Kor. J. Food Hygiene 6(3, 4), 147-155(1991)

돼지에서 유래한 병원성 대장균의 내열성 장독소 생산유전자의 Cloning 및 발현

김교창 · 도대홍*

충북대학교 식품공학과, *충청전문대학 식품가공과

Molecular Cloning and Expression of Heat-stable Enterotoxin Gene from Swine Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Kyo-Chang Kim and Dae-Hong Do*

Department of Food Science and Technology, Chung Buk National University

**Department of Food Science and Technology, Chung-Cheong College*

ABSTRACT—**Enterotoxigenic *E. coli* is one of the major causative agents of the infantile diarrhea and traveler's diarrhea.**

The heat-stable enterotoxin(ST) is thought to be a virulence factor in the pathogenesis of the diarrhea and to be a maker for identification of the enterotoxingeic *E. coli* from non pathogenic *E. coli*.

The isolate of enterotoxigenic *E. coli* was isolated from swine during 1989 year(from 5 to 10 month) in the Kyong-gi and Chung-Cheong provinces, and three strains(KM-4, KM-7 and KM-12) was selected from 189 isolates of ST producing *E. coli*. The detection of a ST produced of the isolated *E. coli* was performed by the infant mouse assay(IMA). This study was designed to know optimal conditions for the production of the ST and the molecular properties of plasmids of the enterotoxigenic *E. coli*. Amount of ST produced were the most at initial pH 8.5~9.0 of succinate salts medium culture. The cultural time of the same medium was accumulated the highest level of ST was at the 14 to 16 hours, and then stationary phase was at the 20 hours. From this experiment the KM-7 strain was selected among ST producing strains by IMA. Partial plasmid-curing experiment was done to select plasmid encoding for ST among other plasmids and then comparing the plasmid pattern of ST producing strain(KM-7) with those of other ST non-producing strains, it is found that ST gene exists on the about 80 Kbp plasmid. Each fragment of this plasmid digested with EcoRI was ligated to vector pBR 322 and transformed into *E. coli* K-12. A clone producing ST(eKT 53) was selected by IMA. The EcoRI digestion pattern of the isolated plasmid(pKD 37) from the ST producing clone it is indicated that the size of the inserted fragment in eKT 53 strain is 16 Kbp. The cultured supernatant of eKT 53 strain was positive result of ST production in IMA.

Keyword□Heat-stable enterotoxin, Enterotoxigenic *E. coli*, Molecular cloning, Gene expression, eKT 53 plasmid

大腸菌은 腸內常住菌으로만 인식되어 오다가 1923년[1] 처음으로 新生兒泄瀉의 原因菌으로 인식되기 시작하였다. 그후 1945년[3,5] 영국의 London 병원에서 집단급식에 의한 집단설사를 유발시킨 原因菌이 특수한 血淸型을 가진 大腸菌에 의한 것으로 밝혀져 大腸菌이 설사를 유발시키는 原因菌임을 인식하게 되었다. 病原性 大腸菌은 腸內 설사유발원인에 따라

Received for publication 21 Oct. 1991
Reprint request; Dr. K.C. Kim at the above address

통상적으로 腸病原性(Enteropathogenic *E. coli*; EPEC), 腸毒素型(Enterotoxigenic *E. coli*; ETEC), 腸侵入性(Enteroinvasive *E. coli*; EIEC) 등으로 분류되어지며, 이들중 腸毒性大腸菌(ETEC)은 음료수와 음식물을 통한 감염 외에 사람과 직접적인 접촉 혹은 가축이나 사람 또는 보균자의 分泌物을 통하여도 쉽게 감염이 이루어진다.[19,22] 病原性은 腸毒素大腸菌이 생산하는 耐熱性腸毒素(heat-stable enterotoxin; ST) 또는 이열성장독소(heat-lable enterotoxin; LT)에 기인하며,[30] 腸毒素大腸菌에는 血清型이 다른 pilus가 있어 小腸内의 腸粘膜에 부착하여 증식하면서 腸毒素를 분비하여 가축과 사람에게 설사를 유발시킨다.[7,9,19] Pilus 抗原性은 K88, K99, F41, CFA(Colonization Factor Antigen) I, II 등을 갖고 있다.[8,17,18] 腸毒素大腸菌은 LT와 ST중에서 하나 또는 둘을 생산하며[1,14,18] 腸毒素중 LT는 小腸内 表皮細胞의 adenylate cyclase-cyclic AMP를 활성화시켜 설사를 일으키고 높은 免疫性이 있지만[14,18] ST는 小腸内 表皮細胞 guanylate cyclase-cyclic GMP를 활성화시켜 설사를 유발시키며[8,17] 免疫性이 낮아 ST단독으로는 抗體를 얻기 어렵다.[4,14,16] 설사환자나 동물의 診斷에 있어서 非病原性大腸菌과 생화학적 성상이나 血清型이 구별되지 않아 ST측정법은 생물학적 방법인 토끼, 개, 돼지 등을 이용하는 ligated loop法[4,12]과 젖먹이 생쥐 검사법(IMA)[10,21] 또는 培養細胞 실험 등을 이용하고 있다.[23,26] 그러나 이들 실험은 시간과 노력이 요구되므로 간편하고 신뢰성있는 방법의 개발이 요구되고 있다.

따라서 본 실험의 목적은 腸毒性泄瀉를 유발하는 腸毒性大腸菌을 경기, 충청지역의 설사돈에서 분리하고 ST생산능력이 우수한 선발균주의 배양상특성과 ST생산유전자의 성질을 조사하기 위하여 *E. coli* K-12균주에 形質轉換시켜 ST생산을 유도하고, coloning된 ST유전자를 probe로 사용하여 腸毒性大腸菌 설사증과 원인균의 종류를 파악하고 또한 ST 항체생산을 위한 정제된 ST생산에 이용하고자 한다.

實驗 材料 및 方法

腸内細胞 분리－본 실험에서 사용된 병원성대장균 즉 ST생산균주는 경기, 충청지역 일원의 농가에서 사육되고 있는 어미와 새끼돼지를 대상으로 1989년 5월부터 10월까지 설사중인 사육돈의 분변시료를 채취하여 WHO大腸菌 분리법[29]과 Edward 등[13]의 방법에 따라 장내세균을 분리하고, 분리된 대장균들중 ST생산능력이 우수한 균주를 선발하였다.

사용배지－분리된 ST생산균주의 균증식 및 배양에는 LB배지를 사용하였고, 形質轉換된 菌株의 ST생산확인용 배지로는 CYES-2배지를 사용하였다.

ST생산 유무 검정－분리한 大腸菌의 ST 생산유무를 WHO ST검정법[32] 및 梁 등[33]의 IMA(Infant Mouse Assay)법을 사용하여 판별하였고 ST 생산유무를 검정하기 위하여 배양액 1.5 m*l*을 microcentrifuge로 5분간 遠心分離한 후 그 上澄液을 사용하였다.

사용균주 및 ST unit 산출－ST생산조건 조사에 사용한 succinate salts 배지는 梁 등[33]의 방법에 따라 조제하여 사용하였고, 분리균중 ST 생산능력이 우수한 KS-4, KM-7, KM-12 3균주를 선발 사용하였다. 생산된 ST의 unit 산출은 배양 上澄液을 2段階 稀釋法으로 희석하여 생후 만 3일된 젖먹이생쥐 胃内에 25 μ*l*씩 주입한 후 WHO의 판정기준[32]에 따라 G/B율이 0.07이 되는 경우를 양성으로 판정하고 희석배율에 40(1,000 μ*l*/25 μ*l*)를 곱하여 배양액 1 m*l*에 상당하는 unit로 환산하였다.

對照群의 G/B율 산출－ST와 LT생산이 음성인 표준균주(EC-84 ; ST- LT- SC 13 01 H7 K1)를 WHO의 Central public Health Laboratory(London)에서 분양받아 對照群으로 하여 IMA법으로 젖먹이생쥐 20마리에 주사한 후 G/B율이 최고와 최저치인 3마리씩을 제외한 14마리의 G/B율 평균치를 對照群의 G/B율로 설정하였다.

균 증식량 측정－分光光度計(LKB Ultrospec 4050)를 사용하여 배양액의 O.D값을 590 nm에서 측정하여 균의 증식량을 비교하였다.

분리균의 배양상 특성조사－분리균의 배양상 특성을 조사하여 가장 효과적인 ST 생산유무 확인 및 형질전환균주의 ST생산 비교에 이용하기 위하여 succinate salts배지에서 pH 및 배양시간에 따른 ST생산량을 조사하고, M9 배지, CYES-2 배지, LB 배지 등과 succinate salts 배지에서 균증식량과 ST생산량을 조사하였다.

ST생산유전자의 형질전환에 사용한 균주 및 Plasmid－ST 생산 표준균주는 EC-82(ST$^+$ LT$^-$ 015 077 H11 K80)를 WHO의 Central Health Labora-

tory(London)에서 분양받아 사용하였고 形質轉換用 宿主 균주는 *E. coli* K-12(F^- recA13 ara14 proA2 lacYI)를, Vector DNA는 pBR322(ColEI Amp^r Tet^r)(BRL, Inc.)를 사용하였다. 실험균주로는 분리한 ST 생산균주중 ST 생산능력이 가장 우수한 KM-7(ST^+ K88 K99) 균주를 선발하여 사용하였다.

Plasmid 분리－분리균의 plasmid분포양상 및 형질전환균주의 ST gene를 함유하는 plasmid확인하기 위한 소량의 plasmid를 분리는 alkaline lysis법[29]을 준용하여 사용하였고, 대량의 plasmid분리에는 Dillon 등[11]의 방법에 따라 LB배지에 chroamphenicol (150 μg/ml)을 첨가하여 plasmid를 증폭하여 실시하였다.

Plasmid 部分消去－ST생산유전자를 함유하는 plasmid를 확인하기 위하여 KM-7균주를 LB배지에서 37℃로 14시간 배양한 다음 그 배양액 0.1 ml을 acridine orange가 25, 50, 75, 100 및 120 μg/ml씩 각각 함유되어 있는 5 ml의 LB 배지에 접종하고 빛을 차단한 상태로 80 rpm으로 흔들어 주면서 10시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 ml를 LB한천평 판배지에 塗抹하고 37℃에서 12시간 배양하였다. 배양된 菌集落들의 plasmid를 분리하여 agaros gel전기영동법으로 plasmid消去를 관찰하고, plasmid가 부분소거된 變異株의 ST생산유무를 IMA법으로 확인한 후 ST生産遺傳子를 함유하는 균집락을 모았다.

ST生産遺傳子 cloning－ST생산유전자를 cloning하기 위하여 acridine orange로 plasmid를 부분소거시킨 變異株중 ST를 생산하는 균주를 선발하여 ST生産遺傳子를 함유하는 plasmid를 분리하였다. 분리한 plasmid는 EcoRI 制限酵素로 절단하여 pBR 322 vector DNA에 접합시킨 후 *E. coli* K-12에 形質轉換시켰다.

DNA 接合과 形質轉換－ST유전자를 함유하는 plasmid는 EcoRI 制限酵素로 절단한 후 CIAP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)로 5′말단의 燐酸基를 Maniatis 등[29]의 방법에 따라 제거시켜 접합에 사용하였고, ST생산유전자와 pBR322 vector DNA의 접합은 50 mM Tris-HCl(pH 7.8), 10 mM $MgCl_2$ 20 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, 5 μg/ml BSA (Bovine Serum Albumin)를 함유한 용액에 10 μl의 EcoRI으로 절단한 plasmid DNA 용액과 2 μl의 EcoRI으로 절단한 vector DNA용액을 넣고 5 μl의 T_4 DNA ligase(1 unit/1 μl, NEB)를 넣어 12℃에서 18시간 반응시켰다. 접합되어진 DNA혼합액은 形質轉換宿主인 *E. coli* K-12에 Maniatis 등[29]과 Dillon 등[11]의 방법을 참고로 하여 形質轉換시켰다.

形質轉換菌株 선발－形質轉換된 2～3 mm의 균집락을 살균한 죽세봉(tooth pick)을 사용해 보관용 LB 한천배지에 옮기고 나머지는 microcentrifuge tube에 옮겨서 急速粉碎法[29]으로 plasimd를 분리하였다. 細胞粉碎液은 68℃에서 10분간 가열하고 microcentrifuge로 5분간 원심분리하여 상등액을 모아 2.5 μl의 25% ficoll을 가하고 agarose gel로 전기영동하여 plasmid양상을 관찰하였다.

Agarose gel 電氣泳動－분리균 및 형질전환균주의 plasmid분포양상 관찰은 Maniatis 등[29]의 방법에 따라 실시했고 사용한 agarose gel은 0.7～1.0%로 7.5 V/cm의 전압하에서 TBE(Tris-Borate EDTA) buffer를 통하여 실시하였다.

DNA 精製－분리한 DNA 정제를 위하여 PREPAC™ mini-column(BRL 제품)을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 분리된 plasmid 및 制限酵素反應이 끝난 DNA용액은 미리 냉각시킨 95% ethanol을 2배량 첨가하여 －20℃에서 4시간 정치하고 microcentrifuge로 10분간 遠心分離하여 上澄液은 버리고 DNA만 냉각건조한 후 완충액 A(0.05 M NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 7.2), 1 mM EDTA) 0.4 ml에 풀어주고 0.12 ml의 완충액 B(2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 7.2), 1 mM EDTA)를 첨가하여 혼합하였다. Mini-column은 완충액 C(0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 7.2), 1 mM EDTA)로 1 ml씩 5～6회 세척하고 DNA 혼합용액을 column에 통과시킨 후 DNA용출은 완충액 D(0.7 M NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 7.2), 1 mM EDTA) 0.25 ml씩 2회 용출하고 DNA용액을 모아서 1 ml의 냉각된 95% ethanol을 가하여 －20℃에 2시간 정치한 후 microcetrifuge로 15분간 遠心分離하여 上澄液을 버리고 침전된 DNA는 냉각건조하여 적당한 완충용액이나 살균증류수에 녹여서 －20℃에 보관해 두고 사용하였다.

結果 및 考察

Succinate salts배지의 배양초기 pH가 균증식과

Table 1. Effect of initial pH of succinate salts medium on growth and heat-stable enterotoxin production in enteropathogenic *E. coli*

Initial pH	Final pH			OD at 24 hour			ST (unit/ml)*			ST (unit/OD)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
6.0	8.4	8.4	8.5	0.76	0.64	0.93	80	160	80	105	250	86
6.5	8.4	8.4	8.5	0.97	0.92	0.92	160	320	80	165	348	86
7.0	8.6	8.7	8.6	1.20	1.30	1.37	320	640	320	267	492	233
7.5	8.8	8.8	8.8	1.00	1.32	1.36	640	640	320	640	485	235
8.0	8.7	8.8	8.8	0.92	1.23	1.29	640	640	320	696	520	248
8.5	8.8	8.9	8.8	1.69	1.92	1.63	1280	1280	640	757	666	392
9.0	8.8	8.8	8.8	0.83	1.90	1.63	640	1280	640	771	673	392
9.5	8.8	8.9	8.9	0.75	0.90	0.97	320	640	320	427	711	329
10.0	9.0	8.9	8.9	0.74	0.90	0.98	320	640	160	432	356	333

* 1 unit; minimal amount of heat-stable enterotoxin that gives gut/body ratio more than 0.070.
A; KS-4, B; KM-7, C; KM-12.

Table 2. Growth of enteropathogenic *E. coli* and heat-stable enterotoxin production in succinate salts medium

Culture time (hr)	Final pH			OD at 24 hour			ST (unit/ml)*			ST (unit/OD)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	8.5	8.5	8.5	0.02	0.02	0.02	N.D.	N.D.	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
2	8.3	8.4	8.2	0.03	0.03	0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	8.2	8.1	8.0	0.05	0.06	0.04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	7.7	7.8	7.6	0.09	0.12	0.08	N.D.	40	N.D.	N.D.	333	N.D.
8	7.8	7.9	8.0	0.16	0.23	0.17	40	160	40	250	695	235
10	8.3	8.4	8.3	0.57	0.68	0.54	160	320	160	280	470	296
12	8.4	8.5	8.4	0.76	0.90	0.78	160	640	320	210	711	410
14	8.8	8.9	8.7	1.35	1.52	1.23	320	1280	640	237	842	520
16	8.9	8.9	8.7	1.55	1.79	1.43	1280	1280	640	825	715	447
18	8.9	8.9	8.7	1.74	1.93	1.57	1280	1280	640	735	663	407
20	8.9	9.0	8.9	1.79	1.97	1.62	1280	1280	640	715	649	395
22	9.0	9.1	9.0	1.78	1.97	1.65	1280	1280	640	719	649	387
24	9.0	9.1	9.0	1.79	1.99	1.67	1280	1280	640	715	643	382

*N.D.; not detection, A; KS-4, B; KM-7, C; KM-12.

ST생산에 미치는 영향—Alderete 등[3]과 Staples 등[31]은 ST생산배지는 기본적인 몇가지 鹽類로 구성된 합성배지가 적합하다고 보고하였다. 따라서 金 등[25]이 보고한 바 있는 succinate salts 배지를 본 실험의 ST생산용 배지로 사용하였다. 분리선발한 ST생산능력이 우수한 KS-4, KM-7 및 KM-12 균주를 배양초기 pH가 6.0에서 10.0사이로 조정된 succinate salts 배지에 접종하고 24시간 진탕배양한 후 각각의 흡광도를 측정하여 균증식량을 조사하고 ST생산량을 검정하였다.

배양초기 pH가 8.5에 가까울수록 耐熱性腸毒素(ST) 생산량이 3균주 모두 가장 많았으며 KM-7과 KM-12균주의 경우는 배양초기 pH 9.0에서도 배양초기 pH 8.5일때와 같은 ST생산량을 나타내었고 3

Table 3. Effect of incubation medium on production of heat-stable enterotoxin

Initial Medium	Final pH			O.D. at 24 hour			ST (unit/ml)*			ST (unit/O.D.)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
M9	8.6	8.8	8.6	1.67	1.70	1.63	640	640	320	383	376	196
SSS	9.1	9.1	9.0	1.73	1.86	1.65	1280	1280	640	740	688	388
CYES-2	8.8	9.0	8.8	1.70	1.94	1.72	640	640	320	376	330	186
LB	8.7	8.8	8.6	1.63	1.69	1.53	160	160	80	98	95	52

A; KS-4, B; Km-7, C; KM-12, M9; medium for enterobacteriaceae by Neidhard, SSS; sodium succinate salts broth, CYES-2; casamino acid yeast extract broth-2, LB; Lauryl broth.

균주의 菌增殖量은 배양초기 pH 8.5~9.0에서 가장 많았다. 菌增殖量과 ST생산량을 비교하기 위하여 ST單位生産量(ST unit/O.D.)으로 환산하여 비교한 결과 KS-4 균주의 경우 배양초기 pH 8.5일때 757로 가장 많았으며 KM-7과 KM-12균주는 배양초기 pH가 9.0일때 각각 673과 392로서 가장 많았다. 이는 梁 등[33]과 Jhonson 등[24]의 CYES-2배지에서 배양초기 pH 8.5일때 가장 ST생산량이 많다고 보고한 내용과 金 등[25]의 succinate salts배지에서 배양초기 pH가 8.5부근에서 가장 ST생산량이 많았다는 보고와 비슷하였다. 그러나 Lallier 등[27]은 CYES-2배지에서 배양초기 pH가 7.2~8.0일때 가장 좋다는 보고와는 다소 차이가 있다. 한편 24시간 배양한 후 배양액의 pH는 배양초기의 pH와 관계없이 pH 8.5~9.0으로 변화되었다. 따라서 菌增殖은 억제시키고 ST생산량을 최대로 유도시킬 수 있는 배양초기 pH는 KS-4 균주는 pH 8.5, KM-7과 KM-12 균주는 pH 9.0으로 나타났다.

Succinate salts 배지에서의 균증식과 ST생산－배양초기 pH를 8.5로 조정한 succinate salts 배지에 KS-4, KM-7 및 KM-12 균주를 각각 접종하고 진탕배양하면서 배양시작후 2시간부터 2시간 간격을 두고 균증식량과 ST생산량을 조사하였다.

增殖量은 접종후 3균주 모두 배양시작후 20시간에서 최대를 나타냈으며 ST생산량의 경우 KS-4균주는 배양 시작후 16시간에서 1280 units였고 KM-7과 KM-12균주는 배양 시작후 14시간에서 최대를 나타내어 1280 units와 640 units가 되었다. 따라서 ST생산량은 균증식이 시작되어 증식이 완료되기 4~6시간전에 완료된다는 것을 알았다. 이러한 결과는 이 등[28]이 보고한 succinate salts배지에서 ST생산 완료시간인 8시간과는 차이가 있었다.

한편 單位生産量의 경우 KS-4균주는 배양시작후 16시간에서 KM-균주와 KM-12균주는 배양시작후 14시간에서 가장 왕성한 속도로 ST생산이 진행된다는 것을 알 수 있었다.

培地組成에 따른 ST생산량 조사－합성배지에 첨가하는 炭素源의 종류에 따라 ST생산에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.[20] 大腸菌의 배양 및 代謝物質生産에 사용되는 합성배지중 M9배지, succinate salts 배지, CYES-2배지 및 LB배지를 대상으로 각 배지의 pH를 8.5로 조정한 후 分離菌을 배양하고 菌增殖量과 ST생산량을 조사하였다.

Succinate salts배지에서 菌增殖量과 ST생산량이 가장 많았다. M9배지와 CYES-2배지는 ST생산량이 비슷하였으나 菌增殖量은 CYES-2배지에서 다소 많았다. 한편 LB배지에서는 菌增殖量은 다른 배지들과 비슷하였으나 ST생산량은 대단히 낮았다. 따라서 ST생산용배지는 succinate salts배지가 가장 적합함을 알 수 있었고, 특히 ST정제를 위한 배지 성분으로 단백질이나 고분자 탄수화물이 함유되면 불리하므로 succinate salts배지와 같이 無機物로만 구성된 합성배지를 사용하는 것이 유리할 것으로 생각된다.

分離菌의 plasmid 分布樣相－분리균중 ST생산능력이 가장 우수한 KM-7균주를 선발하여 plasmid를 분리하고 agarose gel상에서 전기영동한 결과 Fig. 1과 같이 나타났다.

KM-7균주(lane 1)에서 23 Kbp보다 작은 plasmid들은 확인할 수 있었으나 이보다 큰 크기의 plasmid는 확인할 수 없었다. Carton 등[6]은 腸毒性大腸菌의 약 90%이상이 LT와 ST를 함께 생산하고 LT와 ST生産遺傳子도 대부분 같은 plasmid내에

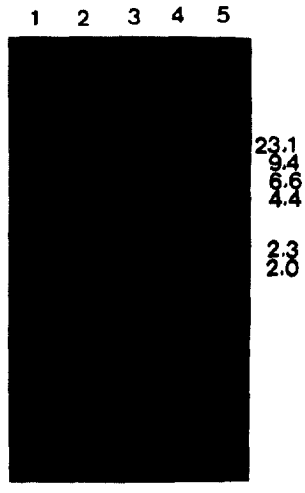

Fig. 1. Plasmid patterns of *E. coli*. Plasmids were electrophoresed on 0.7% agarose gel at voltage 7.5 V/cm.
Lane 1; KM-7, Lane 2; ST^+ LT^-, EC 82 (reference strain), Lane 3; ST^- LT^-, *E. coli*(isolated strain), Lane 5; λ-Hind III.

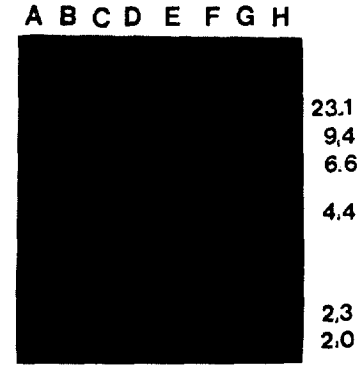

Fig. 2. Plasmid curing test. Plasmid of KM-7 strain was cured with acridine orange. Only B strain produced heat-stable enterotoxin. Cured plasmids were electrophoresed on 0.7% agarose gel at voltages 7.5 V/cm.
A-G; mutants (cured strain with acridine orange), H; λ-Hind III.

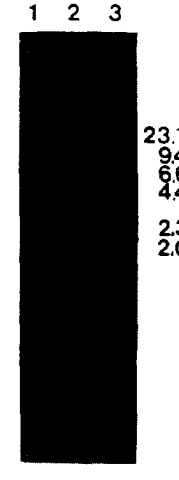

Fig. 3. Plasmid patten of eKT 53. The agarose concentration in the gel was 0.7 V/cm. Electrophoresis was carried out voltages 7.5 V/cm.
Lane 1; pKD 37, Lane 2; eKT 53, Lane 3; λ-Hind III.

존재하며 6×10^7 daltons(90.9 Kbp)의 크기를 갖고 있지만 ST만을 생산하는 腸毒性大腸菌의 경우에는 ST生産遺傳子를 함유하고 있는 plasmid는 2.1~8.0×10^7 daltons(31.8~121.2 Kbp)의 크기로 분포되어 있다고 하였다. 본 실험균주인 KM-7균주의 경우 ST腸毒素만 생산하는 표준균주(EC-82, lane 2)와 plasmid분포양상을 비교하였다. 두 균주의 23 Kbp이상의 plasmid를 비교해 볼 때 EC-82균주는 약 80 Kbp정도의 plasmid가 한개인 반면 KM-7균주는 80 Kbp정도의 plasmid를 포함하여 수개의 plasmid가 존재하고 있었다. 한편 ST와 LT를 생산하지 못하는 균주들(lane 3, 4)의 경우 23 Kbp이상의 plasmid존재를 확인할 수 없었다. 따라서 KM-7균주의 23 Kbp 이상의 plasmid들중에 ST生産遺傳子를 함유하고 있을 것으로 추정하고 plasmid 消去實驗을 통하여 ST生産遺傳子를 갖고 있는 plasmid를 확인하기 위하여 acridne orange를 사용하여 plasmid 消去實驗을 실시하였다.

Plasmid 消去實驗을 통한 ST生産 plasmid 확인—KM-7균주를 plasmid 消去實驗을 통하여 plasmid를 部分消去시키기 위하여 농도별로 acridine orange를 처리한 각 균주로부터 plasmid를 분리하여 agarose gel로 電氣泳動하여 plasmid소거유무와 분포양상을 관찰하였다.

Fig. 2에서 보는 바와같이 B균주에서 plasmid部分消去를 관찰할 수 있다. 그러나 나머지 plasmid 部分消去 실험균주들은 chromosomal DNA 이상의 큰 plasmid가 모두 消去되었다. 이같이 변화된 plasmid분포 양상에서 ST生産遺傳子를 함유하는 plas-

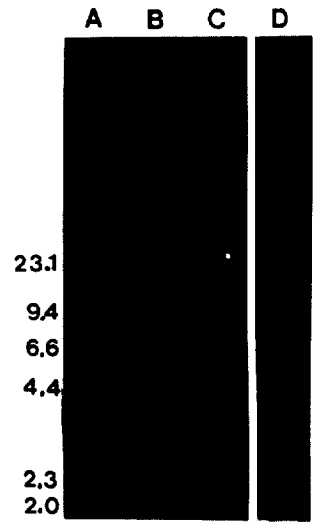

Fig. 4. Restriction fragment patterns of Plasmid pKD 37. Electrophoresis was carried out at voltages 7.5 V/cm on the 0.9% agarose gel.
Lane A; λ-Hind III, Lane B; eKT 53 plasmid cut with EcoRI, Lane C; eKT 53 plasmid patterns, Lane D; undigested pKD 37.

mid를 확인하기 위하여 젖먹이생쥐로 變異菌株에 대한 ST생산능을 검정하였다. 그 결과 Fig. 2의 B 變異菌株만이 ST생산이 양성이고 나머지는 모두 음성을 나타냈다. 따라서 B 變異菌株만이 ST를 생산하는 遺傳子를 갖고 있으며 약 80 Kbp 크기의 plasmid상에서 ST生産遺傳子가 존재함을 간접적으로 증명하는 것으로서 ST生産遺傳子를 gene cloning하기 위한 목표 plasmid로 선정하였다. 분리균중 KM-7균주의 ST生産遺傳子를 함유하는 plasmid를 agarose gel 또는 PREPAC™ mini-column을 이용하여 분리, 정제하고 실험에 사용하였다.

ST생산 plasmid의 制限酵素에 대한 성질－plasmid부분 消去實驗을 통해 확인되어진 ST生産遺傳子를 함유하고 있는 약 80 Kbp크기의 plasmid를 분리하여 EcoRI 制限酵素로 절단하고 Fig. 4와 같이 전기영동하여 본 결과 6개의 DNA 절편이 있었다.

pKD 37 plasmid 合成 및 確認－ST생산유전자가 함유된 약 80 Kbp의 plasmid를 EcoRI制限酵素로 절단하고 EcoRI制限효소로 절단한 pBR 322 vector plasmid와 접합하여 形質轉換시킨 균주들중 80개 균주를 CYES-2배지로 진탕배양한 배양액으로 IMA (Infant Mouse Assay)를 통하여 ST生産能을 조사한 결과 G/B율이 KM-7균주의 0.096보다 높은 0.102를 나타내는 균주(eKT 53)를 얻었다. eKT 53균주로부터 形質轉換되어진 plasmid(pKD 37)를 분리하고 電氣泳動하여 Fig. 3에 나타내었다. 形質轉換된 pKD 37 plasmid의 크기는 20.36 Kbp를 EcoRI 制限酵素로 절단할 경우 Fig. 4의 lane 2에서 보는 것과 같이 16 Kbp의 DNA 절편(insert)이 확인되었다. Lane 3의 eKT 53 균주의 plasmid 분포양상과 비교하여 80 Kbp plasmid내의 16 Kbp EcoRI 制限酵素 절편이 vector DNA와 접합되었음을 알 수 있다.

따라서 16 Kbp의 DNA절편상에 ST 生産遺傳子가 존재함을 알 수 있다.

국문요약

내열성장독소(ST)를 생산하는 병원성대장균(KS-4, KM-7, KM-12)을 설사돈으로부터 분리하고 몇가지 배양상 특성과 ST생산유전자의 성질을 조사하였다.

분리균은 succinate salts배지의 pH가 8.5～9.0일 때 ST생산량이 가장 많았으며, ST정제용 배지로는 succinate salts 배지가 가장 유리한 것으로 생각되어 진다. ST생산, 축적은 분리균 모두 14～16시간에서 가장 높았고 균체량은 배양시작후 20시간에서 가장 많았다. ST생산능력이 가장 우수한 KM-7균주로부터 ST생산유전을 함유하는 약 80 Kbp의 plasmid를 분리하고 EcoRI 제한효소를 절단한 16 Kbp의 DNA절편을 pBR 322 vector DNA에 접합시킨 pKD 37 plasmid를 *E. coli* K-12에 형질전환시켜서 KM-7보다 ST생산능력이 우수한 균주(eKT 53)를 얻었다.

참고문헌

1. Alraham, S.N. and Beachey, E.H.: Assembly of chemically synthesized peptide of *Escherichia coli* type I fimbriae into fimbriae-like antigenic structures. *J. Bacteriol.*, **169**(6), 2460-2465 (1987).
2. Adam, A.: Biology of colin bacillus in dyspepsia, and its relation to intoxication. *J. Kindenheik.*, **101**, 295-314 (1923).
3. Alderate, J.F. and Robertson, D.C.: Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enteroxigenic *Escherichia coli. Infect. Immun.*, **19**, 10 21-1030 (1978).
4. Burgess, M.N. *et al.*: Biological evalution of a methanol soluble heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. *Infect. Immun.*, **43**, 1027-1032 (1979).
5. Bray, J.: Isolation of antigenically homogenous strain of *Bact. coli neapolititanum* from summer diarrhea of infants. *J. Pathol. Bacterial.*, **57**, 239-247 (1945).
6. Carlton, G.S. *et al.*: The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli. J. Infact. dis.*, **130**(1), 40-49 (1974).
7. Davidson, J.D. and Hirsch, D.C.: Use of the K88 antigen for *in vitro* bacterial competition with porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli. Infect. Immun.*, **12**, 760-765 (1975).
8. De Graaf, F.K. and Roorda, I.: Production, purification and cheracterizaion of the fimbrial adhesive antigen F41, isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli. Infect. Immun.*, **36**, 751-756 (1982).
9. De Ree, J.M. and Van-Den Bosh, J.F.: Fimbrial serotype of *Escherichia coli* strains isolated from extra-intestinal infections. *J. Med. Microbial.* (Great Britain and Ireland), **29**, 95-99 (1989).
10. Dean, A.G. *et al.*: Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, **125**, 407-411 (1972).
11. Dillon, J.R. *et al.*: Recombinant DNA methodlogy, Jhon Wiley and Some Inc., U.S.A.
12. Donta, S. *et al.*: Stimulation of steroidgenesis in tissue oulture by enteroxigenic *Escherichia coli* of its neutralization by specific antiserum. *Infect. Immun.*, **9**, 500-506 (1974).
13. Edward, P.R. and Ewing, W.H.: Identification of Enterobacteriaceae, 3rd, ed (1986).
14. Idels, L.R. *et al.*: Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbial. Rev.*, **47**(4), 596-620 (1983).
15. Embaye, H. *et al.*: Interection of enterophogenic *Escherichia coli* **011** with rabbit intestinal mucosa *in vitro. Gastrointerology*, **96**, 1079-1086 (1989).
16. Evans, D.G. *et al.*: Response of rabbit small intestine to heat-lable and heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli. Infect. Immun.*, **7**, 873-880 (1973).
17. Evans, D.G. *et al.*: Production of the vascular permiability factory by enterotoxigen *E. coli* islated from man. *Infect. Immun.*, **8**, 725-730 (1973).
18. Evans, D.G. *et al.*: New surface association heat-stable colonization factor antigen(CFA II) produce by enterotoxingenic *E. coli* of serotypes 06 and 08. *Infect. Immun.*, **21**, 638-647 (1978).
19. Gaastra, W. and Graaf Ff. K.D.: Heat-specific fimbrial adhesine of non-invasive enterotoigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiological. Rev.*, **46**(2), 129-161 (1982).
20. Gallant, A.J.: Stringent control in *E. coli. Ann. Rev.Genet.*, **13**, 293-397 (1979).
21. Ginella, R.A.: Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin; characteristics of the model. *Infect. Immun.*, **14**, 95-99 (1978).
22. Gyles, C.L.: Heat-stable and heat-lable form of the enterotoxin from *E. coli* strains enterotoxigenic for pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **176**, 314-318 (1969).
23. Hirst, T.R. *et al.*: Cellular location of heat-lable enterotoxin in *Escherichia coli. J. Bacteriol.*, **157**, 637-642 (1984).
24. Jhonson, W.H. *et al.*: Heat-stable enterotoxin from *Escherichia coli. Infect. Immun.*, **20**, 352-359 (1978).
25. 김상익, 홍태희 등: 대장균의 내열성장독소 생산조절 기전. 대한미생물학회지, **20**, 55-63 (1985).
26. Kmutton, S. *et al.*: Action accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells; Fasciae of a new diagonsis test for enteropathogenic and entero-hemorrhagic *Escherichia coli. Infect. Immun.*, **57**, 1290-1298 (1989).
27. Lallier, R.S. *et al.*: *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, **28**, 469-474 (1980).
28. 이우곤, 김상익 등: 장독성대장균의 내열성장독소의 정제. 대한미생물학회지. **20**, 199-211 (1985).
29. Maniatis, T.E. *et al.*: Molecular cloning: A laboratory mannual, Cold Spring Harbor Laboatory. U.S.A. (1982).

30. Sack, R.B.: Human diarrheal diseases caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annun. Rev. Microbial.*, **29**, 333-339 (1975).
31. Staples, R.T. *et al.*: Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by strain of *E. coli* pathogenic man. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4716-4721 (1980).
32. WHO/CDD.: Manual for laboratory investigation of acute enteric infections; Microbiology epidemiology, Immunology and vaccine development, 83-3 (1983).
33. 양남용, 김상익 등: 대장균의 내열성장독소 생산에 관여하는 조건. 서울의대 학술지, **25**, 139-145 (1984).