

## Detection of Botulinum Neurotoxin Type A by *In Vitro* Bioassay Based on Endopeptidase Activity

Yun Jeong Kim, Joung Hee Baek, Jeong-Hee Kim, Bong Su Kim, Gi-eun Rhie,  
Cheon-Kwon Yoo and Na-Ri Shin\*

Division of High-risk Pathogen Research, Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, Seoul, Korea

Botulinum neurotoxin type A (BoNT/A) is a metalloprotease that cleaves SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa), a specific cellular protein essential for neurotransmitter release. As well as mouse bioassay to detect BoNT/A, various assay methods based on its endopeptidase activity have been developed. In this study, we tried to develop a BoNT/A assay system using recombinant SNAP-25 with glutathione S-transferase (GST) tags at both termini as substrate. The recombinant GST-SNAP-25-GST with 70 kDa was expressed and purified in *E. coli* and synthesized N-terminal 50 kDa and C-terminal 25 kDa fragment after cleavage at the Gln<sub>197</sub>-Arg<sub>198</sub> bond by BoNT/A. To detect both fragments, we obtained rabbit antisera against peptides corresponding to the cleaved ends of each fragment. In the western blotting, the N-terminal fragment was detected by the antibody specifically recognizing the newly exposed C-terminus (corresponding to amino acid residue 191-197). This assay system was able to detect until 3.125 ng of BoNT/A, which corresponded to about 90 fold LD<sub>50</sub> in mice. These results suggest that the *in vitro* endopeptidase assay developed in this study would replace others to detect BoNT/A.

**Key Words:** Botulinum neurotoxin type A, SNAP-25, Endopeptidase assay

### 서 론

보툴리눔 독소 (botulinum neurotoxin, BoNT)는 절대 혐기성 세균인 *Clostridium botulinum*에서 생성되는 신경독소로 A-G의 7가지 혈청형으로 구분되며, 이 중 A, B, E 및 F 독소만이 사람에게 보툴리눔 독소증 (botulism)을 일으킨다. 보툴리눔 독소가 사람에게 노출될 경우 안면 마비, 구토, 복통, 설사 등을 유발하며, 중증의 경우 호흡근 마비로 인한 호흡장애를 유발하여 사망에 이르게 할 수 있다 (1). 보툴리눔 독소증은 자연적으로 *C. botulinum*

포자가 발아하여 생성된 독소에 오염된 음식을 섭취함으로써 발생하며, 전쟁이나 생물테러 발생시 인위적으로 공기 중에 분사한 보툴리눔 독소를 흡입함으로써 야기될 수도 있다. 보툴리눔 독소는 자연계에서 생성되는 독소 중 가장 강력한 독성을 지니고 있을 뿐만 아니라 심각한 사회적 파급효과를 야기할 수 있는 특성으로 인해 미국질병통제센터 (Centers for Disease Control and Prevention, USA)에서 생물테러 기능물질 category A로 분류하여 국가에서 강력한 통제를 하고 있으며, 이는 결과적으로 군주 및 실험재료 수급에 문제점을 야기하여 보툴리눔 관련 연구에 제한적 요소로 작용하고 있다 (2).

보툴리눔 독소는 100 kDa의 heavy chain과 50 kDa의 light chain으로 구성되어 있으며, 이를 둘러싼 accessory protein과 함께 대략 900 kDa의 복합체를 형성하고 있다 (3). Heavy chain은 콜린성 신경세포의 수용체에 특이적으로 결합하는 50 kDa의 C-terminal domain (H<sub>C</sub>)과 membrane translocation을 유도하는 50 kDa의 N-terminal domain (H<sub>N</sub>)으로 구성된다. Light chain은 zinc-endopeptidase로서 신경

Received: November 10, 2009/ Revised: December 29, 2009

Accepted: January 6, 2010

\*Corresponding author: Na-Ri Shin. Division of High-risk Pathogen Research, Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, 5-Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-701, Korea.  
Phone: +82-2-380-2123, Fax: +82-2-380-1487

e-mail: shinnari1@hanmail.net

\*\*This study was financially supported by intramural grant from Control Disease Center, Korea (Project No. 06-BT감염-1).

전달물질인 아세틸콜린을 시냅스 말단으로부터 근육신경으로 분비하는데 관여하는 vesicle-associated membrane protein (VAMP), 25 kDa의 synaptosome-associated protein (SNAP), 혹은 syntaxin을 분해함으로써 독소작용을 유발하며 (4, 5), 표적 펩타이드의 종류 및 표적 부위는 독소형에 따라 각각 다른 것으로 보고되었다. 보툴리눔 A, C 및 E형 독소는 공통적으로 SNAP-25를 target peptide로 인식하여 작용하며, 보툴리눔 A형 독소는 SNAP-25<sub>197-198</sub> 부위에, 보툴리눔 E형 독소는 SNAP-25<sub>180-181</sub> 위치에, 보툴리눔 C형 독소는 SNAP-25<sub>198-199</sub> 부위 및 syntaxin A1에 작용한다 (6). 보툴리눔 B, D, F 및 G는 VAMP의 서로 다른 amino acid를 각각 절단하는 것으로 보고되었다 (7).

보툴리눔 독소증은 전세계적으로 발생률이 높지는 않으나, 발생이 지속적으로 보고되고 있다. 국내의 경우 2003년 대구에서 3명의 보툴리눔 독소증 A형 환자가 처음 보고된 이래로 현재까지 B형 보툴리눔 독소증 환자 1명, 보툴리눔 독소증 의사 환자 4명이 추가로 발생하는 등 보툴리눔 독소증 환자가 산발적으로 발생하고 있어 이에 대한 신속한 진단 및 치료에 관심이 집중되고 있다 (8, 9). 현재 국내에서는 보툴리눔 독소증의 실험실 진단을 위하여 국제적 표준법으로 사용되고 있는 mouse bioassay법을 적용하고 있다 (10). Mouse bioassay는 민감도 및 특이도가 높아 현재까지 전세계적으로 사용해 오고 있으나 진단 결과가 나오기까지 최소 4일이 소요되며 높은 비용과 많은 동물의 희생을 요구한다는 단점을 지니고 있다 (11). 이러한 단점들을 보완하기 위해서 보툴리눔 독소 탐색을 위한 새로운 기법들이 지속적으로 연구되고 있으며, 그 중 독소의 구조적 특성 및 단백질 분해 효소 활성에 중점을 둔 기능적 특성을 바탕으로 한 연구가 mouse bioassay를 대체할 수 있는 가능성이 있는 분야로 관심을 받고 있다. 독소의 구조적 특성을 이용한 기법으로는 specific epitope 혹은 ligand binding sites를 이용하며, toxin-specific antibody를 이용한 ELISA, time-resolved fluorescence (TRF), surface plasmon resonance, electro-chemiluminescence (ECL), immuno-PCR, color-coded bead arrays 및 ligand sandwiches 등의 다양한 방법이 있다 (12, 13). 또한 보툴리눔 독소의 효소 활성을 이용한 경우에는 보툴리눔 독소가 혈청형마다 가지고 있는 독특한 펩타이드 서열 특이성 (peptide sequence specificity)을 활용하여 보툴리눔 독소에 의해 효과적으로 분해되는 합성 펩타이드들을 이용한 fluorescence resonance energy

transfer (FRET), mass spectrometry 등이 연구되고 있다 (14).

따라서 본 연구에서는 BoNT/A의 양 말단에 glutathione S-transferase (GST) tag를 결합시킨 재조합 GST-SNAP-25-GST 단백질을 표적물질로 제작하고 SNAP-25의 BoNT/A에 의해 절단된 부위에 특이적으로 결합하는 토끼유래 항혈청을 준비하여 BoNT/A를 탐지하는 endopeptidase assay법을 개발하였으며, endopeptidase assay법의 BoNT/A 검출한계값을 독소 생물활성도와 비교함으로써 향후 보툴리눔 독소증 진단을 위한 *in vitro* 시험법으로서의 적용 가능성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 보툴리눔 A형 독소 (BoNT/A)의 준비

BoNT/A는 Wako (Osaka, Japan)사로부터 구입하여 사용하였으며, 독소 단백질은 10% SDS-PAGE 및 Western blot을 통해 확인하였다. BoNT/A의 생물활성도는  $2.0 \times 10^7$  mouse i.p. LD<sub>50</sub>/mg이었으며, 0.05 M acetate-0.2 M NaCl (pH 6.0) buffer에 보관하여 사용하였다.

### SNAP-25 유전자의 클로닝

BoNT/A의 cleavage site가 포함된 SNAP-25 유전자 (GenBank accession no. NM\_011428)를 증폭하기 위하여 이에 대한 특이적인 forward primer (5'-TATGGCCGAGG-ACGCAGACATGC)와 reverse primer (5'-GACCACTTCC-CAGCATGCGTGTTGC)를 제작하여 PCR을 수행하였다 (Bioneer, Daejeon, Korea). 먼저, 1 µl mouse cDNA library (1 µg/µl) (Takara, Otsu, Japan), 0.1 µl LA Taq DNA polymerase (5 U/µl) (Takara), 2.5 µl 10× enzyme reaction buffer, 10 mM의 dNTP mix, 2.5 µl의 MgCl<sub>2</sub> 및 각 10 pmol의 primer set를 첨가하여 총 25 µl가 되도록 혼합액을 제조하였으며, PCR 반응은 94°C에서 5분간 처리 후, 94°C에서 45초, 65°C에서 45초, 72°C에서 1분의 과정을 30회 반복한 다음, 72°C에서 7분을 처리하는 조건으로 수행하였다. 증폭된 유전자는 1.5% agarose gel에서 621 bp의 크기를 확인하고 PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 정제한 후, pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)의 multicloning site에 삽입하여 *E. coli* DH5α competent cell (DonginBiotech, Seoul, Korea)에 형질전환시켰다. SNAP-25 유전자의 삽입 여부는 pGEM/SNAP-25를 *EcoRI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)과 *PstI*

(New England Biolabs)로 처리하거나, ABI prism BigDye terminator cycles sequencing ready reaction kit (ABI, Foster, CA, USA) 및 ABI prism 3100 genetic analyzer (ABI)를 이용한 염기서열 분석을 통해 확인하였다.

#### GST-SNAP-25-GST tagging

SNAP-25 유전자의 GST tagging은 Gateway® Technology system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 pGEX-2T vector를 이용하여 수행하였다. 즉, pGEM/SNAP-25 플라스미드에 *SpeI* (New England Biolabs), Klenow fragment (New England Biolabs) 및 *EcoRI*를 단계적으로 처리하여 SNAP-25 DNA 절편을 추출한 후, pENTR™1A vector의 *EcoRI*과 *EcoRV* (New England Biolabs) 절단 부위에 삽입하여 pENTR™1A/SNAP-25을 제조하였으며, 이 과정은 *Bg/III* (New England Biolabs)와 *EcoRI*를 처리하여 확인하였다. SNAP-25 유전자의 C 말단에 GST tag를 결합시키기 위하여 pENTR™1A/SNAP-25의 유전자 절편을 Gateway® Technology system의 LR clonase를 이용하여 pDEST™24 vector에 재조합하였으며, 유전자 삽입 여부는 *Bg/III*로 처리하여 확인하였다. 이 플라스미드 pDEST™24/SNAP-25를 다시 *EcoRI*으로 처리한 후 SNAP-25-GST 절편을 pGEX-2T vector (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)의 동일한 제한효소 인식부위로 전달하여 SNAP-25의 양 말단에 GST tag가 결합한 발현 벡터 pGEX-2T/SNAP-25를 완성하였다. 최종적으로 재조합 pGEX-2T/SNAP-25 벡터를 Rossetta™(DE3) pLysS competent cell (Novagen, Madison, WI, USA)에 형질전환하여 GST-SNAP-25-GST를 발현하는 균주를 획득하였으며, 이는 *BamHI*을 처리하여 확인하였다.

#### 재조합 GST-SNAP-25-GST 단백질의 정제

재조합 GST-SNAP-25-GST 단백질은 pGEX-2T/SNAP-25로 형질전환된 *E. coli* Rossetta™(DE3) pLysS strain 배양액으로부터 정제하여 준비하였다. 즉, 형질전환된 *E. coli*를 0.1 mM IPTG, ampicillin (100 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) 및 chloramphenicol (34 µg/ml, Sigma)이 포함된 LB broth에서 30°C, 180 rpm의 조건으로 약 4시간 진탕배양한 후, 3,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 세균 침전물을 회수하였다. 침전물은 RIPA buffer (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% NP40, 10% glycerol, pH 7.5) 5 ml에 부유시켜 3분간 초음파로 파쇄한 후, 12,000

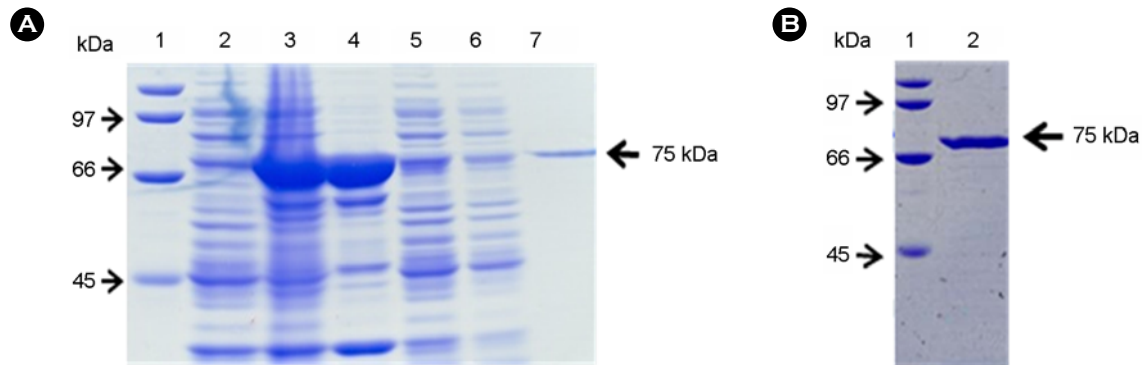


**Figure 1.** The schematic description of SNAP-25 sequence tagged with glutathione S-transferase (GST) at both termini. The number of amino acid residues corresponds to the sequence from native mouse SNAP-25. The peptide bond site of SNAP-25 cleaved by BoNT/A is between G<sub>197</sub>-A<sub>198</sub> as indicated in the SNAP-25. Two black boxes indicate the amino acid sequences of peptides synthesized to produce rabbit antisera.

rpm, 4°C의 조건에서 20분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 원심상층액은 단백질 농도 1 mg/ml가 되도록 binding buffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.1% NP40, 10% glycerol, pH 7.5)로 희석하여 glutathione agarose bead (20 µl/1 mg protein) (Invitrogen)와 혼합한 다음, 병상에서 2시간 반응시켰다. Agarose에 결합한 단백질은 glutathione elution buffer (10 mM reduced glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 이용하여 분리하였으며, 투석을 통해 분리 단백질의 buffer를 toxin assay buffer (50 mM HEPES, 2 mM DTT 및 20 µM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7.4)로 교환하였다. 투석액은 농축하여 BCA™ protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)로 단백질량을 결정하였으며, 10% SDS-PAGE gel에 전기영동하여 발현 단백질을 확인하였다.

#### 재조합 SNAP-25의 cleavage site에 대한 특이항체 제작

SNAP-25의 BoNT/A-specific cleavage site에 대한 특이항체를 생산하기 위하여 BoNT/A의 표적 부위인 SNAP-25<sub>191-197</sub> (CRIDEANQ) 및 SNAP-25<sub>198-204</sub> (RATKMLG)에 대하여 각각 8개의 아미노산으로 구성된 두 개의 펩타이드를 합성하였으며 (밑줄 표시는 SNAP-25 단백질 서열에서 변환 (T<sub>190</sub>→C) 혹은 첨가 (G<sub>204</sub>C)된 아미노산 잔기를 의미한다) (Fig. 1), Peptron사 (Daejeon, Korea)에 각 합성 펩타이드에 대한 토끼 항혈청 생산을 의뢰하였다. 항혈청은 각 펩타이드당 두 마리의 토끼를 사용하여 생산하였으며, SNAP-25<sub>191-197</sub>에 대한 항혈청을 각각 CRI-R1과 CRI-R2, SNAP-25<sub>198-204</sub>에 대한 항혈청을 각각 RAT-R1과 RAT-R2라 명명하였다. 제조한 토끼 항혈청들의 각 펩타이드에 대한 반응 여부는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하여 확인하였다. 즉, 각 펩타이드를 0.1 µg/ml이 되도록 coating buffer (0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)에 희석한 후, 96-well ELISA plate에 well당 100 µl



**Figure 2.** The recombinant GST-SNAP-25-GST proteins in the expression and purification steps. **(A)** Samples from the each step were separated on 10% SDS-PAGE gel and visualized with Coomassie blue staining. Lane 1, protein markers; lane 2, transformed *E. coli* before IPTG induction; lane 3, transformed *E. coli* after IPTG induction for 4 h; lane 4, a sonicated bacterial pellet; lane 5, input sample for glutathione affinity; lane 6, flow-through in glutathione affinity; lane 7, GST-SNAP-25-GST purified with glutathione bead. **(B)** The purity of recombinant GST-SNAP-25-GST was confirmed by SDS-PAGE. Recombinant GST-SNAP-25-GST purified with glutathione bead was buffer-changed by dialysis and concentrated. Lane 1, protein markers; lane 2, the final product of recombinant GST-SNAP-25-GST purified from culture supernatant of transformed *E. coli*.

씩 분주하고 4℃에서 하룻밤 방치하여 coating하였다. 각 well을 tween 20이 첨가된 PBS (tween 20-PBS)로 3회 세척하였으며, 1% BSA (200 µl/well)를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 2배씩 단계 희석한 각 항혈청 및 5,000 배 희석된 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG (Sigma)를 순서대로 100 µl/well씩 분주하여 37℃에서 1시간 반응시킨 다음, 0.4% OPD (Sigma)를 이용하여 30분간 발색시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Endopeptidase assay 및 검출한계값 측정

Endopeptidase assay는 BoNT/A로 절단한 SNAP-25를 위에서 제조한 토끼 항혈청과 반응시켜 수행하였으며, SDS-PAGE 및 Western blot법을 이용하여 탐지하였다. 즉, 먼저 360 µg의 BoNT/A를 toxin reduction buffer (50 mM HEPES, 10 mM DTT, 1 mM NaCl 및 20 µM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7.4)와 1:1 (v:v)로 혼합하여 37℃에서 30분간 환원시킨 후, 환원된 BoNT/A에 GST-SNAP-25-GST를 최종 농도 40 µM이 되도록 첨가하고 toxin assay buffer (50 mM HEPES, 20 mM DTT 및 20 µM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7.4)로 총 10 µl를 맞춘 다음 37℃에서 4시간 반응시켰다. 반응시킨 혼합물은 SDS-PAGE에서 분리하여 nitrocellulose membrane에 옮긴 다음, 항혈청 CRI-R1 (1:500)과 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG (1:1,000)를 순차적으로 각각 2시간 동안 결합시킨 후 NBT-BCIP로 발색하였다. BoNT/A에 대한 검출한계값 (detection limit)은 환원된 BoNT/A를 2배씩 단계 희석하여 endopeptidase assay를 위와 동일한

방법으로 수행함으로써 결정되었으며, 그 결과값은 독소의 제시된 마우스 생물활성도 값에 대입하여 LD<sub>50</sub> 값으로 환산되었다.

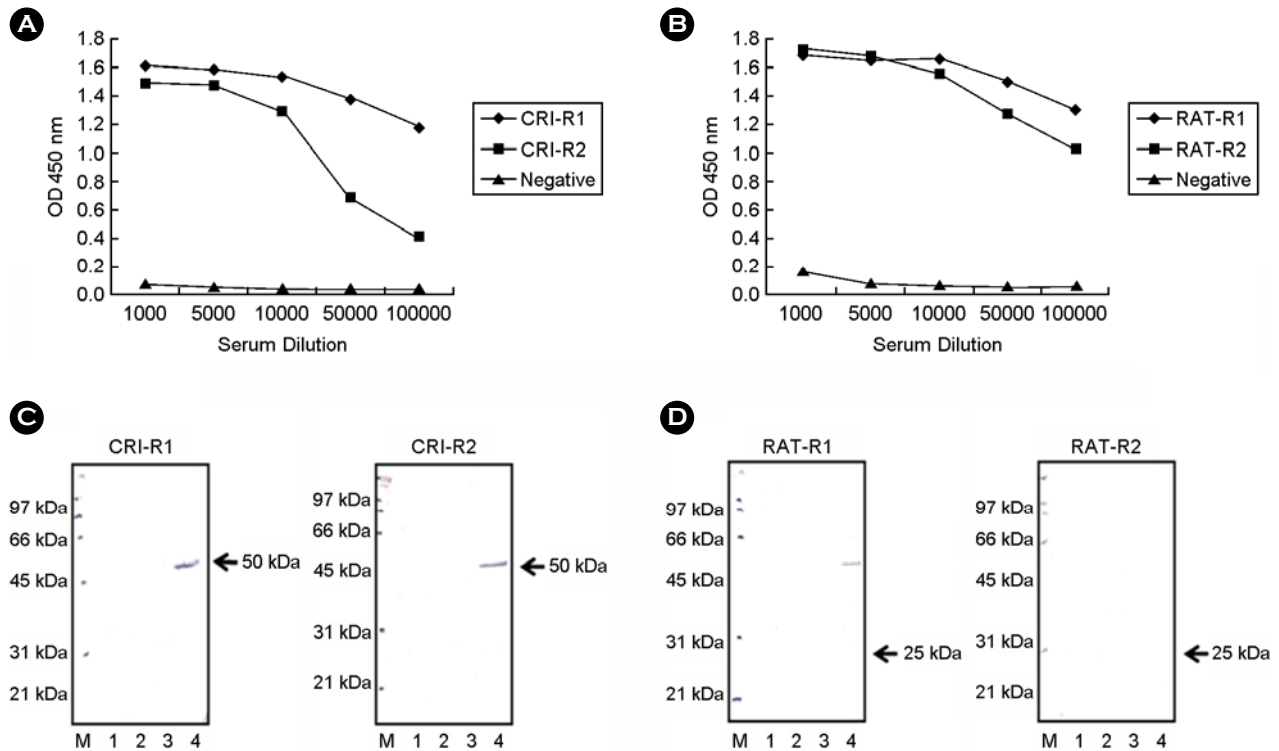
## 결 과

### 재조합 GST-SNAP-25-GST 단백질의 발현

보툴리눔 A형 독소에 대한 기질을 확보하기 위하여 양말단에 GST tag이 결합된 재조합 SNAP-25 단백질 (GST-SNAP-25-GST)을 발현하는 pGEX-2T 벡터를 제작하였다. 이 벡터로 형질전환된 *E. coli*를 IPTG로 induction한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과, 약 75 kDa 분자량의 단백질이 측정되었으며 glutathione agarose bead에 의해 분리되는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이 재조합 단백질은 본 실험의 조건을 통해 *E. coli* 배양액 1 L당 약 15 mg이 회수되었으며, Western blot 분석에서 SNAP-25 펩타이드에 대한 특이 항혈청과 반응하였다 (Fig. 3 및 4).

### SNAP-25의 BoNT/A-specific cleavage site에 대한 특이항체 제작

SNAP-25의 BoNT/A에 의해 절단되는 peptide 결합 (Q<sub>197</sub>R<sub>198</sub>) 부근의 각 단백질 절편의 아미노산 서열을 인식하는 항혈청을 제조하기 위하여 두 개의 펩타이드 (SNAP-25<sub>191-197</sub> 및 SNAP-25<sub>198-204</sub>)를 제작한 후 (Fig. 1), 각각 2마리의 토끼로부터 이에 대한 항혈청을 확보하였다. 제조한 각각의 항혈청은 ELISA로 평가하였으며, 그 결



**Figure 3.** Efficacy measurement of anti-SNAP-25 antisera. The antisera were raised against peptides around newly exposed termini of the SNAP-25 fragments cleaved by BoNT/A from rabbits. **(A)** ELISA analysis of CRI-R1 and CRI-R2 antisera. These antisera were raised against peptides around newly exposed terminus of N-terminal SNAP-25 fragment by toxin. **(B)** ELISA analysis of RAT-R1 and RAT-R2 antisera. These antisera were raised against peptides around newly exposed terminus of C-terminal SNAP-25 fragment by toxin. Western blot analysis with CRI-R1 and CRI-R2 **(C)** and RAT-R1 and RAT-R2 **(D)** antisera after endopeptidase assay. Forty micromoles of GST-SNAP-25-GST were reacted with 360  $\mu$ g of BoNT/A in 10  $\mu$ l for 4 h at 37°C, separated in 10% SDS-PAGE, and analyzed by western blotting with sera. The antisera detected about 50 kDa N-terminal fragment of SNAP-25 cleaved by active BoNT/A. GST (3  $\mu$ g) was used as a negative control. Lane M, protein markers; lane 1, GST only; lane 2, GST reacted with BoNT/A; lane 3, GST-SNAP-25-GST only; Lane 4, GST-SNAP-25-GST reacted with BoNT/A.

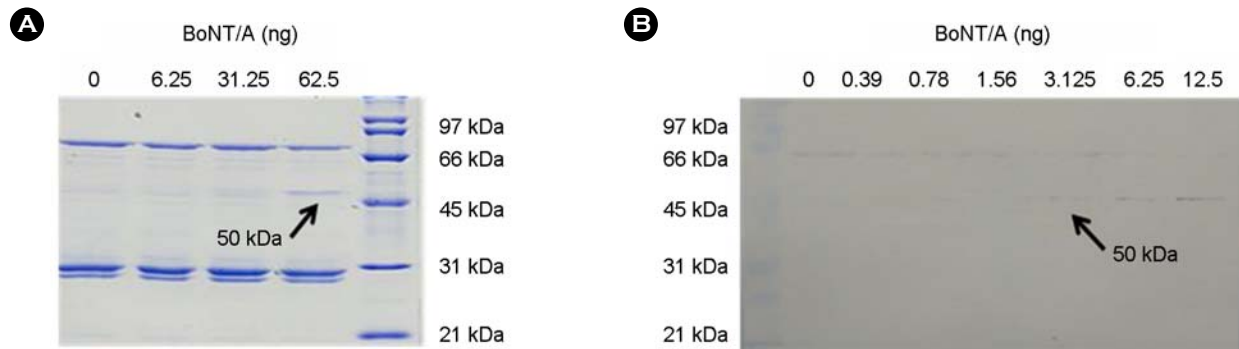
과 면역하지 않은 대조군 혈청은 각각의 펩타이드에 반응하지 않았으나 면역된 토끼로부터 생산된 항혈청은 항원으로 사용한 펩타이드에 각각 특이적으로 결합함을 확인하였다 (Fig. 3A 및 3B). 각 항혈청이 BoNT/A에 의해 절단되어 발생하는 SNAP-25 절편의 말단에 결합하는지 확인하기 위하여 GST-SNAP-25-GST 재조합 단백질을 기질로 한 독소의 endopeptidase assay를 수행하고 발생된 절편에 대한 Western blot을 실시하였다. 그 결과, SNAP-25<sub>191-197</sub>에 대한 항체 (CRI-R1 및 CRI-R2)는 독소에 영향 받지 않은 재조합 GST-SNAP-25-GST 단백질 (약 75 kDa)과는 반응하지 않은 반면, 독소 첨가시 발생하는 약 50 kDa의 N말단 절편과는 매우 강하게 결합하였다 (Fig. 3C). 그러나 SNAP-25<sub>198-204</sub>에 대한 항체 (RAT-R1 및 RAT-R2)는 재조합 기질 단백질과 약 25 kDa의 C말단 절편 모두에 반응하지 않았으며, RAT-R1 항체의 경우 비특이적

반응으로 추정되는 약 50 kDa 크기의 밴드가 확인되었다 (Fig. 3D). 이상의 결과는 N말단 절편 부위를 인식하는 토끼 항혈청만이 BoNT/A에 의해 절단된 SNAP-25 단백질과 결합함을 나타낸다.

#### BoNT/A에 대한 endopeptidase assay 및 검출한계 값 결정

환원시킨 BoNT/A와 75 kDa의 GST-SNAP-25-GST를 toxin assay buffer와 함께 반응시킨 결과 SDS-PAGE 상에서 약 50 kDa의 절편이 생성된 것을 확인하였으며 (Fig. 4A), Western blot을 통해 CRI-R1 항체가 약 50 kDa의 GST-SNAP-25 절편을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하였다 (Fig. 4B). Endopeptidase assay의 검출한계값을 결정하기 위하여 보툴리눔 A형 독소를 2배씩 단계 희석 (0~62.5 ng)하여 적용한 결과, SDS-PAGE 상에서는 육안





**Figure 4.** Detective sensitivity of BoNT/A in the endopeptidase assay using GST-SNAP-25-GST. **(A)** SDS-PAGE analysis. Forty micromoles of GST-SNAP-25-GST were reacted with various concentrations of BoNT/A in 10  $\mu$ l for 4 h at 37°C, separated in 10% SDS-PAGE and visualized with Coomassie blue staining to detect 50 kDa N-terminal fragment of SNAP-25 (arrow). **(B)** Western blot analysis with anti-SNAP-25 antiserum. After the reaction by BoNT/A with the indicated concentrations and separation in SDS-PAGE with the same procedure described in (A), the products of GST-SNAP-25-GST were detected with CRI-R1 antiserum, which detect only 50 kDa N-terminal fragment of SNAP-25 (arrow). The undigested full-length GST-SNAP-25-GST was detected weakly around 75 kDa.

으로 62.5 ng의 BoNT/A까지 검출 가능하였으나, Western blot에서는 3.125 ng의 독소까지 검출하여 항혈청을 이용한 Western blot 분석법이 SDS-PAGE 후 겔을 염색하여 BoNT/A에 의한 SNAP-25 절편을 관찰하는 방법보다 20 배 이상 민감함을 보여주었다 (Fig. 4). 또한 이상의 결과를 독소 생물활성도 ( $2.0 \times 10^7$  mouse i.p. LD<sub>50</sub>/mg)에 대 입시켰을 때, 이 실험에서 확립한 Western blot 분석법의 검출한계값 3.125 ng은 mouse bioassay에서 얻어진 독소 LD<sub>50</sub> 값 ( $2.0 \times 10^7$  mouse i.p. LD<sub>50</sub>/mg)의 약 90배에 해당 하는 것으로 나타났다.

## 고 찰

국내 보툴리눔 독소증 A형 환자가 최초 발생한 이래로 현재까지 A형 및 B형 독소에 의한 보툴리눔 독소증 확진 환자가 지속적으로 발생함에 따라 이에 대한 신속 하고 민감한 실험실 진단법에 대한 관심이 증가하고 있다. 보툴리눔 독소증에 대한 국제적인 표준 진단법은 mouse bioassay로서 이 방법은 보툴리눔 독소 의심가검물을 마우스에 직접 접종하여 보툴리눔 독소증의 특징적인 증상발현 유무를 모니터링하는 방법으로 약 3~4일이 소요되며 하나의 가검물을 진단하는 데 많은 수의 마우스가 요구된다는 단점을 가지고 있어 미국을 중심으로 보툴리눔 독소를 탐색하기 위한 새로운 *in vitro* 진단법에 대한 개발이 진행되고 있다 (11).

보툴리눔 독소는 endopeptidase의 활성을 가지고 있어 혈청형마다 특이적인 target peptide에 작용하는 것으로

알려져 있으며 (15), BoNT/A의 경우 SNAP-25의 G<sub>197</sub>-A<sub>198</sub> 사이의 peptide bond를 특이적으로 절단하는 것으로 보고되었다 (16). 따라서 본 연구에서는 이러한 특성을 이용하여 BoNT/A를 신속 정확하게 검출할 수 있는 *in vitro* 독소 탐지법을 개발하고자 하였으며, 이를 위하여 독소의 효소작용기전을 이용하였다. 즉, *E. coli*에서 발현한 재조합 SNAP-25 단백질을 BoNT/A와 반응시킨 후 SNAP-25의 절단 부위에 효과적으로 결합하는 항체를 이용하여 SNAP-25 절편 산물을 탐지하도록 하였다.

현재까지 많은 연구진들에 의해 endopeptidase assay법 개발에 다양한 SNAP-25 재조합 단백질이 기질로 적용되어 왔다. N말단에 GST가 결합되어 있는 GST-SNAP-25, BoNT/A cleavage site가 포함된 SNAP-25 peptide (biotin-SNAP25<sub>187-203</sub>-biotin 및 SNAP-25<sub>134-206</sub>-MBP) 및 GST-SNAP-25-His<sub>6</sub> 등이 이러한 분석법의 기질로 사용된 바 있다 (17~19). 이들 중 짧은 길이의 재조합 SNAP-25 peptide들도 독소의 기질로서 full-length SNAP-25와 같은 효율성을 가지고 있는 것으로 보고되었다 (6). 본 연구에서는 이러한 실험 결과를 참고하여 SNAP-25의 양 말단에 GST tag를 갖는 약 75 kDa GST-SNAP-25-GST 재조합 단백질을 제조하여 BoNT/A에 대한 기질로 사용하였다. 제작된 발현 벡터로 형질전환된 대장균은 IPTG induction 시 대량의 재조합 단백질을 발현시켰으며, 양 말단의 GST tagging은 glutathione agarose bead에 의한 단백질의 효율적인 분리를 가능하게 하였다. 본 연구에서는 *E. coli* 배양액 1 L 당 약 15 mg의 재조합 단백질을 회수하였으며, 이는 endopeptidase assay 수행시 검체당 약 3  $\mu$ g의 기

질이 요구되는 점을 고려할 때 1회의 형질전환된 *E. coli* 배양으로도 보툴리눔 독소증 진단을 위한 충분한 GST-SNAP-25-GST 기질을 확보할 수 있음을 의미한다.

본 연구에서는 BoNT/A에 의해 절단되는 절편의 양쪽 노출 부위의 펩타이드에 대한 토끼 항혈청을 각각 제조하였다. 그 결과 SNAP-25<sub>191-197</sub> (CRI-R1 및 CRI-R2) 및 SNAP-25<sub>198-204</sub> (RAT-R1 및 RAT-R2)에 대한 항혈청 모두 각각의 합성 펩타이드에 친화도를 나타냄으로써 항체가 제대로 생성되었음을 보여주었다 (Fig. 3A 및 3B). 그러나, endopeptidase assay 결과에서 CRI-R1과 CRI-R2 항체는 BoNT/A에 의해 절단된 50 kDa의 N말단 절편을 검출한 반면, RAT-R1과 RAT-R2 항체는 25 kDa의 C말단 절편을 검출하지 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 3C 및 3D). 이는 아마도 BoNT/A에 의해 생성된 C말단 SNAP-25 절편의 새로운 N말단 노출 부위가 3차원 구조에 매몰되어 항혈청에 의해 인식될 수 없었기 때문으로 추정된다. 이상의 결과를 바탕으로 펩타이드에 대한 반응성이 가장 우수하고 SNAP-25 N말단 절편의 노출 부위를 탐지할 수 있는 CRI-R1 항체를 BoNT/A 탐지를 위한 endopeptidase assay에 적용할 항체로 선정하였다.

본 연구에서 개발한 endopeptidase assay의 경우, 보툴리눔 A, C 및 E형 독소가 공통적으로 SNAP-25를 target peptide로 인식한다 할지라도 BoNT/A에 의해 절단된 SNAP-25 N말단 절편의 노출 부위에 결합하는 항체를 사용하기 때문에 다른 독소형에 의한 교차반응은 없는 것으로 사료된다. 그러나, Western blot 결과에서 endopeptidase assay에 사용한 항체가 BoNT/A에 반응하지 않은 75 kDa의 재조합 GST-SNAP-25-GST 단백질에 약하게 결합하는 것으로 나타났다. 이는 고농도의 GST-SNAP-GST가 절단되지 않고 남아있는 경우 CRI-R1 항체와 약한 결합이 일어나는 것으로 생각되며, 이는 비특이적 결합이라기보다는 CRI-R1 항체를 생산하기 위하여 합성 펩타이드를 사용하였기 때문에 CRI-R1 항체가 아미노산 염기서열을 인식하여 항체작용 부위가 절단에 의한 노출 부위뿐만 아니라 약간의 native SNAP 부위를 포함하기 때문에 발생한 결과라 생각된다. 높은 농도 (360 µg)의 독소를 이용한 endopeptidase assay 및 Western blot에서는 75 kDa의 GST-SNAP-25-GST 밴드가 전혀 확인되지 않았으나 (Fig. 3C 및 3D), 낮은 농도의 독소 (0~6.25 ng)의 독소를 적용한 경우 75 kDa의 밴드가 약하게 반응하였으며, 이러한 결과는 위의 추정을 뒷받침

한다. 따라서 향후 항체에 대한 개선이 다소 필요한 것으로 사료되나, 본 연구 결과에서 확보한 항체 또한 활성 독소를 충분히 효과적으로 탐지할 수 있어 실제 보툴리눔 독소증 환자 집단 발생이나 생물테러와 같이 massive testing이 필요한 경우 유용하게 사용될 수 있으리라 판단된다.

일반적으로 항체를 이용한 진단법은 ELISA법이 간편하나, 본 연구에서는 endopeptidase assay의 결과를 확인하기 위하여 SDS-PAGE 및 Western blot법을 적용하였다. 이는 이러한 방법을 통해 75 kDa의 GST-SNAP-25-GST가 독소에 의해 분해되었음을 육안으로 확인하고, 분해된 GST-SNAP-25-GST에 항체가 선택적으로 결합함을 확인함으로써 독소를 탐지하는 데 있어 비특이적 반응에 의한 위양성 결과를 제거하는 데 SDS-PAGE 및 Western blot법이 ELISA보다 효과적이라는 점에 바탕을 두었다. 본 연구 결과에서 endopeptidase assay 반응 결과물을 SDS-PAGE로 펼쳤을 때 약 50 kDa과 약 25 kDa의 밴드가 육안으로 관찰되었다 (Fig. 4A). 이는 재조합 GST-SNAP-25-GST 단백질이 BoNT/A에 의해 절단되어 두 개의 펩타이드가 생성되었음을 의미하며, 나아가 본 연구에서 제조한 재조합 GST-SNAP-25-GST 단백질이 콜린성 신경 세포에 존재하는 native SNAP-25와 마찬가지로 BoNT/A에 대한 기질로서 사용 가능함을 보여주는 결과라 할 수 있다 (5, 6). 그러나, endopeptidase assay 결과를 SDS-PAGE로 확인하고자 하는 경우 62.5 ng 이상의 BoNT/A가 요구되어 탐지한계는 매우 낮은 것으로 확인되었다. 한편 endopeptidase assay의 결과를 Western blot으로 확인한 경우 3.125 ng의 BoNT/A에서도 약 50 kDa의 N말단 단편만이 탐지되어, 보툴리눔 A형 독소에 대한 검출감도는 SDS-PAGE 후 염색법보다 약 20배 정도 증가하였다 (Fig. 4B). 이러한 결과를 독소의 마우스 생물활성도 ( $2.0 \times 10^7$  mouse i.p. LD<sub>50</sub>/mg)에 대입한 결과 약 90 LD<sub>50</sub>의 검출한계값을 가지는 것으로 나타났다. 즉, 본 연구에서 확인한 검출한계값은 Hallis 등 (20)이 보고한 검출한계값 (200 LD<sub>50</sub>)보다 약 2.2배 이상 높았으나, Ekong 등 (18)이 보고한 값 (0.2~1.0 LD<sub>50</sub>)보다는 낮아 향후 민감도 향상을 위한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료되며, 이는 형광물질의 접합 등을 통해 개선할 수 있을 것으로 예상된다 (21).

본 연구에서 개발한 보툴리눔 독소 탐지법은 기존에 사용하고 있는 mouse bioassay법에 비하여 다음과 같은

여러 가지 장점을 지닌다. 첫째, mouse bioassay (3~4일)보다 실험 결과를 얻기까지 소요되는 시간 (약 12시간)을 단축할 수 있으며, 둘째, *in vitro* 상에서 결과를 도출해 낼 수 있어 동물의 희생을 요구하지 않으며, 셋째, 독소의 효소적 특성을 이용하므로 비활성 독소를 제외한 활성 독소만을 검출해 낼 수 있고, 넷째, 여러 샘플을 동시에 실험하는 massive testing이 가능하다. 결론적으로, 본 연구에서 시도한 재조합 GST-SNAP-25-GST 단백질과 BoNT/A-cleavage site에 선택적인 항체를 이용한 BoNT/A endopeptidase assay법은 국내 보툴리눔 독소증 집단 발생 시 A형 보툴리눔 독소증에 대한 빠른 분석을 가능하게 하고 독소 검출을 위한 mouse bioassay의 보조 분석 방법으로서 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- Centers for Disease Control and Prevention. Botulism in the United States: Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. Atlanta GA. Centers for Disease Control and Prevention, 1998.
- Greenfield RA, Brown BR, Hutchins JB, Iandolo JJ, Jackson R, Slater LN, Bronze MS. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. Am J Med Sci 2002;323:326-40.
- Franciosa G, Ferreira JL, Hatheway CL. Detection of type A, B, and E botulism neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms. J Clin Microbiol 1994;32:1911-7.
- Sugii S, Sakaguchi G. Botulogenic properties of vegetables with special reference to the molecular size of the toxin in them. J Food Safety 1977;1:53-65.
- Sakaguchi G. *Clostridium botulinum* toxins. Pharmacol Ther 1982;19:165-94.
- Binz T, Blasi J, Yamasaki S, Baumeister A, Link E, Sudhof TC, Jahn R, Niemann H. Proteolysis of SNAP-25 by type E and A botulinum neurotoxins. J Biol Chem 1994;269:1617-20.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Physiol Rev 2000;80:717-66.
- Chung GT, Kang DH, Yoo CK, Choi JH, Seong WK. The first outbreak of botulism in Korea. Korean J Clin Microbiol 2003; 6:160-3.
- Yi HA, Lim JG, Lee JB, Her JH, Kim HA, Shin YE, Cho YW, Lee H, Yi SD. A familial outbreak of food-borne botulism. J Korean Neurol Assoc 2004;22:670-2.
- Shin NR. Laboratory protocols for infection disease. Botulism. 3rd ed. Seoul: Korea National Institute of Health; 2005. p.369-77.
- Shone C, Wilton-Smith P, Appleton N, Hambleton P, Modi N, Gatley S, Melling J. Monoclonal antibody-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay. Appl Environ Microbiol 1985;50:63-7.
- Doellgast GJ, Triscott MX, Beard GA, Bottoms JD, Cheng T, Roh BH, Roman MG, Hall PA, Brown JE. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. J Clin Microbiol 1993; 31:2402-9.
- Sharma SK, Ferreira JL, Eblen BS, Whiting RC. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. Appl Environ Microbiol 2006;72:1231-8.
- Marion WR, O'Meara TE, Riddle GD, Berkhoff HA. Prevalence of *Clostridium botulinum* type C in substrates of phosphate-mine settling ponds and implication for epizootics of avian botulism. J Wildl Dis 1983;19:302-7.
- Montecucco C, Schiavo G. Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases. Trends Biochem Sci 1993;18: 324-7.
- Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, Sudhof TC, Niemann H, Jahn R. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. Nature 1993;365:160-3.
- Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A, McWilliams LG, Schmidt JG, Martinez RA, Ashley DL. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. Emerg Infect Dis 2005;11:1578-83.
- Ekong TA, Feavers IM, Sesardic D. Recombinant SNAP-25 is an effective substrate for *Clostridium botulinum* type A toxin endopeptidase activity *in vitro*. Microbiology 1997;143: 3337-47.
- Vaidyanathan VV, Yoshino K, Jahnz M, Dorries C, Bade S, Nauenburg S, Niemann H, Binz T. Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin type A, C, and E: Domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-



- substrate complexes and cleavage. J Neurochem 1999;72:327-37.
- 20) Hallis B, James BA, Shone CC. Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activity. J Clin Microbiol 1996;34:1934-8.
- 21) Poras H, Ouimet T, Orng SV, Fournie-Zaluski MC, Popoff MR, Roques BP. Detection and quantification of botulinum neurotoxin type A by a novel rapid *in vitro* fluorimetric assay. Appl Environ Microbiol 2009;75:4382-90.
-