

Receptor를 이용한 Verotoxin 生産 大腸菌의 檢出에 關한 研究(II)

(副題: 소의 糞便에서 分離한 Verotoxin-2 生産 大腸菌
O157:H7由來의 파아지 特性)

疫學調查科

車仁鎭 · 權赫東 · 李采南 · 趙顯哲 · 李弘洙 · 李秉圭

Characteristics of Phages of Verotoxin-2 Producing *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from Cattle Feces

Epidemiology Division

I.H. Cha, C.N. Lee, H.C. Cho, H.S. Lee, B.G. Lee

Abstract

We isolated verocytotoxin-2-producing *Escherichia coli*(O157:H7) from cattle feces. The strain produced a high titer of toxin to Vero cells and HeLa cells. Also, bacteriophage encoding toxin gene was lysogenized from this strain by the method of UV irradiation. This phage was examined the morphology by electron microscopy and investigated temperature stability, pH stability, inactivation by UV irradiation and characteristics of phage

DNA.

The morphology of bacteriophage lysogenized from verotoxin-2-producing *Escherichia coli* had head and tail as typical bacteriophage. The molecular weights of purified phage DNA was about 47 Kb and phage was digested with *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *SmaI* and *Pst I*.

The phage was stable in wide pH range (pH 6~10), and optimal pH for survival was pH 7.0. In temperature stability, phage was most stable at 35°C and mostly inactivated by UV irradiation for 100 sec.

Adsorption rates of the phage for lawn cell (*E. coli* C600) was represented beyond 90% by mixed incubation for 35 min.

I. 緒 論

Verotoxin(VT) 生産 大腸菌은 사람과 동물에서 泄瀉病의 중요한 原因體로 作用하며,^{1,2} hemolytic uremic syndrome(HUS),^{3,4} hemorrhagic colitis^{5,6} 및 edema disease^{6,7} 등을 誘發하여 近年 많은 問題가 되고 있다.

현재까지 밝혀진 verotoxin의 종류는 Verotoxin-1(VT-1), Verotoxin-2(VT-2) 및 VTE 등으로 알려져 있고^{8,9,10} 이들중 VT-1과 VT-2의 생산에 관여하는 遺傳子는 파아지 DNA 由來이며,^{11,12,13} *Shigella dysenteriae* 및 *Shigella flexneri*의 DNA와 同質性이 있는 것으로 밝혀져 있다.¹⁴

VT는 分子量 32 Kd인 A subunit 하나와 分子량 7.7 Kd인 다섯개의 B subunit로 이루어져 있으며^{15,16} subunit 각각의 機能은 잘 밝혀져 있다.^{17,18,19}

Bacteriophage는 1915년 Twort의 研究를 始初로하여 각종 파아지에 대한 연구가 활발히 이루어지게 되었으며, phage typing에 의한 微生物의 正確한 同精뿐만 아니라 최근에는 각종 遺傳工學 연구의 必須不可缺한 材料로 利用되고 있다. 일반적으로 파아지는 coat, head, tail의 形態로 이루어져 있고, 二重가닥 DNA, 單一가닥 DNA, 單一가닥 RNA 및 이중가닥 RNA를 가지는 形式로 區分할 수 있으며 이중가닥 DNA를 가지는 파아지는 전형적으로 DNA가 파아지무게의 50%를 차지하므로 DNA의 物理的 연구에 좋은 材料가 되고 있다.²⁰

한편, Newland 등²¹과 Jackson 등²²은 mitomycin을 添加하여 VT 生産 大腸菌으로부터 파아지를 溶元化하였고 이들 遺傳子를 vector plasmid에 클로닝하여 再造合한 결과 毒素 生産能力이 있다는 것을 證明한 바 있으며, Weinstein 등²³은 VT-2와 VTE의 파아지 DNA 鹽基序列을 상호비교한 결과 A subunit의 同質性은 94, B subunit의 동질성은 79% 라고 하였다.

Rosenberg 등²⁴에 의하면 operon을 調節하는 promotor가 강력하지 못하면 생산되는 蛋白質의

活性도 低下된다고 하였고, Strockbine 등²⁰⁾은 shiga toxin과 VT-1의 細胞毒性이 VT-2와 VTE에 비하여 10^7 CD₅₀ 정도로 높은 것은 VT-2와 VTE operon의 promotor가 shiga toxin과 VT-1의 promotor보다 강력하지 못하기 때문이라고 하였다.

Jackson 등²¹⁾은 VT-1과 VT-2의 構造遺傳子 鹽基序列을 밝힘으로 VT에 대한 여러가지 分子生物學的 特性을 確立하였으며, 최근 외국의 많은 연구자들은 toxin 구조유전자의 特定部位를 site directed mutation 하므로써 생산되는 toxin protein을 vaccine으로 利用하기 위한 可能性에 대하여 많은 關心을 보이고 있으나, 국내에서의 이에 대한 연구는 매우 未洽한 실정이다.

본 연구에서는 동물로부터 분리한 *Escherichia coli* O157:H7으로부터 파아지를 溶元化하여 파아지의 形態, 온도에 대한 感受性, pH에 대한 安定性, UV irradiation 및 吸着率 등을 調査하고 각종 restriction endonucleases에 대한 파아지 DNA의 patterns을 조사하고자 한다.

II. 材料 및 方法

Bacteriophage의 분리: 動物糞便에서 分離한 VT-2 생산 대장균으로부터 bacteriophage의 분리는 O'Brien 등²²⁾의 방법에 따라 실시하였다. Donor 菌株로서는 分離菌중 VT-2를 생산하는 *E. coli* O157:H7를 사용하였으며, recipient로서는 *E. coli* C600을 사용하였다. Donor로서 분리균을 5 ml의 LB broth(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.25% NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.001% thiamine)에서 600 nm의 파장으로 OD 0.5가 될 때까지 배양하여 遠心分離 시킨 후, 5ml의 10 mM CaCl₂로 현탁시켜 UV-light 아래에서 1분간 照射함으로써 분리균으로부터 파아지를 분리하였다. 紫外線에 조사된 cell을 37°C에서 5시간 배양한 후 遠心分離하여 上層液을 0.45 μm membrane filter로 濾過한 파아지 액을 4°C에 보관하면서 사용하였다. 플라크의 形成은 Adams²³⁾의 방법에 따라 100μl의 donor와 10 mM CaCl₂로 처리한 100μl의 recipient를 混合하여 37°C에서 20분간 배양하였으며, 3ml의 soft agar에서 혼합하고 LB agar plate에 도말한 후 37°C에서 18시간 배양하여 플라크 形成을 관찰하였다. 형성된 plaque를 분리한 후 同一한 방법으로 2회 以上 반복하여 파아지를 순수분리하였다. 파아지의 定量은 Adams의 溶菌斑 計數法으로 실시하였으며, 파아지는 SM 緩衝液[NaCl 5.8g, MaSO₄ 2g, 1M Tris(pH 7.5) 50ml, 2% gelatin per liter]으로 현탁시켜 4°C에서 보관하였다.

電子顯微鏡에서의 파아지 形態觀察: 분리한 파아지 액 100μl에 동량의 phosphotungstic acid를 혼합하고 400 mesh collodion coated electron microscope에 附着시켜 乾燥시킨 다음, Trans Electron Microscope(TEM)에서 68,000배로 觀察하였다.

파아지 DNA의 抽出 및 精製: 파아지의 정제는 Yamamoto 등²⁴⁾의 방법에 準하여 cesium chlo-

ride density gradient로써 정제하였다. 파아지 용액에 DNase와 RNase를 첨가하고 最終濃度 1M이 되도록 NaCl을 첨가하여 遠心分離시켜 상층액을 취하였다. 上層液에 최종농도 10%가 되도록 PEG 6000을 첨가한 다음 원심분리하여 파아지 粒子를 침전시키고, 이 沈澱物을 SM 완충액으로 현탁한 후 동량의 phenol/chloroform을 가하여 원심분리하고 파아지가 포함된 상층액을 회수한 후 최종농도가 50% 되도록 cesium chloride를 첨가하였다. 미리 형성된 cesium chloride step gradients에 50% cesium chloride가 포함되어 있는 파아지 용액을 첨가하여 22,000 rpm으로 4℃에서 2시간동안 원심분리시켜 p1.45와 p1.50사이의 bacteriophage를 21 gage needle로 收集하였다. 이 파아지 입자에 충분한 cesium chloride(1.5g/ml)를 첨가하여 4℃에서 35,000 rpm으로 24시간동안 원심분리시켜 上記와 동일한 방법으로 파아지를 收集하였다. 1,000배 volume의 投石溶液[10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM MgCl₂]으로 실온에서 1시간 投石하여 정제된 파아지 용액으로부터 cesium chloride를 除去한 후 최종농도가 2mM이 되도록 EDTA를 첨가하였다. Pronase와 SDS를 최종농도 0.5mg/ml과 0.5% 되도록 각각 첨가하여 37℃에서 1시간 培養하였으며, 동량의 phenol을 첨가한 후 遠心分離시켜 상층액을 취하고 동량의 phenol/chloroform 용액으로 처리하였다. 抽出한 DNA 용액을 1,000배 volume의 부석용액[10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA]으로 4℃에서 連續적으로 3번 부석한 후 ethanol로 沈澱시켜 파아지 DNA를 준비하였고 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 파아지 DNA의 分子량을 檢定하였다.

物理的 變化에 대한 파아지의 安定性: pH에 대한 파아지의 안정성은 Sklarow 등²⁾의 방법에 따라 pH2~11로 製造한 SM 완충액 0.9ml에 10⁶ PFU/ml의 파아지 용액 0.1ml을 添加하고 37℃에서 60분동안 反應시킨 후에 각 pH에서의 生存파아지 數를 定量하였다.

여러 온도에 대한 파아지의 安定性を 檢査하기 위하여 20℃~70℃의 SM 완충액 0.9ml에 10⁶ PFU/ml의 파아지 용액 0.1ml을 넣고 10분간 處理한 후 0.1ml을 取하여 生存 파아지 數를 定量하였다.

또한 紫外線 照射에 의한 파아지의 不活性化 程度를 알아보기 위하여 10⁶ PFU/ml의 파아지 용액 5ml을 페트리접시에 넣고 실온에서 5w의 紫外線 등으로 50cm의 거리에서 一定時間 동안 照射한 후 파아지 數를 定量하였다.

파아지의 吸着率: 10⁶ colony forming unit(CFU)/ml인 lawn cell 2ml과 10⁶ PFU/ml인 파아지액 1ml을 混合하여 37℃에서 진탕배양하면서 5분 간격으로 0.1ml씩 取하여 滅菌된 9.9ml의 파아지 액체배지로 稀吸着을 停止시킨 다음, 15,000rpm으로 3분간 원심분리하여 菌에 吸着한 파아지를 沈澱시켰다. 吸着率은 상층액속의 미흡착한 잔존 파아지를 溶菌斑 計數法으로 決定하였다.

III. 結果 및 考察

Verotoxin 生産 大腸菌의 分離 : 소의 糞便계로부터 verotoxin 生産 대장균을 분리하여 *E. coli* O합형으로 同精한 결과 Table 1과 같이 O157로 동정되었고 分離菌은 KEC20이라고 命名하였으며, immobilization 試驗結果 H 抗血清에 대하여는 H7으로 判明되었다.

분리균의 培養液을 HeLa cell과 Vero cell에 대하여 細胞毒성을 調査하고 中和法으로 분리균이 生産하는 毒素型을 확인한 결과 HeLa cell에 대하여는 10^7 CD₅₀/ml, Vero cell에 대하여는 10^8 CD₅₀/ml을 나타내었으며, toxin type은 verotoxin-2(VT-2) type으로 確認되었다.

Table 1. Characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle feces.

Strain	Type of toxin produced	Serotype	Cytotoxicity titers(CD ₅₀ /ml) †	
			HeLa cell	Vero cell
KEC20	II	O157 : H7	10^7	10^8

† : HeLa and Vero cells were grown with MEM(SIGMA Co.) in microtiter plate. Microtiter plate containing incomplete monolayers of each cell line were prepared by inoculation of individual wells with 10^6 cells in 0.1ml of growth medium, followed by incubation at 37°C in 5% CO₂ atmosphere for 18~20 h. Bacterial culture filtrates were diluted 1 : 10 in cell-growth medium, and 0.1ml aliquots of this dilution were transferred to cell-containing wells of microtiter plates. Microtiter plates were incubated at 37°C for 72 h, and microscopic examination of the wells was done daily. Cytotoxic titers were expressed as the reciprocal of the dilution required to kill 50% of the cells(CD₅₀) per milliliter of culture filtrate(CD₅₀ / ml).

1994년 感梁病 發生情報誌²⁰⁾에 의하면 食中毒 患者로부터 國內最初로 *E. coli* O157 : H7을 분리 보고한 바 있으며, 著者 등²⁰⁾은 부산지역 설사환자에서 verotoxin 生産 대장균의 分布를 調査하였으나 血清型 O157은 분리되지 않았다고 보고하였다. 國內에서의 verotoxin 生産 대장균에 대한 연구는 현재까지 未備한 실정이며 家畜에서의 分布調査는 전혀 이루어져 있지 않아 이에 대한 基礎調査研究가 時急한 실정이다. 본 시험에 公試한 *E. coli* O157 : H7은 國內 최초로 소의 糞便으로부터 分離하여 卽까지 分離의 材料로 使用하였다.

Cell에 대한 公試菌 KEC20 培養上層液의 cytotoxicity는 Konowalchuk 등²¹⁾의 결과와

同一하게 완전한 cytopathic effect를 나타내었고, HeLa cell에서 보다 Vero cell에서 더 높은 toxicity를 나타내었다.

Bacteriophage의 電子顯微鏡的 觀察: 分離菌 KEC20 strain을 UV light 아래에서 1분간 照射한 후 lawn cell인 *E. coli* C600과 混合하고 培養液 100 μ l를 0.5% soft agar 3 ml에 혼합하여 LB agar plate에 分注한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 15~18시간 培養한 결과 Fig. 1과 같이 많은 플라크를 形成하였다. 이 플라크를 精製하고 phosphotungstic acid로 染色하여 電子顯微鏡下에서 68,000배로 觀察한 결과 bacteriophage 특유의 머리와 꼬리형태가 관찰되었으며(Fig.2) 분리한 파아지는 KEC20-p라고 命名하였다.

O'Brien 등²⁷⁾은 VT 生産 大腸菌의 染色體에 prophage화 되어 있는 파아지를 溶元化하기 위하여 VT light에서 照射한 바 있으며 lawn cell을 *E. coli* K-12 substrain 395-1을 使用하였고 Newland 등²⁸⁾ Jacson 등²⁹⁾은 mitomycin을 添加하여 파아지를 溶元化한 바 있다.

본 實驗에서는 파아지를 溶元化하기 위하여 분리균인 KEC20인 UV-light에서 1분간 조사하였으며 lawn cells은 *E. coli* C600을 10mM MgSO_4 로 competent cell화하여 사용한 결과 *E. coli* K-12와 같이 많은 플라크를 觀察할 수 있었으며, 電子顯微鏡으로 이들 파아지를 觀察한 결과 O'Brien 등²⁷⁾의 결과와 同一하게 典型的인 파아지의 形態를 나타내었다.

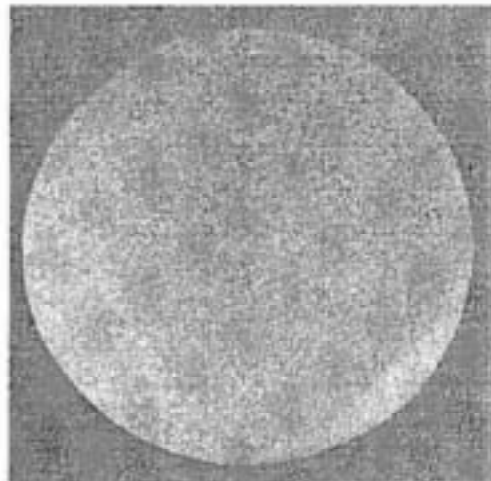


Fig. 1. Phage plaques isolated from verotoxin-2-producing *Escherichia coli* KEC20 strain on LB agar plate.

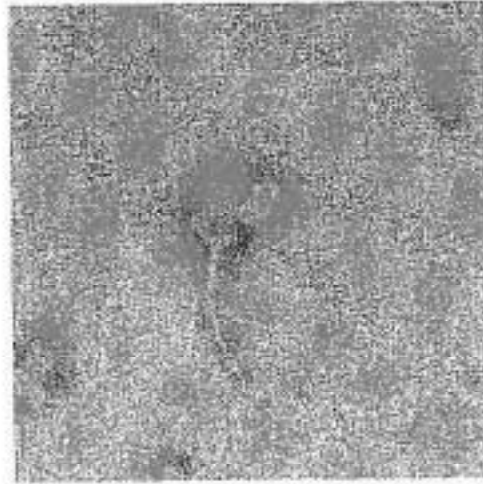


Fig. 2. Electron micrograph of purified phage stained with phosphotungstic acid(magnification, $\times 68,000$)

파아지 DNA의 分離 및 制限酵素에 대한 性狀: Cesium chloride density gradient로써 파아지 DNA를 精製하고 파아지 DNA를 抽出하여 여러가지 制限酵素로 처리한 후 0.8% agarose gel에서 전기영동한 결과는 Fig. 3과 같다.

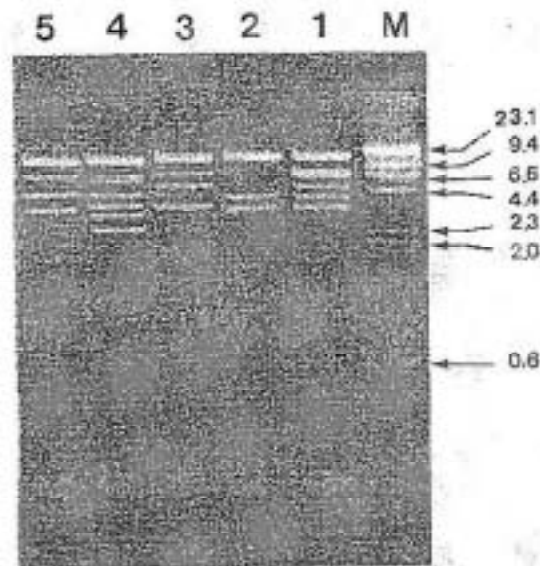


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of restriction endonuclease digested DNA from plaque-purified, CsCl gradient-isolated phages KEC20-

p. The size of the fragments were determined by their relative electrophoretic mobilities when compared to *Hind*III reference fragments of DNA. Lane 1,2,3,4 and 5 were phage DNA, treated with *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, *Sma*I and *Pst* I, respectively.

CsCl gradient로 精製한 파아지 DNA는 전기영동한 결과 분자량 약 47Kb를 나타내었고, 이 파아지 DNA를 *Eco*R I, *Hind*III, *Sma* I 및 *Pst* I 로 처리한 결과 각각의 制限酵素에 대하여 모두 3곳 이상의 restriction site를 保有하고 있음을 확인할 수 있었다.

O'Brien 등²⁷⁾은 VT 생산 대장균인 *E. coli* 933W로부터 파아지 DNA를 抽出한 결과 47 Kb라고 하였으나 본 研究에서도 분리균 KEC20으로부터 분리한 파아지의 DNA는 약 47Kb로 확인되었다. 이 파아지 DNA의 restriction endonuclease에 대한 pattern은 *Hind*III, *Bam*H I 및 *Eco*R I 의 pattern은 3곳 以上の restriction site를 保有하고 있었으며 이 成績은 O'Brien 등²⁷⁾의 성적과 一致하였고 *Sma* I 과 *Pst* I 에 대한 pattern도 많은 restriction site를 保有하고 있었다.

Newland 등²⁸⁾과 Jacson 등²⁹⁾은 분리한 파아지 DNA를 *Eco*R I 으로 切斷하여 얻어진 4.7Kb 斷片을 vector plasmid에 클로닝하여 再造合한 결과 이 切片이 독소생산에 關與하며 再造合한 菌株는 毒素 生産能力이 7배 정도 增加하였다고 보고한 바 있다. 본 試驗에서도 KEC 20-p *Eco* R I 절편중 약 4.7Kb 정도의 절편이 확인되었으며, 이 절편이 toxin 생산에 關與하는 것으로 推測할 수 있었으며 이 斷片을 클로닝하여 毒素生産能力이 높은 再造合 菌株의 開發은 앞으로 계속 연구하여 精明하여야 할 것으로 思料된다.

物理的 變化에 대한 파아지의 安定性: 분리한 파아지 KEC20-p의 pH에 대한 安定성은 Fig. 4와 같이 대체로 넓은 範圍의 pH에서 安定하였다. pH 2에서는 KEC20-p가 生存할 수 없었고 pH 3~5에서는 6~42%의 파아지가 生存可能하였으며, pH 6~9에서는 大部分의 파아지가 安定하였다. 분리한 파아지의 最適 pH는 7에서 8사이로 確認되었으며, 酸性보다는 알카리에서 生存率이 높았다.

一般的으로 파아지는 일정한 pH 領域에서만 安定한 것으로 알려져 있으나 본 實驗結果 比較的 넓은 범위의 pH 領域에서 安定하였고 특히 알카리에서 安定하다는 것을 確認할 수 있었다.

溫度變化에 따른 KEC20-p의 安定성은 Fig. 5와 같다. 20~70℃의 온도에서 10분간 열처리 하였을 때 35℃에서 가장 安定하였고 그 이상의 온도에서는 급격하게 不活化되어 60℃에서는 90% 이상이 不활화되었고 70℃에서는 거의 生存 不可能하였다.

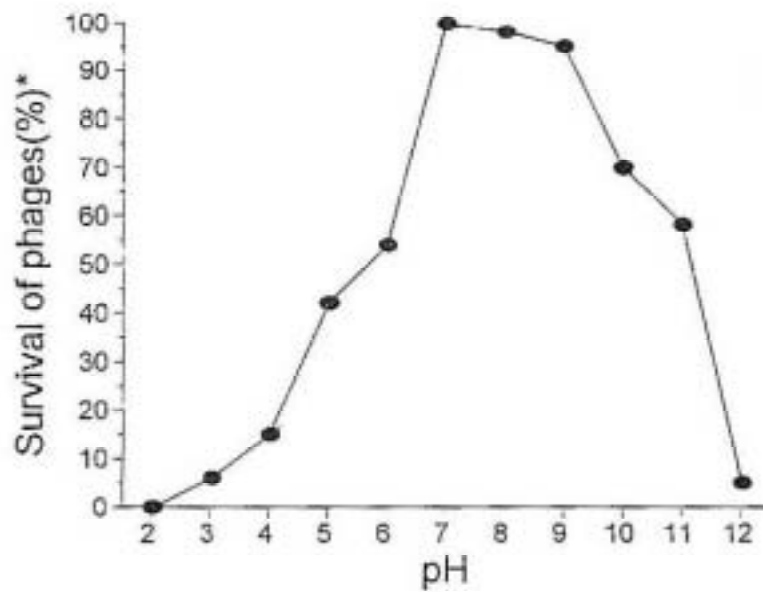


Fig. 4 pH stability of KEC20-p isolated from cattle feces. * : Stability at pH 7.0 was represented as 100% survival of phage.

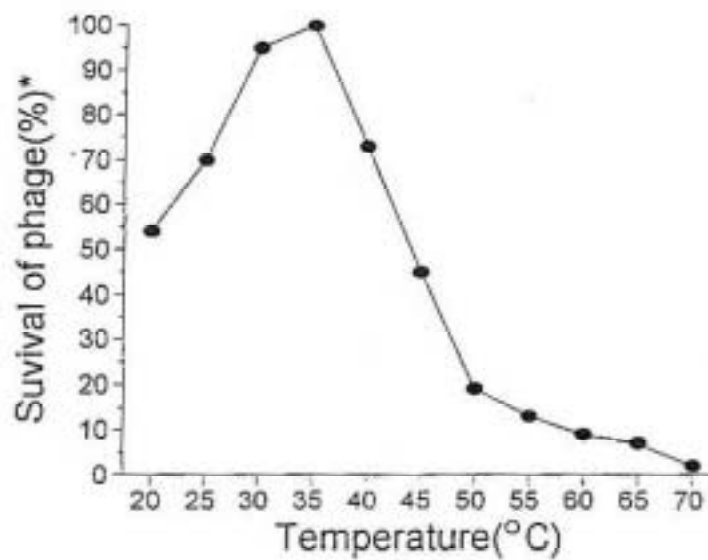


Fig. 5 Effect of temperature of the stability of KEC20-p isolated from cattle feces. * : Survival of phage at 35°C was represented as 100%

한편, 紫外線 照射에 의한 KEC20-p의 안정성은 Fig. 6과 같이 60초동안 照射받은 후 급격히 不活性化되어 100초동안 照射받은 후에는 약 90% 이상이 불활성화되었고 120초동안 照射받은 파아지는 거의 死滅되었다. 이 紫外線 照射에 의한 파아지의 不活化는 thymine dimer의 형성에 起因하는 것으로 알려져 있으며 본 실험에서의 KEC20-p는 55초동안 UV-light에서 照射받은 파아지의 50% 이상이 生存할 수 있었다.

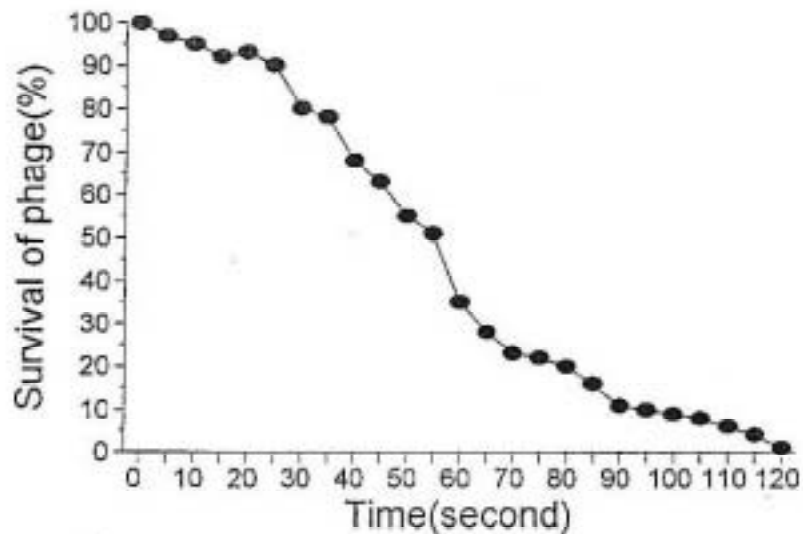


Fig. 6 Inactivation of KEC20-p by UV irradiation.

파아지의 吸着率 : 파아지와 lawn cell을 混合하여 37℃에서 混合培養하면서 시간에 따른 파아지의 吸着率을 調査한 결과 Fig. 7과 같이 KEC20-p는 약 30분이 경과한 후에 87%의 吸着率을 나타내었다.

파아지가 宿主細胞内에서 增殖하기 위해서는 宿主세포의 表面에 吸着이 이루어져야 한다. 이러한 흡착율을 調査하기 위하여 고정된 온도(37℃)에서 확인한 결과 약 20분 정도에서 50% 이상의 파아지가 宿主菌인 *E. coli* C600의 細胞表面에 吸着된다는 것이 확인되었다. 吸着率은 一般적으로 溫度 및 pH의 榮養를 받는 것으로 알려져 있는 바, 본 실험에서 온도와 pH가 吸着率에 미치는 영향을 확인한 결과 25℃~40℃의 溫度範圍와 6.0~10.0의 pH 範圍에서는 吸着率에 큰 차이를 나타내지 않았다.(결과 미제시)

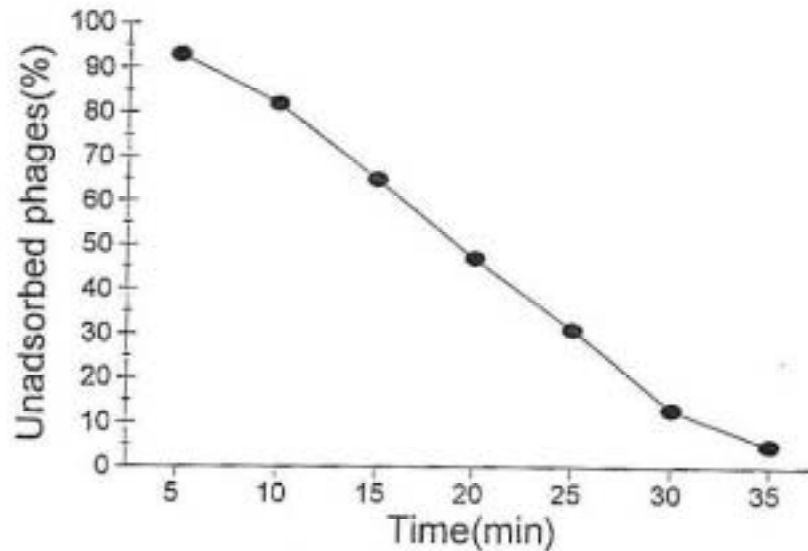


Fig. 7 Adsorption of KEC20-p on lawn cells(*E. coli* C600)

IV. 結 論

동물의 糞便으로부터 分離한 verotoxin-2 生産 大腸菌(KEC20)으로부터 파아지를 溶元化하여 파아지의 形態, 파아지 DNA의 特性, 溫度에 대한 파아지의 感受性, pH에 대한 파아지의 安定性, UV-light 照射에 대한 파아지의 安定性 및 吸着率 등을 調査한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 소의 糞便으로부터 1株의 verotoxin 生産 大腸菌인 *E. coli* O157 : H7(KEC20)을 分離하였다.
2. *Escherichia coli* C600을 宿主菌으로하여 KEC20으로부터 파아지를 分離하였으며 이 파아지를 電子顯微鏡으로 觀察한 결과 典型的인 파아지의 形態를 나타내었다.
3. 精製한 파아지 DNA를 *EcoR* I, *Bam*H I, *Hind*III, *Sma*I 및 *Pst* I 과 같은 制限酵素로 처리한 결과 公試한 전 制限酵素에 대하여 3곳 以上の restriction sites를 保有하고 있었으며, 특히 *EcoR* I 으로 切斷할 경우 毒素 生産에 關與하는 것으로 알려진 4.7Kb 程度의 斷片이 確認되었다.
4. 分離한 파아지의 物理的 變化에 대한 安定성을 調査한 결과 pH 6~9에서 大部分 安定하였고 온도에 대하여는 35℃에서 가장 安定하였으며, 紫外線 照射에 대하여는 55초까지 照射할 경우 50% 以上の 파아지가 生存할 수 있었다.
5. 分離한 파아지와 宿主菌을 混合培養하였을 때 混合培養 시간에 따른 파아지의 吸着率は 20분에서 50% 以上の 吸着率을 나타내었으며 35분에서는 90% 以上の 吸着率을 보였다.

V. 參 考 文 獻

1. Hockin, J.C. and Lior, H. Haemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157 : H7 in Canada. *Can. Dis. Wkly. Rep.* 13 : 203-204, 1987
2. Pai, C.H., Ahmed, N., Lior, H., Johnson, W.M., Sims, H.V. and Woods, D.E. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* : a two-years prospective study. *J. Infect. Dis.* 157 : 1054-1057, 1988.
3. Karmali, M.A., Petric, M., Lom, C., Fleming, P.C., Arbus, S. and Lior, H. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 151 : 775-782, 1985.
4. Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. and Lim, C. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet* i : 619-620, 1983.
5. Karmali, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2 : 15-38, 1989.
6. Clugston, R.E. and Nielsen N.O. Experimental oedema disease of swine(*E. coli* enterotoxemia). I. Detection and prepatation of an active principle. *Can. J. Comp. Med.* 38 : 22-28, 1974.
7. Marques, L.R.M., Cryz, S.J. and O'Brien. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44 : 33-38, 1987.
8. Weinstein, D.L., M.P., Samuel, J.E., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swing. *J.Bacteriol.* 170 : 4223-4230, 1988.
9. Konowalchuk, J., Dickie, N., Stavric, S. and Speirs, J.L. Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. *Immun.* 22 : 644-648, 1978.
10. Konowalchuk, J., Dickie, N., Stavric, S. and Speirs, J.L. Properties of an *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 20 : 575-577, 1978.
11. Konowalchuk, J., Speirs, J.L. and Stavric, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18 : 775-779, 1977.
12. Jackson, M.P., Newlandm, J.W., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. Nucleotide sequence analysis of the structural gene for Shiga-like toxin I by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb. Pathogenesis* 2 : 147-153, 1987.

13. Scotland, S.M., Smith, H.R., Willshaw, G.A. and Rowe, B. Verotoxin-production in strains of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* ii : 216, 1983.
14. Scotland, S.M., Smith, H.R., and Rowe, B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157 : H7. *Lancet* ii : 885-886, 1985.
15. Newland, J.W. and Neill, R.J. DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting bacteriophages. *J.Clin. Microbiol.* 26 : 1292-1297, 1989.
16. Jackson, M.P., Deresiewicz, R.L. and Calderwood, S.B. Mutation analysis the Shiga toxin and Shiga-like toxin II enzymatic subunits. *J.Bacteriol.* 172 : 3346-3350, 1990.
17. Jackson, M.P., Wadolowski, E.A., Weinstein, D.L. Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. Functional analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin type II variant binding subunits by using site-directed mutagenesis. *J.Bacteriol.* 172 : 635-658, 1990.
18. O'Brien, A.D. and Holmes, R.K. Shiga and Sgiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51 : 206-220, 1987.
19. Hovde, C.J., Calderwood, S.B., Mekalanos, J.J. and Collier, R.J. Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 2568-2572, 1988.
20. Endo, T., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., and Igarashi, K. Site of action of a vero toxin(VT2) from *Escherichia coli* O157 : H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosome, *Eur. J.Biochem.* 171 : 45-50, 1988.
21. Igarashi, K., Ogasawara, T., Ito, K., Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Nakabayashi, N. and Dakeda, Y. Mode of action of verotoxins(VT1 and VT2) : demonstration of RNA-glycosidase activity of the toxins. Abstract of International Symposium and Workshop on verotoxin-producing *E. coli* Infection, Toronto. 12-15, 1987.
22. 민경배, 박용근, 배무, 심용섭, 안정배, 이평우, 이형환, 분자생물학, 아카데미서적, p.18-21, 1991.
23. Jackson, M.P., Neill, R.J., O'Brien, A.D., Holmes, R.K. and Newland, J.W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol. Letters* 44 : 109-114, 1987.
24. Rosenberg, M. and Court, D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13 : 319-353, 1979.
25. Strockbine, N.A., Marques, L.R.M., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. Two toxin converting phages from *Escherichia coli* O157 : H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect. Immun.* 53 : 135-140, 1986.

26. Jackson, M.P. Struct-function analysis of Shiga toxin and the Shiga-like toxins, *Microbiol. Pathol.* 8 : 235-242, 1990.
27. O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F. and Holmes, R.K. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea, *Science* 226 : 694-696, 1984.
28. Adams, M.H. Bacteriophages. Interscience Publishers Inc., New York, 1954.
29. Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawhorne, L. and Treiber, G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* 40 : 734, 1970.
30. Sklarow, S.S. Colwell, R.R., Champman, G.B. and Zane, S.F : Characteristics of a *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage isolated from Atlantic coast sediment. *Can. J. Microbiol.* 19 : 1519-1522, 1973.
31. 감염병발생정보 제5권 제12호. p.133, 1994.
32. 차인호, 권혁동, 이채남, 빈제훈, 이병규. 설사환자로부터 분리한 설사유발 원인균의 분리 및 분포도에 대한 조사연구(부제 : verotoxin을 생산하는 병원성 대장균의 분리 및 분포조사), 부산직할시 보건환경연구원보, 5 : 13-28, 1994.