

# 장독성대장균 F41 섬모항원에 대한 특이난황항체 생산

신순오 · 김정우

단국대학교 동물자원학과

## Production of a Specific Yolk Antibody against Enterotoxigenic *E. coli* F41 Fimbrial Antigen

S. O. Shin and J. W. Kim

Department of Animal Science and Resources, Dankook University

### ABSTRACT

Enteric colibacillosis has economically become an important disease of young animals as a result of increasing intensification of farrowing management. The objective of this experiment is to isolate fimbrial antigen from enterotoxigenic *E. coli* F41, to develop specific polyclonal IgY which can effectively neutralize or reduce the proliferation of pathogens in feed or living animal system, and to apply IgY technologies to animal industry. The results obtained were as follows: The molecular weight of the purified F41 antigen was 29,500 dalton on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Fimbrial antigen was confirmed by the western blot method. It was observed that after immunization the level of serum antibody titer of laying hen was shown in two weeks and gradually increased. The antibody titer in egg yolk appeared two weeks after it was shown in serum antibody. The titers of egg yolk antibody were gradually increased to the maximum level of 320,000 (antigen 50µg/ml), 450,000 (antigen 200µg/ml), and 320,000 (antigen 600µg/ml). According to the results of specificity test by ELISA, the anti-F41 antibodies from chicken serum and egg yolk reacted only with ETEC F41 antigen. There was no cross reaction with other ETEC strains (K88, K99, and 987P). *In vitro* condition, as a result of antigen binding ability of yolk antibodies, bacterial concentration was rapidly decreased to 10<sup>5</sup> CFU/ml from 10<sup>9</sup> CFU/ml when 2~4 mg/ml of freeze dried WSF (water soluble fraction) was added.

(Key words : *E. coli*, F41, Fimbrial antigen, IgY, Egg yolk)

### I. 서 론

대장균은 건강한 동물의 장내에 상재하지만 특정균주가 일정한 조건하에서 병원성을 나타낸다. 대장균증은 어린 가축의 중요한 소화기

전염병으로 연령, 모체 이행 항체의 보유 및 방어능력, 조기 이유, 사양관리, 계절적 환경요인, 각종 스트레스 등 복합적 요인으로 일어날 수 있다(Sojka, 1973). 병원성 대장균 설사증의 발병기전은 유즙이나 사료 등에 혼입되어 섭취

Corresponding author : Jung-Woo Kim, Department of Animal Science and Resources, Dankook University, Cheonan, Korea, 330-714. Tel : (041)550-3651 Fax : (041)555-8652 E-mail : kijuw@dankook.ac.kr

된 장독성 대장균(*Enterotoxigenic E. coli*)이 colonization factor인 섬모항원(fimbrial antigen)에 의해 소장상부(십이지장과 공장)의 상피세포에 부착·증식하면서 산출하는 장독소가 소장점막을 자극하여 장점막을 통한 수분과 전해질 대사에 이상이 생겨 조직내 수분이 장관 내로 유출됨으로써 설사가 유발되는 것으로 알려져 있다(Denrke 등, 1984). Gastra 등(1982)은 어린 송아지와 양에서는 K99, F41 대장균이, 돼지에서는 K88, K99, 987P 및 F41 대장균이 주로 문제가 된다고 하였고, 함 등(1997)은 포유자돈에서 국내서 문제시되는 장독성 대장균의 대다수는 K88 또는 K99 섬모항원을 보유하고 있으며 987P와 F41 섬모항원을 보유한 대장균이 증가되는 추세라 하였다.

최근 어린 가축의 설사증으로 인한 폐사 등 각종 피해를 효과적으로 줄이기 위하여 장독소형 대장균에 대한 백신개발에 관한 연구가 여러 학자들에 의해 활발히 진행되고 있다(Chidlow 등, 1977; Nagy 등, 1978; 윤 등, 1998; Marquardt 등, 1999; 김 등, 2000). 이들 장독성 대장균은 소장점막 상피세포에 부착하여 발육·증식하면서 장독소를 분비하므로(Denrke 등, 1984), 이에 대한 효과적인 설사예방 대책으로는 소장 부위에 고역가의 항체를 공급하여 대장균의 장점막 부착을 억제하고 분비된 장독소를 중화시키는 것이다.

Kuhlman 등(1988)은 혈청과 초유에 함유된 항체와 단일클론항체(monoclonal antibody)를 자돈에게 경구 투여하여 설사 치료효과와 예방효과를 보고하였으나 대량의 항체가 필요하므로 많은 비용이 소요되는 문제점이 있다고 하였다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 특이항체를 간편하게 다량으로 생산하는 방법이 요구된다.

태반과 모유가 없는 난생동물의 경우 모체가 획득한 항체는 난황 중에 축적되어 자손에게

전해진다. 이러한 성질을 이용하여 난황으로부터 특이항체(specific antibody)를 얻을 수 있다(Shimizu 등, 1988). 난황에서 항체를 얻을 시 장점은 채란이 용이하며, 간단한 처리로 항체의 분리가 가능하고, 생산비용이 포유류에 비해 저렴하다는 점이다. 또한 시스템화 된 면역이 가능하며, 식품으로 섭취 시 안전성이 높고, 포유동물 유래의 항원에 대해서는 포유동물의 경우 보다 산란계에서 우수한 항체를 얻을 수 있다(Larsson 등, 1988). IgY를 이용하여 Yokoyama 등(1992)은 K88, K99, 987P로부터 분리한 섬모항원을 산란계에 면역하여 얻은 특이항체를 분무건조(spray dry)하여 신생자돈에게 경구 투여한 결과 수동 면역되었다고 하였고, Marquardt 등(1999)도 K88\*에서 섬모항원을 분리하여 산란계에 면역, 생산한 IgY를 동결 건조하여 신생자돈과 이유자돈에게 급여한 결과 대장균에 대해 방어효과가 있다고 하였다.

본 연구의 목적은 장독성 대장균(*enterotoxigenic E. coli*, ETEC)중 하나인 F41균주로부터 특유의 섬모항원을 분리하고, 이를 면역원으로 산란계에 면역시켜 특이난황 항체를 생산하여 가축의 대장균증 예방 및 치료에 활용코자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 균주 배양 및 사용배지

장독성 대장균(*Enterotoxigenic E. coli*; ETEC) 표준균주는 Animal Health Centre(Veterinary Services Branch, Manitoba Agriculture, MB, Canada)에서 F41 균주를 분양 받아 Frits 등(1982)의 최소배지(minimal medium)에서 37°C, 72시간 동안 정치 배양한 다음 원심분리(5,000×g, 4°C, 20min)하여 균체를 회수하였다.

K88, K99, 987P 균주는 *E. coli* Reference

Center(ECRC)에서 표준균주를 분양 받아 사용하였다.

## 2. 섬모항원의 분리

K88 섬모항원의 분리 및 정제는 Marquardt 등(1999)의 방법에 준하여 실시하였으며, K99, 987P의 섬모항원의 분리 및 정제는 김 등(2000)의 방법에 준하여 실시하였다. F41 섬모항원의 분리 및 정제 방법은 Frits 등(1982)의 방법을 수정하여 실시하였다. 회수된 균은 phosphate-urea buffer(2 M urea 함유 50 mM phosphate buffer, pH 7.2)에 부유시킨 후, 항온 수조(60℃)에서 30분간 증탕하였다. 그 후 균체 용액을 원심분리(14,000×g, 4℃, 15min)한 상층액에 ammonium sulfate(50% saturation)를 가한 후 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 원심분리(20,000×g, 4℃, 15min)하여 얻어진 침전물을 0.15 M PBS(0.02 M phosphate buffer, 0.13 M NaCl, pH 7.2)로 녹인 후 dialysis tube(Sigma Co.)에 충전하여 0.15 M PBS에서 투석하였다. 분리된 섬모항원은 Robert 등(1995)의 microwave BCA (bicinchoninic acid) 방법으로 BCA Protein assay kit(Pierce Co.)를 사용하여 정량하였다.

## 3. 전기영동

섬모항원을 변성전기영동방법인 Laemmli(1970) 방법으로 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다. 전기영동 장치는 Mini-Protein II Cell kit(BIO-RAD)를 이용하였다. 각 lane당 5 µg의 단백질을 loading하여 12% separating gel에서 200 V에서 50분 동안 전개시킨 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 관찰하였다.

## 4. Western blot

Gershoni & Palade(1983)의 방법에 의해 western blot을 실시하였다. SDS-PAGE에 의해 분리 전개된 F41 섬모항원을 electroblotting buffer(15.6 mM Tris base, 120 mM Glycine) 내에서 nitrocellulose membrane에 30 V로 하루 밤 방치하여 전이시켰다. 섬모항원이 전이된 nitrocellulose membrane을 PBST(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% tween 20)로 세척한 후, blocking buffer(5% skim milk in PBST)에 실온에서 45분간 정치시킨 후, 다시 PBST로 세척하였다. 여기에 F41 단일클론 항체(CVL Co.)를 PBST에 200배 희석하여 실온에서 30분간 정치한 후 PBST로 세척하였다. 다시 AP-conjugated anti-mouse IgG(Jacson Co.)를 PBST에 1,000배 희석하여 실온에서 30분간 반응시키고, PBST로 세척한 후, 기질용액(100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>)에 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma Co.)와 NBT(p-nitro blue tetrazolium chloride, Sigma Co.)를 사용하여 30분간 반응하여 band를 확인하였다.

## 5. 항체 생산

### (1) 공시동물 및 시험장소

항체 생산에 사용된 동물은 부화 후 48주령의 갈색 ISA-brown계통 산란계로 9마리를 사용하였고, 체중 2.5 kg의 New Zealand white종의 토끼를 2마리를 항체생산에 사용하였다. 사육은 단국대학교 동물자원과학과 실험동물 사육실에서 수행하였다.

### (2) 면역방법

분리한 EPEC F41 섬모항원을 김 등(2000)의 방법으로 산란계에 면역하였다. 토끼면역은 제

조한 면역원을 토끼의 등과 뒷다리에 0.25 ml 씩 4곳에 피하주사와 근육주사 하였다. 면역접종은 2주 간격으로 12주 동안 6번 실시하였다.

(3) 산란계 혈액채취 및 토끼 항혈청제조

산란계 혈액은 날개밑 정맥에서 토끼혈액은 귀정맥에서 각각 2주 간격으로 채취하여 4℃에서 하룻밤 보관 후 원심분리하여 혈중항체역가 측정에 이용하였고, 계란은 매일 회수하여 8℃에 저장하여 실험에 이용하였다. 토끼로부터 제조한 항혈청은 EPEC F41균과 난황항체의 결합능력측정을 위한 2차 항체로 사용하였다.

(4) 난황으로부터 항체분리

김 등(2000)의 방법에 의거하여 water soluble fraction(WSF)을 분리하였다. 분리한 WSF의 일부는 IgY의 농도와 항체역가의 측정 시료로 이용하였다. 분리한 WSF의 일부는 -50℃의 동결 건조기(NCFD5508; 일신엔지니어링)에 장착하여 진공상태(10 micron Hg)에서 4일간의 건조 과정을 거쳐 분말화 하였다.

6. 항체의 측정

(1) IgY 항체역가 측정

EPEC F41 섬모항원에 대한 항체형성 조사는 ELISA법으로 실시하였다. Carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 섬모항원이 5 µg/ml이 되도록 농도를 조정후 ELISA용 plate (MicrotestIII flexible Assay plate; Falcon 3991)에 100 µl씩 분주한 후 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다. 섬모항원이 피복된 plate를 꺼내어 PBS-T (0.02 M phosphate buffer, 0.13 M NaCl, pH 7.2, 0.05% tween 20)로 3회 세척한 후 blocking buffer(5% skim milk, pH 7.3, Difco Co.)를 100 µl씩 분주하여 2시간 동안 실온에 정치시켰다. 이후 각 과정 중 plate 세척은 6회씩 실시하였

고 용액은 100 µl씩 plate에 분주하였다. Plate 세척 후 WSF와 혈청은 blocking buffer와 PBS-T를 동량으로 섞은 희석용액에 1:2000에서 1,458,000배까지 3배수로 희석하여 분주 후 37℃에서 2시간 반응시켰다. 이후 conjugate [Alkaline phosphatase conjugated AffiniPure rabbit anti-chicken IgY(IgG), Jackson Co.]를 5,000배 희석하여 분주 후 37℃에서 2시간 반응 시켰다. 반응 후, 기질용액은 phosphate substrate tablets(Sigma-104)를 10% diethanolamine에 녹여 사용하였으며 plate에 분주 후 실온에서 12분간 효소와 반응시켰다. 5 M NaOH를 이용하여 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 microplate reader(E Max; Molecular Devices, U.S.A)를 사용하여 흡광도(optical density : O.D.)를 측정하였다.

(2) F41 난황항체의 특이성 검사

F41 섬모항원에 대한 항체의 특이성을 조사하기 위해 항체역가 측정과 동일한 방법으로 ELISA법을 사용하여 반응검사를 하였다. EPEC K88, K99, 987P 섬모항원이 피복된 plate에 생산된 난황항체를 각각 30,000배 희석하여 항원항체반응정도를 검사하였다.

(3) EPEC F41균과 난황항체의 결합능력 조사

생산된 F41 난황항체의 체내 효과를 간접적으로 알아보기 위하여, 1×10<sup>10</sup> CFU/ml 농도의 F41균주 5 ml을 각각의 멸균된 시험관에 분주 후, 동결건조된 WSF를 첨가하였고, WSF를 첨가하지 않는 균을 대조군으로 하였다. 동결건조된 WSF를 첨가한 후 37℃에서 2시간 동안 진탕배양(60 rpm/min) 후 시료를 채취하여 60℃에서 30분간 열처리 후 냉장 보관하여 실험에 이용하였다. 전처리가 끝난 WSF과 항원결합능력의 조사는 Kim 등 (1999)의 방법에 준하

여 competitive sandwich ELISA 방법으로 실시하였다. 2차 항체로는 F41 섬모항원을 토끼에게 면역하여 얻은 항혈청(1:2,000)과 AP-Donkey anti-rabbit IgG(Jackson, 1:1,250)를 혼합하여, 사용 전 2시간 전에 미리 37°C에서 반응시킨 후 사용하였다. 세척 후 기질용액은 phosphate substrate tablets(Sigma-104)를 10% diethanolamine에 녹인 용액을 사용하였고, 실온에서 12분간 효소와 반응시킨 후 5 M NaOH를 이용하여 반응을 중지시켰다. 흡광도(optical density : O.D.)는 405 nm에서 측정하였다.

### 7. 난황항체(IgY)의 농도 검사

실험기간 중 항체역가가 최고수준에 도달한 계란으로부터 WSF를 분리하여 동결건조 하였다.

동결건조 시 난황항체의 회수율을 조사하고자 IgY의 농도측정을 Mancini 등 (1965)의 방법에 의하여 single radial immuno diffusion (SRID)을 실시하였다.

## III. 결 과

### 1. 섬모항원의 분리

분리한 섬모항원을 Mini-Protein II Cell kit (BIO-RAD)를 이용하여 전기영동을 실시 한 결과, 주 밴드는 29.5 kDa에서 나타났다(Fig. 1).

### 2. Western blot

분리한 F41 섬모항원을 SDS-polyacrylamide gel(12%)로 전기 영동 후, 29.5 kDa 위치에 나타난 밴드가 F41 섬모인지를 확인해 보기 위해 Western blot을 실시한 결과 Fig. 2에 나타난 것

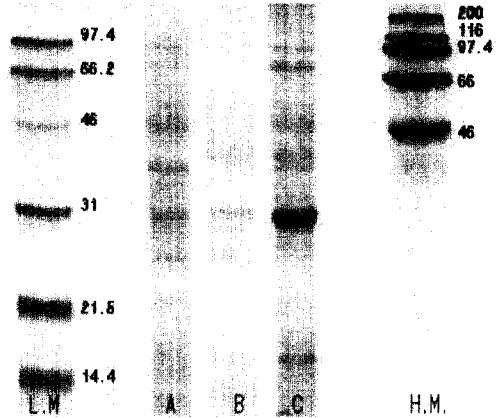


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of fimbrial antigen isolated from F41 on 12% acrylamide gel under denaturing conditions followed staining with Coomassie blue R-250. L.M: Low range marker A: Whole cell B: Before ammonium sulfate treatment C: Purified F41 fimbrial antigen H.M: High range marker.

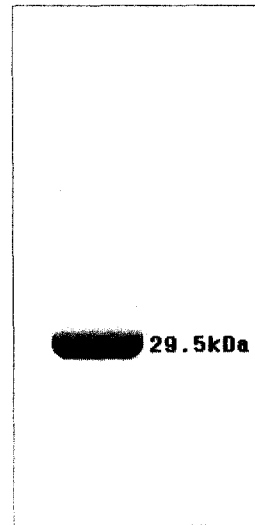


Fig. 2. Immunoblot of F41 fimbrial antigen with mouse anti-F41 monoclonal antibody. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of 20µg of F41 purified fimbrial protein where transferred to nitro-cellulose.

과 같이 주 밴드가 F41 섬모임을 확인해 주었다.

### 3. 섬모항원에 대한 산란계의 면역반응

F41 섬모항원을 면역한 산란계의 혈청에서의 항체역가는 면역 후 2주부터 형성되기 시작하여 면역 후 4주부터 급격히 증가하였다. 섬모항원 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 면역한 산란계에서는 12주까지 계속 증가하는 경향을 보였으나 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 면역한 산란계에서는 8주에 최고의 항체역가(titer : 730,000)를 형성한 후 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 난황의 항체역가도 면역 후 2주 후부터 형성되기 시작하여 면역 후 4주부터 급격히 증가하였다. 섬모항원 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 면역한 산란계의 난황에서는 면역 후 10주에 최고의 항체역가(titer : 320,000)를 보인 후 약간 감소하는 경향을 보였으며, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 면역한 산란계의 난황의 항체역가는 면역 후 4주경에 급격히 증가하여 면역 후 12주에 최고의 항체역가(titer : 450,000)를 보였다. 섬모항원 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 면역한 산란계의 난황 중 항체역가는 면역 후 8주에 최고의 수준(titer : 320,000)을 형성한 후 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 항원농도 별로 항체역가의 변화상은 달랐으나, 항체의 형성은 혈청에서 먼저 형성된 뒤 이어 난황에서 형성되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Shimizu 등(1988)의 연구에서 혈액 중에 형성된 항체가 몇 주후에는 난황으로 이전된다는 보고와도 일치하였다.

### 4. F41 난황항체의 특이성

생산된 난황 항체의 특이성 검사는 ELISA법을 사용하여 실시하였다. 비교검사 균주로는 ETEC K88, K99, 987P 섬모항원을 사용하였다. F41 섬모항원에 대해 생산된 난황항체를 각각

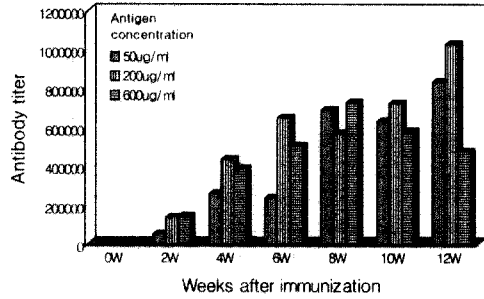


Fig. 3. Serum antibody titer of hens immunized with F41 fimbrial antigen.

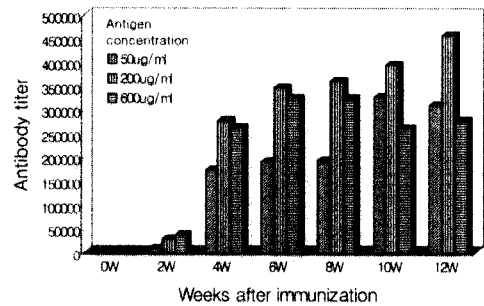


Fig. 4. Yolk antibody titer of hens immunized with F41 fimbrial antigen.

30,000배로 희석하여 각 균주들의 항원과 반응시킨 결과, 생산된 항체는 F41 섬모항원에서만 반응하였다(Table 1).

### 5. 동결건조 된 F41 WSF의 IgY 함량 및 항체역가

면역접종 한 난황 1 ml속에는 48 mg의 단백질이 들어있었으며, 이 중 IgY의 함량은 22.35 mg으로 단백질 함량 중 46.6%가 IgY로 나타났다. 또한 동결건조 전·후의 항체역가 수준에는 변화가 거의 없었다(Table 2).

### 6. ETEC F41균과 난황항체의 결합능력

난황항체와 균과의 반응정도 조사는 Kim 등

Table 1. Specificity of antibody of chicken serum and yolk with the antigen of the different strains by indirect ELISA

Adhesive antigen	Host antibody <sup>a</sup>	
	Egg yolk	Chicken serum
	ETEC F41	
K88 <sup>c</sup>	— <sup>b</sup>	—
K99 <sup>c</sup>	—	—
987P <sup>c</sup>	—	—
F41 <sup>d</sup>	+++	+++

<sup>a</sup> Host antibodies were diluted to 1:30,000  
<sup>b</sup> Range of titer ; - : 0~10,000, +: 10,000~30,000, ++: 30,000~100,000, +++ : over 100,000  
<sup>c</sup> *E. coli* Reference Center, the Pennsylvania State University, USA.  
<sup>d</sup> Animal Health Centre, Veterinary Services branch, Manitoba Agriculture, MB, Canada.

Table 2. The recovery rates of egg yolk protein, IgY and antibody titer treated by freeze drying method

Items	Freeze drying	
	F41 Egg yolk	
Initial volume	12 ml	
Protein content	576 mg	
IgY content	268.15 mg	
Antibody titer	Before treatment	209,000(100%) <sup>a</sup>
	After treatment	199,000(95.2%)

<sup>a</sup> Percent changes of the antibody titer levels before and after treatment.

(1999)의 competitive sandwich ELISA 방법으로 실시하였고 결과는 Table 3과 같다. 난황항체를 ml당 2~4 mg 첨가 시 균의 농도가 10<sup>9</sup> CFU/ml에서 10<sup>5</sup> CFU/ml로 약 10,000배 급격하게 감

Table 3. The changes of ETEC F41 cell concentration according to different treatment levels of IgY

Treatment IgY (mg/ml)	Cell (CFU/ml)
	ETEC F41
0	1.12 × 10 <sup>9</sup>
2	5.35 × 10 <sup>5</sup>
4	5.32 × 10 <sup>5</sup>
8	5.32 × 10 <sup>5</sup>

소하였다. 반면에, 난황항체(IgY)를 ml당 4 mg 이상 첨가 할 경우에는 ETEC F41균과의 결합 능력 수준에는 차이가 없는 경향을 보였다.

#### IV. 고 찰

어린 동물에서 설사병을 일으키는 장독성대장균의 섬모항원은 대장균이 소장점막에 부착, 증식하며 분비하는 장독소가 소장점막을 자극하여 장점막을 통한 수분과 전해질 대사에 이상이 생겨 조직내 수분이 장관내로 유출됨으로써 설사가 유발한다. 따라서 동물의 설사변에서 분리한 대장균에서 병원성과 관련된 섬모항원의 확인은 대장균증의 진단을 위해 필수적이며, 또한 섬모항원을 이용한 백신의 개발 및 이용은 대장균증 예방 및 치료에 매우 유용하므로 대장균에서 섬모항원의 발현과 효과적인 분리방법의 정립은 매우 중요하다. 분리한 섬모항원으로 면역시킨 산란계에서 혈중 항체역가는 섬모항원 농도에 상관없이 1차, 2차 접종 2주 후에 급격한 항체역가의 상승이 관찰되었다. 이러한 현상은 다른 대장균의 섬모나 살모넬라의 flagellin, 혹은 BSA(Bovine Serum Albumin)로 면역한 후 나타나는 항체역가의 변화와 일치하며(김, 1998; 김 등, 1999; 김 등, 2000),

따라서 닭에서 F41 섬모가 면역원성이 있음을 확인할 수 있었다. Schade 등 (1996)은 닭에게 주입할 항원의 양을 최소 10 ng에서 최대 1 mg까지 면역할 수 있고, 10  $\mu$ g에서 100  $\mu$ g이 적당하다고 하였으나, 본 실험의 결과 200  $\mu$ g이 50  $\mu$ g보다 항체역가가 혈중과 난황에서 더 높게 나타났다. 이는 산란계의 종류와 연령의 차이로 사료되며, 보다 정확한 항원의 접종량에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

난황에서 IgY의 수준은 9 mg/ml(Wang 등, 1985)에서 25 mg/ml(Rose 등, 1974)로, 계란에서 15 ml 정도의 난황이 생산된다고 볼 때 연간 IgY의 생산량은 30~90g 정도 된다. 본 연구에서의 항체 함량을 측정한 결과도 약 22 mg/ml으로 Rose 등(1974)의 결과와 매우 유사하였다. 이러한 결과는 난황 내 IgY의 함량은 산란계에 주사하는 항원의 종류에 관계없이 일정한 것으로 사료된다.

난황항체의 중화작용을 실험에서 동결건조한 난황항체를 ml당 2~4 mg 첨가시 균의 농도가  $10^9$  CFU/ml에서  $10^5$  CFU/ml로 약 10,000배 급격하게 감소하였으나, 난황항체(IgY)를 ml당 4 mg이상 첨가 할 경우에는 EPEC F41균과의 결합능력 수준에는 차이가 없는 것 같은 현상을 보였다. 이러한 현상은 Kim 등 (1999)의 competitive sandwich ELISA 방법에 대한 결과에서 보고한 바와 같이 측정의 민감도가  $10^5$  CFU/ml 범위이기 때문에  $10^4$  CFU/ml 이하의 수준에 대한 측정이 불가능함으로 인하여 나타난 현상으로 추정된다.

최근 전문화, 집단화되는 축산경영에 있어서 가축의 질병치료 및 예방목적으로 복합 항균제를 무분별하게 다량 사용함으로써 체내 항생제 내성의 증가를 가속화시키고 있으며, 생산된 축산물 내에 항생물질이 잔류되어 공중보건위생상 문제점을 유발하기도 한다. 최근에는 유럽을 비롯한 북미대륙에서는 항생제사용을 강

력히 제한하고 있다. Marquardt 등 (1999)이 난황항체를 이용한 항생제 대체실험에서 난황항체 첨가구가 항생제 첨가구보다 설사 발생빈도가 낮았다는 보고와, 본 연구에서 난황항체의 탁월한 중화효과, 특이항체(specific IgY)의 높은 함량수준, 그리고 난황 자체가 영양소공급원으로 활용될 수 있다는 점을 종합적으로 고려해 볼 때 난황항체는 대장균증 예방 및 치료에 있어서 항생제의 대체물질로서 산업적 이용이 충분히 가능할 것으로 판단된다.

## V. 요 약

1. EPEC F41 균주로부터 분리한 섬모항원의 분자량은 29.5 kDa으로 나타났으며, western blot을 통하여 섬모항원임을 확인하였다.
2. 분리한 섬모항원의 농도를 50  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml, 600  $\mu$ g/ml로 조정 후 산란계에 접종하였다. 이 후 ELISA법을 이용하여 난황의 항체역가를 측정한 결과 최고치가 320,000(antigen 50  $\mu$ g/ml), 450,000(antigen 200 $\mu$ g/ml), 320,000(antigen 600 $\mu$ g/ml)으로 나타났다.
3. F41난황항체와 K88, K99, 987P 섬모항원과의 교차반응을 ELISA법을 이용하여 조사해 본 결과 난황항체를 30,000배 희석 시 교차반응이 없었다.
4. 실험실조건하에서 난황항체의 항원결합능력을 조사한 결과, 동결건조한 WSF을 2~4 mg/ml 첨가 시 균체의 농도가  $10^9$  CFU/ml에서  $10^5$  CFU/ml로 급격하게 감소하였다.

## VI. 사 사

이 연구는 2001학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.



## VI. 인 용 문 헌

1. Chidlow, J. W. and Poter, P. 1977. Uptake of maternal antibody by the neonatal pig following intramuscular and intramammary vaccination of the preparturient sow. Res. Vet. Sci. 23:185-190.
2. Denrke, C. F., McGowan, K. and Larson A. D. 1984. Attachment of human and pig(K88) enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to either human or porcine small intestinal cells. Infect. Immun. 45:522-524.
3. Frits, K., De Graaf, F. K. and Roorda, I. 1982. Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. Infect. Immun. 36(2):751-758.
4. Gaastra, W. and De Graaf, F. K. 1982. Host-specific fimbrial adhesions of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Micro. Rev. 46(2):129-161.
5. Gershoni, J. M. and Palade, G. E. 1983. Protein Blotting : Principles and Application. Anal. Biochem. 131:1-15.
6. Kim, J. W., Jin, L. Z., Cho, S. H. and Marquardt, R. R. 1999. Use of chicken egg-yolk antibodies against K88<sup>+</sup> fimbrial antigen for quantitative analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC) K88<sup>+</sup> by a sandwich ELISA. J. Sci. Agric. 79:1513-1518.
7. Kuhlman, R., Wiedemann, V., Schmidt, P. and Wanke, R. 1988. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. I. Immunization and antibody determination. J. Vet. Med. 35:610-616.
8. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685.
9. Larsson, A., Balow, R. W., Linda, T. L. and Forsberg, P. O. 1988. Chicken antibodies ; taking advantage of evolution a review. Poultry Sci. 72:1807-1812.
10. Mancini, G., Carbonora, A. O. and Heremans, T. 1965. Immunochemical quantification of antigen by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2:235.
11. Marquardt, R. R., Jin, L. Z., Kim, J. W. and Fang, L. 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> infection in neonatal and early-weaned piglets. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 23:283-288.
12. Nagy, B., Moon, H. W. and Isaacson, R. E. 1978. Immunization of sucking pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. Infect. Immun. 21:269-274.
13. Robert, E. A. and Rocky, S. T. 1995. Ultrafast protein determinations using microwave enhancement. Molecular Biotechnology. Humana Press Inc. 17-24.
14. Rose, M. E., Orlans, E. and Buttress, N. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg : their segregation in yolk and white. Eur. J. Immunol. 4:521-523.
15. Schade, R., Staak, C. and Hendriksen, C. 1996. The production of avian(egg yolk) antibodies : IgY, The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21. ATLA (24):925-934.
16. Shimizu, M., Fitzsimmons, C. R. and Nakai, S. 1988. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated egg yolk immunized chickens as a potential food ingredient. J. Food Sci. 53:1360-1366.
17. Sojka, W. J. 1973. Enteropathogenic *Escherichia coli* in man and Animals. Can. Inst. Food Sci. Technol. 6:52.
18. Wang, K., Hoppe, C. A., Datta, P. K., Fogelstrom, A. and Lee, Y. C. 1986. Identification of the major mannose-binding proteins from chicken egg yolk and chicken serum as immunoglobulins. Proc. Natl Acad. Sci. 83:9670-9674.
19. Yokoyama, H., Peralta, R. C. and Diaz, R. 1992.

- Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun.* 60:998-1007.
20. 김용곤. 1999. 산란계 면역생리를 이용한 건강식품 개발에 관한 연구. 축산기술연구소 연구보고. 48-49.
  21. 김정우, 김도균, 김 철. 2000. 장관독성 대장균 K99(F5)의 섬모항원에 대한 특이 난황항체의 생산. *한국동물자원과학회지.* 42(3):371-378.
  22. 김정우. 1998. *Salmonella enteritidis*의 편모항원에 대한 난황항체의 생산. *한국가금학회지.* 25(4): 161-167.
  23. 윤교복, 김종술, 정동수, 박양주, 이유섭, 한정희. 1998. 돼지에서 대장균 자가백신 효과. *한국가축위생학회지.* 21(2):117-126.
  24. 함희진, 천두성, 채찬희. 1997. 포유자돈 소장에서 분리된 대장균의 섬모항원과 장내독소 분포양상. *대한수의학회지.* 37(4):779-784.
- (접수일자 : 2002. 8. 9 / 채택일자 : 2002. 10. 17)