

## 미꾸라지에서의 *Edwardsiella tarda* isolates의 항원성 비교

이영\* · 전려진 · 김명석\*\* · 박경현\*\*\* · 정현도†

부경대학교 수산생명의학과, \*국립수산과학원 고성수산사무소, \*\*국립수산과학원 병리연구팀,  
\*\*\*국립수산과학원 남해수산연구소

## Comparison of antigenicity of *Edwardsiella tarda* isolates in loach(*Misgurnus mizloepis*)

Young-Lee\*, Lyu Jin Jun, Myoung Suk Kim\*\*, Kyung Hyun Park\*\*\*  
and Hyun Do Jeong†

Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science, Pukyong National University,  
Busan 608-737, Korea

\*National Fisheries Research and Development Institute, Goseong Fisheries Office, Goseong 638-805, Korea

\*\*National Fisheries Research and Development Institute, Pathology Team, Busan 619-902, Korea

\*\*\*National Fisheries Research and Development Institute, South Sea Fisheries Research Institute,  
Yeosu 550-120, Korea

We compared the pathogenicity and antigenicity of two different *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) strains KFE and Edk-2 isolated in Korea and Japan respectively. In the pathogenicity analysis with challenge test against loach, *E. tarda* KFE isolate showed stronger pathogenicity compared to that of *E. tarda* Edk-2 isolate. The differences were also confirmed by the comparison of OMP (outer membrane protein) in SDS-PAGE which showed three major bands, 41kDa, 37kDa and 30kDa, for *E. tarda* KFE isolates and two major bands, 41kDa and 30kDa, for *E. tarda* Edk-2 isolates. On the base of these results, we tried to determine the differences of antigenicities of these two isolates in loach which is one of the important species in freshwater aquaculture in Korea. Numbers of specific antibody secreting cells (SASC), appeared to be higher in loach immunized with FK of *E. tarda* Edk-2 than loach immunized with FK of *E. tarda* KFE. ELISPOT-assay for the comparison of antigenicity showed relatively high percentage of cross-reaction and implied the presence of some common epitopes in the antigens of these two *E. tarda* isolates.

*Key words*: Loach, *Edwardsiella tarda*, Outer membrane protein, ELISPOT-assay

*Edwardsiella tarda* 는 어떤 stress 조건하에서 발병하는 병원체로써 수중이나 정상어의 장내에 상재해 있을 수 있으므로 양식 어류에 대한 감염의 기회도 항상 존재한다고 볼 수 있다. 그러므로 *E. tarda* 의 감염을 예방하기 위한 기초 연구로서 *E. tarda* 의 항원성과 병원성에 관해 많은 관심을 불러일으키고 있으며 그에 따라 많은 연구가 진행되고 있다 (Salati and Kusuda,

1985 ; Bang *et al.*, 1992 ; Suprpto *et al.*, 1996).

그람음성 세균의 병원성을 나타내는 요소는 크게 외독소(exotoxin)와 내독소(endotoxin)로 나눌 수 있는데, *E. tarda*의 외독소로는 extracellular products (ECP) (Suprpto *et al.*, 1995) 및 siderophore (Mathew *et al.*, 2001)와 hemolysin (Chen and Huang, 1996) 등에 대해 연구된 바가 있으며, 내독소로는 outer membrane proteins

†Corresponding Author : Hyun Do Jeong, Tel : 051-629-5941  
Fax : 051-629-5938, E-mail : jeonghd@pknu.ac.kr

(OMP) 및 lipopolysaccharide (LPS)에 대한 연구가 많이 실시되어졌다 (Huang and Lu, 2001). *E. tarda* 는 분리 균주에 따라서 병원성의 차이를 보이며 (Suprpto *et al.*, 1995 ; 박 등, 1997) 그 항원성에 있어서도 차이가 난다고 보고되어 있다 (Ishibe, 2008). 그리고 같은 분리균주라 할지라도 어중에 따라서 다른 병원성을 나타내었다는 보고도 되어진 바가 있다 (Suprpto *et al.*, 1995). 그러나 현재 우리나라에서 많이 양식되어지고 있는 미꾸라지에 대한 *E. tarda* 감염 예는 외국에서는 보고되어진 바가 있으나 (Liu and Fong, 1987 ; Park *et al.*, 1983) 우리나라에서는 없을 뿐만 아니라 다른 담수어에 비해 미꾸라지를 사용한 어류질병 세균의 항원성 및 병원성 연구는 되어진 바가 없으며 특히 미꾸라지의 면역반응에 대한 연구는 미비한 실정이다.

어류의 질병예방방법으로는 백신을 통한 특이적 면역반응 증진 및 각종 생리활성물질들을 이용한 면역 반응 증진법을 들 수 있다. 그러나 최근까지 양식어의 주요 질병에 대한 백신 개발에 대한 연구가 많은 학자들에 의해서 진행되어 있으나, 아직까지는 경제적이면서 실용적인 백신은 일부의 질병에 국한된 상태이다.

본 연구에서는 병원성이 약한 *E. tarda* Edk-2 그리고 병원성이 강한 *E. tarda* KFE 두 균주의 항원성에 대한 연구로 혈청학적인 방법을 이용하였다. 각 균주의 항원을 제작하여 두 균주의 outer membrane proteins (OMP)의 pattern 을 비교하여 독성과 관련하여 어떤 항원적인 요소가 작용하는지를 알고자 하였다. 또한 미꾸라지에 접종한 후 응집항체가와 특이 항체 생성 세포 (Specific Antibody Secreting Cells ; SASC) 수를 조사함으로써 단일세포수준에서의 미꾸라지의 방어체계 변화를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

실험어는 평균 어체중 15 g 정도의 시판되고

있는 양식산 미꾸라지를 구입하였으며 외관상 질병의 증세가 나타나지 않는 건강한 개체들을 사용하였다. 실험어를 50 l 용량의 실험용 수조에 수용한 후 수온을 25 °C로 유지하여 2주 정도 순치 시킨 후 실험에 사용하였다.

### 실험 균주

일본의 뱀장어에서 분리한 *E. tarda* Edk-2 와 우리나라의 넙치에서 분리한 *E. tarda* KFE, 본 실험실에서 직접 분리한 *E. tarda* H-4, 일본의 뱀장어에서 분리한 *E. tarda* NUF49 를 API 20E kit 를 사용하여 *E. tarda* 임을 확인한 후 사용하였다. 이외에도 *Vibrio anguillarum* HUF5001, *Yersinia ruckeri* 11-4 를 사용하였다.

### 공격 실험

*E. tarda* Edk-2 와 *E. tarda* KFE 의 병원성 비교를 위하여 공격 실험을 실시하였다. 시험 균주는 NaCl이 1 % 첨가된 TSB 배지에서 25 °C, 18시간 배양한 후 집균하여, 생리식염수로 3회 세척한 다음 *E. tarda* KFE 는 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> cfu/fish 농도로, *E. tarda* Edk-2 는 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> cfu/fish 농도로 실험구당 10 개체에 각각 0.1 ml 씩 복강 주사하였다. 그리고 대조구의 실험어에는 PBS 를 0.1 ml 씩 주사하였다. 그 후 7일간의 누적 폐사율을 조사하여 LD<sub>50</sub> 을 계산하였다.

### 세균 outer membrane proteins (OMP) 의 전기영동

TSB 를 사용하여 25 °C에서 24시간 배양한 세균들을 8,000 rpm 에서 10분간 원심 분리한 후 침전물을 PBS (pH 7.2) 로 재 현탁하였다. 이와 같은 과정을 두번 더 반복하여 세균들을 세척한 다음 50 mg/ml의 농도로 PBS 에 현탁하여 초음파 분쇄기 (Vibra Cell, 375 W Sonicator, medium tip) 로 40 % power level 에서 15분간 초음파 처리한 후 3,000 rpm 에서 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 이것을 다시 15000 rpm 에서 30분간 (4°C) 원심분리하여 침전물을 소량의 PBS 에 재

현탁하여 OMP를 제작하였다. 그것을 동량의 SDS-sample buffer 와 섞은 후 10분간 끓였다. 각 시료를 12%의 SDS-discontinuous acrylamide gel 에 loading 한 후 175 V 에서 2시간동안 running 을 하였다. Gel 상의 단백질을 Coomassie Brilliant Blue 로 4시간 염색한 후 destaining solution (methyl alcohol 7.5%, acetic acid 5%)을 사용하여 탈색 시켰다. Gel 상 단백질들의 크기를 비교하기 위하여 molecular weight size marker (BRL) 를 사용하였다.

### 항원 제작

항원은 FKC (formalin-killed cells)와 EDTA 추출 항원 (EDTA extracted antigen) 을 제작하였다. FKC는 상법 (하 등, 1999) 에 따라 제조하였다. EDTA 추출 항원은 PBS 완충용액 (pH 7.2) 으로 3회 세척한 후 50 mg/ml의 농도로 20 mM EDTA (Ethylenediamine tetraacetate, pH 7.2) 용액에 현탁하여 45 °C에서 30분간 반응시킨 후 초음파 분쇄기 (Vibra Cell, 375 W Sonicator, medium tip) 로 10% power level 에서 1분간 초음파 처리 후 상정액을 취하여 0.15 M Phosphate buffered saline (PBS, pH 8.0) 완충 용액에서 48시간 동안 투석하여 조제하였다. 이렇게 조제된 항원의 단백질 농도는 Bovine Serum Albumin (BSA) 를 표준 단백질로 사용하여 Spectrophotometer 상에서 280 nm 에서 흡광도 측정으로 분석하였다.

### 특이 항체 생성 세포의 검출

실험어의 비장 조직으로부터 단일 세포 현탁액을 준비하였다. Nitrocellulose membranes 가 들어있는 96 well polystyrene microtiter plate 의 각 well 에 EDTA 추출 항원을 50 µg/well 로 분주한 후 4 °C 에서 overnight 하여 coating 시켰다. 이후로 모든 단계의 반응이 끝날 때마다 Tween 20 이 0.1% 함유된 PBS (T-PBS) 를 washing buffer 로 하여 3번씩 세척하였다. 각 well 에 2% BSA 를 200 µl 가하여 37 °C 에서 1시간동안 반

응시켜 coating 되지 않은 부분을 blocking 하였다. L-15 세포 배양 배지에서 현탁하여 준비된 비장 세포를 각 well 에 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup> cell 의 농도로 duplicate 를 넣고 항체 생성을 유도하기 위해 CO<sub>2</sub> incubator (CO<sub>2</sub> 5%) 에서 25 °C에서 6시간동안 배양하였다. 세척 후 biotin conjugated rabbit anti-loach Ig 를 25 µg/ml의 농도로 75 µl씩 첨가하여 반응시키고 alkaline phosphate peroxidase (Sigma Chem. Co.) 를 1:1000 으로 희석하여 75 µl 씩 첨가하여 반응시킨 후 기질로 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT, Sigma Chem. Co.)를 사용하여 100 µl 씩 well 에 첨가하여 발색 정도를 지켜보면서 세척 후 10분 후에 증류수를 첨가함으로 반응을 정지시켰다. 실험 결과 형성된 spot 을 해부현미경으로 수를 직접 헤아렸다.

### 교차반응 분석

*E. tarda* Edk-2 와 *E. tarda* KFE 의 FKC 를 PBS 로 3번 washing 한 후 동량의 Freund's complete adjuvant (FCA) 와 혼합하여 어체중 1 kg 당 10 mg 의 농도로 0.1 ml 씩 복강 주사한 후 1, 2, 3, 5, 7 주째에 실험어의 비장을 적출하여 면역 반응을 측정하였다. *E. tarda* Edk-2 와 *E. tarda* KFE 로 각각 면역시킨 미꾸라지의 비장 세포와 *E. tarda* Edk-2, *E. tarda* KFE 의 EDTA 추출항원으로 ELISPOT 을 실시하여 특이 항체 생성 세포 수를 측정하여 교차반응을 비교하였다.

## 결 과

### *E. tarda* strains 의 병원성

*E. tarda* KFE 의 미꾸라지에서의 LD<sub>50</sub> 은 약 3.7 × 10<sup>5</sup> cfu/fish 로서 KFE 는 미꾸라지에 대하여 강한 병원성을 지니고 있는 것으로 나타났다. 그에 비해 *E. tarda* Edk-2 는 본 실험에서 사용한 최대 농도인 10<sup>8</sup> cfu/fish로 복강 주사하였을 때에도 실험 전 기간에 걸쳐 10% 의 폐사율

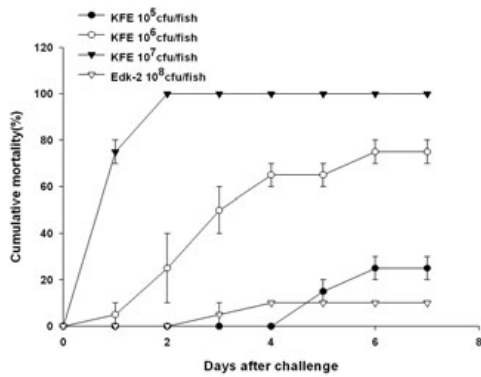


Fig. 1. Cumulative mortality of loach challenged with *Edwardsiella tarda* KFE and *Edwardsiella tarda* Edk-2.

만을 나타내었으므로 매우 낮은 병원성을 보여 주었다 (Fig. 1). PBS를 주사한 대조구에서는 폐사 개체가 없었다.

**Outer membrane proteins (OMP)의 비교**

서로 다른 병원성을 나타낸 *E. tarda* Edk-2와 *E. tarda* KFE의 outer membrane proteins (OMP)을 분리한 후 SDS-PAGE를 실시하였다. 두 균주는 공통적으로 약 41 kDa과 30 kDa 크기의 주요항원을 가지고 있었으나 *E. tarda* KFE 균주는 분자량 약 37 kDa 크기의 또 다른 OMP 분자를 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 그 이외의 약하게 염색된 다른 단백질들의 패턴에도 많은 차이가 나타나 위의 두 균주의 OMP는 서로 다른 구성 성분에 의하여 이루어져 있다는 것을 추정할 수 있었다. 이외에도 우리나라의 분리균주인 *E. tarda* H-4는 *E. tarda* KFE와 OMP pattern이 거의 유사하였고, 일본의 분리균주인 *E. tarda* NUF49는 *E. tarda* Edk-2와 서로 유사한 OMP pattern을 보여주었다. *E. tarda* 균주들과 *Vibrio anguillarum* HUF5001, *Yersinia ruckeri* 11-4의 OMP는 서로 pattern이 달랐다 (Fig. 2).

**특이 항체 생성 세포 수의 변화**

특이 항체 생성 세포의 검출에서는 두 그룹

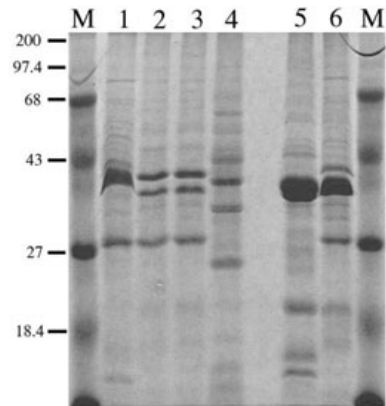


Fig. 2. SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins(OMP) on 12% acrylamide gel. Lane M, marker ; lane 1, *Edwardsiella tarda* Edk-2; lane 2, *Edwardsiella tarda* KFE ; lane 3, *Edwardsiella tarda* H-4 ; lane 4, *Vibrio anguillarum* HUF5001 ; lane 5, *Yersinia ruckeri* 11-4 ; lane 6, *Edwardsiella tarda* NUF49

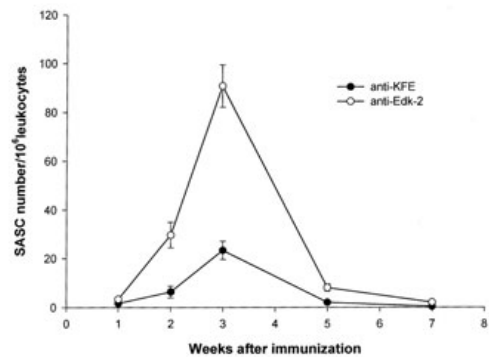


Fig. 3. Numbers of specific antibody secreting cells (SASC) in the spleen of loach after immunization with FKCs of *Edwardsiella tarda* KFE and *Edwardsiella tarda* Edk-2.

모두에서 1주째부터 spot이 관찰되었으며 3주째에 최고 수치에 도달한 후 감소하여 7주째에는 거의 검출되지 않았다. 혈청 내 특이 항체량의 변화와 유사하게 실험 전 기간에 걸쳐 *E. tarda* KFE의 FKCs로 면역시킨 실험구에 비해 *E. tarda* Edk-2의 FKCs로 면역시킨 실험구에서 특이 항체 생성 세포의 수가 유의성 있게 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

### 교차반응 분석

*E. tarda* KFE와 *E. tarda* Edk-2의 항원이 나타내는 교차 반응을 항체 생성 세포 각각의 단일세포 수준에서 분석하기 위하여 각각의 FKc 로 3주간 면역시킨 미꾸라지의 비장 내 백혈구를 분리하여 *E. tarda* Edk-2 균주와 *E. tarda* KFE 균주의 항원 각각에 대한 반응을 ELISPOT assay 법으로 분석하였다. Fig. 4의 A에서 보면, ELISPOT assay 법의 coating 항원으로 *E. tarda* KFE의 EDTA 추출항원을 사용하여 특이 항체 생성 세포를 검출하였을 시에는, *E. tarda* KFE 균주의 FKc 로 면역된 실험어의 비장에서는  $10^7$  개의 백혈구 중 평균 26.25 개, *E. tarda* Edk-2 균주의 FKc 로 면역된 실험어의 비장에서는  $10^7$  개의 백혈구 중 평균 15.75 개로서 나타났다. 이것을 면역항원에 특이적인 SASC 수 (본 연구에서는 26.25개)를 100%로 하면 비교 대상 항원에 대한 교차율은 60% (15.75)로 표시 할 수 있다. 이러한 분석을 coating 항원을 바꾸어 다시 분석하여 보면 (Fig. 4의 B), 즉 항원으로 *E. tarda* Edk-2의 EDTA 추출항원을 사용하여 특이 항체 생성 세포를 검출하였을 시에는, *E. tarda* Edk-2 균주의 FKc로 면역된 실험어의 비장에서는  $10^7$  개의 백혈구 중 평균 77 개, *E. tarda* KFE 균주의 FKc로 면역된 실험어의 비장에서는  $10^7$  개의 백혈구 중 평균 11.75 개로서 그 교차율은 15.26%로 나타났다. 그러므로 역시 두 균주가 나타내는 교차반응의

정도를 확인할 수 있었지만 교차율은 A 그룹에 비하여 낮게 나타났다.

### 고 찰

본 연구에서는 미꾸라지를 사용하여 면역학적 방법으로 각기 다른 병원성을 갖고 있는 두 종의 *E. tarda* 분리균주에 대한 항원성을 비교하고자 하였다.

*E. tarda* Edk-2와 *E. tarda* KFE의 병원성을 조사하기 위해 공격실험을 실시하여 보았을 때, 미꾸라지에서의 *E. tarda* KFE 균주는 미꾸라지에 대하여서 강한 병원성을 지니고 있는 것으로 나타났다. 그에 비해 *E. tarda* Edk-2 균주는 실험 전 기간에 걸쳐 10%의 폐사율만을 나타내었으므로 매우 낮은 병원성을 보여 주었다 (Fig. 1). 본 연구실에서 예비적 실험으로 넙치 (*Paralichthys olivaceus*,  $35 \pm 6$  g body weight)를 사용하여 위의 두 균주로 공격실험을 실시하여 본 결과, 넙치에서의 *E. tarda* KFE 균주의 LD<sub>50</sub>은  $4.1 \times 10^3$  cfu/fish로서 미꾸라지에서보다 더 높은 병원성을 보여주었다. 그리고 *E. tarda* Edk-2 균주는 제일 높은 농도인  $10^6$  cfu/fish로 복강 주사하였을 때에도 실험 전 기간에 걸쳐 10%의 폐사율만을 나타내었으므로 넙치에서도 역시 매우 낮은 병원성을 보여 주었다 (Data not shown). Park et al. (1983)과 Suprpto et al. (1995)은 혈청형이 A

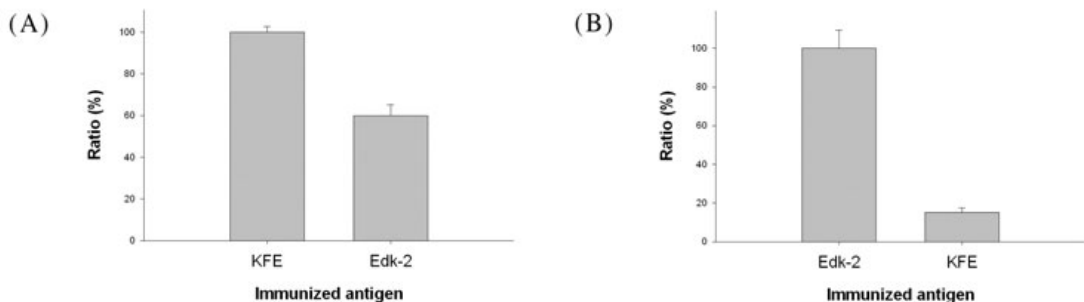


Fig. 4. Compared numbers of SASC analyzed with EDTA extracted antigens of *Edwardsiella tarda* KFE (A) and *Edwardsiella tarda* Edk-2 (B) on ELISPOT assay for the splenocytes in the loach immunized with FKc of *Edwardsiella tarda* KFE or *Edwardsiella tarda* Edk-2.

인 *E. tarda* 균주가 강한 병원성을 나타내었다고 한다. 그러므로 본 실험에서 병원성의 차이를 보여준 *E. tarda* Edk-2 와 *E. tarda* KFE 균주도 그 항원구성 및 혈청학적 특성이 다를 것으로 추정되나 이에 대한 분석은 실시하지 않았다. 그러나 outer membrane proteins (OMP) pattern 을 보았을 때 *E. tarda* Edk-2 와 *E. tarda* KFE는 약 41 kDa 과 30 kDa 의 공통적인 OMP 분자를 가지고 있었으나 그 이외의 그 구성 성분에는 많은 차이가 나타났으며, 특히 병원성이 강한 *E. tarda* KFE 균주는 분자량 약 37 kDa 크기의 또 다른 주요항원을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 그리고 *E. tarda* KFE 와 같이 높은 병원성을 가지고 있는 것으로 보고된 (박 등, 1997) *E. tarda* H-4 균주의 OMP 는 구성 성분이 서로 유사하였다. 그리고 Suprpto *et al.* (1996) 의 보고에 의하면 *E. tarda* 의 extracellular products (ECP) 와 intracellular components (ICC) 에서 독성을 나타내는 단백질의 분자량은 37 kDa 정도였고 병원성이 있는 *E. tarda* 균주에서만 발견되었으며 *E. tarda* 의 병원성 발현에 있어서 중요한 역할을 한다고 하였으므로 본 실험과 유사한 결과를 보여주어 본 실험의 결과를 뒷받침해주고 있다. 이외에도 본 실험의 결과에서 우리나라의 분리균주인 *E. tarda* KFE 와 *E. tarda* H-4 의 OMP 는 구성 성분이 서로 유사하였고, 일본의 분리균주인 *E. tarda* Edk-2 와 *E. tarda* NUF49 역시 서로 유사한 OMP 분자를 가지고 있는 것으로 보아, *E. tarda* 가 분리된 지역에 따라서 다른 항원구성을 가지고 있는 것으로 보인다 (Fig. 2).

항원 투여 후 면역반응 분석은 단일 세포가 생성하는 항체의 분석을 위해 ELISPOT (Enzyme Linked Immuno Spot) 을 실시하여 특이 항체 생성 세포 수의 변화를 조사하여 면역반응의 분석을 보다 구체화 하고자하였다. ELISPOT 법은 항체와 항원, 효소와 기질의 특이적 결합을 이용한 방법으로 기존의 haemolytic plaque assay 보다 감도가 훨씬 뛰어나고 2차 항체를 이용함으로써 haemolytic plaque assay 에서 발생하는 back

ground 의 문제점을 해소함으로써 현재 많이 이용되어지고 있는 방법이다. 이러한 ELISPOT 은 포유류와 설치류에서는 보편적으로 널리 사용되어져 왔으나 어류에서의 적용에 대한 연구는 많이 되어 있지 못하여 Dab, *Limanda limanda* L. (Secombes *et al.*, 1991), Channel catfish (Waterstrat *et al.*, 1991), Rainbow trout (Davidson *et al.*, 1992), Roach (Altonen *et al.*, 1994), 넙치 (하 등, 1999) 등에서 보고된 예가 있으나 미꾸라지에서는 처음으로 보고되었다.

어류는 외부 항원이 어체내로 유입되게 되면 lymphoid organ내의 lymphocyte가 자극되어져 항체를 생성하는 세포로 분화와 증식의 과정을 거치게 되고 lymphoid organ내의 항체 생성 세포가 분비한 항체가 혈액내로 유출된다. 이러한 혈청을 이용한 응집항체가 측정 결과를 살펴보면 특이 항체가 2주째부터 증가하기 시작하여 3~4주째 높은 특이 항체량이 검출된다는 보고가 있다 (변 등, 2001). 본 연구에서 항원 투여 후 혈청내 특이 항체와 특이 항체 생성 세포의 수는 각각 *E. tarda* Edk-2 와 *E. tarda* KFE 로 면역시킨 두 그룹 모두에서 2주째 이전부터 증가하기 시작하여 3주째에 최고 수준에 도달하였으며 그 후 감소하였다. 이러한 특이 항체 생성 세포 수의 변화 양상은 넙치를 사용한 하 등 (1999) 의 보고와 일치하였으나, 하 등 (1999) 의 보고와 Davison *et al.* (1992) 에서의 응집항체의 변화 양상은 5주째에 최대치를 보인 후 7주째까지 동일한 수준을 유지하였으므로 본 실험 결과와는 다른 양상을 보여주었다. 이러한 경향으로 보아 사용한 어류의 종류나 사용 항원 등에 따라 항체 생성 세포 수와 혈청 내 특이 항체량의 동적 변화가 다를 수 있음을 추정할 수 있고, 또는 본 실험시의 미꾸라지를 사육하는 과정에서 자연 환경과는 다른 환경에서 사육하였으므로 그러한 요인들이 미꾸라지의 항체 생성에 어떤 억제적인 영향을 미칠 수 있다는 것도 배제할 수 없다. *E. tarda* KFE와 *E. tarda* Edk-2의 항원성 차이를 항체 생성 세포 검출에 의한 교

차반응을 분석하여 단일세포 수준에서 확인하고자 하였다. ELISPOT 분석 시의 coating 항원으로 *E. tarda* KFE의 EDTA 추출항원을 사용하여 *E. tarda* KFE의 FKc로 3주간 면역시킨 미꾸라지 비장의 특이 항체 생성 세포를 검출한 결과 ( $26.25/10^7$  leukocytes)에 비하여, coating 항원으로 *E. tarda* Edk-2의 EDTA 추출항원을 사용하여 *E. tarda* Edk-2의 FKc로 3주간 면역시킨 미꾸라지 비장의 특이 항체 생성 세포를 검출하였을 시에 specific한 특이 항체 생성 세포가  $77/10^7$  leukocytes 정도로 더 많이 검출되는 것으로 나타났으나 그 교차율은 15.26%로 *E. tarda* KFE 균주의 EDTA 추출항원을 실험실에 사용하였을 때의 교차율 (60%)보다 떨어지는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 이런 결과로 보아 *E. tarda* Edk-2 균주는 *E. tarda* KFE 균주에 비해 미꾸라지 비장의 B 세포를 활성화시키는 항원을 보다 많이 함유하고 있으며, *E. tarda* KFE 균주에 비해 좀 더 specific한 면역반응을 유도하는 것으로 보인다. 또, 혈청 내로의 특이항체 분비 양상과 단일 세포 수준에서의 특이항체 분비 양상이 반드시 일치하지 않는 것은 실험에 사용된 항원이 각각 FKc와 EDTA 추출항원으로 다르며 각 실험방법의 민감성에 있어서도 차이가 날 수 있는 것으로 생각되어진다 (Poxton, 1979). 그러므로 병원성과 항원성에 있어서 차이를 보여주는 *E. tarda* 균주 간에는 특이적인 항체생성 세포의 유도 정도에서도 유사한 차이를 보여 줌을 ELISPOT 기법을 통하여 명확히 확인할 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 우리나라에서 분리된 *E. tarda* KFE와 일본에서 분리된 *E. tarda* Edk-2 두 균주의 병원성과 항원성을 비교하고자 하였다.

병원성을 조사하기 위하여 미꾸라지에 공격실험을 실시하였을 때, *E. tarda* KFE 분리균주는 *E. tarda* Edk-2 분리균주에 비하여 강한 병원성

을 나타내었다. 각 균주의 OMP (outer membrane proteins)를 분리하여 SDS-PAGE를 실시하여 보았을 때에도 두 균주 간의 차이점을 확인할 수 있었는데, *E. tarda* KFE 분리균주에서는 분자량이 41 kDa, 37 kDa 그리고 30 kDa인 세 가지의 주요한 band가 나타났고 *E. tarda* Edk-2 분리균주에서는 41 kDa과 30 kDa인 두 가지의 주요한 band가 나타났다. 이러한 결과를 근거로, 우리나라에서 많이 양식되어지고 있는 담수어인 미꾸라지를 사용하여 위의 두 가지 분리균주의 항원성에 있어서의 차이점을 조사하고자 하였다. 다른 항원을 사용하여 ELISPOT-assay법을 실시하여 면역시킨 미꾸라지의 비장에서 특이항체 생성 세포 수를 조사함으로써 교차반응을 분석하여 본 결과, 응집항체가 test를 실시했을 때에 비하여 더 강한 교차반응을 보여주었으므로, 두 *E. tarda* 균주의 항원에 공통적인 epitope가 존재한다는 사실도 또한 확인할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 국토해양부 마린바이오21사업의 해양바이오프로세스 연구단 연구비 지원 (M2007-07)에 의해 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Altonen, T. M., Jokinen, E. I. and Valtonen, E. T. (1994): Antibody synthesis in roach (*Rutilus rutilus*); analysis of antibody secreting cells in lymphoid organs with ELISPOT-assay. *Fish & Shellfish Immunology*, 4:129-140.
- Bang, J. D., Chun, S. K., Park, S. I. and Choi, Y. J. (1992): Studies on the biochemical and serological characteristics of *Edwardsiella tarda* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 5:29-35.
- Chen, J. D. and Huang, S. L. (1996): Hemolysin from *Edwardsiella tarda* strain ET16 isolat-

- ed from *Anguilla japonica* identified as a hole-forming toxin. Fisheries science., 62:538-54.
- Davidson, E. A., Ellis, A. E. and Secombes, C. J. (1992): An ELISPOT assay for the qualification of specific antibody secreting cells to *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum). J. Fish Dis., 15:85-89.
- Huang, X. and Lu, C.(2001): Analys of outer membrane protein and drug-resistant of *Edwardsiella tarda*. Wei Sheng Wu Xue Bao., 41:640-634.
- Ishibe, K., Osatomi, K., Hara, K., Yamaguchi, K. and Oda, T. (2008): Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. Fish & Shellfish Immunol., 24:243-251.
- Liu, C-K. and Fong, A. A. (1987): Disinfection study of iodophor on the pathogenic bacteria of eels. COA Fish. Ser., 10:115-124.
- Mathew, J.A., Tan, Y.P., Srinirasa Rao, P.S., Lim, T.M. and Leung, K.Y. (2001): *Edwardsiella tarda* mutants defective in siderophore production, motility, serum resistance and catalase activity. Microbio., 147:449-457.
- Park, S. I., Wakabayashi, H. and Watanabe, Y. (1983): Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. Fish Pathol., 18:85-89.
- Poxton, I.R. (1979): Serological identification of *Bacteroides* species by an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol., 32:294-298.
- Salati, F. and Kusuda, R. (1985): Chemical composition of the lipopolysaccharide. Fish pathol., 19:187-192.
- Secombes, C. J., White, A., Fletcher, T. C. and Houlihan, D. f. (1991): The development of an ELISPOT assay to Quantify total and specific antibody-secreting cells in dab *Limanda limanda* (L.). Fish & Shellfish Immunology, 1:87-97.
- Suprpto, H., Nakai, T. and Muroga, K. (1995): Toxicity of extracellular product and intracellular components of *Edwardsiella tarda* in the Japanese eel and flounder. J. Aquatic Animal Health. 7:292-297.
- Suprpto, H., Hara, T., Nakai, T. and Muroga, K. (1996): Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 31:203-207.
- Waterstrat, P. R., Brazil and Ainsworth, A. j. (1991): Use of an ELISA-based assay fir the detection of antibody-secreting cells in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). J. Fish Dis., 14:669-675.
- 박경현, 하재이, 허민도, 허성희, 정현도 (1997): 나일 틸라피아에 대한 질병 예방제 및 면역보조제로서의 PS-K 효과 분석. 한국어병학회지, 10:45-52.
- 변주영, 유민호, 전려진, 이형호, 정현도 (2001): Cadmium이 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 면역 반응에 미치는 영향. 한국어병학회지, 14:97-102.
- 하재이, 박준호, 김명석, 정준기, 정현도 (1999): 수산생물의 생산과 관리에 관한 기초연구 : ELISPOT 기법을 이용한 넙치의 항체생성 세포분석. 한수지, 32:420-426.

---

Manuscript Received : October 27, 2008

Revision Accepted : November 28, 2008

Responsible Editorial Member : Kim, Ki-Hong  
(Pukyong National University)