

간흡충 항원 유전자의 클로닝 및
재조합 항원을 이용한 혈청학적 진단

연세대학교 대학원

의과학과

심서보

간흡충 항원 유전자의 클로닝 및
재조합 항원을 이용한 혈청학적 진단

지도교수 용 태 순

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

심 서 보

심서보의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

먼저 이 논문이 나오기까지 물심양면으로 도와주시고 지도편달을 해 주신 용태순 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 항상 옆에서 지켜봐 주시면서 격려와 충고를 아끼지 않으신 임경일 교수님과 부족한 저에게 많은 조언을 해 주신 박순정 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다. 또 실험을 진행함에 있어 미흡한 저에게 많은 것을 가르쳐 주시고, 여러모로 많은 도움을 주신 교실원 여러분께도 깊은 감사의 마음을 전합니다.

어려울 때나 힘들 때에도 항상 옆에서 용기를 북돋아 주며 버팀목이 되어준 아내에게 고맙다는 말을 전하며, 무엇보다도 항상 저에게 힘이 되어 주시고 변함없는 사랑과 희생을 아끼지 않으신 부모님께 깊은 감사의 마음을 전해드리며 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례.....	iii
국문요약.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료 및 방법.....	6
1. 간흡충과 감염혈청.....	6
2. 분비배설항원의 분리.....	6
3. 간흡충 분비배설항원과 조추출물의 면역.....	7
4. 간흡충 cDNA library.....	7
5. Immunoscreening과 염기서열 분석.....	7
가. Immunoscreening.....	7
나. <i>In vivo</i> excision.....	9
다. DNA sequencing 및 분석.....	10
6. Western blotting.....	10
7. Northern blotting.....	11
8. Southern blotting.....	12
9. Protein purification.....	13
10. 혈청학적 진단에의 검증.....	14
III. 결과.....	15
1. 간흡충 성충의 분비배설항원.....	15
2. 간흡충 cDNA library를 이용한 immunoscreenin.....	15
3. 재조합 항원 유전자의 분석과 검증.....	15
가. 재조합 항원 유전자의 염기서열 분석.....	15
나. Western blotting.....	17

다. Northern blotting.....	17
라. Southern blotting.....	17
4. Protein purification.....	18
5. 혈청학적 진단에의 유용성 검증.....	18
IV. 고찰.....	30
V. 결론.....	34
참고문헌.....	36
영문요약.....	41

그림 차례

Fig. 1. 5-20% gradient SDS-PAGE of <i>C. sinensis</i> ES antigens	20
Fig. 2. Comparative analysis of several <i>C. sinensis</i> antigens including tandem repeats	21
Fig. 3. DNA sequences of <i>C. sinensis</i> myoglobin gene contained a single ORF encoding 150 amino acids	22
Fig. 4. IgG-immunoblot analysis of each recombinant protein with the same serum which was used for immunoscreening	23
Fig. 5. IgG-immunoblot analysis of the ES antigens from <i>C. sinensis</i> with a immune rat serum and a normal rat serum	24
Fig. 6. IgG-immunoblot analysis of the crude extract of <i>C. sinensis</i> with a immune rat serum	24
Fig. 7. Northern blotting	25
Fig. 8. Southern blotting	26
Fig. 9. IgG-immunoblot analysis of each protein with penta · His Antibody	27
Fig. 10. Purification of recombinant GRCSP2, PRCSP, and <i>C. sinensis</i> myoglobin	27
Fig. 11. IgG-immunoblot analysis of the purified recombinant GRCSP2 with normal and clonorchiasis human sera	28
Fig. 12. IgG-immunoblot analysis of the purified recombinant PRCSP with normal and clonorchiasis human sera	28

표 차례

Table 1. Seroreactivity of GRCSP2 and PRCSP recombinant proteins to various helminth-infected patients' sera	29
--	----

국문요약

간흡충 항원 유전자의 클로닝 및 재조합 항원을 이용한 혈청학적 진단

토끼의 담도로부터 얻은 살아 있는 간흡충을 protease inhibitor cocktail 이 들어 있는 RPMI배지에 넣고 유지하여 분비배설항원을 얻었다. 이 분비 배설항원 중 21 kDa 부위의 단백질을 면역시킨 흰쥐의 혈청과 간흡충증 환자 혈청으로 간흡충 성충의 cDNA library를 immunoscreening하여 강하게 반응하는 양성 clone을 선별해 내었다. 간흡충증 환자 혈청을 이용해 분리한 2개의 clone중 하나는 9개의 amino acids가 23회 반복되는 구조를 포함하는 265개의 amino acids로 구성되었고 glycine의 비중이 높아 GRCSP2라 명명하였다(GenBank Accession number AF461709). 다른 하나는 10개의 amino acids가 22회 반복되는 구조를 포함하는 269개의 amino acids로 구성되었고 proline의 비중이 높아 PRCSP라 명명하였다(GenBank Accession number AF461711). 간흡충 분비배설항원을 면역시킨 흰쥐의 혈청을 이용해 분리한 4개의 clone은 모두 흡충류의 myoglobin과 유사성이 높아 *C. sinensis* myoglobin이라 하였고 이는 150개의 amino acids로 구성되었다(GenBank Accession number AF461710). GRCSP2와 PRCSP는 간흡충 total RNA 상에서 모두 1.05 kb 크기로 발현되었고 *C. sinensis* myoglobin은 0.57 kb 크기로 발현되었다. Southern blotting 결과 3가지의 유전자 모두 간흡충 genomic DNA에 존재함을 확인하였다. GRCSP2와

PRCSP의 recombinant protein을 purification하여 간흡충증의 진단에의 민감도를 Western blotting으로 검사해 본 결과 각각 93.3%와 86.7%를 나타냈으며 폐흡충증, 요코가와흡충증, 회충증, 스파르가눔증 환자 혈청에 교차반응을 보였고, 특히 PRCSP가 더 많은 교차반응을 나타냄을 확인하였다.

핵심되는 말 : 간흡충, cDNA library, 분비배설항원, repetitive sequence, myoglobin, 재조합 항원, 혈청학적 진단

간흡충 항원 유전자의 클로닝 및 재조합 항원을 이용한 혈청학적 진단

<지도교수 용 태 순>

연세대학교 대학원 의과학과

심 서 보

I. 서 론

간흡충(*Clonorchis sinensis*)은 사람에게 흔히 기생하는 기생충으로서 한국, 일본, 중국, 태국, 베트남등을 포함하는 동아시아 지역에 널리 분포되어 있다. 한국에서 간흡충증 환자는 큰 강이나 하천을 따라서 넓게 분포되어 있다. 중국에서는 5백만명의 간흡충증 환자가 보고되어 있고,¹⁻³ 한국에서도 사람들에 있어서 1.4%의 높은 간흡충 충란 양성율을 보이고 있다.⁴

사람에 있어서 간흡충의 감염은 제대로 익히지 않은 감염형 피낭유충을 가지고 있는 담수어를 먹음으로 인해 감염되고 감염율과 감염의 중증 정도는 사람의 식습관과 관계되어 있다.⁵

간흡충은 주로 간내 담관, 간의 담관, 담낭, 췌관에 기생하는데, 병리기전으로는 우선 간흡충 자체나 간흡충의 분비물, 충란의 화학적 성분의 자극이나 담관의 물리적 막힘, 혹은 담석 형성의 유도, 십이지장으로부터 담도계로 이동 중에 세균의 번식 유도 등의 원인으로 인해 담도 주위 섬유화, 담관의 비후, 담도 상피세포의 과형성과 염증반응, 협착, 괴사 등을 일

으키고 담낭염과 담도염도 야기 시키는 것으로 알려져 있다.⁶⁻⁹ 이와 더불어 장기간에 걸친 염증반응의 지속은 carcinogen, free radical의 형성으로 인하여 DNA 손상과 돌연변이를 유도함으로써¹⁰ 담관암 형성을 야기 시키는 원인을 제공한다고 알려져 있다.¹¹⁻¹⁴ 그렇기 때문에 각 항원의 특성과 역할을 규명하는 것은 간흡충의 병원성 및 간흡충의 병리적인 현상을 이해하는데 필수적이라 하겠다.¹⁵

간흡충증의 진단에는 대변검사로 충란을 확인하는 것이 가장 확실한 방법이지만, 지난 몇 십 년간 보조적 진단 방법으로 면역학적 진단의 효율을 높이기 위한 연구가 계속되어져 왔다. 면역학적 진단 방법으로는 피내반응 검사(intradermal test), 보체결합반응검사(complement fixation test), 간접혈구응집반응검사(indirect hemagglutination test), 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody test)과 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)등이 사용되어져 왔는데, 이중 ELISA가 제일 민감도와 특이도가 높다고 보고되어 있고 현재 널리 사용되고 있다.¹⁶

이와 더불어 immunoblot analysis 또한 간흡충의 항원단백을 밝히기 위해 시도되어 왔다. 이는 간흡충 총체의 단백질을 전기영동하여 그 양상을 보고 감염시킨 동물의 혈청이나 감염 환자의 혈청으로 반응시켜 나타나는 단백 분획을 봄으로써 그 항원의 크기를 확인하는 방식으로 진행되어 왔다. 그 결과 7개(66, 61.5, 45, 37, 28.5, 23.5, 15.5 kDa)의 간흡충증 환자 혈청의 IgE와 반응하는 주요 항원 단백질과, 그 후로도 여러 단백 분획 중 28 kDa의 간흡충의 장관에 위치하는 IgE와 반응하는 단백질도 밝혀졌다.¹⁸ 43, 34, 28-25 kDa의 단백 분획이 또한 중 특이적으로 환자 혈청과 강하게 반응됨이 보고되었다.¹⁹

최근 cDNA library를 이용하여 감염시킨 동물의 혈청이나 환자의 혈청을 가지고 immunoscreening 해서 얻은 clone을 가지고 항원 단백을 지속

적으로 연구하려는 노력이 시도되어 간흡충 성충의 난황소 단백질인 GRCSP(glycine rich-*C. sinensis* protein)이 밝혀졌고,²⁰ 간흡충의 glycolytic enzyme인 CsPGK(*C. sinensis* phosphoglycerate kinase)과 또 다른 단백질인 CsPRA(proline rich antigen of *C. sinensis*)도 혈청학적 진단에 유용하게 이용될 수 있다고 밝혀졌다.²¹⁻²²

여러 연충류에서 분비배설항원(excretory-secretory antigen) 역시 숙주에 여러 면역 반응과 병리적 변화를 야기 시키는 것이 밝혀졌고,²³⁻²⁴ 분비배설항원 혹은 이의 재조합 항원 또한 면역진단에 유용하게 이용될 수 있음이 여러 기생충에서 보고되어 있다.²⁵⁻³¹ 간흡충에서도 분비배설항원을 면역진단에 이용하려는 시도가 있어서 12.5 kDa의 항원이 간흡충 현증 감염자에 강하게 반응함이 알려졌고,³² 7 kDa의 분비배설항원의 경우 간흡충 현증 감염자에서는 반응하지만 과거 감염자에서는 반응하지 않아 면역진단에 있어 특이도를 높일 수 있다고 알려졌다.³³

간흡충의 이러한 여러 항원을 밝히고 혈청학적 반응을 검사함에 있어서 폐흡충 등의 기타 다른 기생충과의 교차반응이 자주 보고되었으며³⁴⁻³⁵ 이의 해결을 위한 노력이 필요할 것으로 사료된다.

이에 본 연구는 간흡충에서 mRNA를 분리하여 cDNA library를 만들고, 이를 간흡충을 감염시킨 토끼의 혈청이나 간흡충 감염 환자의 혈청을 이용하거나 혹은 간흡충의 분비배설항원을 면역시킨 흰쥐의 혈청을 이용해서 immunoscreening하여 강하게 반응하는 항원 단백을 찾아 이 단백질 유전자의 염기서열을 밝혀 그 역할을 유추하고, *E. coli*에서 재조합 항원(recombinant antigen)을 만들어 다른 간흡충증 환자 혈청과 정상인 혈청과의 면역반응의 구분 여부와 기타 기생충증 환자의 혈청과의 교차반응을 확인하여, 간흡충증의 혈청학적 진단에의 유용성을 검증하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 간흡충과 감염혈청

경북 김해지방의 하천에서 채집한 참붕어 (*Pseudorasbora parva*)를 갈아 인공위액 (pepsin 0.5%, HCl 0.7%, NaCl 0.85%)에 넣어 37°C에서 3시간 정도 소화시킨 후, 0.85% 식염수로 4차례 세척하였다. 그리고나서 해부 현미경으로 피낭유충을 골라내어 New Zealand White rabbit에 300개씩 경구로 감염시키고 8주 후에 담도로부터 간흡충의 성충을 회수하고 감염토끼의 혈액에서 혈청을 분리한 후 -70°C에 냉동 보관하였다. 간흡충증 사람 혈청으로는 본 교실에서 보관하고 있던 간흡충증 환자 혈청을 이용하였다.

2. 분비배설항원의 분리

회수된 간흡충 성충 중 상태가 좋은 것 200마리를 여러 protease inhibitor cocktail(leupeptin 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pepstatin A 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PMSF 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$, EDTA 0.3 mg/ml)이 첨가된 20 ml의 RPMI 1640 배지에 넣고 37°C에서 2시간 배양한 후, 간흡충의 분비배설항원이 포함된 배지를 회수하여 10,000 \times g에서 10분간 원심분리 후, 상청액을 분리하여 5-20%의 gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하여 분비배설항원을 분자량별로 분리하였다. 그후 각 분획별로 gel을 잘라 dialysis tubing에 각각 넣고, electrophoresis buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)에서 120 V로 1시간동안 전기영동하여 각 크기별 분비배설항원

단백질을 추출하여 -70°C 에 보관하였다.

3. 간흡충 분비배설항원과 조추출물의 면역

분리된 크기 분획별 분비배설항원을 각각 동량의 complete Freund's adjuvant와 섞어 9주된 흰쥐(Sprague-Dawley)의 복강에 주사한 뒤, 3주간격으로 항원을 각각 동량의 incomplete Freund's adjuvant와 섞어 2회 boosting하였다. 2주 후 adjuvant 없이 동일한 항원으로 정맥주사한 후 1주일 후에 흰쥐로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 -70°C 에 보관하였다. 또한 간흡충 성충을 homogenizer로 갈아 $10,000\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리 후 추출한 상청액의 간흡충 총체 조추출물(crude extract) 역시 같은 방법으로 면역하여 혈청 분리 후 -70°C 에 보관하였다.

4. 간흡충 cDNA library

간흡충 cDNA library는 연세대학교 의과대학 기생충학교실에서 ZAP ExpressTM cDNA Synthesis Kit(Stratagene, USA)를 이용하여 기존에 만들어 놓았던 것을 사용하였다.

5. Immunoscreening과 염기서열 분석

가. Immunoscreening

준비된 간흡충 감염 사람 혈청, 크기 분획별 분비배설항원 면역 흰쥐 혈청 그리

고 간흡충 조추출물 면역 흰쥐 혈청을 이용하여 각각 plaque screening을 수행하였다. 1차 screening시 각 면역 혈청 별로 150 mm NZY agar plate를 준비한 후, 숙주 세포 *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' strain을 0.2% (v/v) maltose와 10 mM MgSO₄, 12.5 µg/ml tetracyclin이 첨가된 LB broth배지에 접종하여 37°C에서 OD₆₀₀=1.0되게 배양한 후 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet에 10 mM MgSO₄로 OD₆₀₀=0.5가 되도록 희석하여 숙주세포 600 µl 에 약 5.0×10⁴ pfu 정도가 자라도록 phage를 넣은 후 37°C에서 15분간 숙주세포에 phage가 감염되도록 한 후, 50°C로 미리 데워 놓은 7.5 ml top agar와 혼합하여 NZY agar plate에 균일하게 부었다. 42°C에서 약 3시간 배양한 후 10 mM IPTG용액에 적신 nitrocellulose membrane(PROTRAN BA 83, Schleicher & Schuell, Germany)을 이 위에 올려놓고 37°C에서 3시간 30분 더 배양한 후 membrane을 TBST용액(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20)에 세척한 후, blocking solution(3% skim milk in TBS, 0.05% sodium azide)에 넣고 4°C에서 하룻밤동안 차단시켰다. Membrane을 TBST로 10분간 3회 세척 후 1차 항체로는 간흡충증 환자 혈청과 크기 분획별 분비배설항원 면역 흰쥐 혈청을 blocking solution(3% skim milk in TBS)에 1:100으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 membrane을 TBST로 10분간 3회 세척하였다. 2차 항체로는 각각 alkaline phosphatase conjugated anti-human IgG(Sigma, USA)와 alkaline phosphatase conjugated anti-rat IgG(Sigma)를 blocking solution(3% BSA in TBS)에 1:4,000으로 희석하여 상온에서 1시간동안 반응시키고 TBST로 10분간 3회 세척한 후 TBS로 1회 더 세척한 다음, 30 ml의 color development solution(100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)에 NBT와 BCIP를 최종적으로 각각 0.3 mg/ml와 0.15 mg/ml되게 첨가한 후 membrane을 넣고 어두운 곳에서 5-10분간 발색 반응을 진행하였다. 그 후 membrane을 TBS에 1회 씻어낸 다음 stop solution(20 mM Tris-HCl (pH 2.9), 1 mM EDTA)에 넣

어 반응을 정지시킨 후 발색 반응의 정도를 확인하였다. 양성반응을 보이는 plaque를 멸균된 tip을 이용하여 떼어낸 후 500 μ l SM buffer(10 mM MgSO₄, 5 ml 2% (w/v) gelatin)에 넣은 후 10 μ l의 chloroform을 첨가하여 vortex한 후 4°C에 보관하였다가 2차 screening에 사용하였다. 2차와 3차 screening시에는 100 mm plate에 숙주세포를 200 μ l, top agar를 3.0 ml 사용하였고 phage의 양을 조절하여 3차 screening시에는 완전히 분리된 양성 반응의 plaque를 얻었다.

나. *In vivo* excision

ZAP ExpressTM vector에 있는 재조합 pBK-CMV phagemid vector를 분리하기 위해 숙주세포로 *E. coli* strain XL0LR과 ExAssist helper phage를 이용하여 *in vivo* excision을 시행하였다. 3차 immunoscreening을 통하여 완전히 분리된 phage stock 250 μ l에 OD₆₀₀=1.0인 XL1-Blue MRF'를 200 μ l 넣고 여기에 1 μ l의 ExAssist helper phage(>1×10⁶ pfu/ μ l)를 섞어서 37°C에서 15분간 배양한 후 3 ml의 NZY broth를 첨가하여 3시간 더 배양하였다. 그 후 70°C에서 20분간 처리한 후 1000×g에서 15분간 원심분리하여 상청액을 취한 뒤, 이 상청액 100 μ l에 200 μ l의 XL0LR(OD₆₀₀=1.0)을 넣고 15분간 37°C에서 배양 후 300 μ l의 NZY broth를 첨가하여 45분 더 배양하였다. 그 중 200 μ l를 LB-kanamycin agar plate(50 μ g/ml)에 spreading 후, 37°C에서 하룻밤 배양하여 생성된 colony를 다시 kanamycin(50 μ g/ml)이 첨가된 LB broth에서 배양하여 Plasmid DNA Miniprep Kit(BioAtoZ Inc., Korea)를 이용하여 plasmid를 추출한 후 제한효소 *Eco*R I 과 *Xho* I 으로 37°C에서 3시간 절단한 후 cDNA insert의 크기를 1% agarose gel상에서 전기영동하여 확인한 후, 이후 실험에 사용하였다.

다. DNA sequencing 및 분석

선별된 clone의 염기 배열은 Sanger등의 dideoxy nucleotide chain termination 방법을 이용한³⁶ Amersham Pharmacia biotech의 SEQ4×4 automatic sequencer(Canada)를 이용해 insert에 대해 5' 과 3' 양쪽 모두 각각 T3와 T7 primer를 이용하여 염기서열을 읽었다. 여기서 얻어진 염기 배열을 GenBank의 자료를 이용하여 간흡충 혹은 다른 생물체의 유전정보와 비교 분석하였다.

6. Western blotting

In vivo excision하여 insert가 포함된 pBK-CMV phagemid를 갖고 있는 XL0LR균주를 각각 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin과 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetracyclin이 첨가된 LB broth 5 ml에 접종하여 OD₆₀₀=0.5가 되도록 배양한 뒤, 각각 1 ml씩 새로운 tube에 넣은 후 IPTG를 최종 1 mM되게 첨가하여 37°C에서 4시간 더 배양하였다. 그후 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 pellet을 모은뒤 100 μl 의 1×SDS gel-loading buffer(50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM dithiothreitol, 2% (w/v) SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% (v/v) glycerol)를 혼합하여 100°C에서 3분간 가열한 후, 12-15% SDS-PAGE에 0.5-2.0 μl 씩 loading하여 120 V로 전기영동하였다. 전기영동후 젤을 transfer buffer(24 mM Tris base, 192 mM glycine, 20% methanol)에 적신 nitrocellulose membrane과 3MM Whatman paper를 이용하여 Hoefer Semiphor(Pharmacia Biotech, USA)로 15 V에서 30분간 단백질을 membrane으로 옮겼다. Blocking solution(3% skim milk in TBS, 0.05% sodium azide)에 membrane을 옮긴 후 4°C에서 하룻밤 차단시키고,

immunoscreening때와 동일한 방법으로 1, 2차 항체를 반응시켜 발색 반응을 보아 단백 분획을 확인하였다. 또한 분비배설항원을 면역시킨 흰쥐의 혈청의 경우 항체 생성이 잘 되었는가를 확인하고 이 분비배설항원이 간흡충에 실제로 존재하는가를 확인하기 위해 면역시켰던 분비배설항원과 간흡충 조추출물을 membrane으로 옮겨 항체를 반응시켜 발색 반응을 보아 단백 분획을 확인하였다.

7. Northern blotting

간흡충 성충에서의 total RNA의 분리는 easy-BLUE™ RNA Extration Kit(iNtRON, Korea)를 사용하였다. 분리된 total RNA 5.0 μ l에 10×MOPS electrophoresis buffer(0.2 M MOPS (pH 7.0), 20 mM sodium acetate, 10 mM EDTA (pH 8.0)) 2.3 μ l, formaldehyde 4.0 μ l, formamide 10.0 μ l, ethidium bromide(200 μ g/ml) 1.0 μ l를 microcentrifuge tube에 각각 넣은 후 55°C에서 60분간 열처리 후 10분간 얼음물에 담가두었다. 여기에 10× formaldehyde gel-loading buffer(50% glycerol, 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol FF)를 2.3 μ l 첨가한 후, 미리 만들어 놓은 2.2 M formaldehyde를 포함하는 1.5% agarose gel에 1×MOPS electrophoresis buffer를 gel이 잠기도록 부은 뒤 sample을 well에 넣었다. 5 V/cm으로 5시간 전기영동 시킨 후 UV illumination하에서 사진 촬영 후 transfer buffer(0.01 N NaOH, 3 M NaCl)에 20분간 gel을 담근 후, 모세관 현상을 이용하여 10×SSC(84.7 gm NaCl, 88.2 gm sodium citrate, pH 7.0 (HCl로), 1 L)에 5분간 담가두었던 NYTRAN-PLUS(Schleicher & Schuell, Germany) membrane으로 1시간

30분동안 옮겼다. 그 다음 membrane을 23°C에서 6×SSC 300 ml에서 5분간 서서히 흔들면서 씻어낸 후 prehybridization solution(0.5 M sodium phosphate (pH 7.2), 7% SDS, 1 mM EDTA (pH 7.0)) 15 ml에 68°C에서 2시간 rotation시키면서 반응시켰다. 사용할 probe를 만들기 위해 먼저 insert를 포함하는 plasmid를 제한효소 *EcoR* I, *Xho* I으로 3시간 처리후 1% agarose gel상에서 전기영동하여 위치를 확인하고 잘라내었다. 잘라낸 gel 조각을 UltraClean™ DNA Purification Kit(MO Bio, USA)를 이용하여 insert DNA를 정제한 뒤 Random Primer DNA Labeling Kit(TaKaRa biomedical, Japan)을 이용하여 [α - 32 P]dATP로 labeling하였다. 32 P로 표시된 probe를 끓는 물에 5분간 끓여 denature시킨 후, prehybridization solution에 넣고 65°C에서 16시간 동안 hybridization시켰다. 그 후 membrane을 200 ml의 1×SSC, 0.1% SDS 용액에서 10분간 상온에서 씻어낸 후 다시 200 ml의 0.5×SSC, 0.1% SDS 용액에서 10분간 68°C에서 3회 씻어내었다. 세척된 membrane은 -70°C에서 intensifying screen에서 X-ray film으로 24시간 감광시킨 후 현상하였다.

8. Southern blotting

간흡충 성충에서의 genomic DNA는 G-DEX™(iNtRON, Korea)을 이용하여 분리하였다. Genomic DNA를 각각 10 μ g씩을 제한효소 *EcoR* I, *Xho* I, *Hind*III로 완전하게 절단 후 0.8% agarose gel에 전기영동 하였다. 젤을 30분간 천천히 agitation 시키면서 alkaline transfer buffer(0.4 M NaOH, 1 M NaCl)에 담가두어 DNA를 denature시킨 후, Northern blotting때와 마찬가지로 준비된 NYTRAN-PLUS membrane에 alkaline

transfer buffer를 이용하여 12시간동안 옮긴 후 membrane을 neutralization buffer(0.5 M Tris-Cl pH 7.2, 1 M NaCl)에 15분간 담가 DNA를 고정시켰다. 그 후 membrane을 6×SSC에 세척 후 65°C에서 phosphate-SDS buffer(0.5 M sodium phosphate pH 7.2, 1 mM EDTA pH 8.0, 7% (w/v) SDS, 1% BSA)에서 prehybridization 시킨 후 Northern blotting 때와 마찬가지로 probe를 만들어 prehybridization solution에 넣고 65°C에서 16시간 동안 hybridization시켰다. 그 후 300 ml의 2×SSC, 0.5% SDS와 2×SSC, 0.1% SDS와 0.1×SSC, 0.1% SDS로 65°C에서 차례로 세척한 후 상온에서 0.1×SSC로 한번 더 세척하고, -70°C에서 하루동안 X-ray film에 감광 후 현상하였다.

9. Protein purification

발현 전문 vector인 pET-32b에 클로닝된 insert DNA를 ligation시킨 후, *E. coli* BL-21(DE3) strain에 transformation시키고 배양시켜 OD₆₀₀=0.6에서 IPTG가 0.2 mM되게 넣어준 후 22°C에서 overnight 배양시키고 Western blotting을 시행하였다. 1차 항체로는 Penta·His Antibody (QIAGEN, Germany)를 1:5,000으로 희석하였고 2차 항체로는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG(Sigma)를 1:2,000으로 희석하여 발색 반응을 관찰함으로써 insert를 포함하는 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 확인된 clone을 1,000 ml의 LB broth에서 OD₆₀₀=0.6까지 배양시키고 IPTG를 0.2 mM되게 첨가하여 22°C에서 12시간 배양한 뒤 6,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 얻은 침사 1 gm당 4 ml의 lysis buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole pH 8.0)을 넣어 잘 섞은 후

lysozyme을 1 mg/ml되게 넣고 얼음속에 30분간 놓아둔 후 sonication시키고 4°C, 10,000×g에서 20분간 원심분리 후 상청액을 분리했다. 분리된 상청액당 2 ml의 50% Ni-NTA Agarose(QIAGEN, Germany)를 넣고 4°C에서 1시간을 서서히 흔들어 주면서 놓아둔 후 column을 통과시켰다. Wash buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 8.0)로 2회 wash후 1 ml의 elution buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole pH 8.0)로 4회 elution하였다.

10. 혈청학적 진단에의 검증

정제된 단백질을 각 lane당 0.5 μ l씩 SDS gel loading buffer에 혼합하여 SDS-PAGE한 후 동일한 방법으로 Western blotting을 시행하였는데, 1차 항체로는 교실에 보관되어 있던 간흡충증 환자 혈청이나 폐흡충증 등의 기타 기생충증 환자 혈청을 1:200으로 희석하여 반응시켰고, 2차 항체는 1:4,000으로 희석하여 반응시켰다.

Ⅲ. 결 과

1. 간흡충 성충의 분비배설항원

간흡충의 분비배설항원이 포함된 배지를 5-20%의 gradient SDS-PAGE 한 결과 약 63 kDa, 27 kDa, 26 kDa, 21 kDa, 20 kDa, 19.5 kDa, 18.5 kDa 부위에 진한 band를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

2. 간흡충 cDNA library를 이용한 immunoscreening

간흡충증 환자 혈청을 가지고 약 2×10^5 개의 plaque를 immunoscreening한 결과 3차 screening까지 시행 후 양성반응을 보이는 2개의 clone을 최종적으로 선택하였다. 또 간흡충 분비배설항원중 21 kDa 부위를 면역시킨 흰쥐의 혈청을 가지고 약 1×10^5 개의 plaque를 3차 screening까지 시행한 결과 양성 반응을 보이는 4개의 clone을 최종적으로 선택하였다.

3. 재조합 항원 유전자의 분석과 검증

가. 재조합 항원 유전자의 염기서열 분석

선택된 clone을 *in vivo* excision한 후 DNA를 추출하여 T3, T7 primer를 이용하여 각각 5' 과 3' 부위로부터 DNA 염기서열 분석 결과 간흡충증 환자의 혈청으로 선별한 4개의 clone중 하나는 5' 쪽의 methionine부터

stop codon까지 265개의 amino acids를 encoding하는 795개 base pairs의 open reading frame(ORF)을 포함하였고, GGDAQPKSG의 9개 amino acids가 23회 반복하는 구조를 포함하고 있었다. Glycine의 상대적 비율이 높은 것을 고려하여 이 단백질의 이름을 GRCSP2(glycine rich *Clonorchis sinensis* protein 2)로 명명하였고 GenBank에 등록하였다(Accession number, AF461709). 다른 하나는 5' 쪽의 methionine부터 stop codon까지 269개의 amino acids를 encoding하는 807개 base pairs의 ORF을 포함하였고, GPDAPAPKSG의 10개 amino acids가 22회 반복하는 구조를 포함하고 있었다. Proline의 상대적 비율이 높은 것을 고려하여 이 단백질의 이름을 PRCSP(proline rich *Clonorchis sinensis* protein)로 명명하였고 GenBank에 등록하였다(Accession number, AF461711). 이렇게 반복되는 염기서열을 갖는 2개의 clone은 각각 기존에 알려진 CS44(GRCSP) antigen이나 CsPRA(proline rich antigen of *C. sinensis*)과 매우 유사하였다 (Fig. 2). 간흡충 분비배설항원중 21 kDa 부위를 면역시킨 흰쥐의 혈청을 가지고 선별한 4개의 clone은 모두 5' 쪽의 methionine부터 stop codon까지 150개의 amino acids를 encoding하는 450개 base pairs의 ORF을 포함하였다. Stop codon 뒤로 poly(A) tail까지 93개의 번역되지 않는 염기서열을 가지고 있었다 (Fig. 3). 판독한 염기서열 결과를 BLAST program을 이용하여 타 유전자와의 유사성을 비교해 본 결과 흡충류의 일종인 *Paramphistomum epiclitum* myoglobin(AF113510)과 *Isoparorchis hypselobagri* myoglobin(P80722)에 비교적 높은 유사성을 보였다. 따라서 이 단백을 *C. sinensis* myoglobin이라 하였고 GenBank에 등록하였다(Accession number, AF461710).

나. Western blotting

*E. coli*에서 발현되는 GRCSP2, PRCSP, *C. sinensis* myoglobin의 분자량을 알기 위해 IPTG induction 후 전기영동한 단백을 nitrocellulose membrane에 옮겨 immunoscreening 때와 동일한 방법으로 Western blotting을 시행한 결과 각각 48 kDa, 46 kDa, 24 kDa 부위에 반응 분획을 확인할 수 있었다 (Fig. 4A, B, C). 간흡충 분비배설항원 중 21 kDa 부위를 잘라 추출한 단백질을 면역한 흰쥐 혈청이 제대로 면역되었는지 확인하기 위해 간흡충 분비배설항원이 포함된 배지를 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 단백을 옮긴 후 21 kDa 부위 면역 흰쥐 혈청으로 Western blotting을 시행한 결과 20 kDa 부위에 반응 분획을 확인할 수 있었고 (Fig. 5A), 같은 조건으로 정상 흰쥐 혈청에는 반응하지 않는 것으로 보아 (Fig. 5B) 면역이 제대로 되었음을 알 수 있었다. 또 *C. sinensis* myoglobin이 간흡충 충체 내에 존재하는지 확인하기 위해 간흡충 조추출물을 마찬가지로 방법으로 21 kDa 부위 면역 흰쥐 혈청으로 Western blotting을 시행한 결과 20 kDa 부위에 반응 분획을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

다. Northern blotting

간흡충 cDNA library에서 선별해낸 clone의 insert가 간흡충 total RNA에서의 발현 여부와 크기를 알아보기 위해 GRCSP2, PRCSP, *C. sinensis* myoglobin의 insert gene을 이용하여 probe를 만들어 Northern blotting을 수행하였다. 이 결과 위의 유전자는 모두 간흡충 RNA에서 발현됨을 확인할 수 있었으며 그 크기는 각각 1.05 kb, 1.05 kb, 0.57 kb였다 (Fig. 7).

라. Southern blotting

간흡충 cDNA library에서 선별해낸 clone의 insert가 간흡충의 genomic

DNA상에서 발현 여부를 알아보기 위해 genomic DNA를 각각의 insert에는 절단 부위가 존재하지 않는 3개의 제한 효소인 *EcoR* I, *Xho* I, *Hind* III로 각각 절단하여 각 insert를 이용하여 제작한 probe로 hybridization한 결과 GRCSP2와 PRCSP 경우 같은 양상의 hybridization band가 관찰되었고 *EcoR* I, *Xho* I, *Hind* III로 절단한 genomic DNA상에서 각각 3개, 1개, 4개의 band를 관찰할 수 있었다 (Fig. 8A, B). *C. sinensis* myoglobin 경우 *EcoR* I, *Xho* I, *Hind* III로 절단한 genomic DNA상에서 각각 2개, 2개, 4개의 hybridized band를 관찰할 수 있었다 (Fig. 8C).

4. Protein purification

GRCSP2, PRCSP, *C. sinensis* myoglobin을 encoding하는 insert를 pET-32b vector로 옮겨 pET-32b vector만 들어 있을 때의 반응 분획과 비교하여 단백질의 발현 여부를 확인한 결과 GRCSP2와 PRCSP는 약간의 발현이 되었고, *C. sinensis* myoglobin 경우에는 과발현(overexpression)이 되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 9). Ni-NTA column을 이용하여 elution하여 insert가 발현된 단백질을 purification 하였다 (Fig. 10).

5. 혈청학적 진단에의 유용성 검증

GRCSP2와 CPCSP의 insert를 포함하는 protein을 purification한 것을 가지고 간흡충증 환자를 얼마나 잘 선별해 낼 수 있는지 민감도를 시험해보기 위해 간흡충증 환자 혈청을 이용하여 Western blotting을 시행하여 발색되는 단백 분획을 관찰하여 보고 (Fig. 11, Fig. 12), 간흡충과 교차반

응이 많다고 알려진 폐흡충, 요코가와 흡충등의 기타 기생충증 환자의 혈청을 이용하여 특이도도 시험해 본 결과 GRCSP2 경우 민감도는 93.3%였으며, 아무것도 감염되지 않은 정상인의 혈청과는 반응하지 않았고 폐흡충증이나 요코가와흡충증, 회충증 환자 혈청에서 일부 교차반응이 확인되었다. PRCSP 경우 민감도는 86.7%였고, 정상인의 혈청과는 반응하지 않았고 폐흡충증이나 요코가와흡충증, 회충증 환자 혈청에서 높은 비율의 교차반응이 확인되었고 그 밖에 스파르가눔증에서도 교차반응이 확인되었다 (Table. 1).

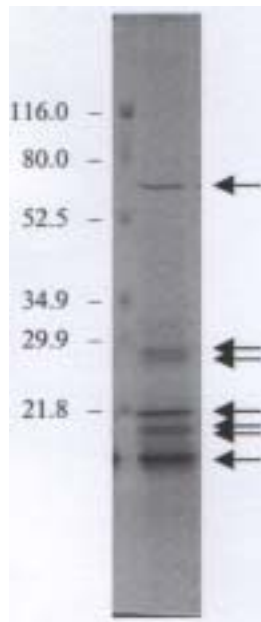


Fig. 1. 5-20% gradient SDS-PAGE of *C. sinensis* ES antigens. Protein bands of 63, 27, 26, 21, 20, 19.5, and 18.5 kDa were observed.

```

CS44 (GRCSF)  ATGAAGTTCCTGAAACTTGTATCATTTGAGCCCTCTTCTCAATGTTCTGTGTTTAGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGTGCAC
GRCSF2        ATGAAGTTCCTGAAACTTATTATCATTTGAGCCCTCTTCTCAATGTTCTGTGTTTAGAACGGCGGTGCACAACCTAAGTCAGGTGACGGCGTGCAC
PRCSF        ATGAAGTTCCTGAAACTTACTATCATTTGAGCCCTCTTCTCAATGTTCTGTGTTTAGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGTGCAC
CsPRA        AAACCTTACTATCATTTGAGCCCTCTTCTCAATGTTCTGTGTTTAGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGTGCAC
*****
CS44 (GRCSF)  AACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGTGCACAACCTCCTAA
GRCSF2        AA—CCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAA
PRCSF        CAGCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAA
CsPRA        CAGTTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAA
* ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
CS44 (GRCSF)  GTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
GRCSF2        GTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
PRCSF        GTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
CsPRA        GTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
CS44 (GRCSF)  GGCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
GRCSF2        GGCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
PRCSF        CCCGATGCACCAAGTTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCAC
CsPRA        CCCGATGCACCAAGTTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCAC
* ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
CS44 (GRCSF)  AACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAA
GRCSF2        AA—CCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAA
PRCSF        CAGCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAA
CsPRA        CAGTTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAA
* ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
CS44 (GRCSF)  GTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
GRCSF2        GTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
PRCSF        GTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
CsPRA        GTCAGGT
***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
CS44 (GRCSF)  GGCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
GRCSF2        GGCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGAC
PRCSF        CCCGATGCACCAAGTTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCAC
CsPRA        CCCGATGCACCAAGTTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTCCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCAC
* ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
CS44 (GRCSF)  AACCT-----CCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTC-----CTAAGT-----CAGGTG-----CTCAACGACCGTTTAGTCA
GRCSF2        AACCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTAAGTCAGGTAGTACAGGGAGCTCAACGATCGTTTAGTCA
PRCSF        CAGCT-----CCTAAGTCAGGTGACGGCGGTGCACAACCTAAGTCAGGTAGTACAGGGAGCTCAACGATCGTTTAGTCA
CsPRA        GGT-----AGTACAGGGAGCTCAACGATCGTTTAGTCA
* * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
CS44 (GRCSF)  CTGGATCGCTGTTGTTCTTGGTTCCCTGGAAGTCAAGGCCCTCCGATCACTTC
GRCSF2        CTGGATCGCTGTTGTTCTTGGTTCTTGGTTCCCTGGAAGTCAAGGCCCTCCGATCACTTC
PRCSF        CTGGATCGCTGTTGTTCTTGGTTCTTGGTTCCCTGGAAGTCAAGGCCCTCCGATCACTTC
CsPRA        CTGGATCGCTGTTGTTCTTGGTTCTTGGTTCCCTGGAAGTCAAGGCCCTCCGATCACTTC
*****

```

Fig. 2. Comparative analysis of several *C. sinensis* antigens including tandem repeats. A part having same DNA sequence for each other was marked as a sign(*).

```

-17 GCATTCTGTTTCGAGTATAATGGCACCCCTATCAAAAGACGAGGTGGACGCACTTTTTGAA 42
      M A P L S K D E V D A L F E
43 GAGCTGAACCCGTTGGTGAGTACCACTGAACAAAGGACTGAATTTGGAAAAGCAGTCTAC 102
      E L N P L V S T T E Q R T E F G K A V Y
103 ATGGCTCTGTTCTCAGCCTATCCGGAATACATCCAACCTTTTTACCAAGATGCAGGGACTG 162
      M A L F S A Y P E Y I Q L F T K M Q G L
163 ACGAAGGACAACGTCGAAGCCTCAGAGGGGATTAAGTACTACGGCCAGACCTTTGCAGAC 222
      T K D N V E A S E G I K Y Y G Q T F A D
223 TCCATCTTAGAAATGCTTCAGTGTGCTTCGGACGATGGCAAACCTGGAGGCCGTGTTGGAG 282
      S I L E M L Q C A S D D G K L E A V L E
283 AAAAGTGGCAAAGAGCACATTACTCGAAATGTAACAAAGCAGCAATTCCTGAGTGCCGAA 342
      K S G K E H I T R N V T K Q Q F L S A E
343 GAAGTCTTCATAAAGCATTTCAGCGGAGTGCTAACAAAAGAAGAGAACAACAGTCTATG 402
      E V F I K H F S G V L T K E E N K Q S M
403 GAAAGGTTTCTCAAACACATCGTGCCAAAAGTTGCCGGCTTTCTTGGCTAAATGTGTTCA 462
      E R F L K H I V P K V A G F L G *
463 CTGCCATGGAACCAATGAAACTCGACCATAATTCAAGTCAACTGCTTCACTTATCTTGA 502
503 AATAGACAACGCTTTTCTGACATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 545

```

Fig. 3. DNA sequences of *C. sinensis* myoglobin gene contained a single ORF encoding 150 amino acids.

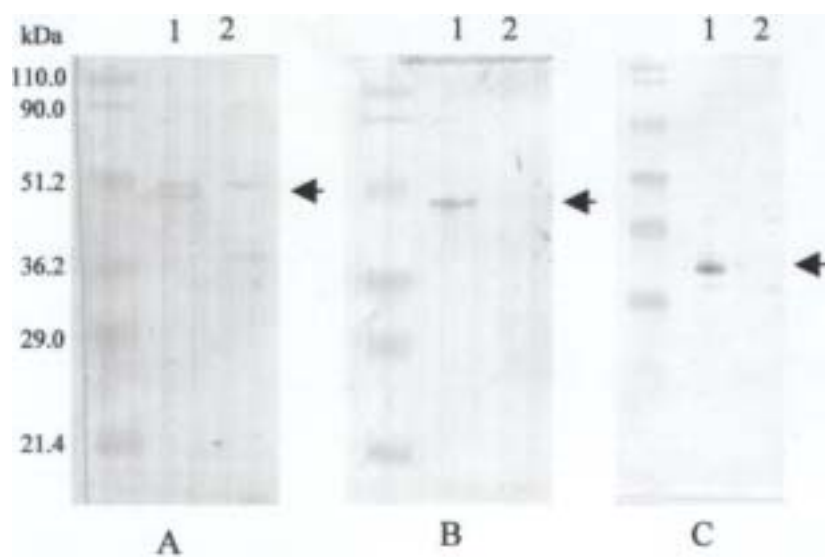


Fig. 4. IgG-immunoblot analysis of each recombinant protein with the same serum which was used for immunoscreening. (A) lane 1, GRCSP2 induced in *E. coli* XLOLR; lane 2, *E. coli* XLOLR; (B) lane 1, PRCSP induced in *E. coli* XLOLR; lane 2, *E. coli* XLOLR; (C) lane 1, *C. sinensis* myoglobin induced in *E. coli* XLOLR; lane 2, *E. coli* XLOLR.

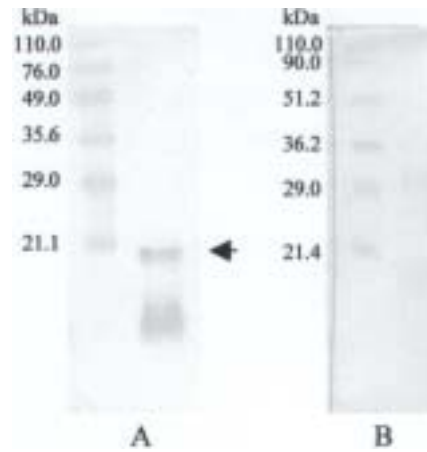


Fig. 5. IgG-immunoblot analysis of the ES antigens from *C. sinensis* with a immune rat serum(A) and a normal rat serum(B). ES antigens showed reactive band to a immune rat serum but not to a normal rat serum.

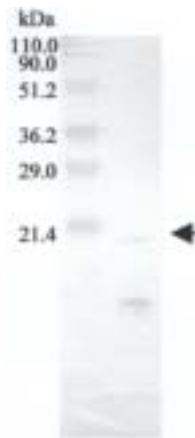


Fig. 6. IgG-immunoblot analysis of the crude extract from *C. sinensis* with a immune rat serum. The crude extract showed reactive band to a immune rat serum.

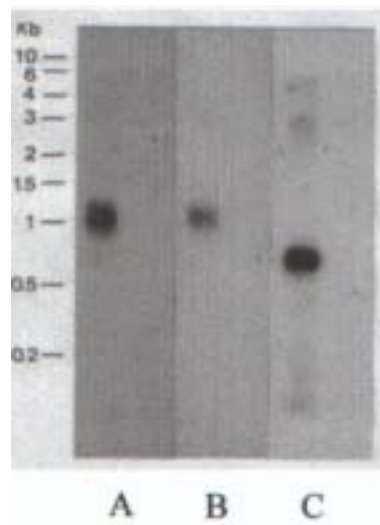


Fig. 7. Northern blotting. When total RNA from *C. sinensis* was hybridized to the GRCSP2 gene(A), the PRCSP gene(B), and *C. sinensis* myoglobin gene(C), a single band of 1.05 kb, 1.05 kb, and 0.57 kb was detected respectively.

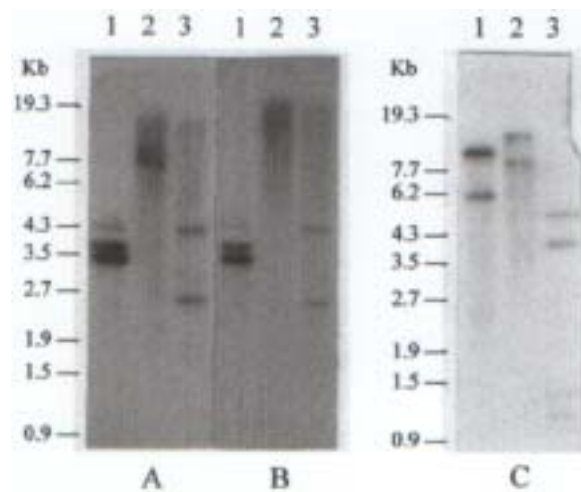


Fig. 8. Southern blotting. Restriction digests of genomic DNA using the enzymes *EcoR* I (lane 1), *Xho* I (lane 2), and *Hind*III (lane 3) from *C. sinensis* were performed and each lane was hybridized to the GRCSP2 gene(A), the PRCSP gene(B), and the *C. sinensis* myoglobin gene(C).

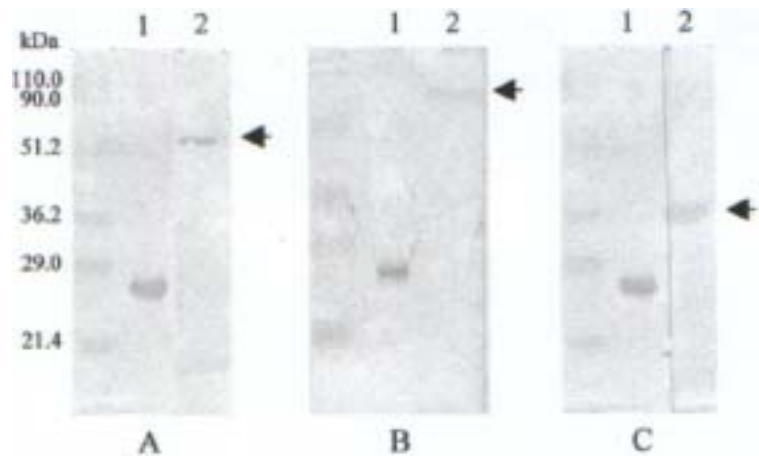


Fig. 9. IgG-immunoblot analysis of each protein with penta · His Antibody. Lane 1, only pET-32b transformed to BL-21(DE3); lane 2, GRCSP2 gene(A), PRCSP gene(B), and *C. sinensis* myoglobin gene(C) were ligated pET-32b and transformed to BL-21(DE3).

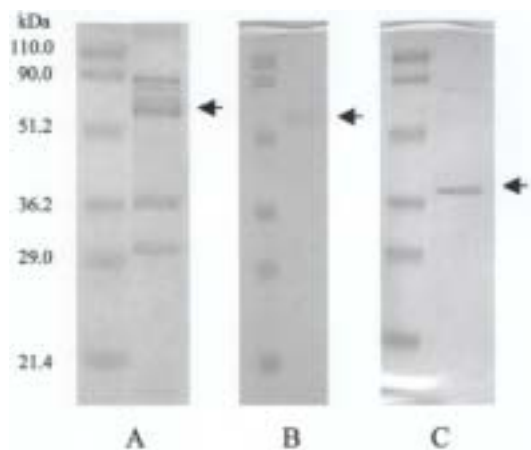


Fig. 10. Purification of recombinant GRCSP2(A), PRCSP(B), and *C. sinensis* myoglobin(C).



Fig. 11. IgG-immunoblot analysis of the purified recombinant GRCSP2 with normal human sera(lane 1, 2) and clonorchiasis human sera(lane 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).



Fig. 12. IgG-immunoblot analysis of the purified recombinant PRCSP with normal human sera(lane 1, 2) and clonorchiasis human sera(lane 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Table 1. Seroreactivity of GRCSP2 and PRCSP recombinant proteins to various helminth-infected patients' sera.

	GRCSP2		PRCSP	
	No. of sera	Positive sera(%)	No. of sera	Positive sera(%)
Clonorchiasis	15	14 (93.3%)	15	13 (86.7%)
Paragonimiasis	11	3 (27.3%)	11	10 (90.1%)
Metagonimiasis	5	1 (20.0%)	5	4 (80.0%)
Fascioliasis	1	0 (0.0%)	1	0 (0.0%)
Cysticercosis	7	0 (0.0%)	7	0 (0.0%)
Sparganosis	6	0 (0.0%)	6	2 (33.3%)
Ascariasis	2	1 (50.0%)	2	2(100.0%)
Toxocariasis	1	0 (0.0%)	1	0 (0.0%)
Filariasis	3	0 (0.0%)	3	0 (0.0%)
Normal control	4	0 (0.0%)	4	0 (0.0%)

IV. 고 찰

간흡충이나 분비배설항원에 대한 많은 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고 각 항원의 생화학적 특성이나 그 구체적인 역할을 연구하는 데는 한계가 있었다. 항원의 계속적인 연구 진행과 면역진단에의 응용을 위해서는 항원의 지속적인 분리와 정제가 필요한데, 이런 문제의 해결을 위해서는 재조합 유전자 기술의 도입으로 재조합 항원을 만드는 것이 필수적이다. 간흡충 분비배설항원의 경우 그 자체에 포함되어 있을 수 있는 단백질분해효소에 의해 분비배설항원 자체가 분해되어 정확한 항원 분획의 크기나 성질이 유지되지 못했을 수도 있어, 이의 해결을 위해 단백질분해효소 억제제를 배지에 첨가하여 실험하였다.

간흡충증 환자 혈청으로 간흡충 cDNA library를 immunoscreening하여 선별된 clone중 GRCSP2와 PRCSP는 각각 9개와 10개의 amino acids를 23회와 22회 반복되는 구조를 보였고 이는 그전에 간흡충 vitellaria에 존재하는 antigen으로 보고된 CS44(GRCSP)나 CsPRA와 매우 유사한 구조를 보였다. GRCSP2 경우 기존의 GRCSP와 반복되는 구조 중 8개의 amino acids가 모두 같았으나 배열 순서에 약간의 차이가 보였고, amino acids는 같으나 3번째의 염기서열이 차이가 나는 것이 1개 있었다. GRCSP 경우 10개의 amino acids가 반복적으로 나타나는 구조를 보여 GRCSP2보다 1개 더 많았으나 23회 반복한다는 점은 같았다. PRCSP 경우 기존의 CsPRA와 매우 유사하였는데 둘 다 10개의 amino acids가 반복되는 구조를 보였고 6번째 amino acids이 PRCSP 경우 A(GCT)였고, CsPRA 경우 V(GTT)라는 것을 제외하고는 반복 구조가 동일하였다. GRCSP2나 PRCSP, GRCSP, CsPRA 모두 반복되는 amino acids 구조에서 뒷부분의 4개는 PKSG로 모

두 동일하였다. 간흡충에서 이런 반복 구조의 차이가 개체변이의 결과인지 각기 다른 gene으로 존재하는 것인지는 정제된 단백질을 흰쥐에 면역시킨 혈청을 이용해 면역형광 항체법으로 충체내의 주요 항원 위치를 분석해 보고 또한 기능에 대한 연구를 좀 더 해 봐야 할 것이다. 아직까지 반복되는 염기서열 구조가 어떤 중요한 의의가 있는지는 확실히 규명되지 않았지만 이와 같은 항원내의 염기서열의 반복되는 구조는 다른 기생충의 항원을 encoding하는 유전자에서도 자주 볼 수 있다. 특히, *Plasmodium*의 circumsporozoite항원이나 *Trypanosoma cruzi*의 주요 표면항원을 encoding하는 유전자에는 이런 구조의 염기서열이 있어 구조적으로 매우 강한 항원성을 갖는다고 보고된 바 있다.³⁷⁻³⁸ 어떤 경우에는 이런 반복되는 염기서열의 역할이 항원의 특이한 3차 구조와 연관되어 설명되기도 한다. 특히, 말라리아의 경우에 circumsporozoite항원의 강한 항원성은 반복되는 epitope의 특이한 구조 때문이라고 보고된 바 있다.³⁹ 간흡충에서도 이런 반복 구조는 주요 항원으로 작용하고 있고 면역학적 진단방법에의 응용에 있어서도 유리하리라 생각된다.

간흡충 분비배설항원중 21 kDa 부위를 면역시킨 흰쥐의 혈청으로 immunoscreening해서 선별된 4개의 clone은 모두 5'의 methionine에서 stop codon까지 150개의 amino acids로 구성되는 같은 염기서열을 보여 주었고, 흡충류의 일종인 *Paramphistomum epiclitum* myoglobin과 유사성이 높았는데 *P. epiclitum* myoglobin gene도 start codon에서 stop codon까지 148개의 amino acids로 구성되어 매우 비슷한 크기임을 알 수 있었다. 재조합 GRCSP2, PRCSP, *C. sinensis* myoglobin에 대해 Western blotting을 시행해 본 결과 각각 48 kDa, 46 kDa, 24 kDa에서 반응 분획을 확인할 수 있었는데 이는 분자량으로 계산된 예상 크기인 34 kDa, 35 kDa, 21 kDa보다 다소 일치되지 않는 결과를 보여주었다. 이는 전기영동상에서의

이동에 있어서의 오차나 posttranslational modification 과정에 의한 것이라 사료된다. 전기영동상에서 특정 단백질이 계산된 분자량과 다른 이동을 보이는 것은 다른 기생충 단백질의 경우에서도 보고된 바가 많다. 특히 톡소포자충 단백질 중 dense granule protein의 경우에는 peptide로부터 계산된 분자량이 24 kDa인 반면 전기영동상에서는 32 kDa로 관찰되고 *Neospora caninum*의 NCDGI protein의 경우에도 계산된 분자량 23 kDa과 10 kDa이 차이나는 33 kDa의 단백질 분획이 전기영동상에서 관찰된다.⁴⁰⁻⁴¹

간흡충 분비배설항원 중 21 kDa 부위를 잘라 면역 시킨 흰쥐의 혈청으로 immunoscreening하여 얻은 *C. sinensis* myoglobin 경우 흰쥐가 제대로 면역되었는지 확인하기 위해 원래의 분비배설항원과 간흡충 조추출물에 Western blotting을 시행한 결과 비슷한 위치에 단백질 분획이 확인된 것으로 보아 잘 면역되었음을 알 수 있었다. 그 위치 아래쪽에도 반응하는 단백질 분획이 분포하는 데 이는 myoglobin이 일부 degradation된 결과라 사료된다. 이는 처음에 간흡충 분비배설항원을 면역시켰을 때 18.5 kDa 부위를 면역시켰던 흰쥐의 혈청으로 immunoscreening하여 선별됐던 clone에서도 거의 유사한 insert를 얻었던 것에서도 알 수 있다(data not shown).

GRCSP2 gene, PRCSP gene, *C. sinensis* myoglobin gene 모두 Northern blotting이나 Southern blotting상에서 hybridized band가 관찰되었고, 이는 각각의 gene이 모두 간흡충의 total RNA나 genomic DNA상에서 존재함을 알 수 있었다. GRCSP2와 PRCSP 경우 같은 양상의 hybridized band가 관찰되었는데 이는 둘간에 반복되는 염기서열 구조가 유사하여 probe가 specific하게 둘 사이를 구분하지 못한 결과일 가능성도 배제할 수는 없었다.

GRCSP2와 PRCSP 경우 purified protein을 가지고 간흡충증 및 여러 기생충증 환자 혈청을 이용하여 Western blotting을 시행하여 민감도와 특

이도를 검정해 본 결과 2가지 경우 모두 비교적 높은 간흡충증에의 민감도를 보였고 PRCSP 경우 다른 폐흡충증, 요코가와 흡충증, 회충증 환자 혈청에서 GRCSP2에 비해 높은 교차반응율을 보였다. 이는 이런 반복구조가 host에 강한 면역 반응을 유도하고 교차반응을 일으키는 데 중요한 역할을 할 것이라 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 분비배설항원을 면역한 흰쥐의 혈청과 간흡충증 환자 혈청을 이용한 immunoscreening을 통하여 3가지의 각기 다른 cDNA clone을 찾아 이 항원의 유전자 검색과 분석을 시행하고 purified protein을 만들어 혈청학적 진단에 이용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간흡충 분비배설항원 중 21 kDa 부위를 면역한 흰쥐의 혈청으로 immunoscreening하여 찾은 *C. sinensis* myoglobin은 150개의 amino acids를 encoding하는 450개 base pairs의 ORF을 포함하였다.

2. 간흡충증 환자 혈청으로 immunoscreening하여 찾은 GRCSP2 경우 265개의 amino acids를 encoding하는 795개 base pairs의 ORF을 포함하며 그 안에 9개의 amino acids가 23회 반복하는 구조를 이루고 있었고, PRCSP 경우 269개의 amino acids를 encoding하는 807개 base pairs의 ORF을 포함하며 그 안에 10개의 amino acids가 22회 반복하는 구조를 이루고 있었다.

3. 간흡충 total RNA에서의 발현과 크기를 알아보기 위해 Northern blotting을 수행한 결과 GRCSP2와 PRCSP는 각각 1.05 kb 부위에 *C. sinensis* myoglobin 경우 0.57 kb 부위에서 발현되는 것을 알 수 있었다.

4. Southern blotting을 수행한 결과 GRCSP2, PRCSP, *C. sinensis* myoglobin gene 모두 간흡충의 genomic DNA에 존재함을 보여주었다.

5. GRCSP2와 PRCSP를 protein purification하여 간흡충증 진단에의 민감도를 Western blotting으로 검사해 본 결과 각각 93.3%와 86.7%를 나타냈으며 폐흡충증, 요코가와흡충증, 회충증, 스파르가눔증의 환자 혈청에 교차반응을 보였고, 특히 PRCSP가 더 많은 교차반응을 나타냄을 확인하였다.

참고문헌

1. Rim HJ. Field investigation on epidemiology and control of fish-borne parasites in Korea. *Int J Food Sci Technol* 1998;33:157-68.
2. Seo BS, Lee SH, Cho SY, Chai JY, Hong ST. An epidemiologic study on clonorchiasis and metagonimiasis in riverside areas in Korea. *Korean J Parasitol* 1981;19:137-51.
3. Soh CT, Lee KT, Cho KM, Ahn YK, Kim SJ, Chung PR et al. Prevalence of clonorchiasis and metagonimiasis along rivers in Jeonra-Nam-Do, Korea. *Yonsei Rep Trop Med* 1976;7:3-16.
4. Korea Association of Health, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea. Prevalence of intestinal parasitic infections in Korea -The sixth report- 1997.
5. Rim HJ. Clonorchiasis. *CRC Handbook Series in Zoonoses, Section C, Parasitic Zoonoses, Vol III (Trematode Zoonoses)*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida; 1982. p.17-31.
6. Lim JH. Radiologic findings of clonorchiasis. *Am J Roentgenol* 1990; 155:1001-8.
7. Carpenter HA. Bacterial and parasitic cholangitis. *Mayo Clin Proc* 1998;73:473-8.
8. Kim YH. Eosinophilic cholecystitis in association with *Clonorchis sinensis* infection in the common bile duct. *Clin Radiol* 1999;54:552-4.
9. Liu LX, Harinasuta KT. Liver and intestinal flukes. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:627-36.

10. Parkin DM, Ohshima H, Srivatanakul P, Vatanasapt V. Cholangiocarcinoma: epidemiology, mechanisms of carcinogenesis and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993;2:537-44.
11. Chapman RW. Risk factor for biliary tract carcinogenesis. *Ann Oncol* 1999;10: Suppl 4:308-11.
12. Meier PN, Manns MP. Cholangiolar carcinoma. *Leber Magen Darm* 1994;24:234-8, 241.
13. Callea F, Sergi C, Fabbretti G, Brisigotti M, Cozzutto C, Medicina D. Precancerous lesions of the biliary tree. *J Surg Oncol Suppl* 1993;3:131-3.
14. Kim SH, Park YN, Yoon DS, Lee SJ, Noh TW. Composite neuroendocrine and adenocarcinoma of the common bile duct associated with *Clonorchis sinensis*: a case report. *Hepatogastroenterology* 2000;47:942-4.
15. Min DY, Soh CT. Elevation of specific IgE antibody in *Clonorchis sinensis* infection. *Korean J Parasitol* 1983;21:27-31.
16. Rim HJ. Clonorchiasis in Korea. *Korean J Parasitol* 1990;28 (Suppl):63-78.
17. Yong TS, Kim DS, Lee SY, Im KI, Lee KY. Detection of specific serum IgE in clonorchiasis cases and analysis of *Clonorchis sinensis* allergens. *Yonsei Med J* 1993;34:248-57.
18. Yong TS, Park SJ, Lee DH, Yang HJ, Lee J. Identification of IgE-reacting *Clonorchis sinensis* antigens. *Yonsei Med J* 1999; 40:178-83.
19. Hong ST, Kho WG, Lee MJ, Lee JS, Lee SH. Immunoblot patterns

- of clonorchiasis. Korean J Parasitol 1997;35:87-93.
20. Yang HJ, Park SJ, Im KI, Yong TS. Identification of a *Clonorchis sinensis* gene encoding a vitellaria antigenic protein containing repetitive sequences. Mol Biochem Parasitol 2000;111:213-6.
 21. Hong SJ, Seong KY, Sohn WM, Song KY. Molecular cloning and immunological characterization of phosphoglycerate kinase from *Clonorchis sinensis*. Mol Biochem Parasitol 2000;108:207-16.
 22. Kim TY, Kang SY, Ahn IY, Cho SY, Hong SJ. Molecular cloning and characterization of an antigenic protein with a repeating region from *Clonorchis sinensis*. Korean J Parasitol 2001;39:57-66.
 23. Santra A, Chowdhury A, Ghosh A, Mazumder DN. Development of an animal model of hepatic fibrosis by excretory-secretory antigen of *Ascaris suum*. Indian J Gastroenterol 2000;19:119-121.
 24. Cervi L, Rossi G, Masih DT. Potential role for excretory-secretory forms of glutathione-S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*. Parasitology 1999;119:627-33.
 25. Sadjjadi SM, Khosravi M, Mehrabani K, Orya A. Seroprevalence of *Toxoplasma* infection in school children in Shiraz, southern Iran. J Trop Pediatr 2000;46:327-30.
 26. Yamasaki H, Araki K, Lim PK, Zasmy N, Mak JW, Taib R et al. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. J Clin Microbiol 2000;38:1409-13.
 27. Carnevale S, Rodriguez MI, Santillan G, Labbe JH, Cabrera MG Bellegarde EJ et al. Immunodiagnosis of human fascioliasis by an

- enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and a micro-ELISA. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:174-7.
28. Auxiliadora Dea-Ayuela M, Bolas-Fernandez F. Dynamics of the IgG3 responses following immunization of BALB/c mice with somatic and excretory/secretory antigens from various *Trichinella* species. Folia Parasitol (Praha) 2000;47:172-80.
 29. Mehta VK, Lohar H, Banerjee GK, Reddy MV, Harinath BC. Surgical filariasis: immunoscreening for filarial IgG antibodies using *Wuchereria bancrofti* microfilarial excretory-secretory antigen. J Commun Dis 1999;31:35-40.
 30. D'Souza PE, Hafeez M. Detection of *Taenia solium* cysticercosis in pigs by ELISA with an excretory-secretory antigen. Vet Res Commun 1999;23:293-8.
 31. Chung YY, Ko RC. A novel cDNA clone encoding a specific excretory/secretory antigen of larval *Trichinella pseudospiralis*. Parasitol Res 1999;85:685-91.
 32. Kim SI. Immune reactions between excretory-secretory antigens and specific antibodies of *Clonorchis sinensis* before and after praziquantel treatment in experimentally infected rabbits. Korean J Parasitol 1994;32:35-42.
 33. Kim SI. A *Clonorchis sinensis*-specific antigen that detects active human clonorchiasis. Korean J Parasitol 1998;36:37-45.
 34. Cho KM, Soh CT. Indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of paragonimiasis and clonorchiasis. Yonsei Rep Trop Med 1976;7:26-39.

35. Yong TS, Im KI, Chung PR. Analysis of *Clonorchis sinensis* antigens and diagnosis of clonorchiasis using monoclonal antibodies. Korean J Parasitol 1991;29:293-310.
36. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463-5467.
37. Dane JB, Williams JL, McCutchan TF. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Science 1984;225:595-599.
38. Peterson DS, Wrightsman RA, Manning JE. Cloning of a major surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. Nature 1986;322:566-569.
39. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. Cell 1985;42:401-403.
40. Lecordier L, Moleon-Bopodowsky I, Dubremetz JF. Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA 6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. Mol Biochem Parasitol 1995;70:85-94.
41. Lally NC, Jenkins MC, Liddell S, Dubey JP. A dense granule protein (NCDG1) from *Neospora caninum*. Mol Biochem Parasitol 1997;87:239-243.

Abstract

Molecular cloning of *Clonorchis sinensis* antigenic proteins and serodiagnosis using recombinant antigens

Seobo Sim

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Tai-Soon Yong)

Clonorchis sinensis adult worms obtained from the biliary tract of an experimentally infected rabbit were suspended in RPMI including a protease inhibitor cocktail in order to obtain *C. sinensis* excretory-secretory(ES) antigens. A *C. sinensis* cDNA library was screened with immune rat sera which were immunized with the 21 kDa protein of ES antigens and also screened with *C. sinensis*-infected human sera. Two clones were isolated by using *C. sinensis*-infected human sera. The cDNA insert of one clone contained a single open reading frame(ORF) of 795 base pairs encoding for 265 amino acids including 23 tandem repeats of 9 amino acids. Because glycine was a major component in its content, the protein was named GRCSP2(GenBank Accession number AF 461709). The cDNA insert of the other contained a single ORF of 807 base pairs encoding for 269 amino acids including 22 tandem repeats of 10 amino acids. Because proline was a major component in its content, the protein was named

PRCSP(GenBank Accession number AF 461711). Four clones were isolated by using the immune rat sera against 21 kDa protein of ES antigens. The cDNA inserts of four clones were very similar and contained a single ORF of 450 base pairs encoding 150 amino acids. Using BLAST program, we could find significant similarity between the cloned gene and a trematode myoglobin gene such as *Paramphistomum epiclitum*, so the protein was named *C. sinensis* myoglobin(GenBank Accession number AF 461710). Northern blotting was performed to examine the expression of the cloned gene in *C. sinensis*. When total RNA from *C. sinensis* was hybridized to the GRCSP2 gene, PRCSP gene, and *C. sinensis* myoglobin gene, a single band of 1.05 kb, 1.05 kb, and 0.57 kb was detected respectively. The results of Southern blot hybridization indicated that each cloned gene was present within the *C. sinensis* genome. Purified recombinant GRCSP2 and PRCSP showed high sensitivity for serodiagnosis, 93.3% and 86.7%, respectively. But the cross-reactivity of each recombinant protein was found against paragonimiasis, metagonimiasis, ascariasis, and sparganosis patients' sera. The rate of cross-reactivity using purified recombinant PRCSP was more higher than that using purified recombinant GRSCP2.

Key Words : *Clonorchis sinensis*, cDNA library, excretory-secretory antigen, repetitive sequence, myoglobin, recombinant antigen, serodiagnosis