표면 항원 분석을 질트리코모나스에 도입하여 질트리코모나스의 표면 항원 분석을 시도하였다. 예비 실험에서 biotinylation된 단백질을 인지하는 방법으로 흔히 쓰이는 avidin-HRP와 anti-biotin-HRP를 사용하여 표면 단백질 분리 양상을 비교한 결과 anti-biotin-HRP는 일부 단백질만을 인식하였으나 avidin-HRP의 경우 많은 단백질을 인식하였으며 세포를 먼저 파괴하고 biotinylation시킨 전체 단백질과 비교할 때 표면 단백질 분획이 거의 동일하게 나타나 avidin-HRP는 표면 단백질을 분리함에 있어서 특이도가 결여되는 것으로 보였다. 따라서



Fig. 3. Western blots of biotin-labelled proteins of *T. vaginalis* HY-1 (lane 1), HY-15 (lane 2) and ATCC 50148 (lane 3). A: Amido black staining of *T. vaginalis* proteins. B: Anti-biotin detection of biotinylated proteins obtained from intact cells. C: Immunoprecipitation of biotinylated proteins obtained from intact cells.

antibiotin-HRP가 표면 단백질 분리에 있어서 특이도가 높아 이 실험에서는 antibiotin-HRP를 사용하여 전개양상을 관찰하였다. 이때 원충을 먼저 파괴하여 biotinylation(L)한 군과 살아있는 원충에 biotinylation시키 파괴한 군(B)의 단백질 전개 양상을 비교한 바 두 군이 동일하게 나타나 biotinylation이나 단백질 용출시에 단백질 변성은 없는 것으로 확인되었다. 또 L군과 B군을 antibiotin-HRP로 염색할 경우 B군의 분획이 현저하게 감소하였으며 면역침전법의 경우에도 같은 경향을 보여 biotinylation에 의해 질트리코모나스의 lysine잔기를 지닌 표면 단백질이 분리되었음을 알 수 있었다. 그러나 원충을 준비하는 과정에서 막 투과성이 변화한 원충에 NHS-biotin이 투과될 수 있다는 가정도 배제할 수 없으므로 향후 biotinylation 시킨 원충에 streptavidin-gold를 반응시켜 전자 미경으로 관찰하여 biotin-streptavidin-gold(Slot and Geuze, 1985) 입자가 원충의 막에서만 존재함이 증명된다면 이 실험을 보다 뒷받침할 수 있으리라 본다. 또한

이 실험의 biotin-antibiotin system에서 전체 항원에 비해 적은 수의 표면 항원 분획이 분리되는 양상을 관찰할 수 있었으므로 앞으로 differential centrifugation에 의해 표면 단백질을 순수 분리하여 이 실험에서 분리된 표면 단백질 분획과 비교하여 본다면 질트리코모나스의 표면 항원 분석에 있어서 중요한 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

이 실험에서는 biotinylation시킨 항원에 면역침전법을 시도하여 46, 60, 68, 90, 130 그리고 220 kDa에서 반응대를 나타내 6개의 분획을 분리하였으며 특히 질트리코모나스의 이질성에 관여한다고 알려져 있는(Alderete *et al.*, 1983b) 200 kDa 이상의 분획이 관찰되었다. Alderete *et al.*(1983a)은 I¹²⁵를 이용하여 질트리코모나스에 대한 RIP를 시행하여 20 kDa에서 200 kDa까지 20개의 단백질 분획이 항원성을 나타냈다고 보고하였으며 200 kDa 이상의 분획이 질트리코모나스의 이질성에 관여한다고하여 이 연구에서 관찰된 200 kDa이상의 분획은 앞으로 표면 항원 및 항원 변이를 연구하는 중요한 분획이 될 것으로 생각되었다.

한편 이 실험에서 biotinylation-IP에 의해 질트리코모나스 표면 항원의 분석과 아울러 분리주간의 비교를 시도하였으나 분리주 HY-1, HY-15 및 ATCC 50148주간의 표면 단백질 전개 양상이나 항원성은 차이가 없는 것으로 관찰되었다. 앞서 민외(1992)는 질트리코모나스 HY-1주를 항원으로 하고 질트리코모나스 6개주에 대한 각각의 항원형으로 EITB한 결과 각 주마다 서로 다른 반응 양상을 보였으며, 51 kDa과 96 kDa에서 질트리코모나스의 특이한 공통 반응대가 관찰됨을 보고하였으나 본 실험에서는 질트리코모나스의 전체 단백질을 계면활성제로 처리하여 준비하였으며 민외(1992)의 실험에서는 trichloroacetic acid처리에 의해 준비된 단백질을 사용하였으므로 민외(1992)의 특이 반응대를 본 실험의 표면 항원과 대응 시키기 위해서는 앞으로 두 가지 처리 방법의 차이를 먼저 밝혀야 할 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서는 비교된 분리주 및 ATCC간에 표면 항원의 항원성이 차이가 없는 것으로 나타나 민외(1992)의 결과와 상반된 것이었으나 biotinylation에 의한 실험의 한계성을 고려하여야 할 것이며 아울러 다른 여러가지 분리주에 대한 분석이 추시되어야 할 것이다.

참고문헌

민득영, 임미혜, 김재만, 최영길 (1992) 효소면역 전기영동 이적법을 이용한 질트리코모나스 항원의 비교 분석. 기생충학잡지 **30**: 323-328.
 Alderete JF (1983a) Antigen analysis of several pathogenic strains of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **39**: 1041-1047.

- Alderete JF (1983b) Identification of immunogenic and antibody-binding membrane proteins of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **40**: 284-291.
- Alderete JF, Demes P, Gombosova A, et al. (1988) Specific parasitism of purified epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **56**: 2558-2562.
- Alderete JF, Sprun-Brown L, Kasmala L, Smith J, Spence M (1985) Heterogeneity of *Trichomonas vaginalis* and discrimination among trichomonal isolate and subpopulations with sera of patients and experimentally infected mice. *Infect Immun* **49**: 463-468.
- Anderson DJ, Blobel G (1983) Immunoprecipitation of proteins from cell-free translations. *Methods Enzymol* **96**: 111-120.
- Andrews BJ, Bjorvatn B (1991) Immunoprecipitation studies with biotinylated *Entamoeba histolytica* antigens. *Parasite Immunol* **13**: 95-103.
- Cole SR, Ashman LK, Ey PL (1987) Biotinylation: an alternative to radioiodination for the identification of cell surface antigens in immunoprecipitates. *Mol Immunol* **24**: 699-705.
- Diamond LS (1968) Techniques for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoebae. *J Parasitol* **54**: 1047-1056.
- Finn FM, Titus G, Horstman D, Hofmann (1984) Avidin-biotin affinity chromatography: application to the isolation of human placental insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7328-7332.
- Hurley W, Finkelstein E, Holst BD (1985) Identification of surface proteins on bovine leukocytes by a biotin-avidin protein blotting technique. *J Immunol Meth* **85**: 195-202.
- Kendall C, Ionescu-Matiu I, Drechsman GR (1983) Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods* **56**: 329-339.
- Kreiger JN, Ravdin JI, Rein MF (1985) Contact dependent cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **50**: 778-786.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- Lima MF, Villata F (1989) *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite cell adhesion molecule. *Mol Biochem Parasitol* **33**: 159-170.
- Scott MJ, Snary D (1979) Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Nature* **282**: 73-74.
- Slot JW, Geuze HJ (1985) A novel method to make gold probes for multiple labelling cytochemistry. *Eur J Cell Biol* **38**: 87-93.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Tsang VCW, Peralta JM, Simons AR (1983) Enzyme-linked immunoelectro transfer blot technique (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **92**: 377-391.

= Abstract =

Identification of surface antigens of *Trichomonas vaginalis*

Nam-Sick Woo¹⁾, Duk-Young Min^{1)*}, Mi-Hyea Leem¹⁾ and Yong-Keel Choi²⁾

Department of Parasitology¹⁾, College of Medicine and Department of Biology²⁾, College of Natural Science, Hanyang University Seoul 133-791, Korea

Surface proteins of *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) were analyzed to study the antigenic variation. The surface proteins of protozoa were labelled by N-hydroxysuccinimide-biotin (NHS-biotin), the NHS-biotin-labelled proteins were immunoprecipitated with rabbit antiserum to purify the antigenic fractions and analysed by SDS-PAGE plus electroblotting. The results obtained in this study were as follows; Biotinylated *T. vaginalis*-proteins obtained from intact cell and cells disrupted prior to labelling were detected by antibiotin-peroxidase in Western blots. Labelled proteins were immunoprecipitated by *T. vaginalis*-immunized rabbit serum and the six bands with the molecular weights of 46, 60, 68, 90, 130 and 220 kDa were identified as having antigenicity. *T. vaginalis* HY-1, HY-15 and ATCC 50148 were immunoprecipitated by immune rabbit serum after biotinylation and there were no difference from antigenic bands among these strains by this technique. In conclusion with the results obtained in the present study, it was assumed that surface proteins of *T. vaginalis* were labelled by biotinylation and the six labelled bands at 46, 60, 68, 90, 130 and 220 kDa in their molecular weight were identified as having antigenicity by immunoprecipitation (IP) and this biotinylation-IP technique may be used for further study of surface antigen of *T. vaginalis*.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, surface antigen, N-hydroxysuccinimide-biotin, Immunoprecipitation

[Korean J Parasit., 31(1): 37-42, March 1993]

*Corresponding author