

GOVP1199810936

최 종
연구보고서

단클론항체를 이용한 비브리오균의 검정법 개발
Development of detection methods for
Vibrio vulnificus using monoclonal antibodies

단클론항체의 제조 및 분석법 개발
Production of monoclonal antibodies
and development of detection methods

항체의 정제 및 가공
Purification and processing of antibodies

환경 및 임상시료의 분석
Analysis of environmental and clinical samples

연구기관 : 전북대학교

농림부

636.089
L293 L

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “단클론항체를 이용한 비브리오팀의 검정법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997 . 12 .

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 박 문 국

연 구 원 : 엄 태 봉

연 구 원 : 임 병 무

요 약



I. 제 목

단클론항체를 이용한 비브리오균의 검정법 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 목적

본 연구개발의 목적은 비브리오패혈증의 원인균인 *Vibrio vulnificus*를 신속하고 효율적으로 확인할 수 있는 검정법을 개발하는 것이다.

2. 중요성

*V. vulnificus*는 감염되어 일단 발병하면, 사망률이 60% 이상에 이르는 무서운 세균이다. 이 세균에 대한 신속하고 효율적인 검정법은 여러 용도에 활용되어 아래와 같은 효과를 유발할 것이다.

용도	기술적 기대효과	경제·산업적 기대효과
수산물의 오염도 측정	오염된 것과 오염되지 않은 수산물의 구분이 가능	하절기 수산물 소비의 급격한 감소를 방지하여 수산업계와 관련 상인의 경제적 이익을 증진할 수 있음
하절기 오염 해역의 판정	오염 해역 지도의 작성이 가능	
환자의 진단	발병 초기의 신속한 진단이 가능	잘못된 또는 지연된 진단에 따르는 인력의 손실과 경제적 비용을 줄일 수 있음

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 *V. vulnificus*를 신속하고 효율적으로 확인할 수 있는 방법을 개발하기 위해서 다음과 같은 실험을 실시하였다.

연도	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1996)	항원 준비 단클론항체를 분비하는 세포주(cell line) 생성법의 확립
2차년도 (1997)	단클론항체의 대량 생성 및 특성 분석 효율적인 검정법의 개발 여러 시료의 분석을 통한 검정법 시험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

*V. vulnificus*에 대한 단클론항체를 분비하는 cell line들을 효율적으로 생성하는 방법을 확립하였고, 이 방법에 따라 총 27주의 단클론항체 분비 세포주들을 확립하였다. 이들이 생성하는 단클론항체들의 특성을 조사하여 반응성과 특이성이 높은 항체를 선정하였다. 이 항체를 대량 생성하고 정제하여 이를 이용하는 효율적인 검출법을 개발하였다. 개발된 검출법의 주요 특징은 다음 표와 같다.

방법	실험 소요시간	검출 한계
microplate assay	3 시간	10,000 세포
membrane assay	2-2.5 시간	1,000 세포

2. 활용 건의

이 검출법은 단클론항체를 이용해서 *V. vulnificus*를 신속하고 간단하게 검출하는 방법이다. 따라서 식품 위생을 검사하는 기관과 연구실에서는 하절기 해산물의 오염 여부를 측정하는데 활용할 수 있으며, 병원에서는 비브리오패혈증이 의심되는 환자의 초기 진단에 활용할 수 있다.

S U M M A R Y

(영문요약문)

Vibrio vulnificus is a pathogenic marine bacterium, which produces severe infection in individuals with certain underlying disease. The mortality of septicemia by this bacterium exceeds 60%. And fear for this bacterium reduces seafood consumption dramatically during summer season. A simple, sensitive, and specific detection method for this bacterium could make it possible to identify the causative agent in the early stage of the infection, which could decrease its mortality. In addition, it could increase economic benefits of fishermen by reducing fear for consumption of seafoods in summer.

In this study, monoclonal antibodies to *V. vulnificus* were prepared and utilized in the development of two detection methods. The quantitative microplate assay could detect 10,000 cells, showed little cross-reactivity to other bacterial species, and could be completed in 3 hours. The qualitative membrane assay could detect 1,000 cells, showed little cross-reactivity, and could be completed in 2-2.5 hours. The methods could detect *V. vulnificus* in seawater collected in July, in artificially contaminated seafood, and also in a patient serum.

C O N T E N T S

Chapter 1 Introduction	8
1.1 Research background	8
1.2 Research purpose	9
1.3 Research content	10
1.4 Research organization	10
Chapter 2 Preparation of monoclonal antibody and development of detection methods	11
2.1 Introduction	11
2.2 Materials and methods	11
2.3 Result and discussion	21
2.4 Conclusions	39
Chapter 3 Purification and processing of antibodies	40
3.1 Introduction	40
3.2 Materials and methods	40
3.3 Result and discussion	43
Chapter 4 Analysis of environmental and clinical samples	46
4.1 Introduction	46
4.2 Materials and methods	46
4.3 Result and discussion	49
Chapter 5 Conclusions	56

목 차

제 1 장 서 론	8
제1절 연구개발의 배경	8
제2절 연구개발의 목적	9
제3절 연구개발의 범위	10
제4절 연구개발의 추진체계	10
제 2 장 단클론항체의 제조 및 검정법 개발	11
제1절 서 론	11
제2절 재료 및 방법	11
제3절 결과 및 고찰	21
제4절 결론	39
제 3 장 항체의 정제 및 가공	40
제1절 서 론	40
제2절 재료 및 방법	40
제3절 결과 및 고찰	43
제 4 장 환경 및 임상시료의 분석	46
제1절 서 론	46
제2절 재료 및 방법	46
제3절 결과 및 고찰	49
제 5 장 결 론	56

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 배경

*Vibrio vulnificus*는 비교적 온화한 기후 지역의 바닷물에 서식하는 호염성 세균인데, 이 균체에 오염된 해수에 피부의 상처부위가 접촉되거나 오염된 굴, 조개, 생선 같은 해산물의 생식에 의해 사람에게 감염한다¹⁾. 사람에게 감염할 경우에 피부 괴사, 폐염, 뇌막염, 패혈증 등이 동반된다. 이 비브리오패혈증은 외국의 경우 60 % 이상, 국내의 경우 80 %에 가까운 사망율을 보이는데, 특히 만성 간염이나 간 경화증 같은 간 질환, 면역기능이 저하된 사람이 쉽게 감염되는 것으로 알려져 있다²⁾. 우리나라와 같이 간질환 환자가 많고, 해산물을 비위생적인에서 날것으로 많이 먹는 환경에서는 이 세균의 감염 가능성이 매우 높아서 여름동안 전남북 해안 지역을 위주로 많은 환자가 발생하여 매년 10여명 이상이 이 세균의 감염에 의해 사망하고 있다.

우리나라는 인구에 비해 국토면적이 좁아 충분한 양의 농축산물을 생산할 수 없으나 삼면이 바다로 둘러싸여 있기 때문에, 해산물은 국민 식생활의 주요 부분을 차지하여 왔으며 앞으로도 그 중요성은 더욱 증대될 것이다. 그러나 하절기에 수온이 증가하면 *V. vulnificus*의 증식이 활발해짐에 따라, 이 균에 의한 감염증 즉 비브리오패혈증이 발생하게 된다³⁾. 비브리오패혈증은 병의 진행속도가 대단히 빨라

1 Tacket,CO., F.Brenner, and PA.Blake, 1984. J. Infect. Dis. 149:558

2 Klontz,KC., M.Schreiber, and RA.Gunn, 1988. Ann. Intern. Med. 109:318

3 Kelly,MT, 1982. Appl. Environ. Microbiol. 4:820

서 미처 진단이 되기 전에 환자가 사망하는 경우가 대부분이기 때문에⁴⁾ 대단히 두려운 질환으로 인식되고 있다. 이에 따라 비브리오패혈증의 발생이 매스컴에 보도되면 이 병에 대한 공포때문에 해산물의 소비가 전국적으로 감소함으로써 이를 생산하는 어민과 관련 상인들이 많은 경제적 어려움을 겪고 있는 실정이다. *V. vulnificus*의 국민보건의 위협성 및 이로 인해 야기되는 수산업계의 피해를 고려해 볼 때, 이 세균에 대한 빠르고, 민감하면서, 특이성이 높은 검출 방법의 개발이 시급한 실정이다. 이러한 방법이 개발되면 환자의 신속한 진단으로 치료 효과를 높일 수 있다. 뿐만 아니라 *V. vulnificus*의 분포 상태와 이에 오염된 해산물을 확인할 수 있게 되기 때문에 이 세균에 의한 감염을 사전에 차단할 수 있게 됨으로써, 비브리오패혈증에 대한 막연한 공포에 의한 해산물 소비의 전반적인 감소를 방지할 수 있게 됨으로써 해산물을 생산하는 어민과 판매상에게 상당한 경제적 도움을 줄 수 있을 것이다.

제2절 연구개발의 목적

본 연구개발의 목적은 감염 환자의 혈청 등 임상적 시료나 해수나 굴, 조개 등의 해산물과 같은 환경 시료에 존재하는 병원성 세균인 *V. vulnificus*를 짧은 시간안에 검출 확인할 수 있는 단클론항체를 이용하는 효율적인 검정법을 개발하는 것이다. 이를 위해 연구 1차년도에는 *V. vulnificus* 항원에 반응하는 반응성 높은 단클론항체들을 만드는 방법을 확립하고, 2차년도에는 여러 단클론항체들을 생성하고 이들의 특성을 조사하여 특이성과 친화도가 높은 항체를 선별한 다

4 Rippey,SR., 1994. Clin. Microbiol. Rev. 7:419

음, 이들을 이용하여 *V. vulnificus*를 가장 효과적으로 검출할 수 있는 검출 시스템을 개발하고자 한다.

제3절 연구개발의 범위

구분	연구개발범위
1차년도 (1996)	비브리오팀 배양 hybridoma cell line 생성법 확립
2차년도 (1997)	단클론항체 대량 생산과 특성 시험 검정법 개발 환경과 임상 시료의 분석

제4절 연구개발의 추진체계

총괄 과제: 단클론항체를 이용한 비브리오팀의 검정법 개발		
전북대학교 생물과학부 박문국		
제 1 세부과제	제 2 세부과제	제 3 세부과제
단클론항체의 제조 및 검출법 개발	항체의 정제 및 가공	환경 및 임상시료의 채집 및 분석
전북대학교 생물과학부 박문국	전북대학교 생물과학부 엄태봉	전북대학교 수의학과 임병무

제 2 장 단클론항체의 제조 및 검정법 개발

제1절 서 론

항체를 이용해서 세균을 검출하는 enzyme immunoassay 방법은 일반적으로 실험이 간단하고, 신속하게 그 결과를 알 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그러나 다클론성 항체는 반응성은 높으나 특이성이 낮아서 특정균주만을 선택적으로 확인하기가 어려운 단점이 있으며, 단클론항체는 다클론성 항체에 비해 일반적으로 반응성이 낮아 이를 활용하는 민감한 검출법의 개발에 어려움이 있다⁵⁾. 따라서 단클론항체를 이용하는 검출법의 성패는 반응성 즉 affinity가 높은 단클론항체의 생성과 이에 의한 반응을 증폭시키는 방법의 확립에 좌우되리라 생각된다. 이를 해결하기 위해 많은 종류의 단클론항체를 생산해서 반응성이 높은 것을 선별해 사용하고, sensitivity를 높이기 위해서 여러 종류의 assay format과 관련 기술들을 시험하였다.

제2절 재료 및 방법

1. Materials

V. vulnificus ATCC 27562와 myeloma cell Sp2/O-Ag14는 American Type Culture Collection(Rockville, Md.)로부터, 기타 세균 균주들은 Korean Collection for Type Cultures(Daejon, Korea)로부

5 Nakamura, R.M. 1992. pp. 3-22. In R.M. Nakamura (ed.) Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990s. ASM, Washington, D.C.

터 구입하였다. 본 실험에 사용된 세균균주들은 Table 1과 같다. New Zealand White rabbits와 BALB/c mouse는 대한실험동물센터에서 구입하였다. Heart infusion broth(HIB), marine broth, nutrient broth, agar는 Difco(Detroit, Mich.)사 제품을 이용하였다. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS)는 Gibco BRL(Grand Island, NY)로부터 구입하였으며, 96 well microplate, 25 T flask 등 세포배양에 사용되는 일회용 제품은 Corning사 제품을 사용하였다. 기타 일반시약은 Sigma(Saint Louis, MO.)와 Boehringer Mannheim(Germany)으로부터, 세균배양용 시약들은 Difco로부터 구입하여 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains

<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562
<i>Vibrio fluvialis</i> ATCC 33812
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749
<i>Vibrio furnissii</i> ATCC 35016
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 33844
<i>Vibrio carchariae</i> NCIMB 2717
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC 19433
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 21074
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 11438
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25306
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 29631

2. Preparation of antigens

항체를 생성하기 위한 항원으로 또한 검출법의 표준 항원으로 사용하기 위해 *V. vulnificus* ATCC 27562를 HIB에서 배양하였다. 세균수를 측정하기 위해서는 HI agar plate를 이용하는 생균수 측정법과 602 nm에서의 흡광도를 분광광도계로 측정하는 혼탁도법을 병행하여 실시하였다⁶⁾.

HI agar plate에서 형성된 colony 몇 개를 HI agar slant에 도말하고 30 °C에서 12시간 배양한 후 200 ml의 HIB에 접종하여 30 °C에서 진탕배양하였다. 24 시간 배양 후에 10,000 x g에서 20 분간 원심분리하여 세포를 모았다. 소량의 PBS에 현탁한 세포에 formaldehyde를 1 %가 되게 첨가하여 실온에서 30 분간 처리한 다음 PBS로 1.0×10^{10} CFU/ml의 농도가 되게 희석하였다. sodium azide를 0.1 %(W/V)가 되게 첨가한 다음 4 °C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. Immunization

가. Immunization for polyclonal antibodies

V. vulnificus ATCC 27562 항원을 10,000 x g에서 15 분간 원심분리하여 모으고 PBS로 2회 씻어 준 후, 2.0×10^9 CFU/ml의 농도가 되게 PBS에 현탁하였다. 0.5 ml의 항원을 같은 부피의 Freund's complete adjuvant와 섞어 emulsion 상태로 만든 다음, New Zealand white rabbits에 피하주사하였다. 3 주 후에 같은 양의 항원을 같은 부피의 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 emulsion 상태로 만든

6 Chung.MS., RM.Rim, TB.Uhm, and MK.Park, 1997. J. Microbiol. 35:87

다음, rabbit에 동일한 방법으로 주사하였다. 2nd immunization으로부터 7일 후 소량의 혈액을 취하여 ELISA 방법으로 혈청의 항체역가를 측정하였다. 항체역가가 높은 rabbit에 2nd immunization 3주 후에 같은 방법으로 3rd immunization하고, 7일 후 심장에서 채혈하였다. 얻은 혈액을 상온에서 2 시간 방치하고 다시 4 °C에서 12시간 동안 방치한 다음, 200 x g로 15 분간 원심분리하여 혈청을 얻고 -20 °C 에 보관하면서 실험에 이용하였다.

나. Immunization for monoclonal antibodies

PBS에 씻은 *V. vulnificus* 항원을 1.0×10^9 CFU/ml의 농도로 PBS에 현탁하였다. 항원을 같은 부피의 Freund's complete adjuvant와 섞어 emulsion 상태로 만든 다음 200 μ l 씩 5 주 된 BALB/c mouse에 복강주사하였다. 3 주 후에 같은 양의 항원을 같은 부피의 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 mouse에 2nd immunization하였다. 2nd immunization으로부터 7일 후 mouse의 tail로부터 소량의 혈액을 취하여 ELISA 방법으로 항체역가를 조사하였다. 가장 높은 항체역가를 보이는 mouse에 2nd immunization으로부터 3 주 후에 같은 양의 항원을 단독으로 정맥주사하고 72 시간 후 fusion실험에 이용하였다.

다. Assay of antibody titer

mouse와 rabbit에서 항원주사에 의한 항체 생성여부를 확인하기 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 실시하였다. 이 방법에 관련된 여러 요소들을 최적화한 다음 실험하였는데, coating antigen으로 사용한 *V. vulnificus* 항원은 well 당 2×10^7 cell을 사용하여 4°C에서 12시간 동안 coating하였다. 1% BSA 용액으로 30분간

blocking한 다음, 적정 희석된 혈청 시료를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 배양하였다. Developer antibody로는 goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate(Sigma A3687)또는 goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase(Sigma A2429)를 적정 농도로 희석하여 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. NPP를 기질로 사용하여 발색시키고, 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

4. Fusion, selection and cloning

fusion partner인 Sp2/O-Ag14 myeloma cell을, 10 % FBS, 10 mM HEPES, 0.1 % 50 mM B-mercaptoethanol를 첨가한 DMEM에 접종하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 10 일 정도 배양한 후 fusion 실험에 사용하였다. 3차 immunization 3일 후에 mouse로부터 spleen을 무균적으로 꺼내어 spleen cell suspension을 마련하였다. 2 x 10⁷ 의 myeloma cell과 1 x 10⁸ spleen cell을 섞고 50 % (V/V) PEG 1 ml을 1 분 동안 천천히 첨가하여 세포융합을 유도한 다음 DMEM으로 희석하여 융합을 중지시켰다. hybridoma growth factor supplement(Boehringer Mannheim)를 첨가한 96 well plate의 well 당 3.0 x 10⁴ 의 myeloma cell이 들어가도록 plating한 다음 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양하였다. HAT medium을 첨가하여 hybridoma cell을 선택적으로 자라게 하였다. hybridoma colony가 well 면적의 30 % 정도에 달하면 상등액을 취하여 ELISA로 항체역가를 측정하였다. 이 ELISA에서는 developer antibody로 goat anti-mouse polyvalent Igs(G,M,A)-alkaline phosphatase conjugate(Sigma A0162)를 적정 농도로 사용하였다. *V. vulnificus*에 대한 항체를 생성하는 hybridoma cell들은 limiting dilution법⁷⁾을 이용하여 cloning하여 세포주로 확립하였다. 확립된 세포주들은 액체질

소탱크에 보관하면서 실험에 이용하였다.

5. Characterization of monoclonal antibody

가. Isotype determination of monoclonal antibodies

확립된 세포주들이 분비하는 단클론항체들의 isotype은 mouse-hybridoma subtyping kit(Boehringer Mannheim)를 사용한 ELISA와 Ouchterlony gel immunodiffusion 방법⁸⁾으로 결정하였다.

나. Reactivities of monoclonal antibodies

확립된 세포주들이 생성하는 단클론항체들 중에서 점출법의 개발에 사용할 반응성과 특이성이 높은 항체를 선택하기 위하여 이들 항체들의 여러 세균종들에 대한 반응성을 조사하였다. 항체를 함유한 세포배양 상등액을 *V. vulnificus* ATCC 27562를 포함하는 14종의 세균 세포들이 각각 coating된 microplate에 적량 첨가하여 반응시킨 다음, 부착된 항체는 goat anti-mouse polyvalent Igs(G,M,A)-alkaline phosphatase conjugate를 사용하여 검출하였다.

6. Production of ascites fluid

선택된 단클론항체들을 대량으로 생성하기 위해서 이들을 분비하는 hybridoma cell 10^7 씩을 pristane-primed mouse의 복강에 주사하여 ascites fluid의 형성을 유발하였다. 주사후 1-2주 후에 ascites fluid를 모으고, 이들로부터 항체를 정제하였다(세부과제 2).

7 Hamilton, M.J., and W.C. Davis, 1995. pp. 17-28. In W.C. Davis (ed.) *Monoclonal antibody protocols*. Humana Press Inc., NJ.

8 Catty, D. and C. Raykundalia, 1988. pp. 137-167. In Catty, D. (ed.) *Antibodies*, Vol. 1. IRL Press, Washington, DC.

7. Development of detection methods

본 연구에서는 정제된 단클론항체 E4G2를 이용하여 96-well ELISA plate를 사용하는 microplate assay(Figure 1)와 PVDF membrane을 사용하는 membrane assay(Figure 2) 등 2가지 검출법을 개발하였다.

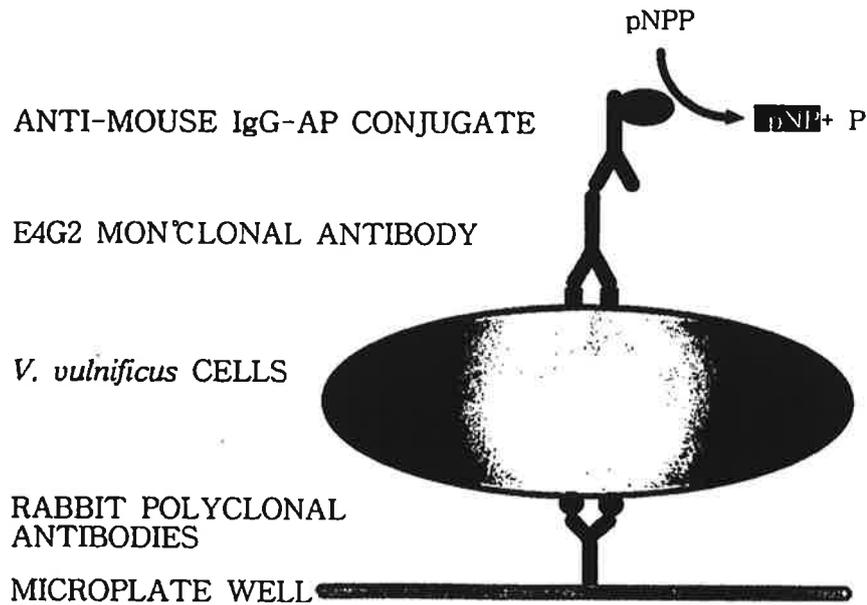


Figure 1. Format of microplate assay.

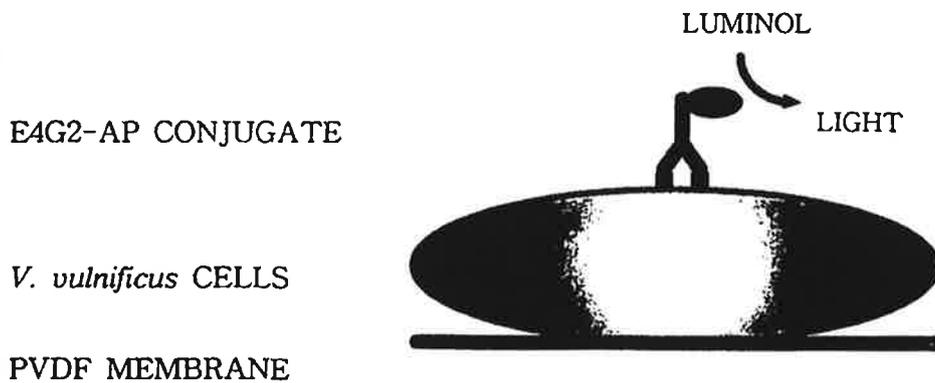
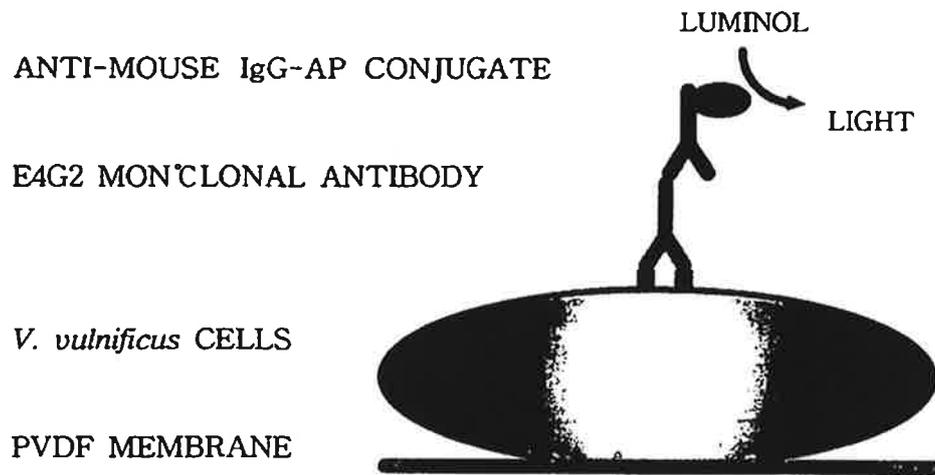


Figure 2. Format of membrane assay.

가. Microplate assay

이 검출법에서는 coating antigen으로 rabbit anti-*V. vulnificus* polyclonal antibody를, blocking 용액으로 1% BSA 용액을, 표준시료로는 *V. vulnificus* ATCC 27562를, detector antibody로는 단클론항체 E4G2를, developer antibody로는 goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase를, 그리고 기질로는 NPP를 사용하였다. coating은 4℃에서 12시간 동안 실시하였으며 나머지 각 단계는 실온에서 30분 동안 실시하였다. 각 단계에서의 최적 농도를 결정하여 사용하였다. rabbit polyclonal Ab는 PBS로 200 배, E4G2와 goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate는 blocking solution으로 각각 3,000배, 20,000배 희석하여 사용하였다.

나. Membrane assay

이 방법에서는 항체로는 단클론항체 E4G2만을 사용하였으며, 검출성을 높이기 위하여 chemiluminescent substrate⁹⁾를 사용하였다. 시험 세균이 자체적으로 가지고 있을 수 있는 alkaline phosphatase의 영향을 제거하기 위해 모든 시료를 100 ℃에서 5 분간 heating하여 사용하였다.

PVDF memberane을 100% methanol과 Tris-buffered saline (TBS, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5)으로 수화시킨 후 filtering unit (Millipore)에 장착하였다. 1 ml의 시료를 주사기로 통과시켜 세균들을 membrane에 부착시켰다. TBS solution 3 ml를 통과시켜 씻은 후 blocking solution(1% BSA solution in TBS) 1 ml을 통과시켰다. filtering unit로부터 membrane을 꺼내어 2 ml의

9 Fowler, S.J. 1995. pp. 115-127. In W.C. Davis (ed.) Monoclonal antibody protocols. Humana Press Inc., NJ.

blocking solution에 넣고 30분간 실온에서 진탕하면서 방치하였다. 2 ml의 wash solution (TTBS, 0.3% tween 20 in TBS)에 5분간 진탕 방치하여 씻은 다음, 1 ml의 E4G2 단클론항체용액(1/500 dilution in 1% BSA in TTBS)에 넣고 30분 동안 진탕하면서 방치하였다. 2 ml TTBS에 5분간 진탕 방치하여 씻기를 2회 반복한 다음, 1 ml의 anti-mouse IgG-AP conjugate 용액 (1/3000 dilution in 1% BSA in TTBS)에 30 분 동안 진탕 방치하였다. 위와 같이 씻기를 4회 반복한 다음 300ul의 chemiluminescent substrate solution (Bio-Rad)에 5분간 처리하였다. 발생되는 빛 신호는 Polaroid film 667(ASA3000)을 이용하는 chemiluminescent detection unit (Camlight 501)로 검출하였다.

한편 membrane assay의 소요 시간을 단축시키고 검출한계를 낮추기 위한 시도로 단클론항체 E4G2을 alkaline phosphatase에 직접 결합시킨(세부과제 2) E4G2-AP conjugate를 이용하는 방법을 시도하였다. 이 방법에서는 E4G2를 단독으로 처리하는 단계가 삭제되는 것을 제외한 나머지 실험은 똑같이 실시하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. Preparation of antigen

mouse와 rabbit의 접종 항원과 검출법의 표준세포로 이용한 *V. vulnificus* 27562의 세균수 측정에는 viable count와 602 nm에서의 흡광도를 이용하였다. Viable count와 turbidity와의 관계는 Figure 3과 같았다.

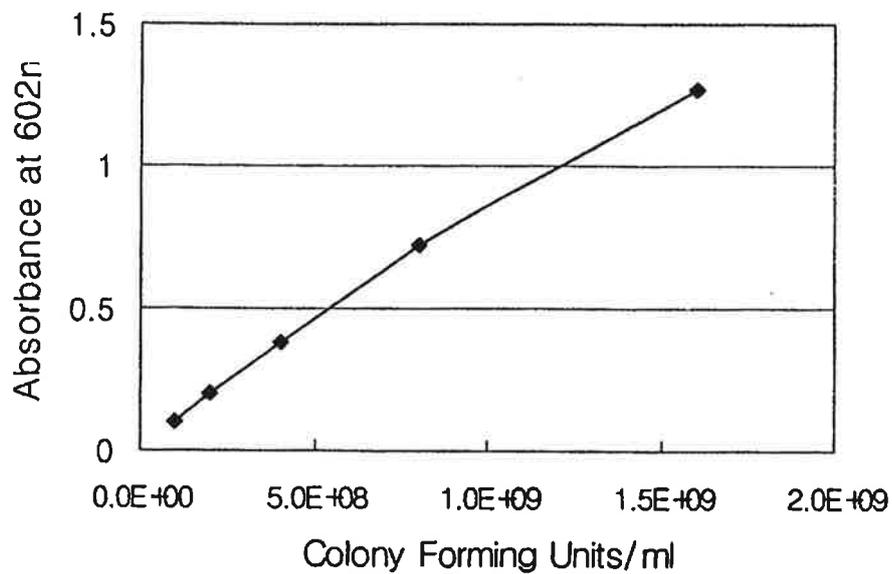


Figure 3. Turbidity and Viable Count

2. Preparation of monoclonal antibodies

세포융합 후 hybridoma cell의 성장을 촉진하기 위하여 feeder cell로서 mouse의 peritoneal cells과 thymus cells, 그리고 hybridoma cloning supplement의 효과를 시험한 결과는 Figure 4와 같다. Colony 형성율은 peritoneal cell의 경우 87.5%, thymus cell의 경우 83.8%, 그리고 hybridoma cloning supplement의 경우 86.9%이었다. 시험한 세가지 경우에 뚜렷한 차이가 없었기 때문에, 이 후의 실험에는 오염의 우려가 있는 feeder cell 대신 hybridoma cloning supplement를 사용하였다.

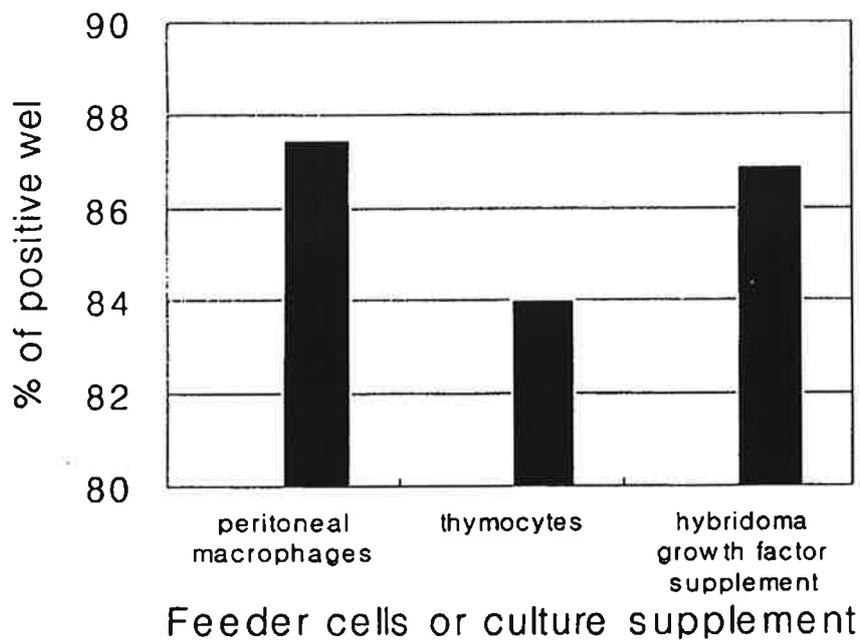


Figure 4. Effects of feeder cell and supplements on hybridoma growth

기타 단클론항체를 생성에 영향을 미치는 여러 요인들을 조정하여 단클론항체의 생산과정을 최적화하였다(Figure 5).

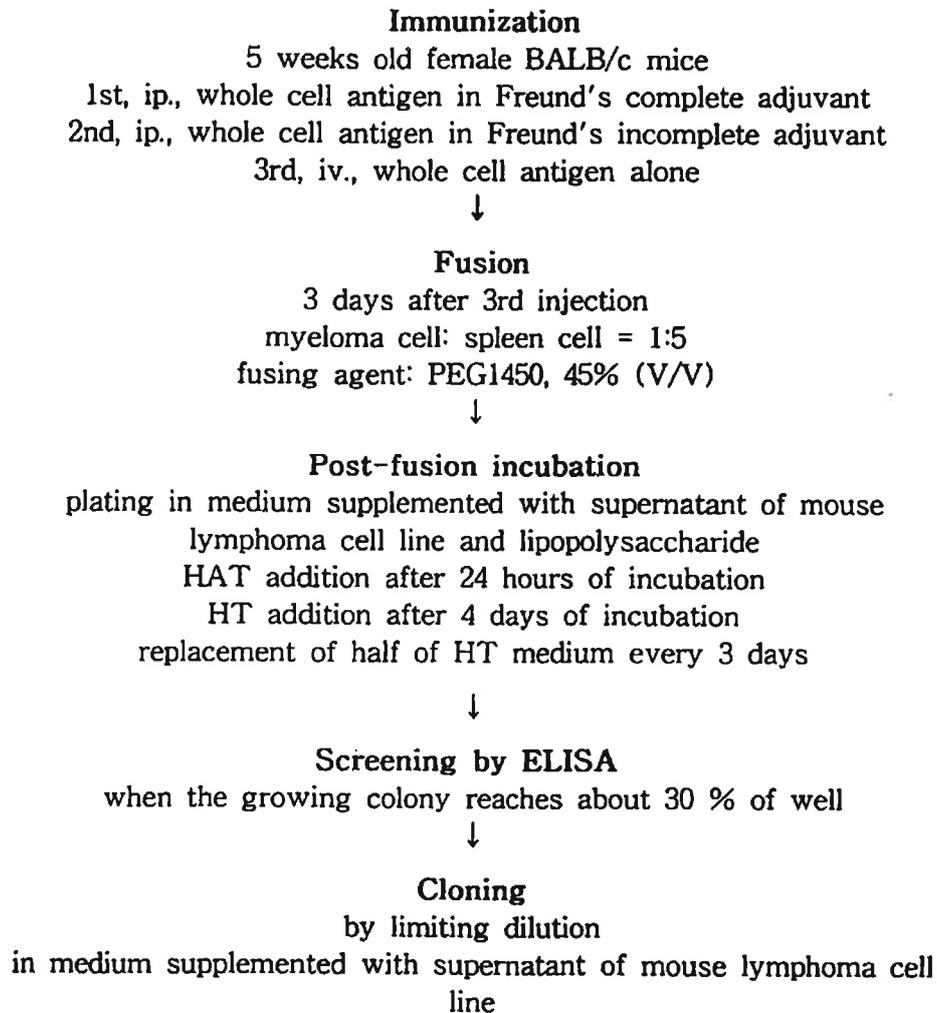


Figure 5. Procedure for the production of monoclonal antibodies to *V. vulnificus*

cloning 과정을 거쳐(Figure 6) 최종적으로 *V. vulnificus*에 대한 단클론항체를 분비하는 27 개의 hybridoma cell lines을 확립하여 액체질소탱크에 보관하면서 실험에 사용하였다.



Figure 6. Photomicrograph of hybridoma cells in cloning process

3. Isotypes of monoclonal antibodies

ELISA로 측정하고 gel diffusion method로 재확인한 단클론항체들의 isotype은 IgG가 13종, IgM이 14종이었다(Table 2).

Table 2. Isotypes of monoclonal antibodies

Antibody name	Isotype	
	Heavy chain	Light chain
P3A3	IgG1	Kappa
A11C8	IgG1	Kappa
G9G10	IgG1	Kappa
A5E5	IgG2a	Kappa
A2D10	IgG2b	Lambda
A4E1	IgG2b	Lambda
D11D11	IgG2b	Lambda
E4G2	IgG2b	Kappa
A10A8	IgG2b	Kappa
D4G10	IgG2b	Kappa
H6A2	IgG2b	Kappa
H11H6	IgG2b	Kappa
3T2E6	IgG2b	Kappa
H3H5	IgM	Lambda
T1E5	IgM	Lambda
3T1C4	IgM	Lambda
3T2D1	IgM	Lambda
H1C10	IgM	Lambda
H1G3	IgM	Lambda
H3F10	IgM	Lambda
3T3B5	IgM	Lambda
H3E1	IgM	Lambda
P2F1	IgM	Lambda
T2B5	IgM	Lambda
H3G7	IgM	Lambda
T2C3	IgM	Lambda
T1E4	IgM	Lambda

4. Reactivities of monoclonal antibodies to *Vibrio* species

확립된 세포주들이 분비하는 단일클론항체들의 *V. vulnificus*와 다른 세균 종들에 대한 반응성을 ELISA로 측정하였다(Table 6). 시험한 27종의 항체들 중에서 24 항체가 immunogen으로 사용한 *V. vulnificus*에 대해서 제일 높은 반응성을 보였다. *V. parahaemolyticus*는 3가지 항체에 대해서는 제일 큰 반응성을 나타내었으며, 나머지 항체들 중에서 많은 경우(67%)에 *V. vulnificus* 다음 가는 반응성을 보여, *V. vulnificus*와 *V. parahaemolyticus* 사이에는 상당한 항원성이 공유되고 있는 것으로 생각된다.

27종의 단일클론항체들 중에서 *V. vulnificus*에 대한 반응성이 높고 나머지 세균들에 대한 (교차)반응성이 낮은 8종의 항체를 선정하고 대량 생성하였다.

항체 D4G10는 시험한 5종의 *Vibrio* 속 세균들 모두에 대해 높은 반응성을 보여, *Vibrio* 속의 공통 epitope에 반응하는 항체인 것으로 생각된다. 따라서 이 항체는 *Vibrio* 속의 검출법에 활용될 수 있으리라 판단된다.

Table 3. Reactivities of monoclonal antibodies to *Vibrio* species

Ab name	reaction to				
	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. carchariae</i>	<i>V. furnisii</i>
P3A3	61	38	4.5	14.5	8.5
A11C8	191	141	60	36.5	15
G9G10	765	55.5	37.5	43	17
A5E5	1345	11.5	1.5	31.5	0.5
A2D10	2306	71	19	57.5	32
A10A8	2152	95	55	52.5	24.5
D4G10	2018	727	455.5	244.5	575
H6A2	714	20	12.5	17.5	6
H11H6	1107	796.5	602.5	61	157.5
3T2E6	121	46	1	16	7
H3H5	532	228.5	49.5	116	99
T1E5	191	67	13	49.5	31
3T1C4	173.5	490.5	68.5	314	142
3T2D1	139.5	23.5	7	27	16.5
H1C10	155.5	69	37	75.5	38
H1G3	348	190	30	139	57
H3F10	60.5	12	3	13.5	1.5
3T3B5	217.5	15.5	8	29.5	11
H3E1	294.5	88.5	16.5	69.5	34
P2F1	333	630	86	297.5	120.5
T2B5	254.5	125	37	119.5	81
H3G7	228	623	295	522	330
T2C3	911.5	611	138	387	297
T1E4	112.5	54	4.5	38	17.5
A4E1	742.5	33.5	8.5	2.5	14
E4G2	995.5	42	25.5	2	23
D11D1	727.5	193	218	105	232.5

5. Ascites production

*V. vulnificus*에 대한 반응성이 높고 다른 세균 종들에 대한 교차 반응성이 낮아 검출법의 개발에 활용할 수 있으리라 생각되는 단클론항체를 분비하는 cell line들을 BALB/c mice의 복강에 주사하여 ascites를 만들었다. 만들어진 ascites fluid의 항체역가를 측정하여 (Table 4) 역가가 가장 높은 E4G2 항체를 포함하는 ascites로부터 단클론항체를 정제하였다.

Table 4. Properties of ascites preparations

ascites	volume (ml)	[Ab] ¹ , units/ml	total Ab, units	isotype
P3A3	4.2	23.1	97	IgG1, kappa
T1E4	11.4	>3200	>36000	IgM, lambda
T1E5	22.4	484	10800	IgM, lambda
3T3B5	23.2	237	5500	IgM, lambda
3T2E6	10.7	18	192	IgG2b, kappa
H1G3	27.8	458	13000	IgM, lambda
A4E1	7	82000	570000	IgG2b, lambda
E4G2	18	56000	1008000	IgG2b, lambda

¹ Ab titer of immune mouse sera was assumed to be 10,000 units/ml.

6. Microplate assay

*V. vulnificus*를 특이적으로 검출할 수 있는 단순하고 민감한 방법을 개발하기 위하여 E4G2 단클론항체를 이용하는 sandwich ELISA 방법에 사용되는 각 성분들의 최적 농도를 결정하였다.

Capture antibody로는 rabbit anti-*V. vulnificus* polyclonal antibody를 사용하였는데, 여러 농도로 희석하여 시험한 결과, 10,000 배 희석 이하에서 signal이 포화되었기 때문에 capture antibody는 10,000 배 희석하여 사용하였다(Figure 10).

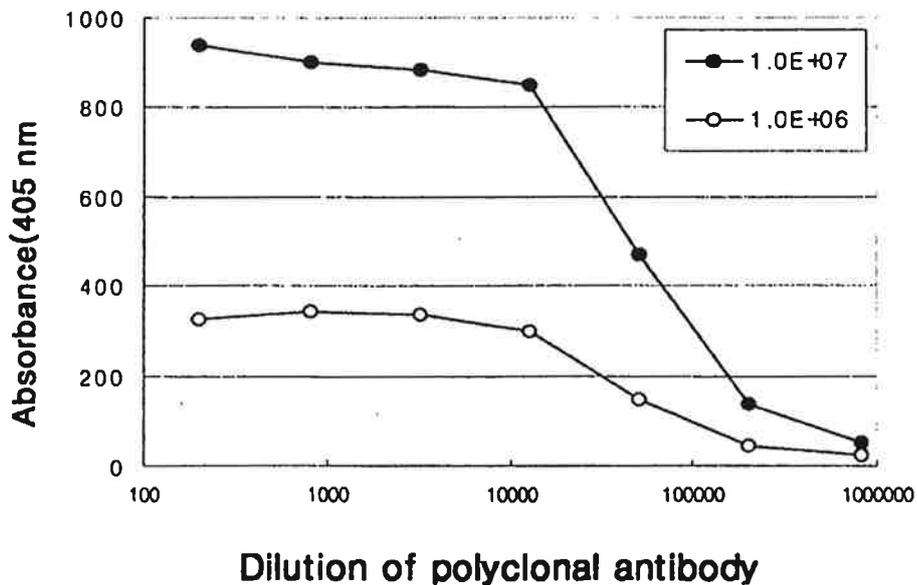


Figure 7. Determination of coating concentration in microplate assay

Detector antibody인 E4G2의 여러 농도를 시험한 결과, 3,000 배 희석에서 signal이 최대이었기 때문에, detector antibody는 3,000 배 희석하여 사용하였다(Figure 8).

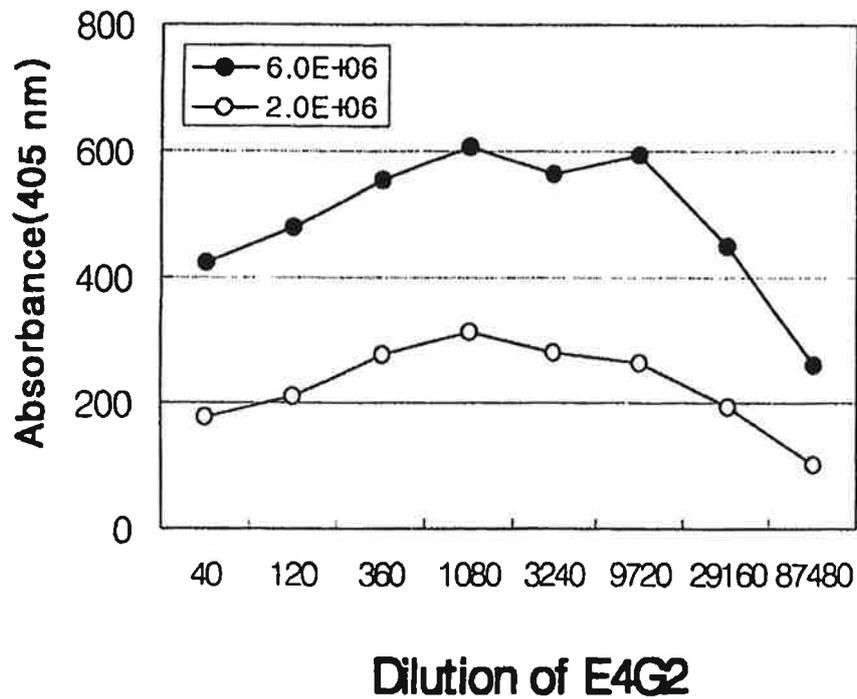


Figure 8. Determination of E4G2 concentration in microplate assay.

Developer antibody로 사용한 goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase의 여러 농도를 시험한 결과, 1,600 배 희석 이하에서 signal이 포화되었기 때문에, developer antibody는 1,600 배 희석하여 사용하였다(Figure 9).

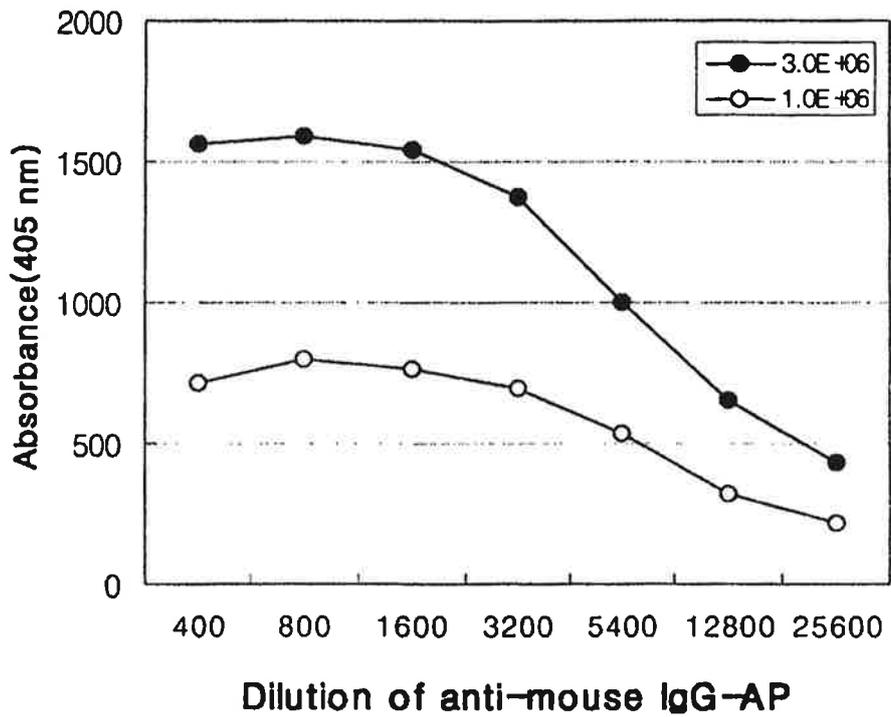


Figure 9. Determination of anti-mouse IgG-AP in microplate assay.

이상에서 확립된 최적조건들을 사용하는 sandwich ELISA의 검출 한계와 범위를 시험하였다. microplate well 당 세포 수 10^4 에서부터 10^7 까지 linear signal이 나타났다(Figure 10). 즉 검출 한계는 10^4 세포이고 최대 정량 한계는 10^7 세포이었다.

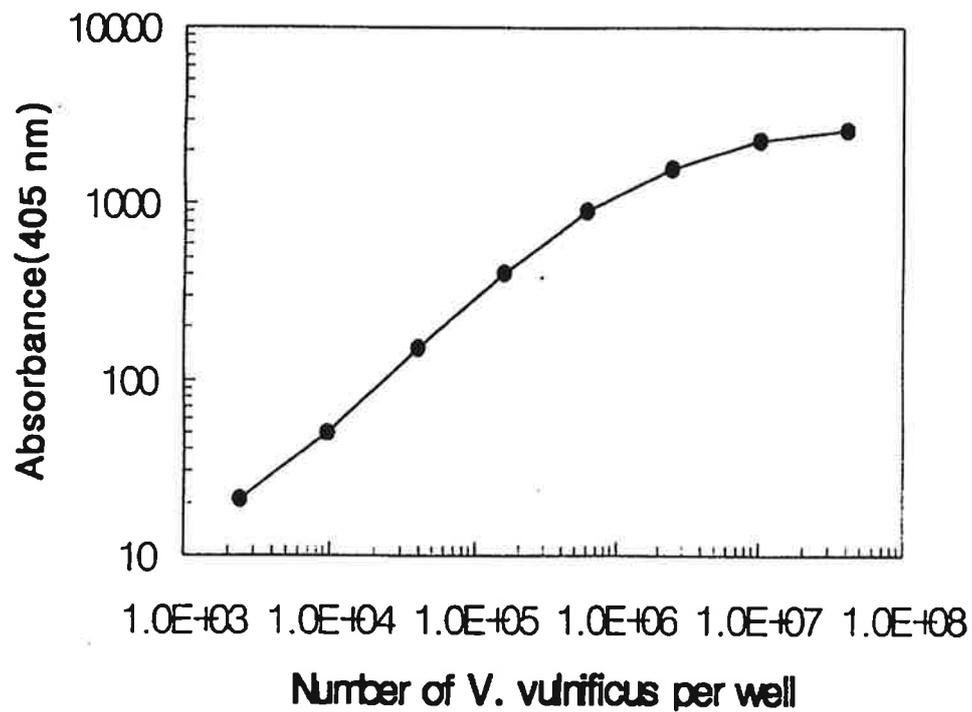


Figure 10. Detection range of microplate assay.

이 검출법의 다른 여러 세균종들에 대한 교차반응성을 시험하였다. 그 결과 시험한 5종의 *Vibrio* species는 모두 3% 미만의 교차반응을 나타내었고, 다른 속에 속하는 9종의 세균들은 1% 미만으로 반응성이 극히 미미하였다(Figure 11). 이 결과에서 단일클론항체 E4G2가 인식하는 항원 epitope는 *V. vulnificus*에만 거의 독점적으로 존재하는 것으로 생각된다.

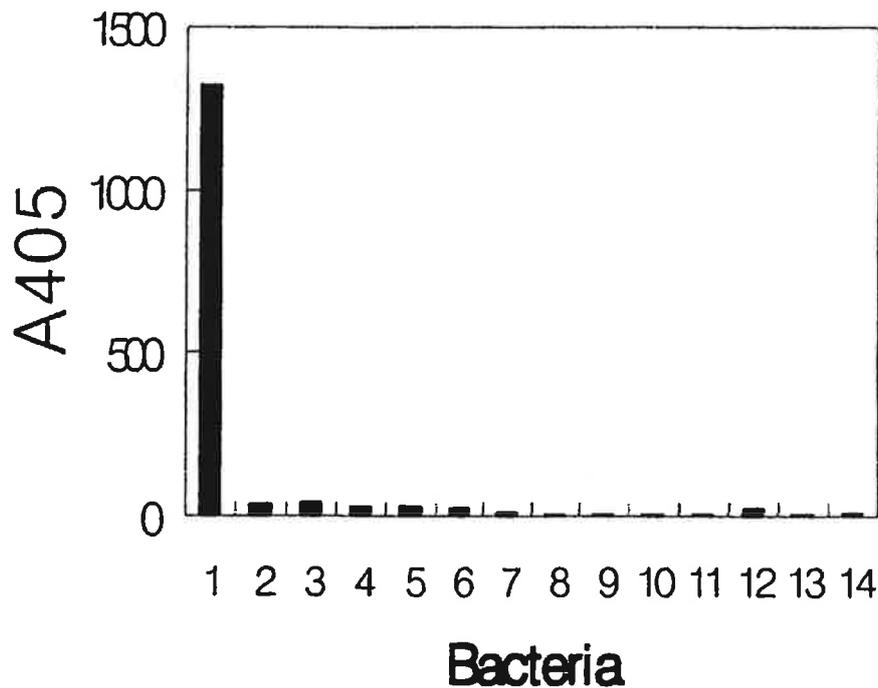


Figure 11. Reactivity of bacterial strains in microplate assay
 1, *V. vulnificus* ATCC 27562; 2-6, other *Vibrio* species; 7-14,
 non-*Vibrio* species

7. membrane assay

membrane assay에서는 검출한계를 개선하기 위해서 chemiluminescent substrate를 사용하였다. 이 검출법에서는 극히 소량의 alkaline phosphatase에도 반응할 수 있는 chemiluminescent substrate를 사용했기 때문에 시험하는 세균 세포들에 존재할 수 있는 alkaline phosphatase의 활성을 없애기 위하여 모든 시험 세균들을 100 °C에서 5분간 처리한 다음 실험하였다. 먼저 가열에 의해 E4G2에 대한 *V. vulnificus* 항원 epitope의 열에 대한 변성 여부를 시험하였다. 열 처리를 한 *V. vulnificus* 세포와 열 처리하지 않은 세포의 E4G2에 대한 반응성을 microplate assay로 분석한 결과, 반응성에 차이가 없었다(Figure 12). 따라서 membrane assay에서 세균세포가 자체적으로 가지고 있는 alkaline phosphatase에 의한 false positive reaction의 가능성을 제거할 수 있었다.

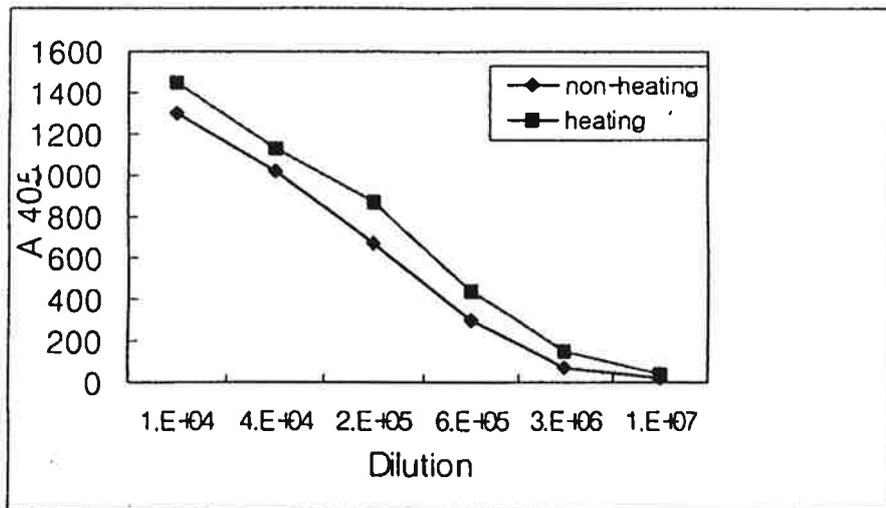


Figure 12. Effect of antigen heating.

이 검출법의 *V. vulnificus*에 대한 검출한계와 검출 범위를 시험하였다. E4G2-AP conjugate를 사용했을 경우와 E4G2 항체와 AP conjugate를 별도로 사용했을 경우 모두 10^3 세포까지(Figure 13, 14) 검출이 가능하며, microplate assay의 검출한계(10^4 세포)보다 10 배 민감한 결과를 얻었다. 하지만 10^4 세포 이상에서는 signal의 뚜렷한 차이를 확인할 수 있었기 때문에 정량적인 분석에는 적합하지 않았다. 따라서 이 검출법은 10^3 이상의 *V. vulnificus* 세포를 확인하는 정성적인 방법으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

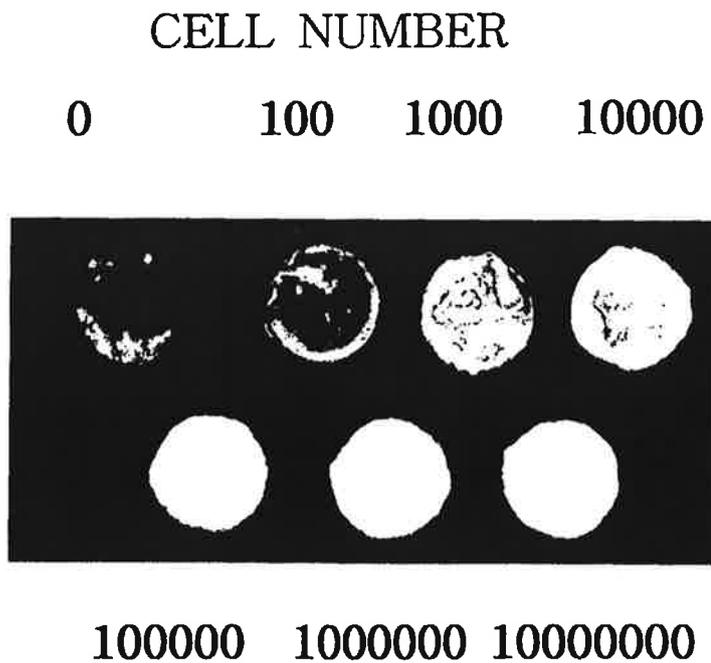


Figure 13. Detection limit of membrane assay using E4G2-AP conjugate.

CELL NUMBER

CELL 0 10 100 1000



10000

10000*

10000**

Figure 14. Detection limit of membrane assay using E4G2 and goat anti-mouse IgG-AP conjugate.

*10000 cells of *V. parahaemolyticus*, **10000 cells of *V. fluvialis*

Vibrio 속의 5종 세균들(10^6 세포)에 대한 교차반응성을 시험한 결과 교차반응성이 나타나지 않았다(Figure 15).

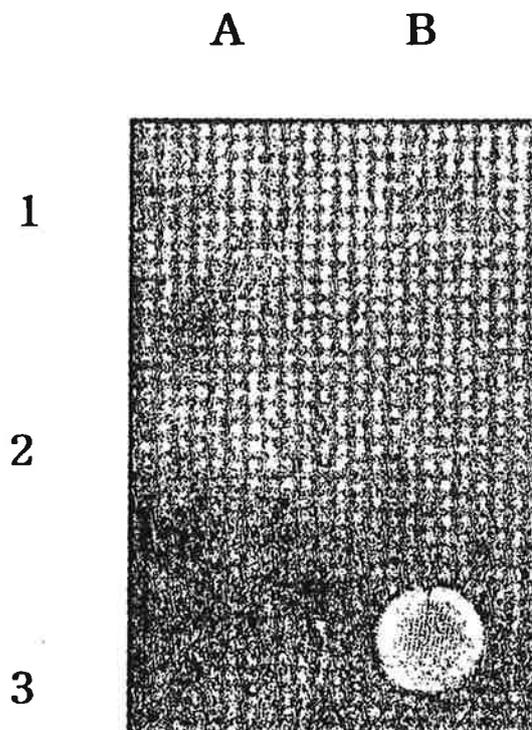


Figure 15. Reactivity of *Vibrio* species in membrane assay.
 A1, *V. carchariae*; A2, *V. parahemolyticus*; A3, *V. fluvialis*; B1, *V. alginolyticus*; B2, *V. furnissii*; B3, *V. vulnificus*

개발된 검출법들의 특징을 요약해 보면 다음과 같다.

Table 5. Summary of developed methods.

METHOD		TIME (HOURS)	DETECTION LIMIT (CELLS)
MICROPLATE ASSAY		3.0	10^4
MEMBRANE ASSAY	FORMAT 1	2.5	10^3
	FORMAT 2	2	10^3

제4절 결론

I. 2가지 검출법이 개발되었다.

- microplate assay는 정량 분석법으로 활용될 수 있다.
- membrane assays는 정성 분석법으로 활용될 수 있다.

II. 개발된 방법들은 단순하다.

- 2 - 3 시간 내에 완료될 수 있다.
- 고가의 실험 장비가 필요하지 않다.
- 숙련된 인력이 필요하지 않다.

III. 개발된 방법들은 특이성이 높다.

- 전체 8 종의 non-Vibrio strain들은 전혀 반응성이 없었다.
- 전체 5 종의 *V. vulnificus* 이외의 *Vibrio* strain들은 거의 반응성을 보이지 않았다.

IV. 개발된 방법들은 민감하다.

- microplate assay의 검출한계는 10000 세포이다.
- membrane assay의 검출한계는 1000 세포이다.

제 3 장 항체의 정제 및 가공

제1절 서 론

항체를 enzyme-linked immunoassay에 이용하기 위해서는 혈청, culture supernatant 혹은 ascites fluid로부터 항체를 분리하여 순도가 높은 시약으로 만드는 것이 필요한 경우가 많다. 특히 특이성이 높고 민감한 검출법을 개발하기 위해서는 이 과정이 필수적이라고 생각된다. *V. vulnificus*의 검출법을 개발하는 본 연구에서는 capture antibody로 사용할 다클론항체와 detector antibody로 사용할 단클론항체의 순도를 높이기 위해 이들을 정제하였다. 한편 membrane assay의 실험 단계를 줄이기 위해 정제된 단클론항체를 alkaline phosphatase에 결합시켜 실험에 사용하였다.

제2절 재료 및 방법

1. Purification of polyclonal antibodies

세부과제 1에서 준비된 토끼의 면역혈청에 100% ammonium sulfate 용액을 첨가하여 45% 포화시킨 다음, 4 °C에서 12 시간 방치하였다. 10000 x g 에서 15 분간 원심분리하여 침전물을 모으고 PBS에 녹인 다음 원심분리하여 불용성 물질들을 제거하였다. 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6에 투석한 다음 DEAE-Sephacel ion exchange column (3.0 x 6 cm)에 처리하였다. wash buffer로는 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6을 사용하였으며, column에 부착된 항체는 linear NaCl gradient (0-0.5 M)을 사용하여 유출시켰다. flow

rate는 분당 2 ml이었으며, 각 분획의 280 nm에서의 흡광도와 항체 역가를 측정하였다. 항체역가를 측정하는 ELISA에서는 developer antibody로서 goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase(Sigma A-3811)를 사용하였다.

2. Purification of monoclonal antibody

세부과제 1에서 생성한 E4G2 ascites fluid에 60 mM sodium acetate buffer, pH4.0를 1:2의 비율로 첨가하고, 0.1 M HCl을 사용하여 pH 4.8로 조정하였다. 교반하면서 caprylic acid를 0.3%가 되게 천천히 넣어준 다음, 상온에서 30 분간 교반하면서 방치하였다¹⁰⁾. 10000 x g로 30분간 원심분리하여 상등액을 모으고 PBS에 투석한 다음 ammonium sulfate 용액을 첨가하여 50% 포화하였다. 상온에서 30 분간 천천히 교반해 준 다음 10000 x g 에서 15 분간 원심분리하여 침전을 모았다. 소량의 PBS에 녹인 후 PBS로 투석하였다.

3. SDS-PAGE

항체의 정제과정 동안에 분리 정도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Bio-Rad 사의 minigel apparatus를 사용하였다. 10.5% seperating gel과 7% stacking gel을 사용하였으며, 120 V에서 60 분 동안 전개시켰다. Coomassie brilliant blue R-250 으로 염색하여 관찰하였다.

4. Preparation of E4G2-AP conjugate

단클론항체 E4G2와 alkaline phosphatase(Sigma P0905)를 1:3의

10 Harloe, E. and D. Lane, 1988, p. 300. In Antibodies a laboratory manual Cold spring Harbor Laboratory, NY.

비율로 섞은 다음 25% glutaraldehyde를 0.2%가 되게 첨가하고 실온에서 2시간 동안 방치하였다¹¹⁾. 100 mM lysine과 100 mM ethanolamine을 함유한 PBS를 첨가하여 반응을 중지시킨 후, Sephadex G-25 column에 통과시켜 desalting하였다. 0.5% BSA, 0.05% NaN₃, 2.5 mM MgCl₂를 함유한 PBS와 1:2의 비율로 섞은 다음 4 ℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

11 Harloe, E. and D. Lane. 1988. p. 349. In *Antibodies a laboratory manual* Cold spring Harbor Laboratory. NY.

제3절 결과 및 고찰

1. Purification of polyclonal antibodies

anti-*V. vulnificus* polyclonal antibody를 함유한 토끼의 면역혈청으로부터 항체를 분리하는 과정 중, DEAE-Sephacel을 이용한 ion exchange chromatography의 결과는 Figure 16과 같다. 항체는 NaCl gradient 0.2 M 부분에서 유출되었다. 이중 활성이 높은 7 분획을 모아, -20 °C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

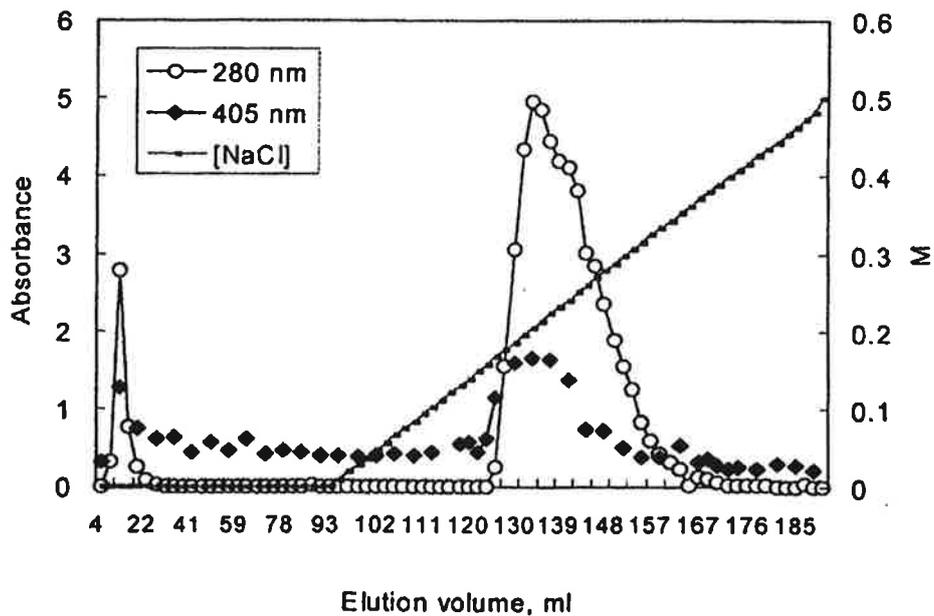


Figure 16. DEAE-Sephacel chromatography of polyclonal antibodies.

2. Purification of monoclonal antibody

ascites fluid로부터 caprylic acid와 ammonium sulfate를 처리하여 E4G2 단클론항체를 분리한 결과는 Table 6과 같다. 이 분리법의 최종 수율은 91%이었으며, ascites 11 ml로부터 1520000 units의 항체를 분리하였다. 분리 과정 중 시료의 정제 정도는 SDS-PAGE로 측정하였는데, 분자량이 60,000 정도로 나타나는 albumin이 caprylic acid 처리에 의해서 아주 효과적으로 제거됨을 알 수 있었으며, 정제된 E4G2의 heavy chain의 분자량은 50,000이었고 light chain의 분자량은 29,000 이하였다(Figure 17).

Table 6. Summary of E4G2 purification

Purification step	Volume, ml	[Ab], units/ml	Total Ab, units	Yield, %
Ascites	11	152000	1672000	100
Caprylic acid treatment	34	46000	1564000	94
Ammonium sulfate precipitation	4	380000	1520000	91

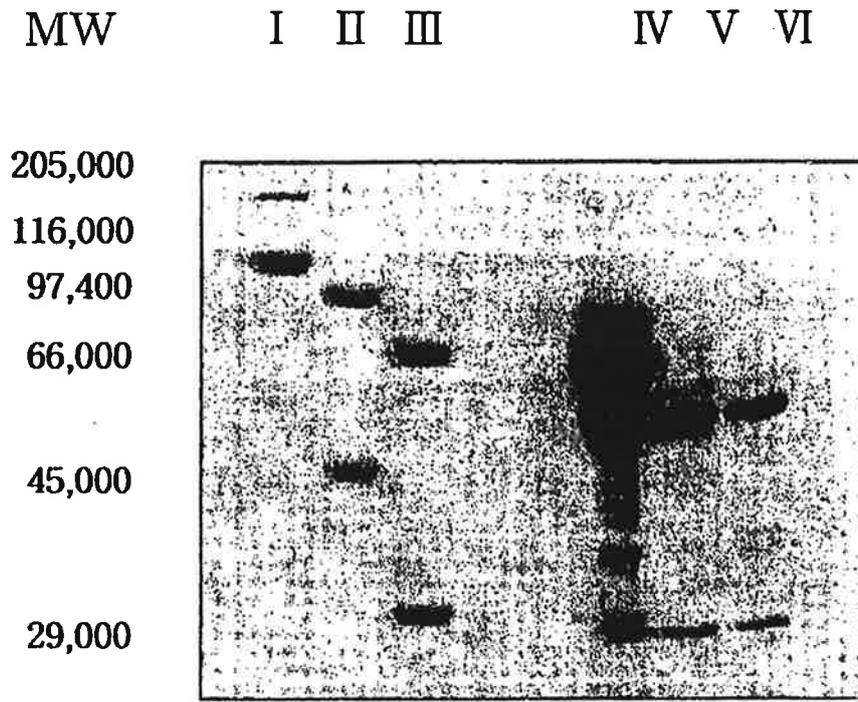


Figure 17. SDS-PAGE of E4G2 preparations.

I, II, III: Molecular weight standards

IV: Acites fluid

V: Caprylate treated sample

VI: Purified antibody

제 4 장 환경 및 임상시료의 분석

제1절 서 론

본 연구에서 개발된 *V. vulnificus*에 대한 검출법을 실제의 환경 시료와 임상시료에 적용할 수 있는지를 검정해 보았다. 환경 시료로는 해수, 해수에서 분리한 환경 균주, 및 바지락을 시험하였으며, 임상 시료로는 환자로부터 분리한 임상균주와 환자의 혈청을 사용하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 해수의 채집 및 분석

해수는 남해안 여천군의 한 지점과 서해안 금강 하구의 한 지점 으로부터 5월 초순부터 8월 하순에 걸쳐 2주 간격으로 채집하였다. 채집된 해수들은 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

-20℃에 보관한 해수는 실험 시점에 해동하여 microplate assaay (세부과제 1 참조)로 분석하였다.

2. 환경 균주의 분리

해수로부터 환경균주의 분리는 VVE agar, CSPP agar, OLDS broth, 및 NA 등의 배지를 이용한 세균 배양법과 몇 가지 생화학적 시험을 통하여 분리하였다(Figure 18).

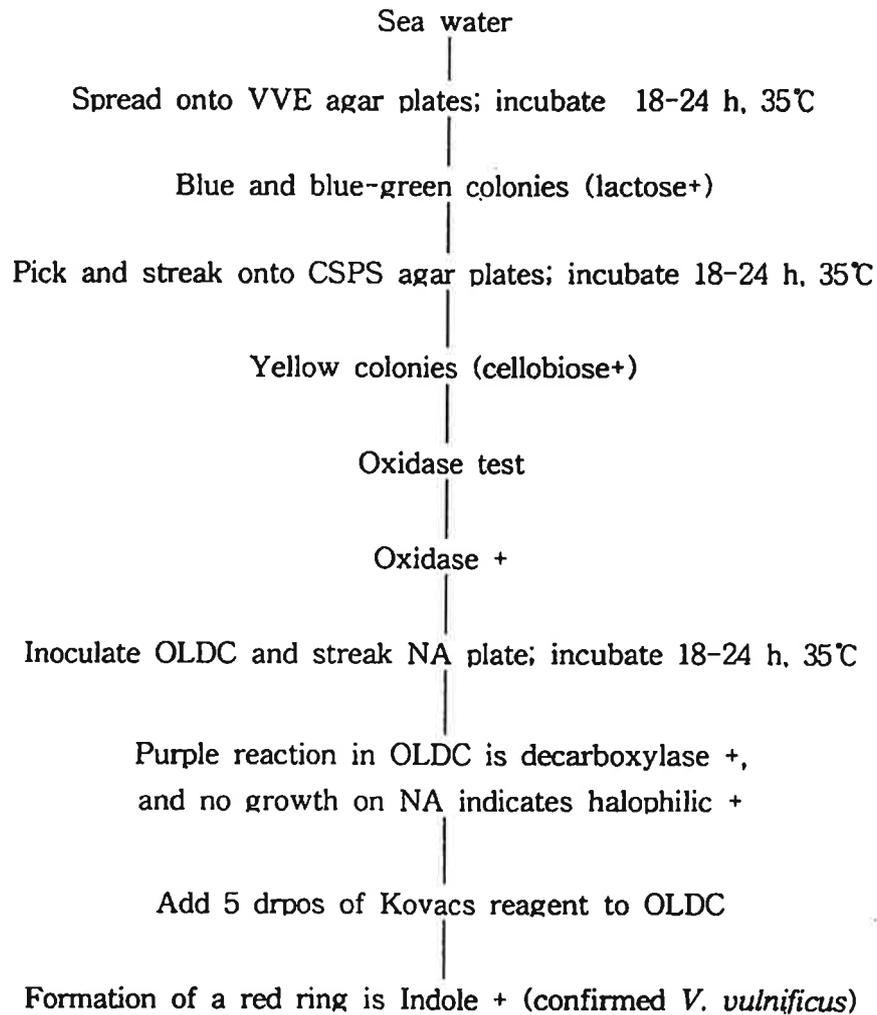


Figure 18. Procedure for the isolation of *V. vulnificus* from seawater¹²⁾

12 Miceli, G.A., W.D. Watkins, and S.R. Rippey, 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59:3519

3. 환경 균주의 반응성

앞의 방법으로 분리된 환경균주들을 microplate assay에 적용하여 환경균주의 반응성을 조사하였다. 실험에 사용한 세균 수는 10^5 cell 이었다.

4. 해산물 시료의 분석

해산물 시료로는 바지락을 시험하였다. 바지락은 시내의 해산물 가게에서 구입하였다. 껍질을 제거한 10 g의 바지락에 여러 농도의 *V. vulnificus* ATCC 27562 세균 용액 10 ml를 첨가하고 4℃에 24시간 방치하였다. 방치 후 혼합액을 mixer로 분쇄한 다음 PBS에 현탁하여 100 ml로 만들고 4℃에 2시간 동안 교반하면서 방치하였다. 1000 x g로 15분간 원심분리하여 불용성 고체를 제거하고, 상등액에 존재하는 *V. vulnificus*의 양을 microplate assay로 측정하였다.

5. 임상 균주의 반응성

원광대학교 의과대학의 박석돈 박사로부터 비브리오패혈증 환자에서 분리한 임상균주 10 종을 분양받았다. microplate assay에서의 이 균주들의 반응성을 *V. vulnificus* ATCC 27562와 비교 분석하였다.

6. 환자 혈청의 분석

1997년 7월에 발생한 비브리오패혈증 환자의 혈청을 원광대학교 의과대학의 박석돈 박사로부터 얻었다. 이 환자 혈청에 존재하는 *V. vulnificus* 세균 수를 microplate assay로 측정하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 해수 분석

5월부터 8월 사이의 해수 시료들에 존재하는 *V. vulnificus* 세균을 조사한 결과는 Figure 19와 같다. 남해안과 서해안 두곳의 시료들 중에서 7월 중에 수집된 시료 하나씩에서 이 세균을 확인할 수 있었다. 나머지 시료들은 검출 한계에 미치지 못해서 세균의 존재 유무를 확인할 수 없었다.

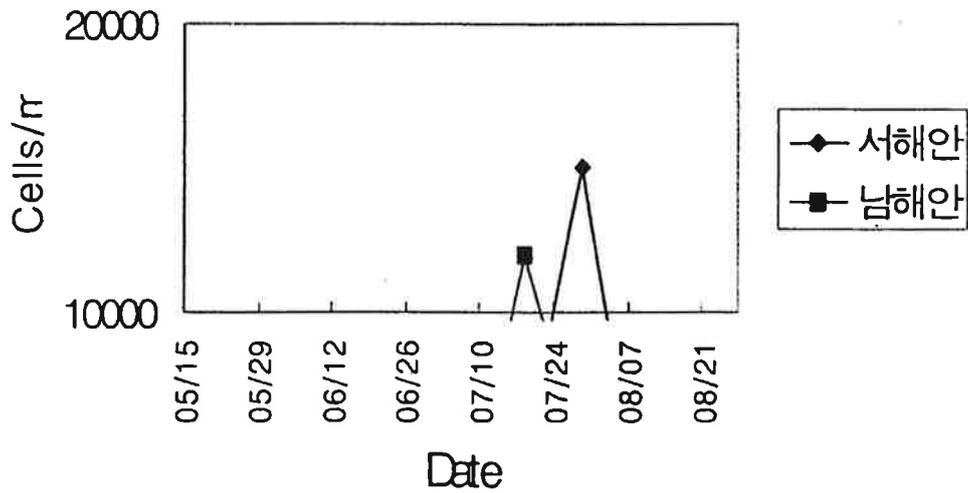


Figure 19. Analysis of seawater samples

2. 환경 균주의 반응성

해수에서 모두 5 종의 *V. vulnificus* strain들을 분리하였다(Figure 20).

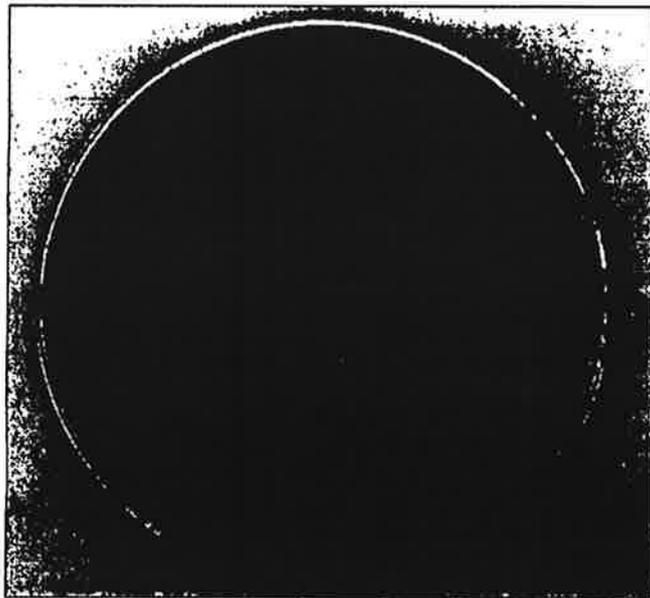


Figure 20. Growth of environmental strain on CSPA agar plate.
Yellow cells are cellobiose positive.

10⁵ 세포를 사용해서 이들의 반응성을 표준 균주인 *V. vulnificus* ATCC 27562와 비교한 결과는 Figure 21과 같다. 시험한 5종의 환경 균주들 중 3종은 13% 이상의 반응성을 보여 검출에 어려움이 없었으나, 2종은 5% 이하의 반응성을 나타내어 세균 수가 적을 경우에는 검출에 어려움이 따랐다. 이 결과는 환경 균주들 간에 표면 항원의 미세 구조에 차이가 있거나 항원 epitope의 밀도에 차이가 존재하기 때문으로 생각된다.

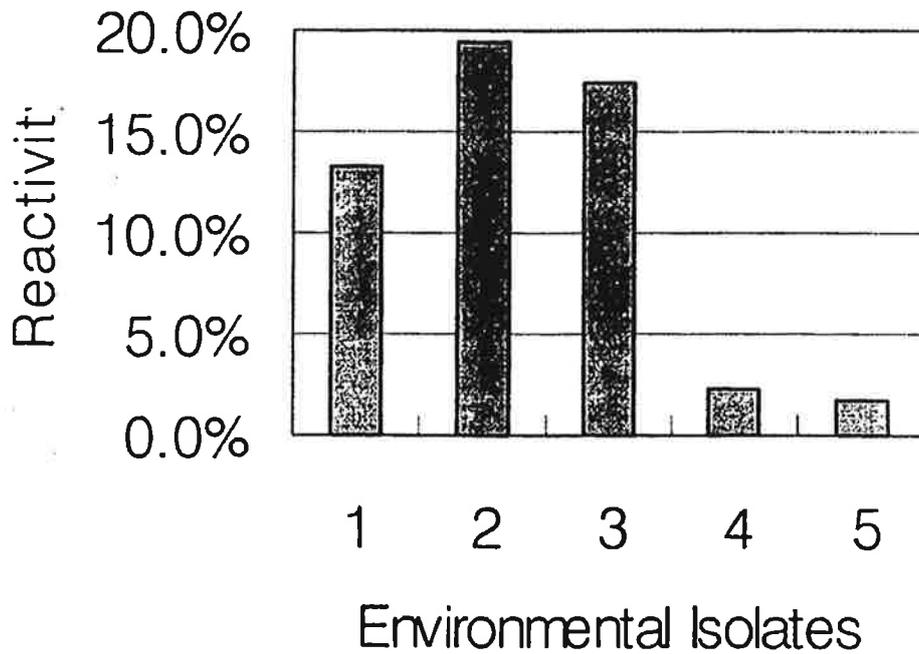


Figure 21. Reactivity of environmental strains

3. Analysis of seafood

해산물 중에 존재하는 *V. vulnificus* 세포를 검출하기 위해 바지락에 인위적으로 일정량의 세균을 첨가한 후 microplate assay로 분석한 결과는 Figure 22와 같다. 검출율이 55%이상을 나타내어 바지락 자체 성분에 의한 검출 저해 효과는 미미한 것으로 판단된다.

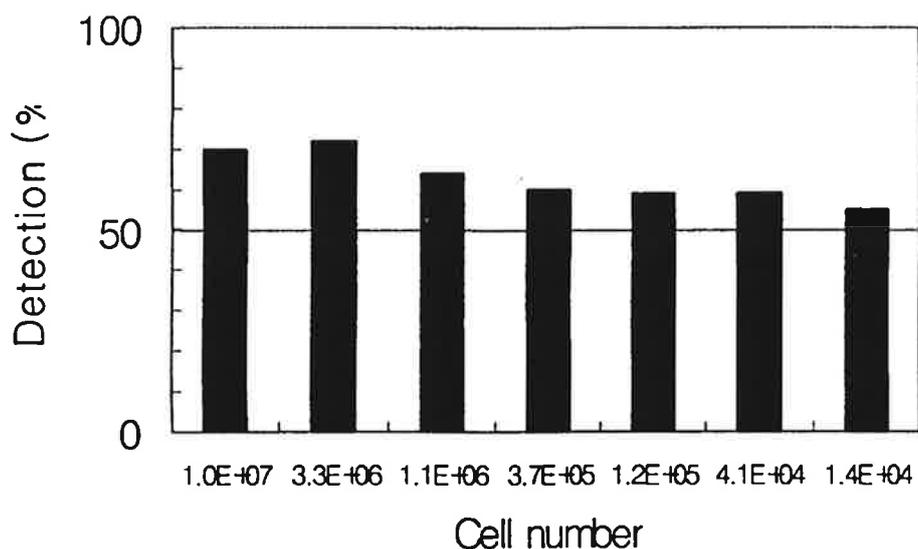


Figure 22. Detection of *V. vulnificus* cells in seafood.

Detection (%) = measured cell number/added cell number x 100.

4. 임상균주의 반응성

10⁵ 세포를 사용하여 10종의 임상균주의 microplate assay에서의 반응성을 *V. vulnificus* ATCC 27562와 비교한 결과 7종의 경우에는 10% 이상의 반응성을 보여 검출에 어려움이 없었다. 3종의 경우에는 5% 이하의 반응성을 나타내어, 세균 수가 적을 경우에는 검출에 어려움이 따랐다.

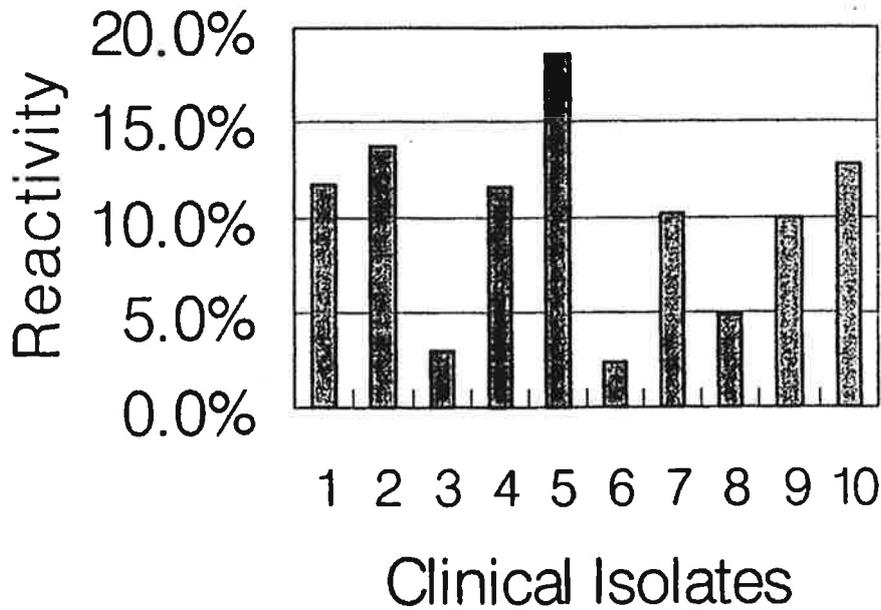


Figure 23. Reactivity of clinical isolates

5. Analysis of patient serum

환자 혈액에 존재하는 *V. vulnificus* 세균을 검출하기 전에 우선 혈액이 세균 검출을 방해하는 지를 조사하였다. PBS와 사람의 정상 혈청에 같은 양의 세균을 넣고 microplate assay에서의 반응을 비교한 결과 이들 사이에 유의한 차이가 없음을 알 수 있었다(Figure 24).

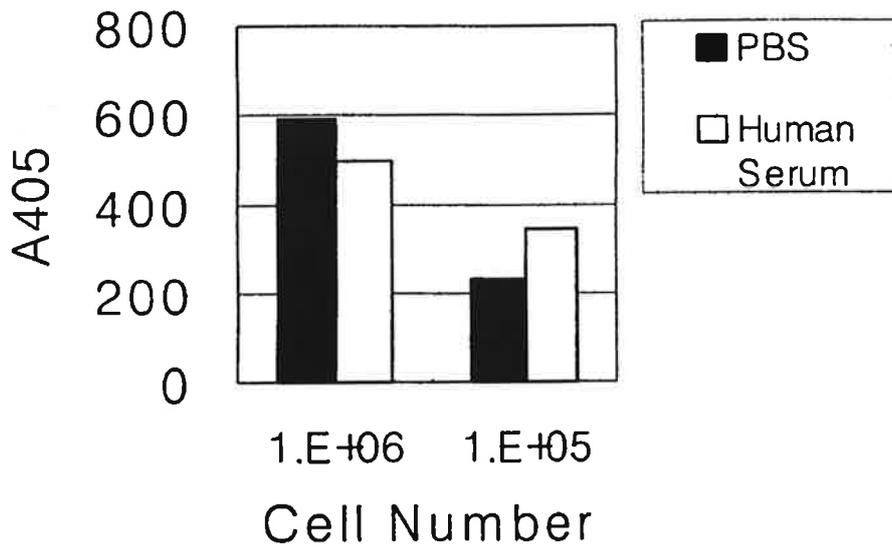


Figure 24. Effect of human serum on assay,

실제 비브리오패혈증 환자의 혈청을 microplate assay로 분석한 결과 5.0×10^6 cells/ml의 *V. vulnificus* 세균을 확인할 수 있었다 (Figure 25). 이 값은 10 회 측정치의 평균으로서 표준 편차는 4.9×10^5 이었다.

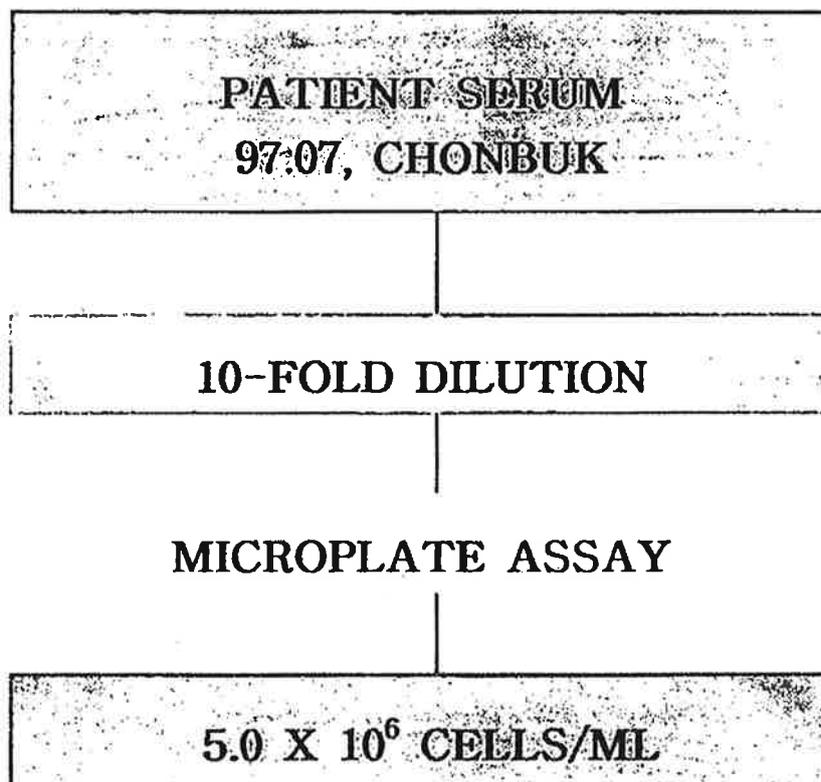


Figure 25. Enumeration of *V. vulnificus* in a patient serum

제 5 장 결 론

본 연구에서 개발한 *V. vulnificus* 검출법은 다음과 같이 요약될 수 있다.

I. 2가지 검출법이 개발되었다.

- microplate assay는 정량 분석법으로 활용될 수 있다.
- membrane assays는 정성 분석법으로 활용될 수 있다.

II. 개발된 방법들은 단순하다.

- 2 - 3 시간 내에 완료될 수 있다.
- 고가의 실험 장비가 필요하지 않다.
- 숙련된 인력이 필요하지 않다.

III. 개발된 방법들은 특이성이 높다.

- 전체 8 종의 non-*Vibrio* strain들은 전혀 반응성이 없었다.
- 전체 5 종의 *V. vulnificus* 이외의 *Vibrio* strain들은 거의 반응성을 보이지 않았다.

IV. 개발된 방법들은 민감하다.

- microplate assay의 검출한계는 10000 세포이다.
- membrane assay의 검출한계는 1000 세포이다.

V. 개발된 방법은 환경과 임상 시료들에 적용될 수 있다.

- 실제 환경시료와 임상시료에서 *V. vulnificus*를 검출하였다
- 높은 특이성으로 인해 일부의 임상 균주와 환경 균주의 경우에는 수효가 적을 경우 검출에 어려움이 있을 수 있다.