발간등록번호
11-1543000-000161-01

Genetic engineering에 기초한 delivery system을 이용 돼지의 주요 세균성 설사예방용 다가 백신 개발

(Development of polyvalent vaccine for pigs against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* infections using genetically modified delivery system)

전북대학교

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Genetic engineering에 기초한 delivery system을 이용 돼지의 주요 세균성 설사예방용 다가 백신 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9 월 일

주관연구기관명 : 전북대학교
주관연구책임자 : 이 존 화
세부연구책임자 : 이 존 화
협동연구기관명 : 경남과학기술대학교
협동연구책임자 : 김 삼 웅

요 약 문

Ⅰ. 제 목

Genetic engineering에 기초한 delivery system을 이용 돼지의 주요 세균성 설사예방용 다가 백신 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

산업 동물에 있어서 포유시기에 폐사의 원인 중 약 80% 이상이 소화기 질환에 의해 야기되고 있으며, 육성시기에 증체율 감소의 중요한 원인 중 하나가 바로 소화기 질환이다. 특히 포유자돈에서의 1회 설사는 출하시기를 약 1주일 정도 지연시키는 것으로 알려져 있어 포유 자돈에서의 소화기 질환은 양돈 산업에 막대한 경제적 손실을 초래하는 중요한 질병 중 하나이다. 자돈에서 병원성 대장균과 살모넬라균에 의한 소화기 질환은 작년 한해 전체 소화기 질환 원인 중 약 57%와 30% 정도를 차지한다. 더욱이 세균성 소화기 질환 원인균 중에서는 거의 대부분을 차지할 정도로 그 발생률이 빈번하다. 이처럼 양돈 산업에 심각한 경제적 손실을 초래하는 세균성 소화기 질환을 예방하기 위하여 전 세계적으로 효과적인 예방백신을 개발하고자 많은 심혈을 기울이고 있다. 소화기 점막은 대다수의 소화기 및 호흡기 질환 유발 병원균과 처음으로 접하는 장소임과 동시에 이들 세균의 감염을 방어하는 최전방으로서 매우 중요한 곳이다. 하지만 기존 상용화 백신의 대부분은 주로 병원성 대장균을 포르말린 등으로 불활화 시킨 사균백신 이거나 유전자 조작 기술을 이용하여 항원성이 높은 항원을 정제한 단백질 항원을 오일이나 겔 등과 같이 적합한 면역증강제와 혼합한 형태이다. 이런 종류의 백신은 주로 근육으로 접종하기 때문에 점막에서의 방어보다는 systemic immunization에 중점을 두고 있다. 이런 systemic vaccine은 systemic 면역 유도는 높지만 점막에서의 항체 유도에는 별다른 영향을 주지 못해 점막에서의 항체 역가는 매우 낮아 병원균 방어에 실패하는 경우가 종종 발생하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 미국을 비롯한 선진국에서는 점막면역을 유도할 수 있는 백신 및 면역증강제 개발에 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 아직까지 이는 사람의 질병 및 실험동물인 마우스를 대상으로 한 기초 연구가 주종을 이루고 있다. 최근에는 수의학 분야에서도 일부의 질병에 대해서 특히, 조류 및 돼지를 대상으로 점막면역에 대한 연구가 수행 중에 있다. 그렇지만 아직 국내외적으로 연구실 수준의 연구가 진행 되고 있을 뿐 현장에서는 아직 활용되지 못하고 있는 실정이다.

돼지에서 설사를 일으키는 병원성 대장균 중 장독소원성 대장균 (entrotoxigenic *Escherichia coli*; ETEC)에 의해 주로 설사 및 부종병과 같은 다양한 장관 감염이 발생하고

있으며, 또한 장병원성 대장균 (enteropathogenic *Escherichia coli*; EPEC)에 의해서도 야기되고 있다. 돼지에서 지금까지 알려진 ETEC의 주요 adhesin (fimbriae)에는 F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P, Fas), F18, F41이 있으며 EPEC의 부착인자 (adhesin)로는 intimin이 알려져 있다. 세균이 숙주 세포에 부착하는데 사용하는 모든 인자를 부착인자 (adhesin)라고 하며 이에는 세균의 fimbria와 같은 세포 표면 단백질이 포함되어 있다. 세균은 이들 부착인자를 이용하여 숙주의 장관 세포 표면에 안정적으로 부착하여 증식을 시작하면서 독소를 분비함으로써 질병을 일으킨다. 따라서 이들 병원성 세균의 부착인자에 대한 면역반응이 유도 된다면 세균에 감염되었을 경우 이들 유도 항체가 이들 adhesin과 결합하여 세균이 숙주의 장관 표면에 부착하여 증식할 수 있는 기회를 미연에 차단함으로써 병원성 세균에 의한 질병 발생을 예방할 수 있을 것이다.

본 발명은 우선 ETEC와 EPEC의 발현되는 부착인자 항원의 분비를 증가시키도록 개발된 대장균 및 살모넬라균 shuttle vector에 각각 cloning시킨 후 이들 vector로 약독화 *Salmonella* Typhimurium을 형질전화 시켰다. 이들 형질 전화된 약독화 *S.* Typhimurium (살모넬라균)은 각 부착인자를 안정적으로 발현하여 돼지의 점막으로 분비시킴으로써 분비된 이들 항원에 대한 점막 및 전신 면역을 유도하여 이 병원성 대장균을 예방할 수 있도록 개발된 예방백신이다.

더욱이 본 연구에서 ETEC와 EPEC의 부착인자 항원을 돼지의 점막으로 전달하도록 고안된 약독화 살모넬라균은 병원성과 관련된 *lon*과 *cpxR* 두 유전자를 인위적으로 결실시킨 약독화 변이 균주로 병독성 균주로의 복쉬는 거의 불가능한 매우 안정적인 변이균주로 이들 두 유전자가 결실된 이 균주는 장 상피 세포로의 부착과 침입력은 증가하지만 숙주세포에서의 증식은 감소되어 결국은 면역원성은 높지만 병원성은 낮아진 약독화 살모넬라균이 되어 백신으로서의 활용이 가능하게 된다. 또한 이 약독화 살모넬라균은 하나가 아닌 두 개의 유전자를 결실시켰기 때문에 병원성 균주로 전환될 수 있는 기회는 매우 희박하다. 게다가 peptidoglycan 합성에 필요한 aspartate β-semialdehyde dehydrogenase (Asd)의 유전자가 결여된 살모넬라균은 diaminopimelic acid (DAP) 요구주로서 증식을 위해서는 배지에 DAP의 첨가나 이 유전자를 가진 plasmid의 형질전환이 필요하다. 그래서 *asd* 유전자를 갖고 있는 plasmid에 원하는 항원 유전자를 cloning한 후 이 변이 균주로의 형질전환은 항생제 선택 marker를 사용하지 않고도 외래 단백질을 발현할 수 있는 전달계 (delivery system)로서 이용이 가능하다.

또한 국내에서 주로 사용되고 있는 예방접종 방식인 사균 백신은 열이나 포르말린과 같은 방법으로 균체를 불활화하여 오일 등 면역 강화제와 혼합하여 주로 근육으로 접종하여 전신 면역반응을 유도하였다. 하지만 점막에서의 면역 반응을 유도하지 못해 점막에서의 질병 예방에 효과적이지 못 했다. 따라서 점막에서 생균처럼 점막으로의 투여와 점막 면역 반응을 유도할 수 있는 새로운 개념의 사균 백신의 개발이 절실하다. 따라서 국내 분리균주를 이용하여 점막 면역 반응을 효과적으로 유도할 수 있는 유전자 변형에 기초한 사균 (ghost

bacteria) delivery system을 이용한 다가 백신을 개발하여 돼지에서 병원성 대장균과 살모넬라균에 의한 소화기 질병을 동시에 예방하고자 한다. 특히 이들 병원균 중 일부는 사람에서도 심각한 질병을 유발 할 수 있는 인수공통전염병으로 동물에서의 이들 질병을 예방함으로써 사람으로의 전염 기회를 미연에 차단할 수 있는 효과를 얻을 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 백신 개발을 위한 면역원성이 우수한 항원 유전자 확보

돼지에서 주요 세균성 소화기 질병을 유발하는 병원성 대장균의 면역원성과 밀접한 관계가 있는 부착인자에 대해 조사하였으며 해당 인자에 대한 유전자를 확보하였다.

2. Genetic modification에 의한 생균 delivery system을 이용한 재조합 다가 백신 개발

각 부착인자 후보 항원 (K88ab, K88ac, K99, FasA, F41, intimin, FedA, FedF)을 pBP244와 약독화 *S.* Typhimurium delivery system에 클로닝한 후 항원의 발현 및 분비 여부를 Western blot 방법으로 확인하였다. 하였다.

3. BALB/c mice에서 신생 자돈 설사와 관련된 백신 후보주의 혼합 접종 후 각 항원별 면역반응 유도 실험

신생자돈 설사와 관련된 각 부착인자를 발현하는 백신균주를 마우스에 접종한 후 ELISA를 이용하여 항체 역가를 측정하였다.

4. 실험동물에서 이유 자돈 설사와 관련된 백신 후보주의 혼합 접종 후 각 항원별 면역반응 유도 실험

이유자돈 설사와 관련된각 부착인자를 발현하는 백신균주를 BALB/c mice에 접종한 후 정기적으로 각 부착인자에 대한 항체 역가를 ELISA를 이용하여 측정하였다.

5. 실험동물을 이용한 점막면역 유도 면역보강제 (adjuvant)의 효능시험

LTB를 발현하는 약독화 살모넬라를 마우스에 접종한 후 ELISA를 이용하여 면역 유도 여부를 확인하였으며 야외도전 균주로 감염 시킨 후 폐사 여부로 면역보강제의 효능에 대한 실험을 수행하였다.

6. 고스트 시스템 개발 및 마우스에서의 고스트 효능 시험

E lysis, Ptrc 프로모터, agfA signal peptide를 사용하여 항원이 발현할 수 있는 고스트 시스템을 개발하였으며, 제조된 고스트 시스템에 신생 자돈 및 이유후 자돈 설사와 관련된 각 부착인자를 클로닝하여 약독화 살모넬라 균주를 형질전화시킨 후 성장곡선과 생균수를 측정하였으며, 백신접종 후 야외균주로 도전감염을 진행하였다. 또한 각 부착인자에 대한 발현 여부를 Western blot으로 확인하였다. 마우스에 여러 경로로 각 부착인자 발현 고스트 사균 백신을 각각 백신 접종한 후 면역 역가는 ELISA를 이용하여 측정하였다.

7. 목적동물에서의 생균 백신 효능 예비실험

포유자돈에서의 백신의 효능실험을 확인하기 위해, 임신모돈에 예방접종 한 후 ELISA를 이용하여 항체 유도 여부와 그 모돈에서 출생한 자돈에 F4, F5, F6, F41 발현 야외균주를 혼합하여 도전감염하여 설사 및 폐사 여부로 방어 효과를 확인하였다.

이유자돈에서의 백신의 효능을 확인하기 위해, 임신모돈에 접종한 후 그 모돈에서 출생한 자돈에 예방백신 접종한 후 5주령이 되었을 때 F4와 F18 발현 야외균주로 도전감염하여 설사 및 폐사 여부로 방어 효과를 확인하였다.

8. 목적동물에서의 접종 경로별 백신의 효능 실험

임신 모돈이 분만 전에 생균 백신 및 포르말린 불활화 백신을 이용하여 다양한 경로로 접종하여 그 모돈에서 출생한 자돈이 1주령이 되었을 때 야외균주를 혼합하여 도전감염시켜 설사 및 폐사 유무로 백신의 효능을 조사하였다.

9. 자돈에서의 백신 효능 실험

이유자돈에서의 백신의 효능을 알아보기 위해 임신 모돈이 분만 전에 각각 생균 백신을 이용하여 다양한 경로로 접종하였으며, 그 모돈에서 출생한 자돈이 2주령이 되었을 때 포르말린 불활화 백신을 근육접종 한 후 야외균주를 혼합하여 경구 감염시켜 설사 및 폐사 유무로 백신의 효능을 조사하였다.

10. 고스트 벡터를 이용한 신생자돈 설사예방 백신 개발

개선된 고스트 벡터를 이용하여 포유자돈에서 주로 설사와 관련된 K88ab, K88ac, K99,

FasA를 클로닝하여 약독화 살모넬라를 형질전환하여 고스트 사균 백신 후보 균주로 제작하여 고스트화 여부 및 발현여부를 확인하였다.

11. 개발된 고스트 백신의 마우스에서의 면역유도 실험

제작된 각 ETEC의 부착인자를 발현하는 *Salmonella* Typhimurium Ghost vaccines의 접종 경로별 접종량 결정을 위해 각 접종경로별로 다양한 접종량을 접종 후 면역 유도 여부와 폐사 유무 등으로 접종경로별 접종량으로 결정하였다.

12. 실험동물에서의 ghost 백신 면역 반응 유도 및 최적화 시험

새로 구축한 벡터를 이용하여 고스트 사균 백신을 제작한 다음 고스트 사균화 비율과 각 부착인자의 발현 유무를 확인하였으며, 마우스에 고스트 사균 백신을 접종한 후 살모넬라 LPS에 대한 면역반응 유도 여부와 야외균주로 도전감염하여 방어 효과를 측정하였다.

13. 생균 다가 백신과 기존 상업용 백신과의 효과 비교실험

임신 모돈에 개발 백신 및 상업용 백신을 접종한 후 면역반응을 측정하였으며, 자돈이 1nfud이 되었을 때와 3주령이 되었을 때 각각 야외균주로 도전감염시켜 설사와 폐사 여부로 백신의 효능을 비교하였다.

14. 백신 균주의 양돈장에서의 방어 효과 실험

포유 자돈에서 설사로 인해 경영상에 애로사항을 겪고 있는 한 농장을 선택하여 모돈에 개발 백신과 그 농장에서 사용하고 있던 대장균 백신 그리고 대조군으로 나누어 백신을 접종하고 자돈이 출생하여 이유할 때까지 설사 여부 및 설사로 인한 폐사율을 비교하여 보았다.

15. 개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역 유도 실험

마우스를 대상으로 근육접종의 경우 면역 보강제를 혼합하거나 혼합하지 않고 근육접종한 후 ELISA를 이용하여 각 그룹간에 유도된 면역 반응을 비교하였다.

16. 개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역 유도 실험

마우스를 대상으로 경구 접종에 있어 면역 보강제를 혼합하거나 혼합하지 않고 경구접

종한 후 ELISA를 이용하여 유도된 항체 역가를 비교하였다.

17. 목적동물을 대상으로 경구접종에서의 신생 자돈 설사 예방 ghost 다가 백신의 효능 및 접종량 결정시험

임신 모돈이 분만 전에 개발 백신을 다양한 접종량으로 경구 접종한 후 ELISA로 항체 역가를 비교하였으며, 자돈에 야외균주로 도전감염하여 설사 및 폐사 유무로 백신의 효능 및 경구 접종량을 결정하였다.

18. 고스트 사균백신과 기존 상업용 백신과의 효능비교실험

임신 모돈이 분만 전에 개발 백신을 근육 접종과 경구접종 그리고 시판 상업용 백신을 각각 접종한 후 혈청 및 초유에서의 면역 반응을 비교하였으며 더불어 출산한 자돈에서 야외균주로 도전감염하여 설사 및 폐사 유무로 백신의 효능을 비교하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

1. 백신 개발을 위한 면역원성이 우수한 항원 유전자 확보

돼지에서 주요 세균성 소화기 질병을 유발하는 병원성 대장균의 부착인자가 면역원성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 부착인자를 중심으로 그 유전자를 확보하였다.

1) 신생 자돈에서 설사와 관련된 병원성 대장균의 주요 부착인자
F4 (K88ab, K88ac), F5 (K99), F6 (FasA), F41, Intimin

2) 이유 자돈에서 설사와 관련된 병원성 대장균의 주요 adhesin들
F4 (K88ab, K88ac), F18 (FedA, FedF)

2. Genetic modification에 의한 생균 delivery system을 이용한 재조합 다가 백신 개발

각 부착인자 후보 항원 (K88ab, K88ac, K99, FasA, F41, intimin, FedA, FedF)을 pBP244와 국내 분리주인 *S.* Typhimurium으로부터 개발된 약독화 *S.* Typhimurium delivery system에 클로닝한 후 항원의 발현 및 분비 여부를 Western blot 방법으로 확인하여 발현이 확인된 균주를 생균 다가 백신 균주로 사용하였다.

3. BALB/c mice에서 신생 자돈 설사와 관련된 백신 후보주의 혼합 접종 후 각 항원별 면역반응 유도 실험

신생자돈 설사와 관련된 K88ac, K99, FasA, F41, intimin을 실험동물인 마우스에 경구 접종한 후 정기적으로 각 부착인자에 대한 혈청에서의 IgG 항체 역가를, 분변에서 mucosal IgA 항체역가를 측정하여 혼합접종에 따른 각 부착인자에 대한 면역 유도 여부를 확인하였다.

4. 실험동물에서 이유 자돈 설사와 관련된 백신 후보주의 혼합 접종 후 각 항원별 면역반응 유도 실험

이유자돈 설사와 관련된 K88ab, K88ac, FedA, FedF를 BALB/c mice에 경구로 2회 접종한 후 정기적으로 각 부착인자에 대한 혈청에서의 IgG 항체 역가를, 분변에서 mucosal IgA 항체역가를 측정하여 혼합접종 후 각 부착인자에 대한 면역 유도 여부를 확인하였다.

5. 실험동물을 이용한 점막면역 유도 면역보강제 (adjuvant)의 효능시험

LTB를 발현하는 약독화 살모넬라가 점막에서 면역보강제로서의 효능 여부를 마우스를 이용하여 확인하여 본 결과 1차 접종을 약독화 살모넬라균주와 LTB 발현 약독화 살모넬라 균주를 1:5로 혼합한 후 2차를 약독화 살모넬라 균주만을 접종할 경우 LTB 발현 약독화 살모넬라만을 접종한 경우와 약독화 살모넬라만을 접종한 경우, 그리고 1차 및 2차 접종 모두 혼합하여 접종 경우에 비해 높은 방어면역과 방어율이 우수함을 확인할 수 있었다.

6. 고스트 시스템 개발 및 마우스에서의 고스트 효능 시험

고스트 cassette의 구성은 cI-P_R E lysis로 되어 있으며, cI는 P_R 프로모터에 온도 의존적 억제자로서 작용한다. E lysis는 박테리오페이지 ∅X174의 세포용균 단백질로서 온도 의존적으로 발현되어져서 표적 세포를 용균 시키게 하였다. 외부항원의 발현을 위해서 Ptrc 프로모터를 이용하였고 세포막으로 분비를 위해 agfA signal peptide를 사용하였다. 이렇게 제조된 고스트 시스템에 신생 자돈 및 이유후 자돈 설사와 관련된 각 부착인자를 클로닝하여 약독화 살모넬라 균주를 형질전화시킨 후 성장곡선과 생균수를 측정하였으며, 고스트 사균화 한 후 사균여부를 확인하였고, SEM으로 고스트 세포의 표면을 관찰하여 고스트 여부를 최종 확인하였다. 더불어 백신접종 후 도전감염을 진행하여 고스트 백신의 효능을 측정하였다. 또한 각 부착인자에 대한 발현 여부를 Western blot으로 확인하여 최종 고스트 사균 백신후보균주로 결정한 후 마우스에 여러 경로로 각 부착인자 발현 고스트 사균 백신을 각각 백신 접종한 후 접종

부착인자에 대한 혈청 IgG 항체 역가와 IgG1 및 IgG2a 항체 역가 유도 여부 그리고 질세척액에서의 mucosal IgA 항체 역가를 측정하여 고스트 백신의 효능 여부를 확인하였다.

고스트 사균 백신의 세포 표면에 각 부착인자 항원을 고발현시키기 위해 ompA signal sequence를 이용하였고, 고스트화 효율을 높이기 위해 역방향 arbinose promotor 시스템을 도입 하였다.

7. 목적동물에서의 백신 효능 예비실험

포유자돈에서의 백신의 효능실험을 확인하기 위해, 방어 임신모돈 분만 9주 전에 생균으로 경구접종한 후 3주 후 9분만 6주전에 생균 백신 균주를 포르말린으로 불활화 처리하여 근육 접종하여 혈청에서의 IgG, 초유에서의 IgG 및 IgA 항체역가 유도를 확인하였으며 그 모돈에서 출생한 자돈이 1주령이 되었을 때에 포유자돈에서 설사를 주로 일으키는 F4, F5, F6, F41 야외균주를 혼합하여 도전감염하여 도전 감염균주에 대한 방어 효과를 확인하였다.

이유자돈에서의 백신의 효능을 확인하기 위해, 임신모돈 분만 9주 전에 생균으로 경구접종한 후 3주 후 9분만 6주전에 생균 백신 균주를 포르말린으로 불활화 처리하여 근육 접종하여 혈청에서의 IgG, 초유에서의 IgG 및 IgA 항체역가 유도를 확인하였으며 그 모돈에서 출생한 자돈이 1주령이 되었을 때 포르말린으로 불활화 시킨 K88ab, K88ac, FedA, FedF를 발현하는 약독화 살모넬라균을 포르말린으로 불활화 시킨 사균 백신을 근육 접종하였으며 또한 자돈이 4주령이 되었을 때 K88ab, K88ac, FedA, FedF를 발현하는 약독화 살모넬라균 생균 백신을 경구 접종한 후 5주령이 되었을 때 이유자돈 설사와 밀접한 관련이 있는 F4와 F18 발현 야외균주로 도전감염하여 도전 감염균주에 대한 방어 효과를 확인하였다.

8. 목적동물에서의 접종 경로별 백신의 효능 실험

임신 모돈 분만 8주 전 및 5주 전에 각각 생균 백신 및 포르말린 불활화 백신을 이용하여 다양한 경로로 접종하여 그 모돈에서 출생한 자돈이 1주령이 되었을 때 포유자돈 설사와 관련된 F4, F5, F6, F41 발현 야외균주를 혼합하여 경구 감염시켜 설사 및 폐사 유무로 백신의 효능을 실시하여 본 결과 생균 백신을 경구로 두 번 접종한 그룹에서 가장 높은 방어면역을 유도하였으며, 접종경로와 상관없이 대조군을 제외한 모든 백신 접종 그룹의 자돈에서 탁월한 방어 효과가 관찰되었다.

9. 자돈에서의 백신 효능 실험

이유자돈에서의 백신의 효능을 알아보기 위해 임신 모돈 분만 8주 전 및 5주 전에 각각 생균 백신을 이용하여 다양한 경로로 접종하였으며, 그 모돈에서 출생한 자돈이 2주령이 되

었을 때 포르말린 불활화 백신을 근육접종 한 후 F4, F5, F6, F18, F41 발현 야외균주를 혼합하여 경구 감염시켜 설사 및 폐사 유무로 백신의 효능을 실시하여 본 결과 백신을 접종한 그룹에서 탁월한 방어 효과가 관찰되었다.

10. 고스트 벡터를 이용한 신생자돈 설사예방 백신 개발

개선된 고스트 벡터를 이용하여 포유자돈에서 주로 설사와 관련된 K88ab, K88ac, K99, FasA를 클로닝하여 약독화 살모넬라를 형질전환하여 고스트 사균 백신 후보 균주로 제작하였다. 고스트화 여부 및 Western blot으로 각 부착인자에 대한 발현여부를 확인한 다음 각 부착인자에 대한 발현이 확인된 균주를 최종 고스트 사균 백신 균주로 결정하였다.

11. 개발된 고스트 백신의 마우스에서의 면역유도 실험

Ghost system은 E lysis gene을 바탕으로 하여 해당 일정한 온도가 되면 활성화 되어 숙주에 구멍을 뚫게 만든다. 그리고 그 안의 세포질을 빠져나가게 하여 숙주 균을 화학적 처리나 물질적 스트레스 없이 자연적으로 사멸시킨다. 따라서 숙주가 가진 Outer membrane protein의 항원성을 그대로 유지 할 수 있으며 내부에 세포질이 없어 더 높은 항원 제시 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 특징을 이용하여 돼지에서 주로 설사 및 부종병과 같은 다양한 장관 감염을 일으키는 장독성 대장균(Enteropathgenic Escherichia coli; ETEC)의 주요 인자 adhesin (fimbriae) F4(K99) F5(K99) F6(987P)를, Salmonella delivery system을 이용하여 발현시켜 *Salmonella*와 ETEC를 동시에 예방할 수 있는 다가 백신을 개발하였다. 먼저 개발백신의 목적동물에서의 효능을 검증하기 위하여 실험동물인 마우스에서 효과를 확인하였다. 제작된 ETEC를 발현하는 *Salmonella* Typhimurium Ghost vaccines의 적절한 접종량을 결정하였으며 그에 따른 접종 경로를 결정하였다. 특히 근육접종하였을 때 CD4+ CD8+의 cell population이 대조군에 비해 보다 유의성 있게 증가하였다. 또한 항체분비를 위한 B cells의 항원 자극에 대한 cell population 역시 대조군 그룹에 비해 증가하였다. 게다가 cell-meidated immune response의 결과 모든 항원에 대한 자극에 유의성 있게 반응하였다. 특히 점막면역에서 방어에 중점적인 역할을 수행하는 sIgA의 항체 역가는 접종 후 2주차에 그 효과가 가장 높았다. 이 항체를 유지하기 위하여 수행한 2차접종의 결과 그 항체 역가를 최고 6주까지 유지하여 백신이 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 항체 반응의 실질적인 점막에서의 발현을 IHC로 확인할 수 있었다. 따라서 ETEC를 발현하는 *Salmoenlla* Typhimurium Ghost Vaccines은 근육접종으로 $1x10^8$cells/100μl의 접종량으로 2회 접종하는 것이 적절하였다.

12. 실험동물에서의 ghost 백신 면역 반응 유도 및 최적화 시험

새로 구축한 벡터를 이용하여 고스트 사균 백신을 제작한 다음 고스트 사균화 비율과 Western blot으로 발현을 확인하여 최종 고스트 사균 백신으로 결정하였다.

마우스에 FedA. FedF, F41, intimin을 세포 외벽에 각각 발현하는 고스트 사균 백신을 근육 접종한 후 살모넬라 LPS에 대한 혈청에서의 IgG 및 질 세척액에서의 IgA 항체 모두 잘 유도함의 확인되었으며 살모넬라 야외균주로 도전감염 하여 도전감염 균주에 대해서 대조군에 비해 방어 효능이 우수함을 확인하였다.

13. 생균 다가 백신과 기존 상업용 백신과의 효과 비교실험

개발 백신 및 상업용 백신은 초유에서의 IgG 및 IgA의 항체 역가가 높았다. 따라서 모든 백신 모돈에서 출생한 자돈은 모돈의 높은 항체를 포함한 모유를 섭취하여 1주령에서의 혈청 IgG의 항체역가는 대조군에 비해 유의 있게 높았다. 그래서 대조군에서는 약 45%에서 설사가 관찰된 반면 모든 백신 그룹에서 출생한 자돈에서는 도전감염 균주를 방어 했다. 하지만 개발 백신을 투여한 모돈에서 출생한 자돈은 3주령의 혈청 IgG의 항체역가는 상업용 백신을 투여한 모돈에서 풀생한 자돈 및 대조군에 비해 유의 있게 높았다. 비록 상업용 백신에서 출생한 자돈에서의 항체역가 또한 대조군에 비해 높았지만 1주령과는 다르게 개발 백신을 투여한 모돈에서 출생한 자돈에 비해 유의 있게 낮은 항체역가가 관찰되었다. 이 것은 도전감염 후 자돈에서의 방어와도 직접적인 관련이 있는 것으로 생각된다. 즉 3주령 자돈에서의 방어여부를 확인하기 위해 도전감염 후 설사 유무를관찰하여 본 걀과 개발 벡신을 투여한 모돈에서 출생한 자돈은 1주령에 이어 설사가 관찰되지 않은 반면, 상업용 백신을 투여한 모돈에서 출생한 자돈은 약 37%에서 설사가 관찰되었으며 대조군에서는 50%에서 설사가 관찰되었다.

14. 백신 균주의 양돈장에서의 방어 효과 실험

야외 양돈장에서의 본 개발 백신의 실제 효능을 알아보기 위해 포유 자돈에서 설사로 인해 경영상에 애로사항을 겪고 있는 한 농장을 선택하여 모돈에 개발 백신과 그 농장에서 사용하고 있던 대장균 백신 그리고 대조군으로 나누어 백신을 접종하고 자돈이 출생하여 이유할 때까지 설사 여부 및 설사로 인한 폐사율을 비교하여 보았다. 그 결과 개발백신을 접종한 모돈에서 출생한 자돈에서는 설사와 폐사가 거의 발생하지 않은 반면 상용화 백신 접종군 및 대조군의 모돈에서 출생한 자돈의 경우에는 대체로 모든 자돈에서 심한 설사가 관찰되었으며 설사로 인한 폐사와 항생제 처치를 필요로 하였다. 이는 개발 백신이 야외 양돈농장에서도 기존 상업용 백신에 비해 포유자돈에서 설사를 효과적으로 예방할 수 있음을 확인할 수 있었다.

15. 개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역 유도 실험

마우스를 대상으로 근육접종의 경우 면역 보강제와의 혼합 여부에 대한 실험 결과, 혈청 IgG 유도 실험에서 면역 보강제의 첨부 없이도 1차 접종 후 4주째부터 강력한 면역 반응을 유도하였으며, 점막 면역 반응 유도 시험에서는 2차 접종 후 2주나 4주 째에 면역 보강제의 첨부와 상관없이 강력한 면역 반응을 유도하였다. 이와 같은 결과를 종합해 보면 대장균 설사 예방을 위해서는 근육 접종의 경우에 면역 보강제와의 혼합 없이 백신 균주 단독으로 접종하여도 질병 예방에 필요한 충분한 면역 반응을 유도할 수 있음을 확인하였다.

16. 개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역 유도 실험

마우스를 대상으로 경구 접종에 있어 면역 보강제와의 혼합 여부에 대한 실험 결과, 혈청 IgG 유도 및 fecal IgA 유도 모두에 있어서 근육 접종에서와는 면역 보강제와의 혼합에도 불구하고 대조군에 비해 월등한 면역 반을을 유도하지 못해 면역 보강제와의 혼합 유뮤와 상관없이 접종경로로는 적합하지 않음이 확인되었다.

17. 목적동물을 대상으로 경구접종에서의 신생 자돈 설사 예방 ghost 다가 백신의 효능 및 접종량 결정시험

개발 백신을 접종량을 달리하여 경구 접종하였을 경우 접종량을 2×10^9 cells로 접종 할 경우에는 모돈 혈청 IgG 및 초유 IgG와 IgA 항체 역가는 대조군에 비해 증가는 하였지만 월등할 정도의 증가는 관찰되지 않았으며 또한 초유를 섭취한 자돈에서의 혈청 IgG 및 IgA 항체 역가 역시 대조군에 비해 월등한 항체 역가가 관찰되지 않았다. 반면, 접종량을 2×10^{10} cells 이상으로 경구 접종할 경우에는 모돈 혈청에서의 IgG 그리고 chdb 에서의 IgA 및 IgG 항체 역가 모두에서 대조군에 비해 탁월한 증가가 관찰되었으며 초유를 섭취한 자돈 혈청에서의 IgG 및 IgA 역시 대조군에 비해 상당히 높은 항체 역가가 관찰되었다. 또한 이들 면역 반응의 결과에서와 같이 접종량을 2×10^{10} cells 이상 경구 접종할 경우에는 도전 감염에 대해 모든 자돈에서 방어한 반면, 이 접종량 이하로 접종 할 경우에는 도전감염 균주에 대해 일부의 자돈에서만 설사가 관찰되지 않았다.

18. 고스트 사균백신과 기존 상업용 백신과의 효능비교실험

자돈에서 도전 균주에 대한 방어능은 초유에서의 IgA 및 자돈 혈청에서의 IgA의 결과와 일치하는 결과가 관찰되었다. 즉, 초유에서의 IgG 및 자돈에서의 IgG 항체 역가는 백신의 종류 및 접종 경로와 상관없이 모든 그룹에서 모든 항원에 대해 대조군에 비해 shb은 항체 역

가가 관찰된 반면, 초유에서의 IgA 및 자돈 혈청에서의 IgA 항체 역가는 고스트 백신을 경구 접종한 그룹에서 가장 높은 항체 역가가 관찰되어 모든 자돈에서 도전 감염 후 설사가 관찰되지 않았다. 한편 고스프 백신을 근육 접종한 경우는 상업용 백신을 근육 접종한 경우보다 약간 높은 IgA 항체 역가가 관찰되었으며, 상업용 백신을 근육 접종한 경우는 대조군에 비해 약간 높은 항체 역가가 관찰되어 자돈에서 도전 감염 후 23.5%와 30.4%에서 각각 설사가 관찰되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 본 연구에서 제작된 생균 다가 백신 및 고스트 사균 백신은 기존의 시판 백신에 비해 방어력에 있어 우수함을 나타내었으며, 살모넬라균과 병원성 대장균을 동시에 예방할 수 있는 장점을 지니고 있으며, 또한 기존 시판 백신과 달리 이유 후 설사를 예방할 수 있어 본 연구에서 제작된 백신은 상당한 가치가 있다. 실용화를 위한 준비 단계에 있다.

2. 고스트 사균 백신은 방어 효과에 있어 생균백신 보다는 못하지만 생균백신에 대한 부정적인 생각을 가진 경우에는 더욱 안전한 사균 백신을 필요로 하는 경우에 적용이 가능하다.

3. 생균 및 사균 백신 모두 경구 및 근육 접종이 가능하기 때문에 농장 현실에 맞는 접종 방법을 선택할 수 있는 장점이 있다.

SUMMARY

I. Title

Development of polyvalent vaccine for pigs against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* infections using genetically modified delivery system

II. Summary

To investigate the association of pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesins with the development of diarrhoea in piglets of different age groups and to test their relative competitiveness, piglets were orally inoculated with a mixture of *E. coli* strains harbouring F4, F5, F6, F18 and F41 fimbrial genes. A total of 537 *E. coli* strains with haemolytic activity were isolated from 36 diarrhoeic piglets. The F4 fimbrial gene was observed in 98.5%, 97.6% and 80.6% strains carrying fimbrial genes isolated from diarrhoeic piglets that were infected at 1, 3 and 5 weeks of age, respectively. These data demonstrate that F4 fimbriae are highly associated with diarrhoea in piglets of all age groups. Interestingly, the F18 fimbrial gene was observed in 2.4% and 25.4% strains carrying fimbrial genes isolated from the 3- and 5-week-old groups, respectively, which confirms that F18 fimbriae are associated with diarrhoea in piglets from late stages of suckling to postweaning, and are more related to diarrhoea in weaned than in unweaned piglets.

To construct a novel live oral vaccine candidate for the prevention of pathogenic *Escherichia coli* infections in neonatal piglets, an expression and secretion plasmid and an attenuated *Salmonella* delivery system were used. The individual *E. coli* genes K88ac, K99, FasA, F41 and intimin adhesins were inserted into pBP244 containing *asd, lepB, secA* and *secB*, and these plasmids were transformed into a *Salmonella* Typhimurium Δcpx R Δlon Δ asd. Forty female BALB/c mice were divided into four groups, A to D (ten mice per group). Groups A and B were administered with the mixture containing all constructs and the *S.* Typhimurium containing pBP244 only as a control, respectively. Groups C and D were primed and boosted with the mixture and the *S.* Typhimurium harboring pBP244 only, respectively. Each recombinant adhesin secreted from the individual candidates was confirmed by Western blot analysis. The serum IgG and secretory IgA (sIgA) titers to individual adhesins in all immunized groups were higher than those in control. Furthermore, IgG and sIgA levels in group C were higher than those in group A, and the IgG1 titers were increased in Group C but IgG2a titers were similar or decreased in Group C compared to Group A. In addition, the vaccine strains were not detected in fecal samples

of any immunized mice. The novel vaccine candidates are not only highly immunogenic, but also safe for vaccinated mice and environment. In addition, the immune responses can be more efficiently induced through the booster-administration.

A plasmid harboring *eltB*, the gene encoding heat-labile enterotoxin (LTB), was constructed by insertion of *eltB* into an Asd-lactamase signal plasmid (pMMP65). This was introduced into the *Δ*lon *Δ*cpxR *Δ*asd *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain and designated the LTB adjuvant strain. LTB protein production and secretion from the strain were demonstrated with an immunoblot assay and enzyme-linked immunosorbent assay. The LTB strain was evaluated for enhancement of immunity and protection efficacy induced by a previously constructed live *Salmonella* vaccine candidate. In addition, immunization strategies using the LTB strain were optimized for effective salmonellosis protection. Seventy female BALB/c mice were divided into seven groups (A to G; n 10 mice per group). Mice were primed at 6 weeks of age and boosted at 9 weeks of age. All mice were orally challenged with a virulent wild-type strain at week 3 postbooster. Serum IgG and IgA titers from mice immunized with the LTB strain alone or with a mixture of the LTB strain and the vaccine candidate were significantly increased. The secretory IgA titers from mice immunized with the LTB strain alone or with the mixture were at least 2.2 times greater than those of control mice. In addition, all group E mice (primed with the vaccine-LTB mixture and boosted with the vaccine candidate) were free of clinical signs of salmonellosis and survived a virulent challenge. In contrast, death due to the challenge was 100% in control mice, 80% in group A mice (single immunization with the vaccine candidate), 60% in group B mice (primed and boosted with the vaccine candidate), 40% in group C mice (single immunization with the LTB strain), 30% in group D mice (primed and boosted with the LTB strain), and 30% in group F mice (primed and boosted with the vaccine-LTB mixture). These results suggest that vaccination with the LTB strain, especially when added at the prime stage only, effectively enhances immune responses and protection against salmonellosis.

In order to construct a novel vaccine candidate for preventing post-weaning diarrhea in swine, the individual genes for *Escherichia coli* K88ab, K88ac, FedA, and FedF fimbriae were inserted into a secretion plasmid pBP244 containing asd, lepB, secA, and secB. These were transformed into *Salmonella* Typhimurium *Δlon ΔcpxR Δasd*. Secretion of the individual recombinant fimbrial antigens was confirmed by immunoblot analysis. Groups 1 and 2 mice received a single oral dose of the vaccine mixture and *S.* Typhimurium carrying pBP244 only as a control, respectively. In groups 3 and 4, mice were primed and boosted with the vaccine mixture and *S.* Typhimurium carrying pBP244 only as a control,

respectively. In general, all immunized mice had significantly increased serum immunoglobulin (Ig)G (P , 0.05) and intestinal secretory IgA against the individual fimbrial antigens compared with those mice in the control group. In the IgG2a and IgG1 titer assay, only IgG2a titer was increased in group 1, while both IgG2a and IgG1 titers were increased in group 3. Furthermore, the vaccine strains were not detected in the excreted feces of any immunized mice. Thus, the vaccine candidate can be highly immunogenic and be safe to the environment.

In this study, we investigated the optimal condition of a novel multivalent *Escherichia coli* vaccine candidate for protection efficacy against *E. coli* colibacillosis in piglets via booster strategy using oral and intramuscular administration routes. The candidate was constructed using an expression and secretion plasmid and an attenuated *Salmonella* delivery system as described earlier. Pregnant sows were divided into four groups of three sows each and immunized with a mixture of the individual vaccine strains. Sows were primed and boosted at 8 and 11 weeks of pregnancy. Group A sows were primed intramuscularly and boosted orally. Group B sows were primed and boosted orally. Group C sows were orally primed and intramuscularly boosted. Group D sows were primed and boosted with PBS as a control. The serum IgG and IgA levels to individual adhesin antigens were elevated in immunized sows compared to controls, as were colostral IgA and IgG levels of all immunized sows. In addition, serum IgG and IgA levels in piglets from all immunized sows were significantly increased. These data suggest that systemic and colostral immune responses were highly induced by vaccination with the candidate. After challenge with a virulent strain of *E. coli*, clinical signs such as diarrhea and mortality were not observed in suckling piglets from the immunized sows, while diarrhea and mortality affected 100% and 25% of the control group piglets, respectively. These findings indicate that immunization of sows with the candidate vaccine irrespective of administration routes can effectively protect their piglets against neonatal *E. coli* diarrhea.

The efficacy of a novel, live delivery vaccine was examined for protection against postweaning diarrhea in pigs. An expression/secretion plasmid harboring genes encoding enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ab, K88ac, FedA and FedF fimbriae was constructed and harbored in an attenuated *Salmonella*, which was used as the vaccine candidate. Groups A (n = 3) and B (n = 3) sows were orally immunized with the candidate vaccine and PBS as a control, respectively, at 8 and 11 weeks of pregnancy. All group piglets were challenged with two challenge strains at 5-week-old. All immunized sows had significantly increased IgG and IgA levels in both serum and colostrum to individual adhesins compared to the control ($p \leq 0.05$). Immune response in Group A piglets were

significantly increased ($p \leq 0.05$). Furthermore, no clinical signs were observed in Group A piglets after the challenge and no challenge strains were detected in rectal swabs, while diarrhea was observed in 47.8% control piglets and challenge strains were isolated from all the diarrheic piglets. These results show that immune response of sucking piglets can maintain at higher levels through the milk of the immunized sows and vaccination of sows with the candidate may protect colibacillosis in weaned piglets.

In this study, a comparative evaluation of a novel live vaccine candidate expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) fimbriae and a commercial ETEC vaccine was carried out in suckling to weaned piglets. The *E. coli* K88ab, K88ac, K99, FasA and F41 fimbrial genes were individually inserted into an expression/secretion plasmid, pBP244. These plasmids were subsequently transfected into attenuated *Salmonella*, which were used as the vaccine candidate. Eighteen pregnant sows and 107 of their piglets were used in this comparative study. All the vaccinated groups of sows and piglets exhibited significantly increased antibody levels relative to specific antigens when compared with those in the unimmunized control. The experimental piglets with the vaccine candidate did not experience diarrhea following challenge with the virulent ETEC strains. However, diarrhea was observed in 36.8% of the piglets in the group immunized with the commercial vaccine and in 50% of the control group after challenge with the ETEC strains. These findings indicate that immunization of sows with the candidate vaccine can effectively protect their young pigs against colibacillosis.

In order to prevent diarrhea in young pigs caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC), a bacterial ghost vaccine was developed by expressing antigens K88ab, K88ac, K99, FasA isolated from domestic pigs with diarrhea. The expression of cloned antigens was confirmed by Western Blot. Experiment number one. The 6 week old female Balb/C mice were used for study. In order to determine the appropriate dosage, preliminary experiments were conducted by delivering the K88ab expressing vaccine with various dosages via intramuscular and oral methods. The status of the plasma IgG and fecal sIgA titers confirmed the appropriate dosage for IM delivery was $1x10^8$cells, and $1x10^9$cells for oral delivery. Experiment number two. Bacterial ghost preparations expressing K88ab, K88ac, K99 and fasA were individually delivered via IM and Oral routes with the dosage determined in preliminary experiments. Lymphocyte proliferation assay was conducted to determine the differentiation of immune cells against the antigens and FACS proved the differentiation of CD4+ T cells, CD8+ T cells, B cells in all test subjects regardless of route of delivery. The plasma IgG and fecal sIgA titers were higher in mice vaccinated via IM route. The data indicated that the IM route is better for delivery of studied vaccine.

Experiment number three. The mice were immunized with mixture of bacterial ghosts expressing K88ab, K88ac, K99 and FasA antigens. The immunization induced significant systemic antibody titers, and the expression of IFN-gamma in in-vitro stimulated splenocytes. The expression of antigen specific sIgA on the epithelial surface of the intestines was conformed by immunohistochemistry. Experiment number four. Booster vaccinations were carried out to enhance the efficiency of the vaccine. Group 1, 2 and 3 mice received one, two and three time vaccinations, respectively. Group 4 was used and non-immunized control. Each inoculation took place at 3 weeks interval and plasma IgG and fecal sIgA titers were monitored until the 8th week after the last inoculation. Results showed that the 2nd, 3rd group showed the best level of sustainability in terms of antibody titers.

Salmonella enterica serovar Typhimurium JOL401 was isolated from chicken in South Korea. A novel plasmid, pSW, harbored in JOL401, consists of 2,216 base pairs (bps) and three putative open reading frames (ORFs). pSW was 86% and 82% homologous to pSGI15 from *Salmonella enterica* and pJHCMW1 from *Klebsiella pneumonia*, respectively, both of which are ColE1-type plasmids that undergo theta-type replication. ORF1 of pSW exhibited 98% identity and 99% positive to ORF1 of pJHCMW1, which encodes a putative transmembrane protein. ORF2 of pSW was homologous to sequences that encode replication initiators in pSGI15 and pJHCMW1, exhibiting a high degree of homology to the putative replication initiator of pJHCMW1. Thus, ORF2 appeared to encode the pSW replication initiator. ORF3 of pSW, which exhibited similarity to ORF2 of pSGI15, remains undefined. Newly isolated pSW is a member of the ColE1-type family of plasmids and consists of three putative ORFs, of which one, ORF2, is a strong candidate for the gene encoding the pSW replication initiator.

The plasmid pJB01 contains a single operon consisting of three orfs as *copA, repB* and *repC* cistrons. The operon, also called as *repABC* operon, starts transcription at T695 or A696 on the pJB01 genetic map. CopA (called as RepA in pMV158 family) or ctRNA (counter-transcriptRNA)ofthisplasmidplayrolesasarepressorofRepB,areplicationinitiator,onthetranscriptionalandtranslationallevel,respectively.RepCdidn'tbind73bpPCRproductincludingthreetandemrepeats(5¢-CAACAAA-3¢), the binding sites for RepB and any other regions on pJB01. However, when RepB and RepC were added simultaneously in the reaction mixture for gel mobility shift assay, unexpectedly, three kinds of retarded bands were observed. It suggests that RepC can interact with RepB by protein-protein interaction. In addition, the copy numbers of RepC-deleted pJB01 *ermC* (erythromycin-resistantmethylaseC) plasmids are in creased 1.37-1.45 folds when compared with that of parent pJB01*ermC*. From these,

it could be proposed that RepC plays a role as a negative regulator to modify RepB function in the initiation of pJB01 replication, and therefore, the copy number of pJB01 is maintained via mutual global regulation of various replication factors, such as CopA, ctRNA, RepB, and RepC.

Signal sequence (SS) of surface or secreting proteins plays an important function for protein secretion in bacterial system. The SS of various proteins may mediate different level of protein excretion yield of the proteins. In order to examine the effect of SS types in protein secretion, signal sequences of Bla (b - lactamase), AgfA (thin aggregative fimbriae A), StfA (*S.* Typhimurium fimbriae A), and OmpW (outer membrane protein W) were selected for the secretion of PspA protein which was used as a test protein. The PCR-amplified DNAs corresponding to each SS were cloned into the plasmid pYA3342. A primer used in PCR was designed to insert a His_6-tag at the C-terminal of SS for the convenientde tection of expressed SS. The 0.8kb *Eco*RI-*Hin*dIII *pspA* gene was cloned into the recombinant plasmids, resulting pMMP66, pMMP67, pMMP68, and pMMP70. The *S.* Typhimurium strains harboring the recombinant plasmids expressed the His_6-tagged PspA, demonstrating in-frame fusion of PspA to each SS. Depending upon the type of SS, cell lysateas wel lassecreted PspA of each *Salmonella* samples was found different. Relatively, *S.* Typhimurium containing pMMP67 (carrying AgfA SS) secreted the highest level of PspA than others, suggests that the AgfA SS mediates efficient translocation of the PspA. Conclusively, the AgfA SS mediated secretion system in pMMP67 can be used in variety fields required for the high level of protein secretion, especially antigen delivery in recombinant attenuate *Salmonella* vaccines.

In order to construct a conditional lethal *Salmonella* mutant, an arabinose-regulated recombinant genetic system was used. The *Salmonella* aspartatesemialdehydedehydrogenase (*asd*) gene was localized under the control of *araC* P_{araBAD} in a plasmid to create the *araC* P_{araBAD}::*asd* cassette. The cassette was cloned into a plasmid carrying a p15A replication origin to create the recombinant plasmid pMMP55. The growth of *Salmonella* MMP10 harboring pMMP55 was dependent on the presence of arabinose. In the presence of arabinose, the Asd deficiency due to chromosomal deletion of *asd* in the *Salmonella* host was complemented by the *asd* gene transcribed and translated under the P_{araBAD} promoter and *araBAD* Shine-Dagorno (SD) sequence in pMMP55. Growth inhibition of the strain was demonstrated by arabinose depletion in M9 minimal medium, indicating that the strain were unable to grow in an arabinose-limited environment. In addition, the analysis of a 50% lethal dose (LD50) using mice revealed that the strain MMP10 exhibited attenuation by approximately 100-fold relative to that of the unmodified strain. In conclusion, these

data suggest that the *araC* P_{araBAD}::*asd* system developed in this study can be used to construct conditional lethal *Salmonella* mutants for application as safe, live-attenuated *Salmonella* vaccines.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Application ---------- i

Summary in Korean ---------- ii

Summary in English ---------- xiv

Contents in English ---------- xxi

Contents in Korean ---------- xxiii

Chapter 1. Introduction ---------- 1
1. Purpose of research ---------- 1
2. Necessity of research ---------- 1
3. Contents of research ---------- 3

Chapter 2. Present state of the technical development ---------- 5
1. International stage of the technical development ---------- 5
2. Technical level of the research team ---------- 5

Chapter 3. Contents of research and result ---------- 7
1. Annual plan of research ---------- 7
1) The first year ---------- 7
2) The second year ---------- 8
3) The third year ---------- 9
2. Methods and result ---------- 10
1) Deletion of pathogenicity-related genes ---------- 10
2) Development of recombinant polyvalent vaccine using live delivery system by genetic modification ---------- 11
3) Induction of immune response and assessment of side effects of the vaccine in murine models ---------- 18
4) Development of ghost system and assessment of protection efficacy of the ghost in murine models ---------- 36

5) Evaluation of protection efficacy of the vaccine in pigs ---------- 56
6) Evaluation of safety and protection efficacy of the vaccine by various immunization routes in pigs ---------- 64
7) Evaluation of protection efficacy of the vaccine in piglets ---------- 70
8) Development of ghost vaccine against colibacillosis for suckling piglets ---------- 73
9) Evaluation of immune response induction post immunization with ghost vaccine for colibacillosis in murine models ---------- 77
10) Optimization of the ghost vaccine in murine models ---------- 97
11) Comparative study between the vaccine and the commercial vaccine ---------- 126
12) Filed test of the vaccine in pig farm ---------- 136
13) Optimization of the ghost vaccine by intramuscular immunization in murine models ---------- 139
14) Optimization of the ghost vaccine by oral immunization in murine models ---------- 143
15) Optimization the ghost vaccine by oral immunization in pigs --------- 147
16) Comparative study between the ghost vaccine and the commercial vaccine ---------- 153
17) Improvement of recombinant ghost vaccine and evaluation of protection efficacy against salmonellosis in mice immunized with the improved ghost vaccine ---------- 159

Chapter 4. Contribution to related field ---------- 177

Chapter 5. Achievement and plan for practical use ---------- 179

Chapter 6. Scientific information obtained ---------- 183

Chapter 7. Reference ---------- 184

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ---------- 1
제 1 절 연구개발의 목적 ---------- 1
제 2 절 연구개발의 필요성 ---------- 1
제 3 절 연구개발의 범위 --- ---------- 3

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ---------- 5
제 1 절 국내외 기술개발 현황 ---------- 5
제 2 절 본 연구팀의 선행기술 수준 ---------- 5

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ---------- 7
제 1 절 연차별 세부과제별 연구개발의 목표 및 개요 ---------- 7
1. 1차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 ---------- 7
2. 2차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 ---------- 8
3. 3차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 ---------- 9
제 2 절 연구개발 수행방법 및 결과 ---------- 10
1. 백신 개발을 위한 면역원성이 우수한 항원 유전자 확보---------- 10
2. Genetic modification에 의한 생균 delivery system을 이용한 재조합 다가 백신 개발 -- 11
3. 실험동물에서의 면역 유도 실험 및 부작용 검사 ---------- 18
4. 고스트 시스템 개발 및 마우스에서의 고스트 효능 시험 ---------- 36
5. 목적 동물에서의 백신 효능 예비 실험 ---------- 56
6. 목적동물에서의 접종 경로별 백신의 효능 시험 ---------- 64
7. 자돈에서의 백신 효능 시험 ---------- 70
8. Ghost vector를 이용한 신생자돈 설사 예방 백신 개발 ---------- 73
9. 개발된 ghost 백신의 마우스에서의 면역 유도 실험 ---------- 77
10. 실험동물에서의 ghost 백신 면역 반응 유도 및 최적화 시험 ---------- 97
11. 생균백신과 기존 상업용 백신과의 효능비교실험 ---------- 126
12. 백신균주의 양돈장 filed 시험 ---------- 136
13. 개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역 유도 실험 - 마우스를 대상으로 근육접종에서의 최적화 실험 : adjuvant 혼합 여부 실험 ---------- 139
14. 개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역 유도 실험 - 마우스를 대상으로 경구접종 경우에서의 최적화 실험 :adjuvant 혼합 여부 실험 ---------- 143
15. 목적동물을 대상으로 경구접종에서의 신생 자돈 설사 예방 ghost 다가 백신의 효능 및

접종량 결정시험 ---------- 147
16. 고스트 사균백신과 기존 상업용 백신과의 효능비교실험 ---------- 153
17. 고스트 재조합 다가 고스트 백신 개선 및 이를 활용한 마우스에서 고스트 사균백신 근육 접종 후 살모넬라에 대한 방어 효과 ---------- 159

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ---------- 177

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ---------- 179

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ---------- 183

제 7 장 참고문헌 ---------- 184

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구의 최종목표는 포유자돈에서 돼지에서 주요 소화기 질병을 야기하는 원인균인 병원성 대장균과 살모넬라균을 방어하기 위해 genetic modification에 기초한 생균 및 ghost 사균 delivery system을 이용하여 두 병원체를 동시에 예방할 수 있는 다가 백신을 개발하여 실험동물 및 목적동물에서의 백신의 안전성과 효능에 관한 실험을 수행하여 현장에서 적용 가능한 접종경로와 제조방법을 최적화 하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 포유자돈에서 병원성 대장균 및 살모넬라에 의한 소화기 질환의 중요성

산업 동물에 있어서 포유시기에 폐사의 원인 중 약 80% 이상이 소화기 질환에 의해 야기되고 있으며, 육성시기에 증체율 감소의 중요한 원인 중 하나가 바로 소화기 질환이다. 특히 포유자돈에서의 1회 설사는 출하시기를 약 1주일 정도 지연시키는 것으로 알려져 있어 포유자돈에서의 소화기 질환은 양돈 산업에 막대한 경제적 손실을 초래하는 중요한 질병 중 하나이다. 자돈에서 병원성 대장균과 살모넬라균에 의한 소화기 질환은 작년 한해 전체 소화기 질환 원인 중 약 60%와 30% 정도를 차지한다. 더욱이 세균성 소화기 질환 원인균 중에서는 거의 대부분을 차지할 정도로 그 발생률이 빈번하다. 이처럼 양돈 산업에 심각한 경제적 손실을 초래하는 세균성 소화기 질환을 예방하기 위하여 전 세계적으로 효과적인 예방백신을 개발하고자 많은 심혈을 기울이고 있다.

2. 병원성 대장균 및 살모넬라에 백신 현황

통계청자료에 의하면 11년 12월 현재 모돈 사육 두수 약 100만 마리로 1년에 평균 2.2회 임신을 하며 대장균 백신은 초산 돈일 경우와 대장균에 의한 설사가 심한 양돈장에서는 임신할 때마다 2회 접종을, 그리고 상태가 대체로 양호한 양돈장에서는 경산 돈에서는 1회 접종을 권장하고 있다.

소화기 점막은 대다수의 소화기 질환 원인균과 처음으로 접하는 장소임과 동시에 이들 세균의 감염을 방어하는 최전방으로서 매우 중요한 곳이기도 하다. 하지만 기존 상용화 백신의 대부분은 주로 병원성 대장균을 포르말린 등으로 불활화 시킨 사균 백신 이거나 유전자 조작 기술을 이용하여 항원성이 높은 항원을 정제한 단백질 항원을 오일이나 겔 등과 같이 적합한

면역증강제와 혼합한 형태로 이런 종류의 백신은 주로 근육으로 접종하기 때문에 점막에서의 방어보다는 systemic immunization에 중점을 두고 있다. 이런 systemic vaccine은 systemic 면역 유도는 높지만 점막에서의 항체 유도에는 별다른 영향을 주지 못해 점막에서의 항체 역가는 매우 낮아 병원균 방어에 실패하는 경우가 종종 발생하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 미국을 비롯한 선진국에서는 점막면역을 유도할 수 있는 백신 및 면역증강제 개발에 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 아직까지 이는 사람의 질병 및 실험동물인 마우스를 대상으로 한 기초 연구가 주종을 이루고 있다. 최근에는 수의학 분야에서도 일부의 질병에 대해서 특히, 조류 및 돼지를 대상으로 점막면역에 대한 연구가 수행 중에 있다. 그렇지만 아직 국내외적으로 연구실 수준의 연구가 진행 되고 있을 뿐 현장에서는 아직 활용되지 못하고 있는 실정이다.

3. 본 연구의 전략

돼지에서 설사를 일으키는 병원성 대장균 중 장독소원성 대장균 (entrotoxigenic *Escherichia coli*; ETEC)에 의해 주로 설사 및 부종병과 같은 다양한 장관 감염이 발생하고 있으며, 또한 장병원성 대장균 (enteropathogenic *Escherichia coli*; EPEC)에 의해서도 야기되고 있다. 돼지에서 지금까지 알려진 ETEC의 주요 부착인자에는 F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18, F41이 있으며 EPEC의 부착인자로는 intimin이 알려져 있다. 세균이 숙주 세포에 부착하는데 사용하는 모든 인자를 부착인자라고 하며 이에는 세균의 fimbria와 같은 세포 표면 단백질이 포함되어 있다. 세균은 이들 부착인자를 이용하여 숙주의 장관 세포 표면에 안정적으로 부착하여 증식을 시작하면서 독소를 분비함으로써 질병을 일으킨다. 따라서 이들 병원성 세균의 부착인자에 대한 면역반응이 유도 된다면 세균에 감염되었을 경우 이들 유도 항체가 이들 부착인자와 결합하여 세균이 숙주의 장관 표면에 부착하여 증식할 수 있는 기회를 미연에 차단함으로써 병원성 세균에 의한 질병 발생을 예방할 수 있을 것이다.

본 발명은 우선 ETEC와 EPEC의 발현되는 부착인자 항원의 분비를 증가시키도록 개발된 대장균 및 살모넬라균 shuttle vector에 각각 cloning시킨 후 이들 vector로 약독화 *Salmonella* Typhimurium을 형질전화 시켰다. 이들 형질 전화된 약독화 *S.* Typhimurium (살모넬라균)은 각 부착인자를 안정적으로 발현하여 돼지의 점막으로 분비시킴으로써 분비된 이들 항원에 대한 점막 및 전신 면역을 유도하여 이 병원성 대장균을 예방할 수 있도록 개발된 생균 예방백신이다.

더욱이 본 연구에서 ETEC와 EPEC의 부착인자 항원을 돼지의 점막으로 전달하도록 고안된 약독화 살모넬라균은 병원성과 관련된 *lon*과 *cpxR* 두 유전자를 인위적으로 결실시킨 약독화 변이 균주로 병독성 균주로의 복쉬는 거의 불가능한 매우 안정적인 변이균주로 이들 두 유전자가 결실된 이 균주는 장 상피 세포로의 부착과 침입력은 증가하지만 숙주세포에서의 증식은 감소되어 결국은 면역원성은 높지만 병원성은 낮아진 약독화 살모넬라균이 되어 백신으로서의 활용이 가능하게 된다. 또한 이 약독화 살모넬라균은 하나가 아닌 두 개의 유전자를 결실시켰기 때문에 병원성 균주로 전환될 수 있는 기회는 매우 희박하다. 게다가 peptidoglycan 합

성에 필요한 aspartate β-semialdehyde dehydrogenase (Asd)의 유전자가 결여된 살모넬라균은 diaminopimelic acid (DAP) 요구주로서 증식을 위해서는 배지에 DAP의 첨가나 이 유전자를 가진 plasmid의 형질전환이 필요하다. 그래서 *asd* 유전자를 갖고 있는 plasmid에 원하는 항원 유전자를 cloning한 후 이 변이 균주로의 형질전환은 항생제 선택 marker를 사용하지 않고도 외래 단백질을 발현할 수 있는 전달계 (delivery system)로서 이용이 가능하다.

또한 점막에서 생균처럼 점막으로의 투여와 점막 면역 반응을 유도할 수 있는 새로운 개념의 사균 백신의 개발이 절실하다. 따라서 국내 분리균주를 이용하여 점막 면역 반응을 효과적으로 유도할 수 있는 유전자 변형에 기초한 사균 (ghost bacteria) delivery system을 이용한 다가 백신을 개발하여 돼지에서 병원성 대장균과 살모넬라균에 의한 소화기 질병을 동시에 예방하고자 한다. 특히 이들 병원균 중 일부는 사람에서도 심각한 질병을 유발 할 수 있는 인수공통전염병으로 동물에서의 이들 질병을 예방함으로써 사람으로의 전염 기회를 미연에 차단할 수 있는 효과를 얻을 수 있을 것이다.

제 3 절 연구개발의 범위

본 연구 과제는 축산 농가에서 문제가 되고 있는 세균성 감염에 의하여 유도되는 주요 소화기 질병 중 병원성 대장균과 살모넬라균에 의해 야기되는 폐사 및 설사를 예방하기 위해 유전자 재조합 다가 백신 개발을 목표로 연구를 수행할 계획이다. 특히 국내에서 주로 사용되고 있는 예방접종 방식인 사균 백신을 이용한 근육접종은 소화기 질병 유발 병원체를 방어하는데 있어 절대적으로 필요한 점막에서의 방어 면역을 효과적인 유도할 수 없다. 따라서 국내 분리균주를 이용하여 점막 면역 반응을 효과적으로 유도할 수 있는 유전자 변형에 기초한 생균 및 사균 (ghost bacteria) delivery system을 이용한 다가 백신을 개발하여 돼지에서 병원성 대장균과 살모넬라균에 의한 소화기 질병을 동시에 예방하고자 하였다. 특히 이들 병원균 중 일부는 사람에서도 심각한 질병을 유발 할 수 있는 인수공통전염병으로 동물에서의 이들 질병을 예방함으로써 사람으로의 전염 기회를 미연에 차단할 수 있는 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각되었다. 세부과제별 연구범위는 아래와 같았다.

[제1세부과제] : Genetic modification에 기초한 생균 *Salmonella* Typhimurium delivery system을 이용한 주요 소화기 질병 동시 예방 다가 백신 개발

최종목표	Genetic modification에 생균 delivery system을 활용한 병원성 대장균과 살모넬라균 동시 예방백신 개발

1차년도	2차년도	3차년도
• Ghost bacteria *Salmonella* Typhimurium delivery system을 이용한 병원성 대장균 및 살모넬라 동시 예방 다가 백신 개발 • 실험동물에서의 ghost bacteria delivery system을 이용한 다가 백신의 부작용 및 효능실험	• 목적 동물에서의 생균 delivery system을 이용한 다가 백신의 효능 실험 및 백신의 안전성 실험	• 목적 동물에서의 생균 및 ghost bacteria 다가 백신의 효능 조사 • 다가 백신의 현장 적용 실험

새로운 백신용 delivery system을 활용한 돼지에서의 병원성 대장균 및 살모넬라균 동시 예방 다가 백신의 산업화 및 현장에서의 적용

[제1협동과제] : Ghost bacteria 개발 및 사균 (ghost gacteria) delivery system용 재조합 vector 제작

최종목표	생물합성학의 최신 유전공학 기법을 이용한 ghost bacteria *S.* Typphimurium delivery system 개발 및 ghost bacteria 백신에 적합한 vector 개발

1차년도	2차년도	3차년도
• 국내 분리주를 대상으로 ghost system 개발 • 숙주를 ghost vaccine으로의 유발 및 발현 외부항원을 세포 외막으로 운반하는 vector 체계의 개발 • 실험동물에서의 ghost bacteria delivery system을 이용한 다가 백신의 부작용 및 효능실험	• 목적 동물에서의 사균 (ghost bacteria) delivery system을 이용한 다가 백신의 효능 및 안전성 검사	• 목적 동물에서의 생균 및 사균 (ghost bacteria) delivery system을 이용한 다가 백신의 효능 조사 • 생균 및 사균 delivery system 개선

생물합성학 분야의 최신 유전공학 기법에 의한 사균 (ghost bacteria) delivery system 및 vector의 산업화

제 2 장　국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. 돼지에서 *Salmonella* Typhimurium에서 백신화 연구

돼지에서 살모넬라를 예방하기 위해서는 불활화 사균 백신이 아닌 약독화 생균 백신이 절대적으로 필요하다. 하지만 아직까지 돼지에서 살모넬라균을 예방하기 위한 생균 백신 개발에 관한 연구는 아직까지 이루어지고 있지 않으며, 병원성과 관련된 하나의 유전자를 제거하여 약독화 시킨 후 실험동물인 마우스에서 방어여부를 확인하는 수준에 머무르고 있다.

2. 돼지에서 병원성 대장균 백신 연구 현황

현재 국내 동물약품 제조사에 의해 제작되어 판매되고 있는 상용화 백신의 대부분은 주로 병원성 대장균을 포르말린 등으로 불활화 시킨 사균 백신이 주이며, 외국 제조사에 의해 수입되어 국내에서 판매되고 있는 상용화 백신은 유전자 조작 기술을 이용하여 항원성이 높은 항원을 정제한 단백질 항원을 오일이나 겔 등과 같이 적합한 면역증강제와 혼합한 형태로 이런 종류의 백신은 주로 근육으로 접종하여 전신면역 반응을 유도하여 방어를 하는 형태가 주이다. 하지만 이런 전신면역 유도에 의한 방어 기전은 전신면역 유도는 좋지만 실지로 병원성 대장균이 질병을 유발하는 장 점막에서의 점막면역 유도에는 별다른 영향을 주지 못해 점막에서의 항체 역가는 매우 낮아 병원균 방어에 실패하는 경우가 종종 발생하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 미국을 비롯한 선진국에서는 점막면역을 유도할 수 있는 백신 및 면역증강제 개발에 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 아직까지 이는 사람의 질병 및 실험동물인 마우스를 대상으로 한 기초 연구가 주종을 이루고 있다. 최근에는 수의학 분야에서도 일부의 질병에 대해서 특히, 조류 및 돼지를 대상으로 점막면역에 대한 연구가 수행 중에 있다. 그렇지만 아직 국내외적으로 연구실 수준의 연구가 진행 되고 있을 뿐 현장에서는 아직 활용되지 못하고 있다.

제 2 절 본 연구팀의 선행기술 수준

제1절에서 살핀 것과 같이, 특정유전자를 결실시킴으로 유전학적으로 안정된 약독화 생균 백신 제작은 매우 합리적이다. 따라서 본 연구팀은 *lon* 및 *cpxR* 두 유저자를 결실시켜 얻어지는 *Salmonella* Typhimurium 변이균주에 관한 연구 (Kim SW et al., 2009. Changes of physiological and biochemical properties of Salmonella enterica serovar Typhimurium by deletion of cpxR and lon genes using allelic exchange method. J Microbiol Methods.

79(3):314-20.)는 병원성과 관련된 유전자를 결실시키는 점이 metabolic 관련 유전자를 결실시킨 기존방법과 차별화된다. 또한 본 연구팀은 *asd* 유전자를 결실시켜 DAP 영양요구주로 만들어 배양할 때 배지에 DAP을 첨가하거나 또는 *asd* 유전자가 삽입된 플라스미드를 요구하게 만들었다. 바꾸어 말하면 이 *asd* 유전자가 제거된 약독화 살모넬라 균주에 asd 유전자가 삽입된 플라스미드를 이용하여 외부 항원을 발현 전달하게 할 수 있는 delivery system으로 제작하여 병원성 대장균의 부착인자를 발현 전달하는 다가 백신을 제조하는 기술과 이 플라스미드에 대장균의 E-lysis 유전자를 또한 삽입하여 고스트 사균화 유도 기술은 학술적으로도 매우 높아 매우 유용한 결과물을 얻을 수 있었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연차별 세부과제별 연구개발의 목표 및 개요

1. 1차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 (**표 1**)

세부과제명	연구목표	연구개발 수행내용
Genetic modification에 기초한 생균 *Salmonella* Typhimurium delivery system을 이용한 주요 소화기 질병 동시 예방 다가 백신 개발 (제1세부 전북대)	백신 개발을 위한 면역원성이 우수한 항원 유전자 확보	신생 자돈에서 설사와 관련된 병원성 대장균의 주요 adhesin들 F4 (K88ac), F5 (K99), F6 (FasA), F41, Intimin
		이유 후 자돈에서 설사와 관련된 병원성 대장균의 주요 adhesin들 F4 (K88ab, K88ac), F18 (FedA, FedF)
	Genetic modification에 의한 생균 bacteria delivery system을 이용한 재조합 다가 백신 개발	단백 항원 확보를 위한 cloning
		약독화 살모넬라균주로부터 asd (aspartate semialdehyde dehydrogenase)유전자가 제거된 생균 delivery system 개발
		백신 개발을 위한 클로닝
		점막면역 유도에 효과적인 adjuvant 개발 및 개선
		Western blot을 이용한 후보 항원의 백신으로부터 외부 환경으로의 분비 여부 확인
	실험동물에서의 면역 유도 실험 및 부작용 검사	BALB/c mice에서의 신생 자돈 설사와 관련된 백신 후보주의 혼합 접종 후 각 항원별 면역반응 유도 실험
		BALB/c mice에서의 이유 자돈 설사와 관련된 백신 후보주의 혼합 접종 후 각 항원별 면역반응 유도 실험
		마우스에서의 백신 부작용 실험
Ghost bacteria 개발 및 사균 (ghost bacteria) delivery system용 재조합 vector 제작(제 1협동:경남과기대)	특정 유전자 제거에 기초한 delivery system 개발	약독화 살모넬라균주로부터 asd 유전자를 제거하여 delivery system으로 개발
	Ghost system 개발	Ghost cassette를 pYA3342/3332 로 클로닝 E.coli agfA의 세포외막 doamin을 클로닝
	Ghost bacteria 형성 및 분석	성장곡선, CFU와 SEM으로 확인
	외부항원의 분비된 양 측정	SDS-PAGE 및 dot blotting으로 확인
	확보된 병원성 대장균의 항원 유전자를 ghost delivery system용 vector에 cloning	항원 유전자를 Ghost system에 삽입
	마우스에 고스트 백신 접종 및 효능 확인	마우스에 고스트 백신 접종 및 효능확인
	혈청에서 IgG subtype, 분비물에서 sIgA 측정	ELISA로 확인
	IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ TNF-α등의 사이토카인 측정	real-time PCR로 확인

2. 2차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 (**표 2**)

세부과제명	연구목표	연구개발 수행내용
Genetic modification에 기초한 생균 *Salmonella* Typhimurium delivery system을 이용한 주요 소화기 질병 동시 예방 다가 백신 개발 (제1세부 전북대)	Ghost vector를 이용한 신생 자돈 설사 예방 백신 개발	Ghost vector에 adhesin 유전자 cloning
		adhesin 유전자가 삽입된 플라스미드를 ghost 백신에 적합하게 개조된 약독화 살모넬라균에 형질전환
		Western blot으로 각 adhesin 발현여부 확인
		배양 후 ghost 백신으로 전환 여부 확인
	개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역유도 시험	마우스를 이용한 접종 경로 시험
		각 adhesin 발현 백신 접종 후 접종 항원에 대한 면역반응 유도 여부 시험
		각 adhesin 발현 백신을 혼합 접종 후 각adhesin에 대한 면역 유도 시험
		Ghost 백신의 최적화 시험
Ghost bacteria 개발 및 사균 (ghost bacteria) delivery system용 재조합 vector 제작(제1협동:경남과기대)	개선된 delivery system을 이용한 재조합 다가 고스트 백신 개발	Ghost cassette를 pYA3342로 클로닝, cI::PR28::Elysis::araC::OmpA TM을 클로닝
		확보된 병원성 대장균 유전자를 asd유전자를 포함한 개선된 ghost delivery cassette에 cloning
	다가 고스트 백신 in vitro에서의 효능 실험	Ghost yield 분석
		외부항원의 세포 밖 또는 세포 외막으로의 운반능력 분석
		delivery system 및 외부 항원 운반체계의 개선 · 최적 ghost 생산 조건의 검투 · 최적 세포외막 운반조건의 검토
	실험동물에서의 개선된 다가 고스트 백신의 부작용 및 효능 측정	마우스에 백신 접종
		백신 접종 후 발열, 설사, 폐사, 침울, 식욕 감퇴 등 조사
		혈청 IgG, IgA, IL-4, Il-12. IFN-ɣ, TNF-α 측정
		Vaginal washing, fecal sample로부터 mucosal IgA 측정
	모돈 및 이유 자돈에서의 개선된 다가 고스트 백신의 효능 및 안전성 실험	임신 모돈에 경구 또는 근육으로 다가 백신 1회 및 2회 접종
		모돈 혈청에서의 IgG 및 IgA ELISA로 측정
		모돈 초유에서의 mucosal IgA 및 IgG ELISA로 측정
		이유자돈에서의 백신효능실험; ▪ 모돈 및 자돈에서 예방 접종 ▪ 이유 자돈에서의 도전 실험 ▪ 설사 및 폐사 자돈 관찰 ▪ 설사 자돈의 분변으로부터 도전 감염 균주 분리 동정

3. 3차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 (**표 3**)

세부과제명	연구목표	연구개발 수행내용
Genetic modification에 기초한 생균 *Salmonella* Typhimurium delivery system을 이용한 주요 소화기 질병 동시 예방 다가 백신 개발 (제1세부 전북대)	기존 상업용 백신과의 효능비교실험	임신 모돈에 개발 백신 접종
		모돈의 혈청 및 유 그리고 자돈의 혈청을 대상으로 면역반응 조사
		백신접종 후 확보된 ETEC 야외균주로 1주령 자돈에서의 방어시험
		백신접종 후 확보된 ETEC 야외균주로 3주령 자돈에서의 방어시험
	백신균주의 양돈장 field 시험	임신 모돈에 백신접종
		초유(乳)에서의 면역반응 조사
		설사빈도, 폐사율, 도태율, 항생제 사용빈도 등을 관찰
	개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역유도 시험	마우스를 이용한 최적화 실험 - adjuvant필요여부 확인 시험
	개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 목적동물에서의 효능 시험	임신 모돈에 신생 자돈 설사 예방백신 접종
		자돈의 혈청을 대상으로 면역 유도 여부 조사
		생후 1주령 자돈에 병원성 대장균으로 도점감염 시킨 후 방어력 조사
Ghost bacteria 개발 및 사균 (ghost gacteria) delivery system용 재조합 vector 제작(제1협동:경남과기대)	안정된 delivery system을 이용한 재조합 다가 고스트 백신 개선	개선된 고스트유도 벡터의 개발 - Ara 및 cI 조절을 받는 이중 조절 체계의 개선
		고스트 효율 증진을 위한 살모넬라 세포의 개선 - Ara 조절을 받는 glmS의 삽입
		새로운 호스트에 새로운 Ghost cassette가 클로닝된 백신을 이용해서 보다 안정화된 다가 고스트 백신 개발
		각 항원의 클로닝
		발현을 western blotting으로 확인
	안정되고 발현이 강화된 ghost vaccine 백신의 마우스에서의 최적화 실험	마우스에 백신 접종
		혈청 IgG, IgA, IL-4, IL-12, IFN-γ, TNF-α 측정
		Vaginal washing, fecal sample 로부터 mucosal IgA 측정
	고스트 세포의 살모넬라균에 대한 보호능력 확인	in vitro에서 다가 고스트 백신의 보호능력 확인

제 2 절 연구개발 수행방법 및 결과

[1차년도]

[제1세부과제 : 전북대학교]

[1] 백신 개발을 위한 면역원성이 우수한 항원 유전자 확보

1. 주요 세균성 소화기 질병

(1) 돼지에서 주요 세균성 소화기 질병을 유발하는 병원성 대장균의 adhesin이 면역원성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 부착인자를 중심으로 그 유전자를 확보하였다.

(2) 돼지에서 병원성 대장균에 의한 설사는 크게 두 시기 (신생자돈 설사와 이유 자돈 설사)에 발생하며 설사와 관련된 adhesin의 종류 또한 다른 것으로 알려져 있다.

(3) 두 시기와 관련된 주요 부착인자들 (표 4)

1) 신생 자돈에서 설사와 관련된 병원성 대장균의 주요 adhesin들
F4 (주로 K88ac 관여), F5 (K99), F6 (FasA), F41, Intimin

2) 이유 자돈에서 설사와 관련된 병원성 대장균의 주요 adhesin들
F4 (K88ab, K88ac), F18 (FedA, FedF)

표 4. 실험에 사용된 분리 균주

Strain or plasmid	Description
Strains	
E. coli	
JOL417	Wild type F4 (K88ac)$^+$ETECisolatefrompig
JOL412	Wild type F5 (K99)$^+$ETECisolatefrompig
JOL415	Wild type F6 (Fas)$^+$ETECisolatefrompig
JOL413	Wild type F41$^+$ETECisolatefrompig
JOL206	Wild type intimin$^+$ETECisolatefrompig
JOL416	Wild type F4 (K88ab)$^+$ETECisolatefrompig
JOL500	Wild type F18$^+$,LT$^+$,STa$^+$,STb$^+$,stx2$^+$,stx2e$^+$ETECisolatefrompig

[2] Genetic modification에 의한 생균 delivery system을 이용한 재조합 다가 백신 개발

1. 단백 항원 확보

(1) Cloning

1) 신생 자돈에서 설사와 관련된 병원성 대장균의 주요 adhesin인 K88ac, K99, FasA, F41, intimin을 대상으로 하여 cloning을 수행하였다. 더불어 이유 자돈에서 설사와 관련된 병원성 대장균의 주요 adhesin을 K88ab, K88ac, FedA, FedF를 대상으로 cloning을 수행하였다.

병원성 대장균의 총 DNA 추출은 전통적인 방법에 따라 준비하였다. 즉, -70℃에 보관 중인 병원성 대장균을 LB agar에 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 colony들 중에서 한 colony를 선택하여 1.5㎖ LB broth에 접종하여 하룻밤 배양한 후 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 멸균 증류수를 1㎖ 첨가하여 재부유시켰다. 이 부유액을 원심분리한 후 상청액을 제거한 다음 멸균 증류수 50㎕를 첨가하여 다시 부유시켰다. 그리고 95℃에서 20분간 가열한 후 원심분리하여 상청액을 조심스럽게 멸균 소형관으로 옮겨 병원성 대장균의 총 DNA로 추출하였다.

각 부착인자 유전자는 제한효소 절단 부위를 가진 특이 primer (표 5)를 이용하여 PCR 기법으로 증폭되었다. 증폭된 각 adhesin 유전자는 agarose gel을 이용하여 해당 크기를 확인한 다음 AccuPrep gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제되었다.

표 5. 실험에 사용된 primer sets

Primer		Sequence	크기(bp)	참고균주
faeG	K88ac-F K88ac-R	CCGCGGATCCGGCACATGCCTGGATGACT CCGCAAGCTTAATTGGCAGCTCATCACG	819	AJ616256.1
fanC	K99-F K99-R	CCGCGAATCCATGAAAAAAACACTGCTA CCGCAAGCTTTTACATATAAGTGACTAAGAA	546	M35286
fasA	FasA-F FasA-R	CCGCGGATTCAGCGCCCGCTGAAAACAA CCGCAAGCTTATTACGGTGTACCTGCTGA	515	M35257
f41	F41-F F41-R	CCGCGAATTCATGAAAAAGACTCTGATTGC CCGCAAGCTTTTAACTATAAATAACGGTGA	834	X14354
eae	Intimin-F Intimin-R	CCGCGGATCCGATGAAAAACGGTCAGCCAGT CCGCAAGCTTTATTTTAGCCGGGGTGGTTAT	778	FJ609803
faeF	K88ab-F K88ab-R	CCGCGGATCCGGCACATGCCTGGATGACT CCGCAAGCTTCCAGCAACTTTAGTAATAA	814	V00292.1
faeG	K88ac-F K88ac-R	CCGCGGATCCGGCACATGCCTGGATGACT CCGCAAGCTTAATTGGCAGCTCATCACG	819	M61713
fedA	FedA-F FedA-R	CCGCGAATTCCAGCAAGGGGATGTTAAAT CCGCAAGCTTGATGATTACTTGTAAGTA	455	AE006468
fedF	FedF-F FedF-R	CCGCGAATTCGCGTCTACTCTACAAGTA CCGCAAGCTTTTACTGTATCTCGAAAACAA	846	
cpxR	cpxR-F cpxR-R	CAGCGCCAGCGTCAACCAGAAGAT GAGGCCATAACAGCAGCGGTAACT	304	
lon	lon-F lon-R	ATTTTATCTCCCCTTTCGTTTTTC CTGCCAGCCCTGTTTTTATTAGC	244	

Underlines indicate the sites of restriction enzymes, such as BamHI, EcoRI and HindIII.

2) 시판되는 발현용 vector (pQE series와 pET28a)와 host (*E. coli* TOP10과 *E. coli* BL21)를 이용하여 각 해당 유전자를 발현용 vector에 삽입한 후 해당 host에 transformation 시켜 단백 항원 발현 균주를 확보하였다.

정제된 PCR 증폭산물과 pQE31 (BamHI과 HindIII) 또는 pET28a (EcoRI과 HindIII) vector를 표 5에서 기술된 제한 효소로 각각 절단한 후 agrose gel에서 전기영동하였다. 절단된 각 절편을 AccuPrep gel purification kit를 이용하여 정제한 다음 T4 DNA ligase (Takara, Japan)로 두 산물을 ligation한 후 *E. coli* JM109 또는 *E. coli* BL21으로 형질전환 되었다. 이들 형질전환 균주를 ampicillin (pQE31을 발현 vector로 사용하였을 경우) 또는 kanamycin (pET28a를 발현 vector로 사용하였을 경우)이 각각 첨가된 LB agar에 골고루 펴서 말린 다음 37℃에서 하룻밤 배양하여 발현 vector로 형질전환 된 *E. coli* JM109 또는 *E. coli* BL21을 선택하였다 (표 6).

각 부착인자 유전자가 삽입된 vector는 *E. coli* JM109 또는 *E. coli* BL21으로부터 AccuPrep plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하여 표 5에 제시된 바와 같이 제한 효소로 절단하여 agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 그리고 이렇게 확인된 colony를 각 발현 vector에 맞는 항생제가 첨가된 LB broth 5㎖에 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 균액 중 250㎕를 각 항생제가 첨가된 새로운 5㎖ LB broth에 재접종하여 45분간 배양한 후 이중 1㎖는 유도 전 대조군으로 사용하기 위해 멸균 소형관으로 옮겼다. 나머지 4㎖에는 isopropyl-βD- thiogalactopyranoside (IPTG)의 최종 농도가 1mM이 되도록 첨가하여 3시간 동안 배양한 후 이중 1㎖는 유도 후 발현 여부를 확인하기 위해 멸균 소형관에 옮겼다. 그리고 나머지 3㎖는 발현 단백질이 가용성인지 또는 불용성인지를 확인하기 위해 4,000×g에서 20분간 원심분리한 후 멸균 phosphate buffered saline (PBS) 500㎕로 재부유하였다. 이를 초음파처리 (sonication)하여 cell을 분쇄한 다음 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액은 새로운 멸균 소형관에 옮기고 침전물 (pellet)은 500㎕의 멸균 PBS로 재부유하였다. 이들 상층액 (발현 단백질이 가용성일 경우)과 재부유액 (발현 단백질이 불용성일 경우) 그리고 유도전·후에 준비한 sample들을 SDS-PAGE로 전기영동하여 각 부착인자의 발현 여부 및 발현 상태를 확인하였다.

(2) 각 adhesin 단백 항원 확보

시판되고 있는 kit를 이용하여 제작되어 보관 중인 각 adhesin 발현 대장균을 LB agar에 접종하여 확인된 한 colony를 LB broth 200㎖에 접종하여 30℃에서 150rpm의 속도로 흔들어 주면서 하룻밤 배양하였다. 이 배양액에 IPTG의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 같은 조건으로 4시간 재배양하였다. 이 배양액을 8,000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하였다. 상층액

은 버리고 침전물은 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)가 1mM이 되도록 첨가된 10㎖의 멸균 PBS로 재부유시킨 다음 -70℃에서 냉동하였다. 냉동된 부유액을 다시 37℃ water bath 내에서 해동한 다음 -70℃에서 냉동하기를 2 ~ 3회 반복하였다. 마지막으로 해동한 후 부유액을 초음파처리하여 cell들을 분쇄한 다음 15,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상층액을 멸균 관에 옮겼다. 발현 단백질이 가용성일 경우에는 Buffer B (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 8.0) 4㎖를 상층액과 혼합하였고 불용성일 경우에는 6㎖의 Buffer B로 침전물을 재부유시킨 후 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이 반응액을 15,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 resin이 들어 있는 관으로 옮겨 단백질이 resin과 결합하도록 30분간 교반하였다. 이 반응액을 준비된 column에 충전시키고 천천히 흘려보냈다. 흘려보낸 이 액으로 column을 재충전한 다음 다시 천천히 흘려보냈다. 반응액을 흘려보낸 다음 Buffer C (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 6.3) 6㎖로 column을 3회 세정하여 resin과 결합하지 않은 기타 불필요한 단백질을 제거하였다. Elution buffer (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 4.5) 2㎖로 column을 충전시킨 후 20분간 반응시켜 발현 단백질을 resin으로부터 분리시킨 다음 elution buffer를 1㎖씩 첨가하여 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질을 SDS-PAGE에서 전기영동하여 발현 단백질을 확인하였으며 정량한 후 -70℃에 보관하며 ELISA 항원으로 사용하였다.

2. 각 해당 항원에 대한 항혈청 확보

각 해당 항원 발현 colony를 LB broth 200㎖에 접종하여 30℃에서 150rpm의 속도로 흔들어 주면서 하룻밤 배양하였다. 이 배양액에 IPTG의 최종농도가 1mM/ml이 되도록 첨가하여 같은 조건으로 4시간 재배양하였다. 이 배양액을 8,000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물은 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)가 1mM이 되도록 첨가된 10 ㎖의 멸균 PBS로 재부유시킨 다음 -70℃에서 냉동하였다. 냉동된 부유액을 다시 37℃ water bath내에서 해동한 다음 -70℃에서 냉동하기를 2 ~ 3회 반복하였다. 마지막으로 해동한 후 부유액을 초음파 처리하여 cell들을 분쇄한 다음 15,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상층액을 멸균 관에 옮겼다. 발현 단백질이 가용성일 경우에는 Buffer B (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 8.0) 4㎖를 상층액과 혼합하였고 불용성일 경우에는 6㎖의 Buffer B로 침전물을 재부유시킨 후 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이 반응액을 15,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 resin이 들어 있는 관으로 옮겨 단백질이 resin과 결합하도록 30분간 교반하였다. 이 반응액을 준비된 column에 충전시키고 천천히 흘려보냈다. 흘려보낸 이 액으로 column을 재충전한 다음 다시 천천히 흘려보냈다. 반응액을 흘려보낸 다음 Buffer C (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 6.3) 6㎖로 column을 3회 세정하여 resin과 결합하지 않은 기타 불필요한 단백질을 제거하였다. Elution buffer (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 4.5) 2㎖로 column을 충전시킨 후 20분간 반응시켜

발현 단백질을 resin으로부터 분리시킨 다음 elution buffer를 1㎖씩 첨가하여 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질을 SDS-PAGE에서 전기영동하여 발현 단백질을 확인하였으며 정량한 후 -70℃에 보관하며 ELISA 항원으로 사용하였다.

1주일 정도의 적응 기간을 거친 약 2Kg 정도의 암컷 New Zealand white rabbit에 위에서 준비된 각 adhesin 항원이 200㎍이 되도록 멸균 PBS로 희석 한 후 Freund's complete adjuvant와 동량 혼합하여 피하 접종하였다. 1차 접종 14일 후에 동량의 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 같은 방법으로 혼합하여 피하 접종하여 boosting 하였다. 2차 접종 후 14일째에 채혈하여 혈청을 분리한 다음 -70℃에 보관하며 각 adhesin 항혈청으로 사용하였다.

3. 생균 delivery system을 이용한 다가 백신 개발

(1) 백신 개발을 위한 클로닝

1) 각 후보 항원 (K88ab, K88ac, FasA, F41, intimin, FedA, FedF)을 pBP244와 국내 분리주인 *S.* Typhimurium으로부터 개발된 약독화 *S.* Typhimurium delivery system에 클로닝한 후 항원의 발현 및 분비 여부를 Western blot 방법으로 확인하였다.

발현이 확인된 각 vector와 pBP244를 Table 2에서 제시한 제한효소로 절단한 후 agarose gel에서 전기영동하였다. AccuPrep gel purification kit를 이용하여 agarose gel로 부터 절단된 adhesin과 pBP244 절편을 정제하고 T4 DNA ligase를 이용하여 4℃에서 하룻밤 ligation하였다. 이 ligation 된 반응액으로 *E. coli* χ6212를 형질전환시켜 DAP을 첨가하지 않은 LB agar에 골고루 펴서 말린 다음 하룻밤 배양하여 pBP244에 의하여 형질전화 된 균주를 선택하였다. 각 adhesin의 확인은 *E. coli* χ6212로부터 plasmid를 분리하여 각 adhesin에 해당하는 제한 효소로 절단한 후 agarse gel에서 전기 영동하여 최종 확인하였다.

위에서 최종 확인된 각 정제 plasmid를 electropoartion방법에 의하여 JOL912에 형질전환시켜 JOL940 (K88ab), JOL941 (K88ac), JOL946 (K99), JOL937 (FasA), JOL934 (FedA), JOL935 (FedF), JOL947 (F41), JOL948 (intimin)를 얻었다. 즉, JOL912를 DAP (50㎍/㎖)이 포함된 LB broth에서 mid-log phase까지 배양한 후 멸균된 ice-cold 10% glycerol 함유 증류수로 두 번 세척하였다. 준비된 JOL912를 0.2 ㎝ cuvette에 넣고 플라스미드 0.1 ㎍과 섞은 후 Bio-Rad MicroPulser (Bio-Rad, USA)의 Pre-Programmed Settings 중 Ec2에 따라 전기충격을 가하였다. 반응 된 균을 cuvette에서 회수한 다음 DAP을 넣지 않은 LB broth 1㎖를 첨가하여 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 형질전환 된 살모넬라균을 선별하기 위해 배양된 균액 100㎕를 다시 DAP을 첨가하지 않은 LB agar에 골고루 펴서 말린 다음 37℃에서 하룻밤 배양한 후 형성된 균주를 선별하였다 (표 6).

표 6. 실험에 사용된 균주 및 플라스미드

Strain or plasmid	Description
Strains	
E. coli	
JM109	*end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi, hsd*R17 (r_k^-,m_k^+), *rel*A1, *sup*E44, Δ(*lac-pro*AB), [F′ *tra*D36, *pro*AB, *laq*IqZΔM15]
BL21(DE3)pLysS	F^-,*omp*T, *hsd*S_B(r_B^-,m_B^-),*dcm, gal*, λ(DE3), pLysS, Cm^r
χ7213	*λpir thi-1 thr-1 leuB6 supE44 towA21 lacY1 recA* RP4-2 Tc::Mu *ΔasdA4*
JOL471	JM109 with pQE-K88ac
JOL794	BL21 with pET-K99
JOL945	BL21 with pET-FasA
JOL796	BL21 with pET-F41
JOL472	BL21 with pET-eaeA
JOL470	JM109 with pQE-K88ab
JOL943	BL21 with pET-FedA
JOL944	BL21 with pET-FedF
JOL939	χ7213 with pBP-K88ac
JOL805	χ7213 with pBP244-K99
JOL521	χ7213 with pBP244-FasA
JOL807	χ7213 with pBP244-F41
JOL814	χ7213 with pBP244-eaeA
JOL938	χ7213 with pBP-K88ab
JOL942	χ7213 with pBP-fedA
JOL923	χ7213 with pBP-fedF
S. Tyhphmurium	
JOL401	Wild type isolate from chicken
JOL912	*Δlon ΔcpxR Δasd,* a derivative of JOL401
JOL941	JOL912 containing pBP-K88ac
JOL946	JOL912 containing pBP-K99
JOL936	JOL912 containing pBP-fasA
JOL947	JOL912 containing pBP-F41
JOL948	JOL912 containing pBP-eaeA
JOL940	JOL912 containing pBP-K88ab
JOL934	JOL912 containing pBP-fedA
JOL935	JOL912 containing pBP-fedF
JOL932	JOL912 containing pBP244
Plasmids	
pQE31	IPTG-inducible expression vector; Am^r
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Km^r
pQE-K88ac	pQE31 derivative containing K88ac fimbrial gene
pET-K99	pET28a derivative containing K99 fimbrial gene
pET-FasA	pET28a derivative containing *fasA* gene
pET-F41	pET28a derivative containing F41 fimbrial gene
pET-eaeA	pET28a derivative containing eaeA gene
pQE-K88ab	pQE31 derivative containing K88ab fimbrial gene
pET-fedA	pET28a derivative containing *fedA* gene
pET-fedF	pET28a derivative containing *fedF* gene
pYA3493	pBR*ori*, Asd^+,β-lactamasesignalsequence-basedperiplasmicsecretionplasmid
pBP244	pYA3493 derivative containing *lepB*, *secA* and *secB* genes
pBP-K88ab	pBP244 derivative containing K88ab fimbrial gene
pBP-K99	pBP244 derivative containing K99 fimbrial gene
pBP-FasA	pBP244 derivative containing *fasA* gene
pBP-F41	pBP244 derivative containing F41 fimbrial gene
pBP-eaeA	pBP244 derivative containing *easA* gene
pBP-K88ab	pBP244 derivative containing K88ab fimbrial gene
pBP-fedA	pBP244 derivative containing *fedA* gene
pBP-fedF	pBP244 derivative containing *fedF* gene

3. Western blot을 이용한 후보 항원의 ghost bacteria 백신 세포 외막에서의 발현 여부 확인

3-1. 수행 방법

제작된 백신 균주가 해당 adhesin을 발현하여 세포 밖으로 분비하는지를 확인하기 위하여 각 백신 후보균주를 100㎖ LB broth에 하룻밤 배양 한 후 7,000 rpm에서 원심분리하여 상청액과 침전물 sample을 준비하였다. 상청액은 ice-cold 10% trichloroacetic acid로 처리하여 세포 밖으로 분비된 발현항원을 검출하였다. 각 sample은 94℃에서 5분간 boiling 한 후 SDS-PAGE한 다음 PVDF membrane으로 옮겨 bolocking buffer (3% skim milk in PBST)로 하룻밤 반응시켰다. 다음 날 준비한 각 adhesin에 대한 항혈청을 1:500내지는 1:1,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 1:40,000으로 희석된 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG(H+L) HRP)로 1시간 반응시켰다. WEST-oneTM Western Blotting System (Intron Biotechnology, Korea)으로 발색하여 발현을 확인하였다.

3-2 결과

Transformation된 균주 중 Western blot에 의해 supernatant에서 항원 발현이 확인된 총 8균주를 백신 후보주로 결정하였다.

1. Western blot에 의한 백신 후보 균주들로부터 신생 자돈의 설사와 관련된 **K88ac, K99, FasA, F41, intimin** 발현 및 분비 확인 (그림 1).

백신 후보 균주들로부터 K88ac, K99, FasA, F41, intimin adhesin 항원의 분비를 확인하기 위해 TCA-침전법을 이용한 Western blot 방법이 수행되었다. K88ac는 27 kDa, K99은 18.2 kDa, FasA는 15 kDa, F41은 29 kDa 그리고 intimin은 25.2 kDa에서 각각 관찰된 반면, JOL932 즉, pBP244만을 함유한 *S.* Typhimurium *ΔlonΔcpxRΔasd*가 대조군으로 사용된 경우에는 이 사이즈에서 어떠한 밴드도 관찰되지 않았다.

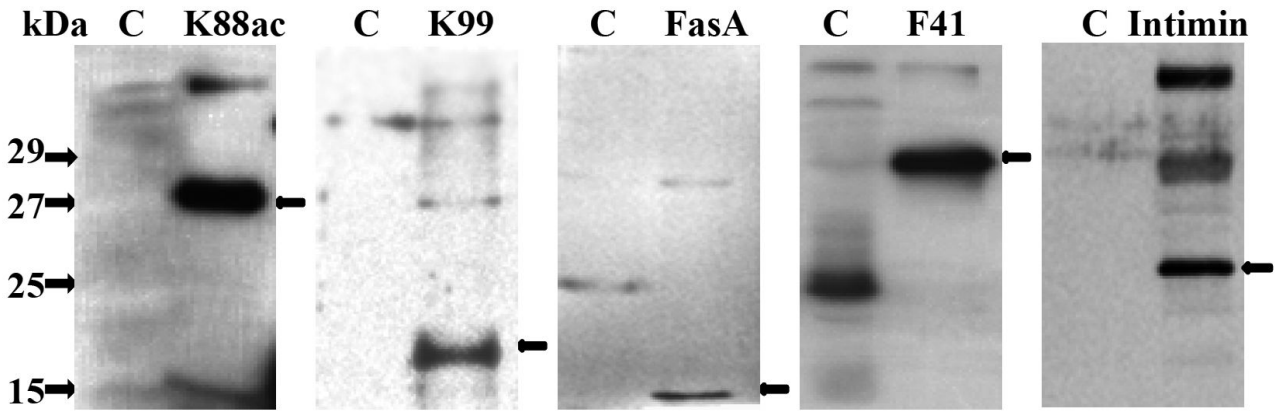


그림 1. Identification of secreted recombinant K88ac, K99, FasA, F41 and intimin adhesin antigens using Western blot analysis. Recombinant K88ac, K99, FasA, F41 and intimin adhesin antigens expressed and secreted by JOL941, JOL946, JOL937, JOL947 and JOL948, respectively, were detected via Western blot using the appropriate antigen-specific antibodies. JOL932 carrying only pBP244 was used as a control. Lanes: C, control; K88ac, recombinant K88ac fimbrial antigen secreted by JOL941; K99, K99 fimbrial antigen secreted by JOL946; FasA, recombinant FasA fimbrial antigen secreted by JOL937; F41, recombinant F41 fimbrial antigen secreted by JOL947; and Intimin, recombinant intimin adhesin antigen secreted by JOL948.

2. Western blot에 의한 백신 후보주들로부터 이유 자돈의 설사와 관련된 **K88ab, K88ac, FedA, FedF** 발현 및 분비 확인 (그림 2).

백신 후보 균주들로부터 K88ab, K88ac, FedA, FedF adhesin 항원의 분비를 확인하기 위해 TCA-침전법을 이용한 Western blot 방법이 수행되었다. k88ab는 29 kDa, K88ac는 27 kDa, FedA는 16 kDa 그리고 FedF는 30 kDa에서 각각 관찰된 반면, JOL932 즉, pBP244만을 함유한 *S.* Typhimurium *ΔlonΔcpxRΔasd* 가 대조군으로 사용된 경우에는 이 사이즈에서 어떠한 밴드도 관찰되지 않았다.

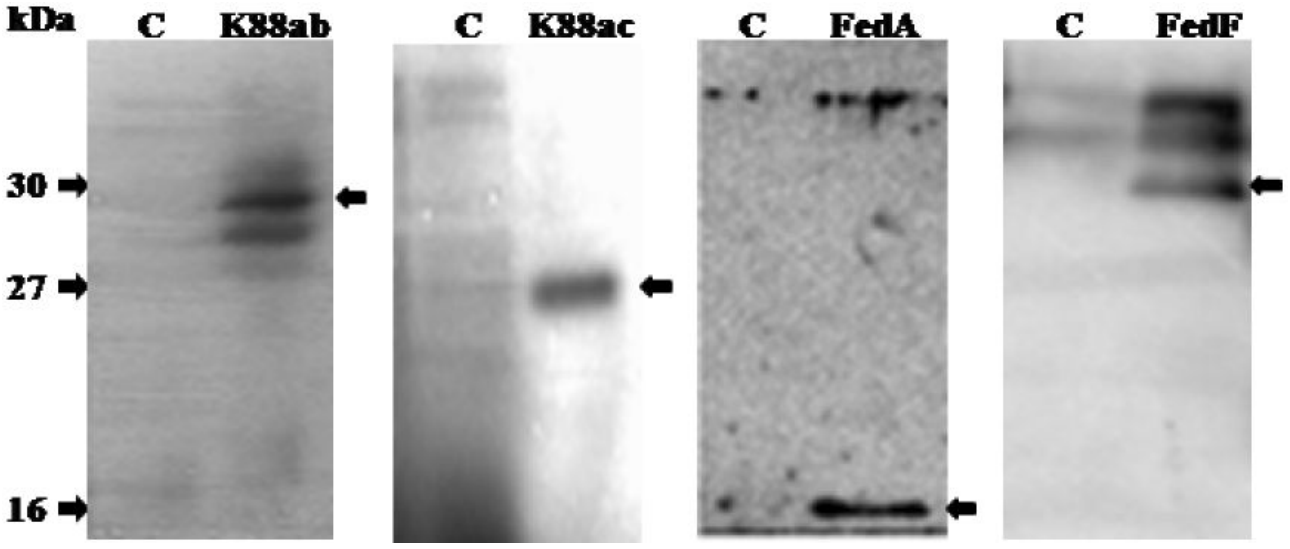


그림 2. Identification of secreted recombinant K88ab, K88ac, FedA, and FedF fimbrial antigens by immunoblot analysis. Recombinant K88ab, K88ac, FedA, and FedF fimbrial antigens expressed and secreted by JOL940, 941, 934, and 935, respectively, were detected by immunoblotting with the appropriate fimbrial-specific antibodies. JOL932 carrying only pBP244 was used as a control. Lanes C, control; K88ab, recombinant K88ab fimbrial antigens secreted by JOL940; K88ac, K88ac fimbrial antigen secreted by JOL941; FedA, recombinant FedA fimbrial antigen secreted by JOL934; FedF, recombinant FedF fimbrial antigen secreted by JOL935.

[3] 실험동물에서의 면역 유도 실험 및 부작용 검사

1] BALB/c mice에서 점막면역 유도 adjuvant의 효능 시험

3-1-1. 수행 방법

(1) 실험동물

5주령의 BALB/c 암컷 마우스를 70두를 구입하여 전북대학교 실험동물사육장에서 사육하면서 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

(2) 실험에 사용된 균주 및 플라스미드

실험에 사용된 균주와 플라스미드는 Table 4에서 보는 바와 같다. 약독화 *Salmonella* Typhimurium strain JOL911은 야외분리주인 *S.* Typhimurium JOL401 (이후 JOL911이라 칭

함)의 *cpxR*과 *lon* 유전자를 제거함으로써 제조되어 백신균주로 사용되었다. 또한 *S.* Typhimurium JOL912는 JOL911에서 *asd* 유전자를 제거함으로써 제조되어 LTB (*eltB* 유전자에 의해 발현됨)를 전달하는데 사용되었다. 독성 야외분리주인 *S.* Typhimurium JOL389는 LTB가 점막 면역 유도 adjuvant로서의 효능을 알아보기 위한 도전균주로 사용되었다.

(3) Cloning of the *eltB* gene

eltB 유전자는 eltB-F (5'-CCGCGAATTCGCTCCCCAGTCTATTACAG-3')와 eltB-R (5'-CCGCAAGCTTCTAGTTTTCCATACTGATTG-3') primer를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었다. 이 PCR 증폭산물은 시판되는 발현용 플라스미디인 pET28a (표 7)에 cloning 되어 pET28a-LTB로 조되었다. 이 제조된 플라스미드는 *E. coli* BL21(DE3)pLysS로 형질전환 되었고 LTB 단백질을 정제하였다.

또한 *eltB* 유전자는 pMMP65에 삽입되어 pMMP65-LTB가 제조되었고 이 플라스미드는 JOL912에 형질전환시켜 JOL906을 제조하였다. 이 JOL906을 LTB adjuvant 균주로 사용하였다.

(4) Immunoblot assay

JOL906으로부터 LTB의 발현 및 분비는 immunoblot analysis방법으로 확인하였다. 즉, JOL906을 100㎖ LB broth에 하룻밤 배양 한 후 3,400 × g에서 20분간 원심분리한 다음 상청액을 0.22 ㎛-pore-size 필터로 여과하였다. 여과된 상청액은 ice-cold 10% trichloroacetic acid로 처리하여 세포 밖으로 분비된 발현항원을 검출하였다. 각 sample은 94℃에서 5분간 boiling 한 후 SDS-PAGE한 다음 PVDF membrane으로 옮겨 bolocking buffer (3% skim milk in PBST)로 하룻밤 반응시켰다. 다음 날 anti-his-tag antibodies (IG Therapy Co., Ltd., Chuncheon,Korea)를 1:1,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 1:40,000으로 희석된 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG(H+L) HRP)로 1시간 반응시켰다. WEST-oneTM Western Blotting System (Intron Biotechnology, Korea)으로 발색하여 발현을 확인하였다.

(5) 백신 및 LTB adjuvant 준비

생균백신 준비를 위해서 JOL911과 JOL912 균주 각 항원별로 개발되어 보관중인 약독화 살모넬라균을 10㎖ LB Broth에 접종하여 37℃에서 200 rpm의 속도로 16시간 배양하였다. 이 배양액을 1/100 (volume)의 비율로 100㎖ LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 OD_{600}에서 0.8이 될 때까지 배양하였다. 이 배양액을 4℃에서 3,400 × g에서 20분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 멸균 PBS로 재부유시키는 방법으로 세척하였다. 2번 더 세척한 후 마지

막 침전물은 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose) 소량으로 부유시켜 OD_{600}값을 측정하여 균수를 확인하였다. PBS-sucrose를 이용하여 각 adhesin 발현 약독화 살모넬라균이 2.0×10^{11} CFU/1㎖가 되도록 희석하였다.

표 7. 실험에 사용된 균주와 플라스미드

Strain or plasmid	Description
Strains	
E. coli	
JOL500	Wild type $F18^+$,LT^+,STa^+,STb^+,$stx2^+$,$stx2e^+$ETECisolatefrompig
TOP10F′	F′{*lac*Iq Tn*10* (TetR)} *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G
BL21(DE3)pLysS	F^-,*omp*T, *hsd*S_B(r_B^-,m_B^-),*dcm, gal*, λ(DE3), pLysS, Cm^r
JOL740	TOP10′ with pET28a-LTB
JOL741	BL21(DE3)pLysS with pET28a-LTB
S. Typhimurium	
JOL389	Wild type isolate from piglet with diarrhea, challenge strain
JOL401	Wild type isolate from chicken
JOL911	*Δlon ΔcpxR,* a derivative of JOL401
JOL912	*Δlon ΔcpxR Δasd,* a derivative of JOL911
JOL906	JOL912 containing pMMP65-LTB
Plasmids	
pMEG375	Suicide vector
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Km^r
pET28a-LTB	pET28a derivative containing *eltB* gene
pMMP65	Asd+, pBR *ori,* β-lactamase signal sequence-based periplasmic secretion plasmid, 6xHis
pMMP65-LTB	pMMP65 derivative containing *eltB*

(6) 백신접종

5주령의 BALB/c female mice를 각 group별로 10마리씩 구입하여 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험군 및 접종 방법은 표 8과 같았다. 적어도 백신 접종 4시간 전에는 절식을 시켰다.

(7) 가검물 채취

접종 전 그리고 접종 후 3, 6주째에 각각 혈청과 vaginal washing samples을 채취하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. Vaginal washing samples은 멸균 PBS 100 ㎕로 vagina를 세척한 후 모아 실험에 사용하엿다. 모든 samples은 -80℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

표 8. Immunizations with the vaccine and adjuvant strains, isolation of challenge strains from organs, and mortality after challenge.

그룹	Immunization		Challenge					
	Prime*	Booster	마우스	사망율 (%)	Isolation of challenge strain			
					기관	감염 수	기관	감염 수
A	JOL911**	None	10	80	Liver	2/2	Spleen	2/2
B	JOL911	JOL911	10	60	Liver	1/4	Spleen	1/4
C	JOL906	None	10	40	Liver	4/6	Spleen	4/6
D	JOL906	JOL906	10	30	Liver	3/7	Spleen	3/7
E	4 parts JOL911 & 1 part JOL906	JOL911	10	0	Liver	0/10	Spleen	0/10
F	4 parts JOL911 & 1 part JOL906	4 parts JOL911 & 1 part JOL906	10	30	Liver	2/7	Spleen	2/7
G	PBS	PBS	10	100	Liver	ND[b]	Spleen	ND

[a] The number of infected organs/the number of tested organs.

[b] Not detected.

*JOL911 is a vaccine strain and JOL906 is an LTB protein-secreting strain.

**Total inoculated bacterial cell number per dose for all animals was 2×10^9CFU in a volume of 20μl.

(8) ELISA

혈청 및 vaginal washing samples에서 재조합 LTB 및 Salmonella LPS에 specific한 항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. sample well에는 정제된 항원 단백질을 500ng/well 의 농도로, standard well에는 goat anti-mouse IgG/IgG1/IgG2a 혹은 rabbit anti-mouse IgA를 각각 200ng/well의 농도로 분주 한 후 4℃ overnight 하여 coating 하였다. Coating 된 plate는 Tween 20이 0.05% 함유된 PBS (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (3% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum은 PBST로 1:100 또는 1:400으로 vaginal washing samples은 1:3로 각각 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 1시간30분~2시간 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a HRP 그리고 IgA level에 대해서는 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA HRP를 1:6,000의 배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응 시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색 후 3M H_2SO_4로 stop후 492nm 에서 OD값을 측정하였다. 각 항원 specific한 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정하였다.

(9) 백신 균주의 분변으로의 배출 확인

백신접종 후 접종 익일부터 3주 동안 매일 분변으로 백신균주의 배출 여부를 확인하였다. 균부리는 살모넬라균 분리방법에 따라 실시되었으며 분리된 균주를 일차적으로 살모넬라 특이

primer인 OMPC (OMPCF: 5′-ATCGCTGACTTATGCAATCG; OMPCR: CGGGTTGCGTTATAGGTCTG-3′) 와 *S.* Typhimurium 특이 primer 인 TYPH (TYPHF: 5′-TTGTTCACTTTTTACCCCTGAA-3′; TYPHR: 5′-CCCTGACAGCCGTTAGATATT-3′)로 확인한 다음 백신 균주 여부를 *cpxR* and *lon* primer sets (표 5)으로 최종 확인하였다.

(10) 도전감염

독성 야외분리주인 JOl389를 백신 및 LTB adjuvant 균주를 준비하는 방법과 동일한 방법으로 준비한 후 멸균 PBS-sucrose로 20 ㎕안에 2×10^8CFU 가 되도록 희석한 후 접종 6주째에 20 ㎕씩 경구 접종하였다. 경구로 도전감염 후 14일 동안 매일 2회씩 폐사 여부를 확인하였다.

(11) 실질장기에서의 도전감염 균주의 분리

도전감염 후 14일째에 생존한 모든 마우스를 희생시켜 간과 비장을 멸균 PBS로 각각 1:10, 1:3으로 희석한 후 BGA agar에 도말 접종하여 도전감염 균주를 분리하였으며 위에서 사용된 OMPC와 TYPH 특이 primer set으로 도전감염 균주를 확인하였다.

3-1-2. 결과

1) JOL906으로부터 LTB 분비 확인

JOL906으로부터 재조합 LTB의 발현 및 분비는 immuno blot analysis로 확인하여 본 결과 11.6 kDa에서 밴드가 확인되었다 (그림 3). 더불어 마우스에 접종되었을 때 LTB가 발현 및 분비되어 면역반응을 유도하는 지의 여부를 LTB에 대한 항체 형성정도로 확인하여 본 결과, JOL906만 (groups C와 D) 또는 JOL911 및 JOL906 (groups E와 F)을 같이 접종 했던 마우스에서는 접종 후 6주 째에 serum IgG의 경우 대조군에 비해 적어도 1.3 배이상 증가하였다. 하지만 JOL911만 접종 한 groups A와 B에서는 대조군과 유사한 항체 역가가 관찰되었다 (그림 4A). Fecal sIgA의 경우에는 group C (JOL906을 한번 접종)와 E (primed with a JOL911 and JOL906 mixture and boosted with JOL911 only)에서는 접종 6주 후에 대조군에 비해 각각 8.7배와 7.0배 증가한 반면, group F (both primed and boosted with the mixture)에서는 대조군에 비해 3.7배 증가하였다 (그림 4B). Group D (primed and boosted with JOL906)의 경우에는 대조군보다는 증가하였지만 groups A(single administered with JOL911)와 B(primed and boosted with JOL911)보다는 낮은 항체 역가가 관찰되었다 (그림 4B).

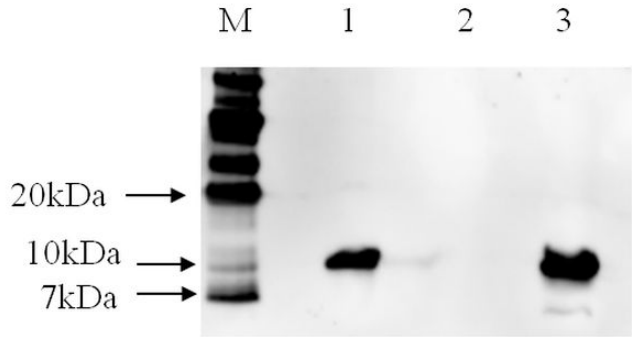


그림 3. Identification of the LTB protein by immunoblot analysis. The LTB protein, expressed and secreted by JOL906, was detected by immunoblotting with anti-his-tag monoclonal antibody. The JOL912 carrying pMMP65 only was used as a negative control and recombinant LTB protein was used as a positive control. Lane M, Size marker; Lane 1, JOL906; Lane 2, JOL912 negative control; Lane 3, LTB protein positive control.

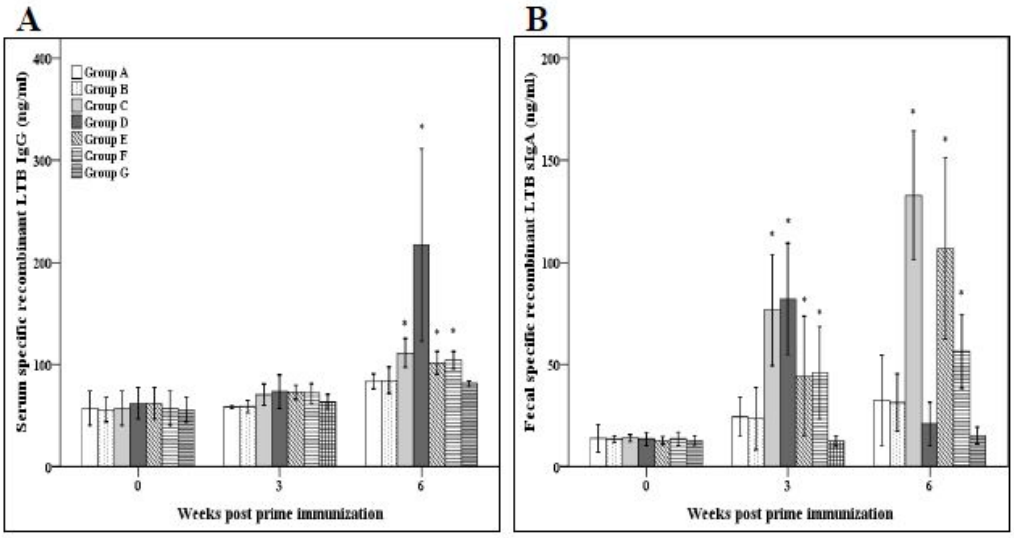


그림 4. Immune responses to LTB in mice orally inoculated with or without the LTB adjuvant strain. (A) Anti-LTB serum IgG. (B) Anti-LTB fecal sIgA. Group A mice were immunized with JOL911, group B mice were primed and boosted with JOL911, group C mice were immunized with JOL906, group D mice were primed and boosted with JOL906, group E mice were primed with a JOL911 and JOL906 mixture and boosted with JOL911, group F mice were primed and boosted with a JOL911 and JOL906 mixture, and group G mice were inoculated with PBS as a control. Data are the mean values of all mice in each group, and error bars demonstrated standard deviation (SD). Asterisks indicate significant differences between groups A, B, C, D, E and F values ($^{*}P < 0.05$) and those of the control group.

2) 백신접종 후 유도된 *Salmonella*에 대한 특이항체

그림 5A에서 보는 바와 같이 groups A와 B의 경우 serum IgG는 접종 6주 후에 대조군과 비교해 약 1.1배 증가한데 비해, groups C와 F는 대조군에 비해 적어도 1.5배 증가하였고 더불어 groups A와 B에 비해 적어도 1.3배 증가하였다. Serum IgA의 경우에도 groups C와 F에서는 접종 6주 후에 다른 그룹에 비해 유의 있게 증가하였다 (그림 5B). 그리고 이들 그룹은 fecal sIgA에서도 유의 있게 증가하였다 (그림 5C).

3) Serum IgG1과 IgG2a

Salmonella Typhimurium LPS에 대한 groups A, B, C, D, E, F에서 serum IgG2a/IgG1의 비율은 각각 2.0, 1.8, 1.3, 2.4, 1.5, 1.9배로 관찰되었다 (그림 5D).

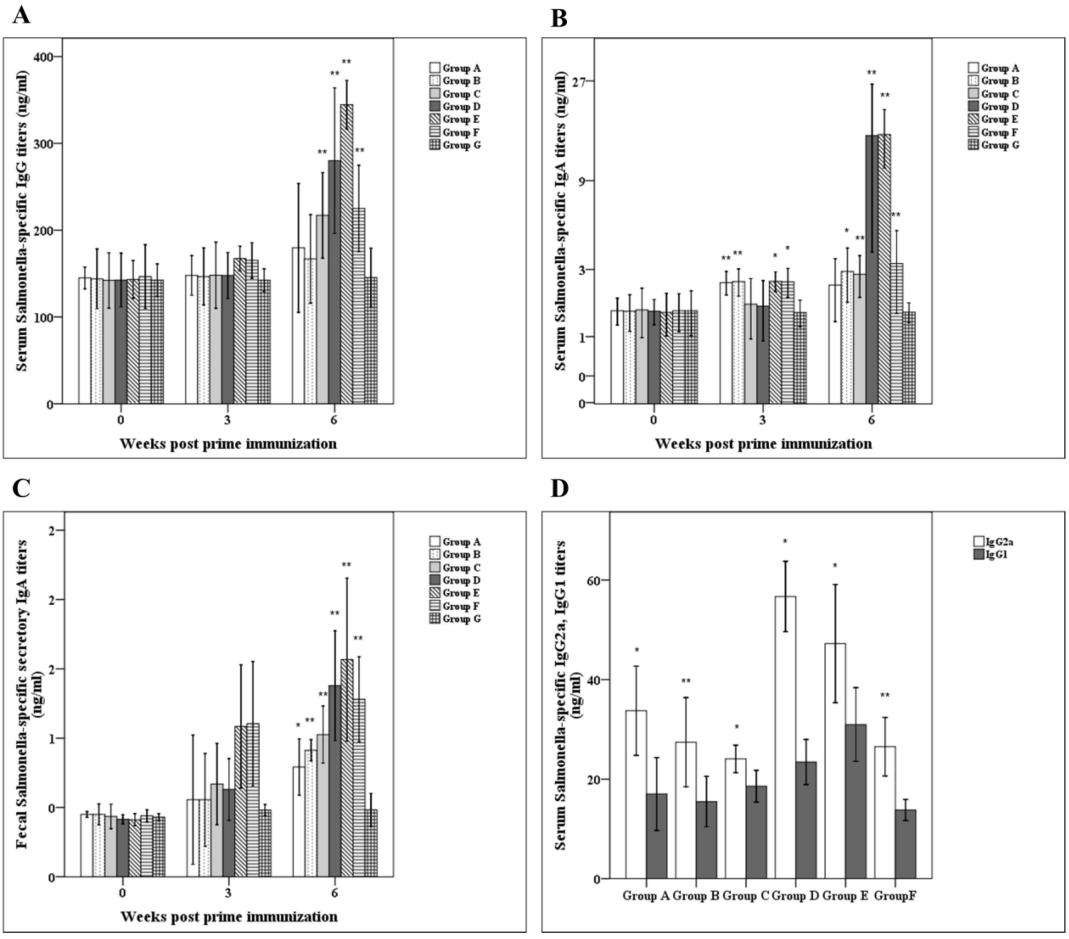


그림 5. Immune responses to *Salmonella*-specific antigens in mice orally inoculated with the *Salmonella* vaccine candidate with or without mucosal adjuvant strains. (A) Serum *Salmonella*-specific IgG. (B) Serum *Salmonella*-specific IgA. (C) Fecal

Salmonella-specific sIgA. (D) Serum *Salmonella*-specific IgG1 and IgG2a. Group A, B, C, D, E, F and G values refer to Fig. 4 and Table 8. Data are the mean values of all mice in each group, and error bars demonstrated standard deviation (SD). Asterisks indicate significant differences between group A, B, C, D, E and F values ($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$) and those of the control group mice.

4) 접종 후 백신 균주의 분변으로 배출 여부

백신 및 adjuvant 균주를 경구 접종 후 3주 동안 매일 분변으로 이들 균주의 배출 여부를 확인하여 본 결과 어떤 균주도 검출되지 않았다.

5) 도전 감염에 따른 방어 여부

도전감염 후 방어율을 조사하여 본 결과 표 8과 그림 6에서 보는 바와 같이, group E (primed with the JOL911 and JOL906 mixture and boosted with JOL911)에서는 임상증상 뿐만 아니라 폐사가 관찰되지 않았다. 하지만 다른 그룹에서는 도전감염 후 6일에서 12일 사이에 폐사율이 관찰되었다.

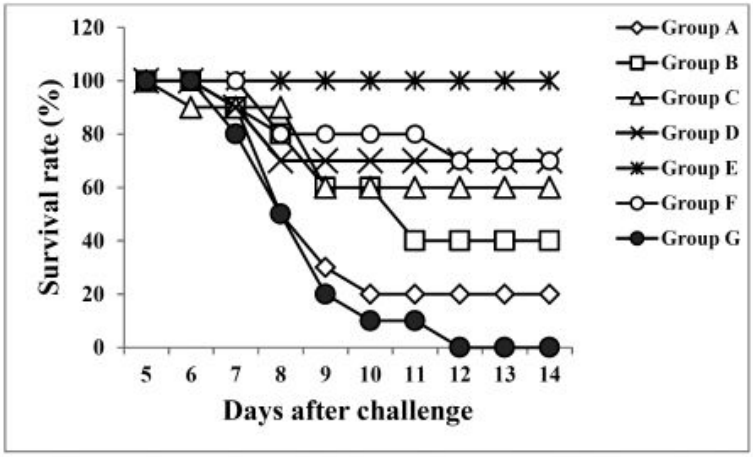


그림 6. Survival rates in mice challenged with a wild type *S.* Typhimurium. Group A, B, C, D, E, F and G values refer to Fig. 4 and Table 8. All mice in each group were orally challenged with 2×10^8 CFU virulent wildtype *S.* Typhimurium at 6 weeks post-prime immunization. Mice demonstrated mortality from day 6 post-challenge.

6) 도전감염 후 실질장기에서의 균 분리

도전감염 후 14일 째에 생존한 모든 마우스를 희생시켜 간과 비장에서 균 분리를 수행하여 본 결과, Table 8에서와 같이, group E 마우스에서는 도전감염균주가 분리되지 않은 반면, 다른 group의 마우스에서는 균이 분리되었다.

2] BALB/c mice에서 신생 자돈 설사와 관련된 백신 후보주의 혼합 접종 후 각 항원별 면역반응 유도 실험

3-2-1. 수행 방법

(1) 실험동물

5주령의 BALB/c 암컷 마우스를 40두를 구입하여 전북대학교 실험동물사육장에서 사육하면서 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

(2) 백신 제조

생균백신 준비를 위해서 각 항원별로 개발되어 보관중인 약독화 살모넬라균을 10㎖ LB Broth에 접종하여 37℃에서 200 rpm의 속도로 16시간 배양하였다. 이 배양액을 1/100 (volume)의 비율로 100㎖ LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 3 ~ 5 시간 동안 재배양하였다. 이 배양액을 4℃에서 4,000 rpm으로 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 멸균 PBS로 재부유시키는 방법으로 세척하였다. 2번 더 세척한 후 마지막 침전물은 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose) 소량으로 부유시켜 OD_{600}값을 측정하여 균수를 확인하였다. PBS-sucrose를 이용하여 각 adhesin 발현 약독화 살모넬라균이 1.0×10^{11} CFU/1㎖가 되도록 혼합하여 생균백신으로 준비한 후 당일 접종하였다.

(3) 백신접종

5주령의 BALB/c female mice를 각 group별로 10마리씩 구입하여 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험군은 표 9에서 보는 바와 같았다. 적어도 백신 접종 4시간 전에는 절식을 시켰으며 1차 접종 군(group A)은 약독화 생백신 균주를 LB broth에 접종하여 37℃ overnight culture 한 후 접종 총 균수가 2×10^{9}CFU/20㎕가 되게 PBS-sucrose로 희석한 후 각 개체 당 20㎕씩 경구 접종 하였다. 2차 접종 군(group C)은 1차 접종 3주 후 동량의 백신 균주를 접종하였다.. 항원이 삽입되지 않은 pBP244만 CK110에

transformation 시켜 vector control로 사용하였고 group B는 grpup A와 같은 방법으로, group D는 group D와 같은 방법으로 각각 접종 하였다.

표 9. 신생자돈 설사와 관련된 마우스에서의 실험

Groups	대상 항원	1차 접종	2차 접종
A	K88ac, K99, FasA, F41, Intimin	모든 항원 경구접종	-
B	CK110 with pBP244	경구접종	-
C	K88ac, K99, FasA, F41, Intimin	모든 항원 경구접종	모든 항원 경구접종
D	CK110 with pBP244	경구접종	경구접종

(4) 가검물 채취

접종 전 그리고 접종 후 2, 5, 7, 9, 11, 13주째에 각각 혈청과 분변을 채취하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심분리하여 상층액인 serum을 분리한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 분변은 무게를 잰 후 sodium azide가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/㎖가 되도록 부유시킨 후 최고속도에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

(5) ELISA

혈청 및 분변에서 각 항원에 specific한 항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. sample well에는 정제된 항원 단백질을 500ng/well 의 농도로, standard well에는 goat anti-mouse IgG/IgG1/IgG2a 혹은 rabbit anti-mouse IgA를 각각 200ng/well의 농도로 분주한 후 4℃ overnight 하여 coating 하였다. Coating 된 plate는 Tween 20이 0.05% 함유된 PBS (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (3% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum 및 분변 sample은 PBST로 1:200, 1:3로 각각 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 1시간 30분 ~ 2시간 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a HRP 그리고 IgA level에 대해서는 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA HRP를 1:6,000의 배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응 시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색 후 3M H_2SO_4로 stop후 492nm에서 OD값을 측정하였다. 각 항원 specific한 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정하였다.

(6) 백신 균주의 분변으로의 배출 확인

백신접종 후 접종 익일부터 3주 동안 매일 분변으로 백신균주의 배출 여부를 확인하였다. 균부리는 살모넬라균 분리방법에 따라 실시되었으며 분리된 균주를 일차적으로 살모넬라 특이 primer인 OMPC (OMPCF: 5′-ATCGCTGACTTATGCAATCG; OMPCR: CGGGTTGCGTTATAGGTCTG-3′) 와 *S.* Typhimurium 특이 primer 인 TYPH (TYPHF: 5′-TTGTTCACTTTTTTACCCCTGAA-3′; TYPHR: 5′-CCCTGACAGCCGTTAGATATT-3′)로 확인한 다음 백신 균주 여부를 *cpxR* and *lon* primer sets (표 5)으로 최종 확인하였다.

3-2-2. 결과

(1) 면역반응

1) Serum IgG 및 mucosal sIgA

그림 7과 8에서 보는 바와 같이 group C 마우스 (prime-booster with the vaccine mixture)의 경우 각 부착인자 항원에 대한 serum IgG 역가는 group D의 항체 역가와 비교했을 때 접종 5주 후부터 실험이 끝날 때까지 증가하였다 ($P<0.05$). Group A (single administration with the vaccine mixture)의 경우 또한 group B와 비교했을 때 접종 5주 후부터 실험이 끝날 때까지 항체 역가가 증가하였다 (그림 7). 더불어 group C 마우스의 경우에는 각 부착인자 항원에 대한 fecal sIgA 항체 역가는 접종 2주 후부터 실험이 끝날 때까지 group D 마우스의 항체 역가 보다 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 ($P<0.05$). 하지만 group A의 경우에는 group B와 비교 했을 때 단지 접종 후 2주째에만 통계학적으로 의의 있는 증가가 관찰되었다 (그림 8).

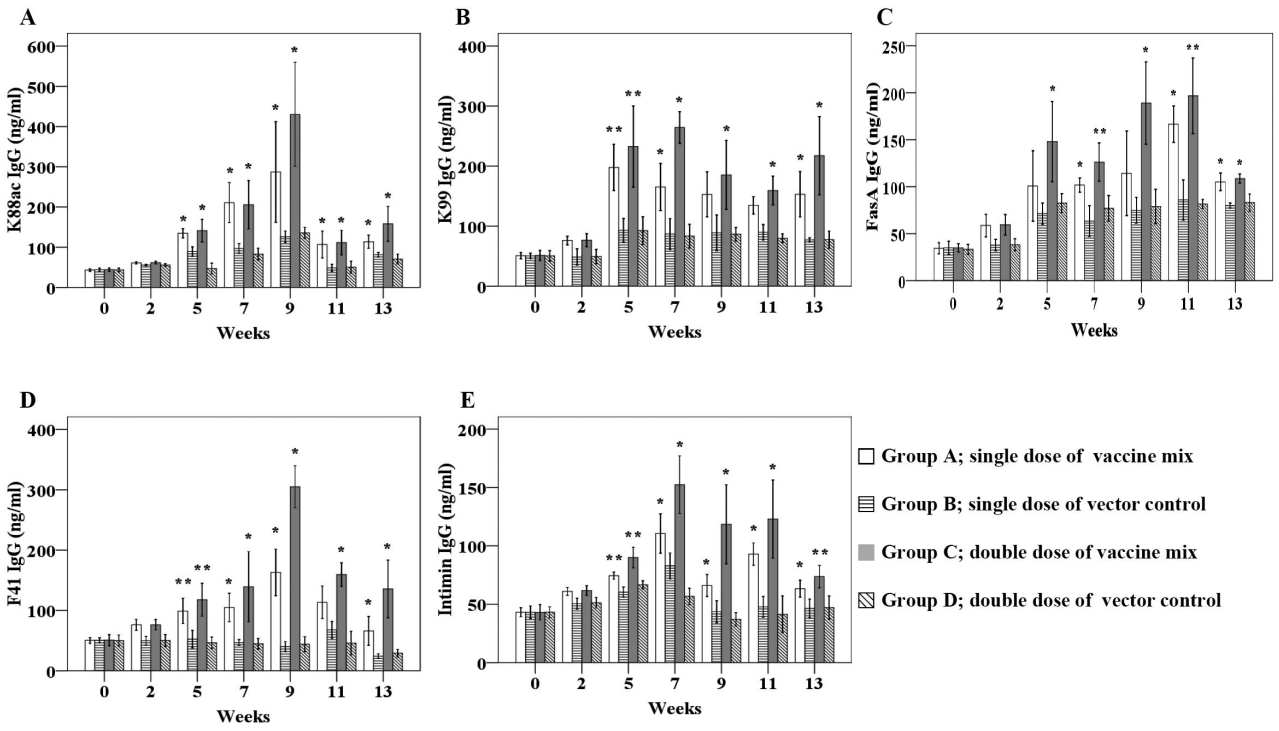


그림 7. Titers of serum IgG against K88ac, K99, FasA, F41 and intimin antigens in mice immunized with the mixture of vaccine constructs. (A) K88ac-specific IgG; (B) K99-specific IgG; (C) FasA-specific IgG; (D) F41-specific IgG; and (E) intimin-specific IgG. Group A mice (□) were administered a single dose of a mixture containing all of the vaccine constructs. Group B mice (▤) were given a single dose of the vector control, JOL932. Group C mice (■) were primed and boosted with the vaccine mixture. Group D mice (▧) were primed and boosted with JOL932. Weeks indicate weeks post prime immunization. Asterisks indicate significant differences between the antibody titers of groups immunized with the vaccine constructs and those of the controls ($^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$).

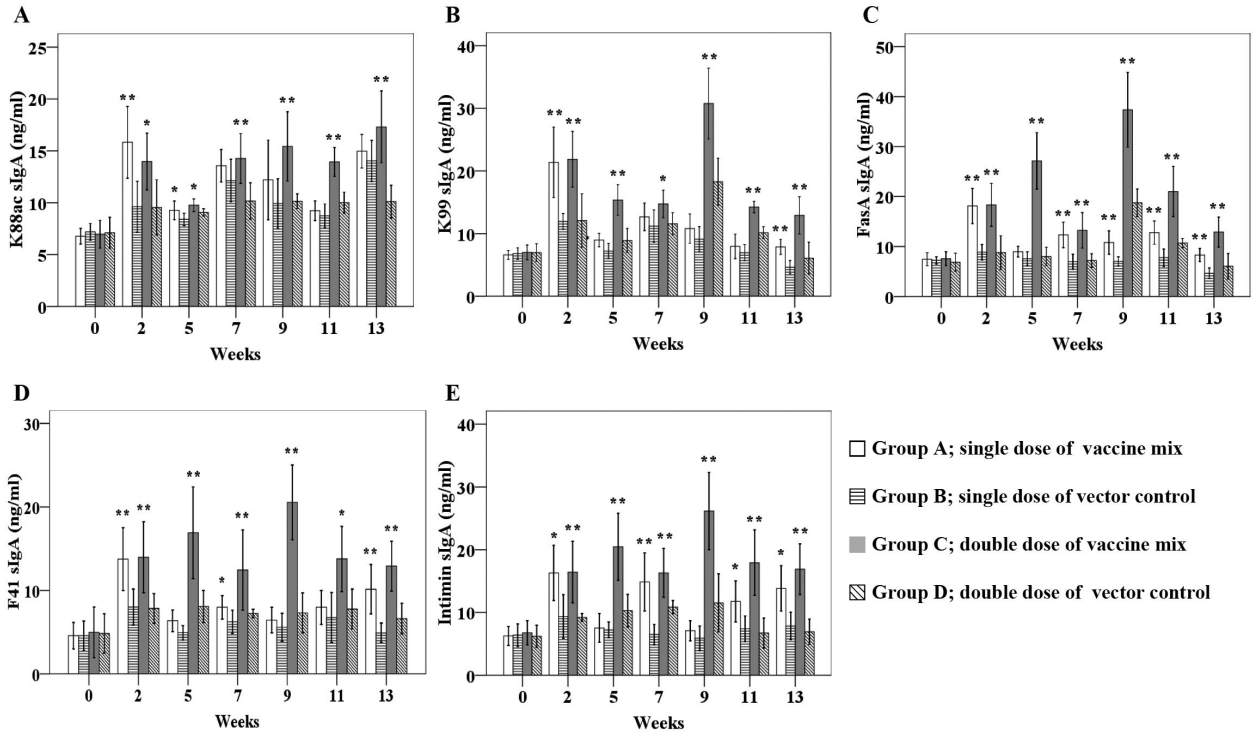


그림 8. Titers of fecal sIgA against K88ac, K99, FasA, F41 and intimin fimbrial antigens in mice immunized with the vaccine constructs. (A) K88ac-specific sIgA; (B) K99-specific sIgA; (C) FasA-specific sIgA; (D) F41-specific sIgA; and (E) intimin-specific sIgA. Refer to Fig. 7 for specific immunization conditions of groups A-D. Asterisks indicate significant differences between the antibody titers of groups immunized with the vaccine constructs and those of the controls ($^{*}P< 0.05$, $^{**}P<0.01$).

2) Serum IgG1과 IgG2a

K88ac, K99, FasA, F41 그리고 intimin adhesin 항원에 대한 면역 반응의 특성을 더 조사하기 위해 rkr 항원에 대한 IgG2a와 IgG1 역가를 측정하여 보았다. 그림 9에서 보는 바와 같이, group A의 경우에는 각 항원에 대한 IgG2a의 항체 역가가 IgG1에 비해 통계학적으로 의의 있게 높았던 반면, group C의 경우에는 IgG2a와 IgG1의 항체 역가가 함께 증가되었음이 관찰되었다 (그림 9).

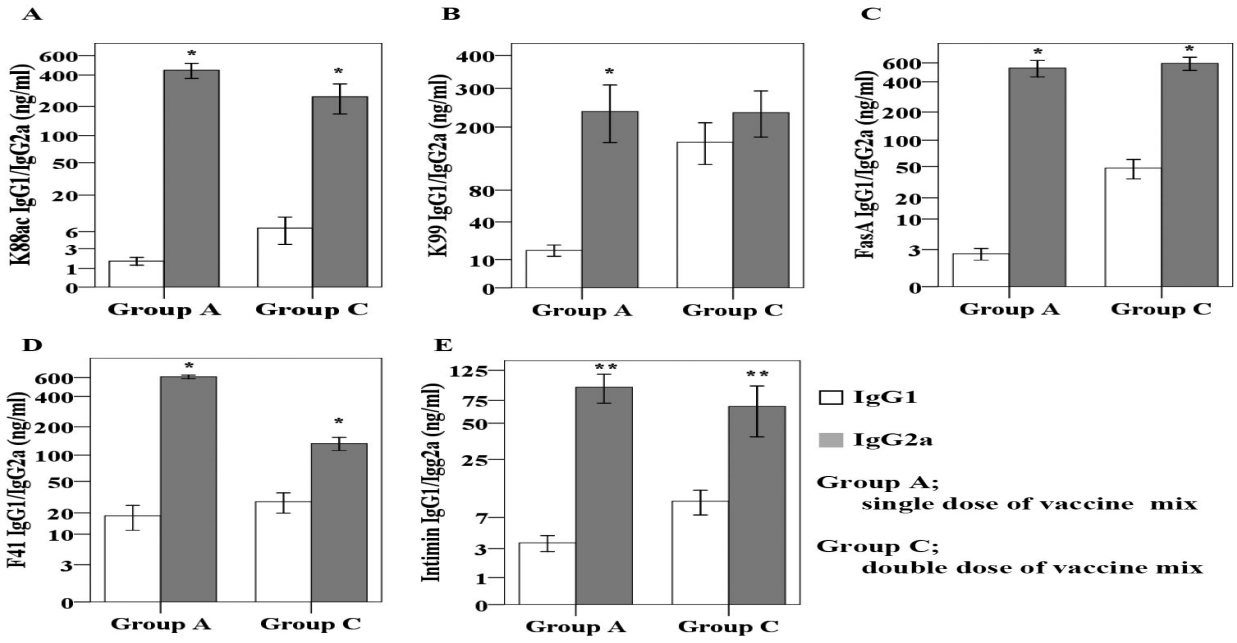


그림 9. Serum K88ac-, K99-, FasA-, F41- and intimin-specific IgG1 and IgG2a. (A) K88ac-specific IgG1 and IgG2a; (B) K99-specific IgG1 and IgG2a; (C) FasA-specific IgG1 and IgG2a, (D) F41-specific IgG1 and IgG2a; and (E) intimin-specific IgG1 and IgG2a. Refer to Fig. 7 for specific immunization conditions of groups A and C. Asterisks indicate significant differences between the individual adhesin antigen-specific IgG1 and IgG2a titers in groups immunized with the vaccine constructs ($^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$).

(2) 백신 접종 후 부작용 여부

백신의 경구 접종 후 3주 동안 매일 분변으로의 배출 여부를 조사하여 본 결과 어떤 백신 균주도 분변에서 검출되지 않았다.

3] BALB/c mice에서 이유 자돈 설사와 관련된 백신 후보주의 혼합 접종 후 각 항원별 면역반응 유도 실험

3-3-1. 수행 방법

(1) 실험동물

5주령의 BALB/c 암컷 마우스를 40두를 구입하여 전북대학교 실험동물사육장에서 사육하면서 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

(2) 백신 제조

생균백신 준비를 위해서 각 항원별로 개발되어 보관중인 약독화 살모넬라균을 10㎖ LB Broth에 접종하여 37℃에서 200 rpm의 속도로 16시간 배양하였다. 이 배양액을 1/100 (volume)의 비율로 100㎖ LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 3 ~ 5 시간 동안 재배양하였다. 이 배양액을 4℃에서 4,000 rpm으로 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 멸균 PBS로 재부유시키는 방법으로 세척하였다. 2번 더 세척한 후 마지막 침전물은 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose) 소량으로 부유시켜 OD_{600}값을 측정하여 균수를 확인하였다. PBS-sucrose를 이용하여 각 adhesin 발현 약독화 살모넬라균이 1.0×10^{11} CFU/1㎖가 되도록 혼합하여 생균백신으로 준비한 후 당일 접종하였다.

(3) 백신접종

5주령의 BALB/c female mice를 각 group별로 10마리씩 구입하여 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험군은 표 10과 같았다. 적어도 백신 접종 4시간 전에는 절식을 시켰으며 1차 접종 군(group A)은 약독화 생백신 균주를 LB broth에 접종하여 37℃ overnight culture 한 후 접종 총 균수가 2×10^{9}CFU/20㎕가 되게 PBS-sucrose로 희석한 후 각 개체 당 20㎕씩 경구 접종 하였다. 2차 접종 군(group C)은 1차 접종 3주 후 동량의 백신 균주를 접종하였다. 항원이 삽입되지 않은 pBP244만 CK110에 transformation 시켜 vector control로 사용하였고 group B는 grpup A와 같은 방법으로, group D는 group D와 같은 방법으로 각각 접종 하였다.

표 10. 이유 자돈 설사와 관련된 마우스에서의 실험

Groups	대상 항원	1차접종	2차접종
1	K88ab, K88ac, FedA, FedF	모든 항원 경구접종	-
2	CK110 with pBP244	경구접종	-
3	K88ab, K88ac, FedA, FedF	모든 항원 경구접종	모든 항원 경구접종
4	CK110 with pBP244	경구접종	경구접종

(4) 가검물 채취

접종 전 그리고 접종 후 2, 5, 7, 9, 11, 13주째에 각각 혈청과 분변을 채취하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심분리하여 상층액인 serum을 분리한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 분변은 무게를 잰 후 sodium azide가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/㎖가 되도록 부유시킨 후 최고속도에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리,

-20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

(5) ELISA

혈청 및 분변에서 각 항원에 specific한 항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. sample well에는 정제된 항원 단백질을 500ng/well 의 농도로, standard well에는 goat anti-mouse IgG/IgG1/IgG2a 혹은 rabbit anti-mouse IgA를 각각 200ng/well의 농도로 분주한 후 4℃ overnight 하여 coating 하였다. Coating 된 plate는 Tween 20이 0.05% 함유된 PBS (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (3% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum 및 분변 sample은 PBST로 1:200, 1:3로 각각 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 1시간30분~2시간 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a HRP 그리고 IgA level에 대해서는 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA HRP를 1:6,000의 배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응 시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색 후 3M H_2SO_4로 stop후 492nm에서 OD값을 측정하였다. 각 항원 specific한 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정하였다.

(6) 백신 균주의 분변으로의 배출 확인

백신접종 후 접종 익일부터 3주 동안 매일 분변으로 백신균주의 배출 여부를 확인하였다. 균부리는 살모넬라균 분리방법에 따라 실시되었으며 분리된 균주를 일차적으로 살모넬라 특이 primer인 OMPC (OMPCF: 5′-ATCGCTGACTTATGCAATCG; OMPCR: CGGGTTGCGTTATAGGTCTG-3′) 와 *S.* Typhimurium 특이 primer 인 TYPH (TYPHF: 5′-TTGTTCACTTTTTACCCCTGAA-3′; TYPHR: 5′-CCCTGACAGCCGTTAGATATT-3′)로 확인한 다음 백신 균주 여부를 *cpxR* and *lon* primer sets (표 5)으로 최종 확인하였다.

3-3-2. 결과

(1) 면역반응

1) Serum IgG 및 mucosal sIgA

그림 10과 11에서 보는 바와 같이, group 1 (ingle administration with the vaccine mixture)과 3 (prime-booster with the vaccine mixture)의 경우 각 adhesin 항원에 대한 serum IgG 역가는 각각 group 2와 4의 항체 역가와 비교했을 때 접종 5주 후부터 실험이 끝

날 때까지 통계학적으로 유의 있게 증가하였다 (P<0.05) (그림 10). 더불어 group 3 마우스의 경우에는 각 adhesin 항원에 대한 fecal sIgA 항체 역가는 접종 2주 후부터 실험이 끝날 때까지 group 4 마우스의 항체 역가 보다 통계학적으로 유의 있게 증가하였다 (P<0.05). 하지만 group 1의 경우에는 group 2와 비교 했을 때 단지 접종 후 2주와 5주째에만 증가가 관찰되었다 (그림 11).

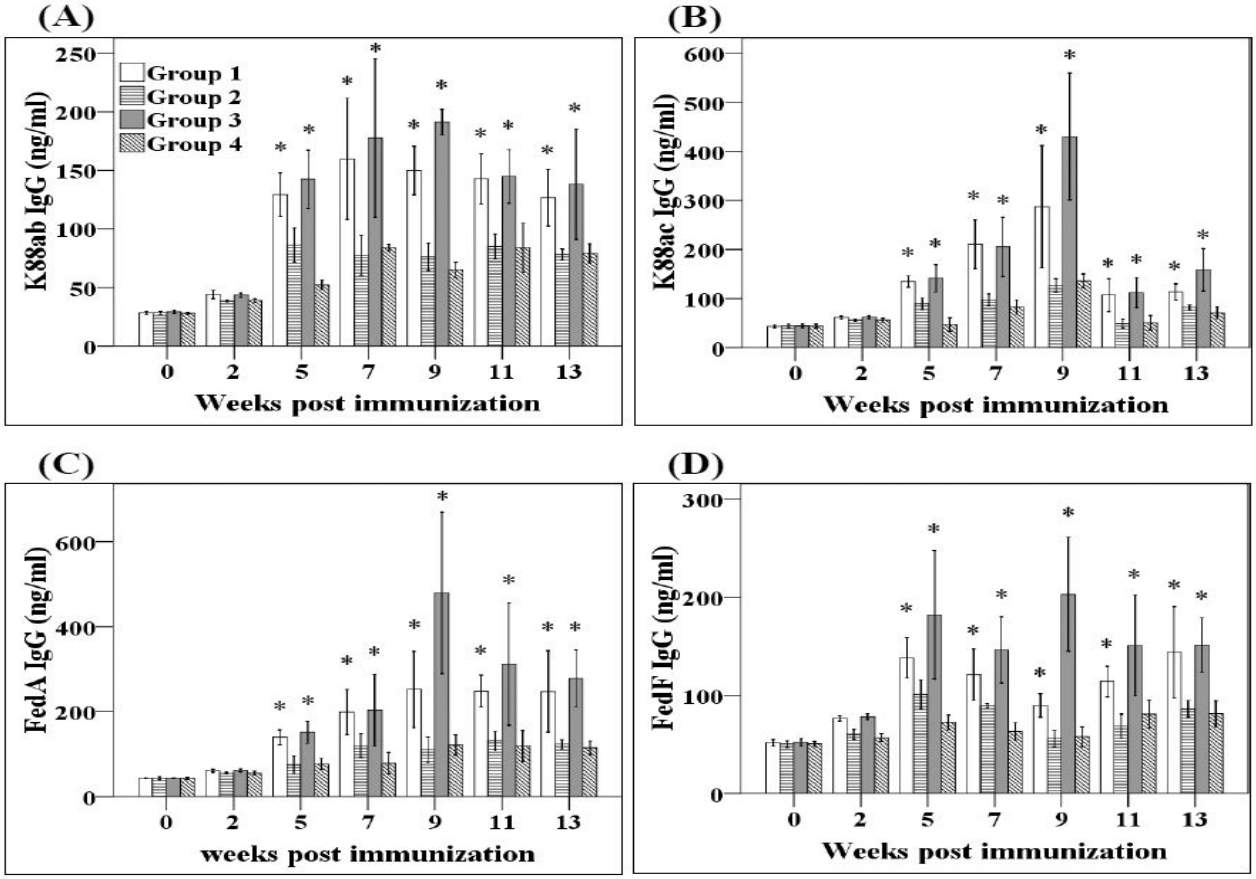


그림 10. Titers of serum IgG against K88ab, K88ac, FedA, and FedF fimbrial antigens in mice immunized with the mixture of vaccine constructions. (A) K88ab-specific IgG; (B) K88ac-specific IgG; (C) FedA-specific IgG; and (D) FedF-specific IgG. Group 1 mice (□) were administered a single dose of the vaccine mixture. Group 2 mice (▤) were given a single dose of JOL932. Group 3 mice (■) were primed and boosted with the vaccine mixture. Group 4 mice (▧) were primed and boosted with JOL932. Asterisks indicate significant differences between the antibody titers of groups immunized with the vaccine constructions and those of the control ($^{*}P < 0.05$).

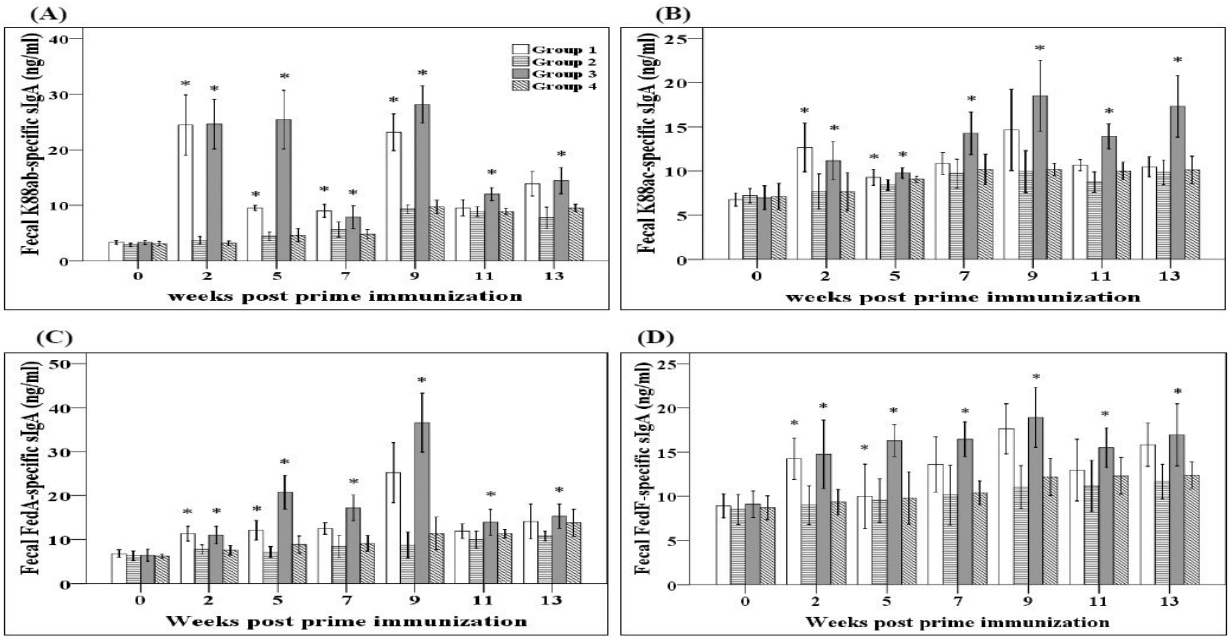


그림 11. Titers of fecal sIgA against K88ab, K88ac, FedA, and FedF fimabrial antigens in mice immunized with the vaccine constructions. (A) K88ab-specific sIgA; (B) K88ac-specific sIgA; (C) FedA-specific sIgA; and (D) FedF-specific sIgA. Please refer to Fig. 10 for specific immunization conditions of groups 1 - 4. Asterisks indicate significant difference between the antibody titers of groups immunized with the vaccine constructions and those of the control ($^{*}P < 0.05$).

2) Serum IgG1과 IgG2a

K88ac, K99, FasA, F41 그리고 intimin adhesin 항원에 대한 면역 반응의 특성을 더 조사하기 위해 각 항원에 대한 IgG2a와 IgG1 역가를 측정하여 보았다. 그림 12에서 보는 바와 같이, group 1의 경우에는 각 항원에 대한 IgG2a의 항체 역가가 IgG1에 비해 통계학적으로 유의 있게 높았던 반면, group 3의 경우에는 물론 여전히 IgG2a의 항체 역가가 우세하기는 하지만 IgG1의 항체 역가 또한 증가 되었다 (그림 12).

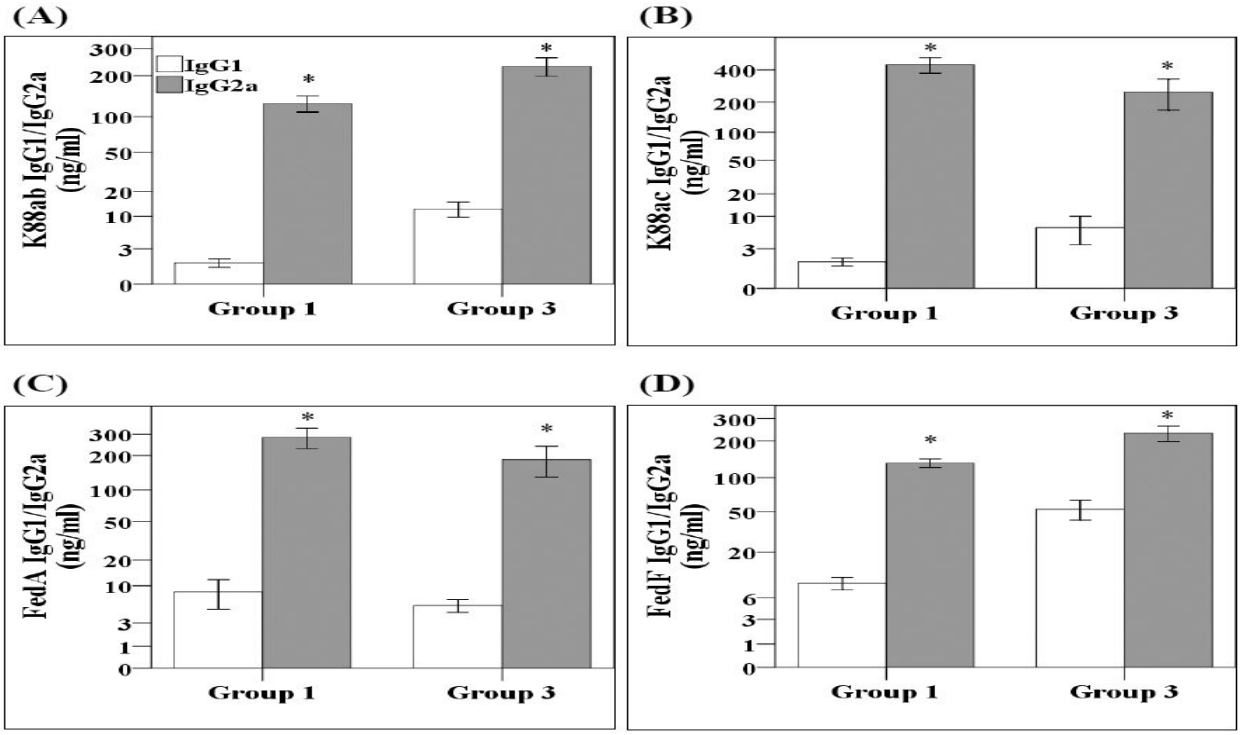


그림 12. Serum K88ab-, K88ac-, FedA-, and FedF-specific IgG1 and IgG2a. (A) K88ab-specific IgG1 and IgG2a; (B) K88ac-specific IgG1 and IgG2a; (C) FedA-specific IgG1 and IgG2a; and (D) FedF-specific IgG1 and IgG2a. Please refer to Fig. 10 for specific immunization conditions of groups 1 and 3. Asterisks indicate significant differences between the individual fimbrial antigens-specific IgG1 and IgG2a titers in groups immunized with the vaccine constructions ($^{*}P < 0.05$).

(2) 백신 접종 후 부작용 여부

백신의 경구 접종 후 3주 동안 매일 분변으로의 배출 여부를 조사하여 본 결과 어떤 백신 균주도 분변에서 검출되지 않았다.

[제1협동과제 : 경남과학기술대학교]

[4] 고스트 시스템 개발 및 마우스에서의 고스트 효능 시험

4-1. 수행방법

1) 사용된 균주 및 플라즈미드

사용된 균주 및 플라tm미드는 표 11에 정리되어 있다. *E. coli* 및 *Salmonella* strain은 현재 연구실에 보관중인 균주 또는 전북대학교 수의과 대학에서부터 분양받은 균주를 사용하였다.

2) PCR (polymerase chain reaction) 및 DNA

목적으로 하는 DNA절편들은 PCR을 사용하여 증폭하였다. PCR을 위한 효소로서 Tag DNA polymerase는 EX-Tag (TaKaRa), Eco-Tag (Solgent)를 사용하였고, *Pfu* DNA polymerase는 invitrogen로부터 구입하여 사용하였다. 목적으로 하는 DNA segment가 insertion되어 있는 recombinant plasmid들은 제한 효소 절단, PCR 및 DNA sequencing (Macrogen)으로 확인하였다.

3) 고스트 세포 성장곡선, 생균수 측정 및 고스트 형성

고스트 세포를 2 mL의 LB broth로 30℃에서 전배양한 후 100 mL의 배지에 1%로 접종하였다. 접종한 후 30℃에서 OD_{600}값이 0.2-0.4까지 배양하였다. 온도를 42℃로 올린 후 성장곡선을 측정하기 위해 0, 4, 24, 48시간에서 OD_{600}값을 측정하였다. 생균수를 측정하기 위해서 온도를 42℃로 후 0, 4, 24, 48시간별로 고스트 세포를 연속적으로 10배씩 희석시킨 후 LB agar plate상에서 12-16시간 배양한 후 CFU (colony forming unit)/ml를 측정하였다. 고스트 형성을 위해서 42℃에서 배양을 하면서 생균수가 10^3이하로 감소될 때 배양을 종료하고 동결건조하여 마우스 시료로써 준비하였다.

4) 고스트 세포의 SEM (Scanning Electron Microscopy) 관찰

MMP13[pMMP101-1] 고스트 세포를 2 mL의 LB broth로 30℃에서 전배양한 후 100 mL의 배지에 1%로 접종하였다. 접종한 후 30℃에서 OD_{600}값이 0.2-0.4까지 배양하였다. 온도를 42℃로 올린 후 24시간 배양하였다. 배양한 고스트 세포를 원심분리기를 이용해서 세포를 침전 시켰다. 침전 시킨 고스트 세포를 2.5% glutaraldehyde/0.1M Na-cacodylate (pH. 7.4)) 용액에 넣어서 4℃에서 24시간 정도 고정화 시켰다. 고정된 고스트 세포를 20% EtOH 15 min, 50% EtOH 15 min, 70% EtOH 15 min, 90% EtOH 15 min, 100% EtOH 30 min, 100% EtOH 30 min로 탈수 시켰다. 탈수된 고스트 세포에 전자이온을 코팅을 시켜서 SEM (Scanning Electron Microscopy)을 이용해서 관찰하였다.

5) 고스트 세포의 살모넬라균에 대한 보호능력 확인

고스트 세포가 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰하기 위해서 도전실험을 다음과 같이 실시하였다. $1x10^9$ CFU/ml 고스트 세포를 경구와 근육으로 접종하고 동량으로 2주후에 추가 접종하였다. 고스트 세포 접종 4주후에 *S. typhimurium* x3339를 $1.8x10^6$으로 경구로 투여하였다. 접종하기 전에 4시간이상 절수 및 절식을 시켰고 접종 후 1시간 후 음수 및 사료를 제공하였다. 접종을 실시한 후 4주 동안 마우스를 관찰하였다.

6) 고스트 세포의 마우스 vaccination

동결 건조된 고스트 세포를 농도별로 희석하여 일주일간 순화된 BALB/c 마우스에 경구 또는 근육으로 접종하였다. 접종량은 경구가 10^8, 10^9, 10^{10} CFU/ml로 투여하였고, 근육으로는 10^6~10^9 CFU/ml 까지 접종하였다. 접종하기 전에 4시간이상 절수 및 절식을 시켰고 접종 후 1시간 후 음수 및 사료를 제공하였다. 접종을 실시한 후 5주동안 마우스를 관찰하였고 혈액 중의 면역글로불린 함량을 측정하기 위한 혈액의 채취는 2주, 4주에서 실시하였다. 또한 분비액 중에 sIgA를 측정하기 위해 질세척액과 분변을 2주, 4주에서 채취하였다. 사이토카인 함량을 측정하기 위해 지라의 절취는 8일과 5주에 실시하였다.

7) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

항원인 intimin을 200ng/100ul 농도로 0.05M carbonate 용액 (pH 9.6) 에 넣어서 4℃에서 overnight 시켜서 plate의 표면에 항원을 코팅 시켰다. 코팅용액을 버리고 1xPBS (pH 7,4) 용액으로 한번 washing을 하였다. 1xPBS (pH 7,4) 용액을 완전히 제거한 후 0.1% skim milk 용액으로 상온에서 30분 blocking 시켰다. Blocking 용액인 0.1% skim milk 용액을 버리고 새로운 0.1% skim milk 용액을 넣은 후 샘플(혈액(1:100), 분변(1:4), 질분비액(1:4))을 넣고 2시간 37℃에서 반응 시켰다. 1xPBS (pH 7,4) 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1xPBS (pH 7,4) 용액을 완전히 제거한 후, 2차 항체인 IgG (1:5000), lgG1 (1:5000), IgG2a (1:5000), IgA (1:2000)을 상온에서 2시간 반응 시켰다. 1xPBS (pH 7,4) 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1xPBS (pH 7,4) 용액을 완전히 제거한 후 반응 기질 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405nm에서 발현정도를 관찰하였다.

8) Real-Time PCR (RT-PCR)

마우스에 고스트 세포를 경구 및 근육으로 투여하고 8일 및 5주가 경과한 후 지라

(spleen)을 채취해서 ice에 보관중 인 RPMI 용액에 넣어서 절민 후 cell strainer(ϕ70, SPL)에 여과시켰다. 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리 시켜 상등액을 버리고 Red blood cell (RBC) lysis 용액으로 넣어서 적혈구를 파괴시켰다. 그리고 RPMI 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1 mL의 RPMI1640 용액으로 침전물을 녹인 후, 96 well plate에 침전물을 녹인 용액을 넣고 항원을 처리한 후 5% CO2 배양기 (37℃)에서 3일 배양한 후 RNA Kit를 이용해서 RNA를 추출하였다. RTase (Fermantas)를 이용해서 뽑은 RNA 2 ug을 사용해서 cDNA를 합성하였다. IL-4, IL-5, IL-6, IFN-γ, TNF-α, GAPDH 올리고머를 이용해서 Real-time PCR (Bio-Red)을 수행하였다.

9) Cell Proliferation Assay

마우스에 고스트 세포를 경구 및 근육으로 투여한 후 3주가 지나서 지라(spleen)을 절취해서 ice에 보관중 인 RPMI 용액에 넣어서 절민 후 cell strainer(ϕ70, SPL)에 여과시켰다. 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리 시켜 상등액을 버리고 Red blood cell (RBC) lysis 용액으로 넣어서 적혈구를 파괴시켰다. 그리고 RPMI 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1 mL의 RPMI1640 용액으로 침전물을 녹인 후, 24 well plate에 침전물을 녹인 용액을 넣고 항원을 처리한 후 5% CO2 배양기 (37℃)에서 1, 2, 3일 배양한 후 cell lysis reagent (ViaLight Plus kit, Lonza)을 이용해서 cell proliferation를 측정하였다.

표 11. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains of plasmids	Characteristics	References
Strains		
E.coli		
Top10	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG	invitrogen
χ7213	*thi-1 thr-1 leuB6 supE44 tonA21 lacY1 recA RP4-2-Tc::Mu λpir, Δasd Δzhf-2::Tn10*	Lab. collection
χ6212	*Φ*80d lacZ ΔM15 *deoR Δ(lacZYA-argF)U169 supE44λ⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 ΔasdA4 Δzhf-2::Tn10 hsdR17* (R^- M^+)	Lab. collection
Salmonella		
MMP7	CK114 *asd*A16	this study
MMP13	*S. typhimurium* JOL401 *asd*A16	this study
S. typhimurium χ3339	Animal-passaged isolate of wild-type strain SL1344	Lab. collection
plasmids	a overexpression vector containing pBR322 origin	

pET28a		Novagen
	a vector containing pSC101 origin	
pWSK29	a vector containing polylinker of the pUC18	Lab. collection
pBSL14	a temperature sensitive vector containing R101	Lab. collection
pBP527	origin	this study
	a vector containing p15A origin	
pYA3332	a vector containing pBR origin	Lab. collection
pYA3342	x7213 [pYA3332::ss stfA/His]	Lab. collection
pMMP72	x7213 [pYA3332::ss agfA/His]	this study
pMMP81	x7213 [pYA3342::ghost-1]	this study
pMMP101	x6212 [pMMP72::intimin]	this study
pMMP124	x6212 [pMMP81::fedA]	this study
pMMP128	x6212 [pMMP81::fedF]	this study
pMMP129	x6212 [pMMP81::f41]	this study
pMMP130	x6212 [pMMP81::LT-B]	this study
pMMP132		this study

4-2. 결과

1) 고스트 세포의 구축

pMMP101-1 plasmid의 골격은 pYA3342이고 pBR ori, 5ST1T2, MCS 및 *asd* 유전자는 pYA3342로부터 유래 되어졌다(그림 13). 고스트 cassette는 pYA3342의 XbaI 사이트로 삽입 되어졌다. 고스트 cassette의 구성은 cI-P_R E lysis로 되어 있으면 cI는 P_R 프로모터에 온도의존적 억제자로서 작용한다. E lysis는 박테리오페이지 ∅X174의 세포용균 단백질로서 온도의존적으로 발현되어져서 표적 세포를 용균 시키게 한다. 외부항원의 발현을 위해서 Ptrc 프로모터를 이용하고 세포막으로 분비를 위해 agfA signal peptide를 운반하고 있다.

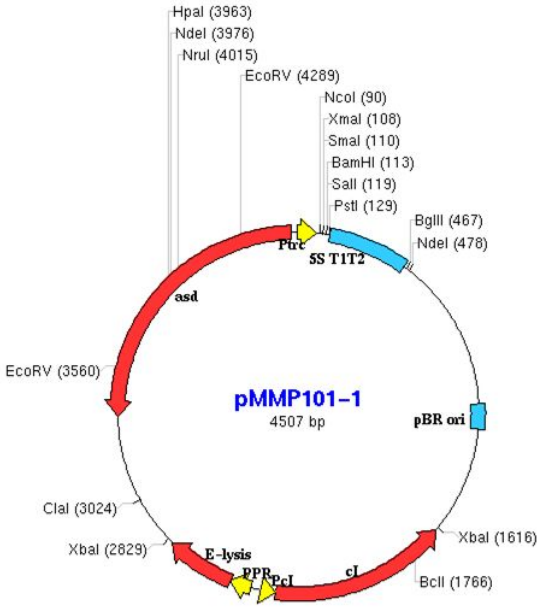


그림 13. pMMP101-1 plasmid의 모식도. Ptrc; Ptrc 프로모터, 5S T1T2; 5S rRNA transcriptional terminater, pBR ori; 복제기점.

2) 고스트 세포의 성장곡선과 생균수 측정 결과

고스트 세포의 성장곡선에서 TOP10을 이용할 경우 OD_{600}값이 0.35 시작되어 0.51까지 증가한 후 감소되는 경향을 나타내었다 (그림 14). 3시간째 최소로 감소한 후 일정하게 유지되는 경향을 보였다. 생균수는 10^9에서 시작하여 3시간 후에 10^3으로 감소하여 일정하게 유지되어 성장곡선과 유사한 경향을 보였다. *asd* 결손 돌연변이주인 x7213을 이용할 경우 OD_{600}값이 0.32 시작되어 0.61까지 증가한 후 서서히 감소되는 경향을 나타내었다. 생균수는 고스트화후 6시간째 최대인 10^9으로 된 후 급격히 감소하여 10^2이하까지 감소하였다. 이와 같이 성장의 양상이 다른 것은 asd 돌연변이의 경우에는 성장이 지연되는 양상이 나타나며 이런 경향이 고스트화에 지연을 유도하는 것으로 추정된다. 그림 14E, F는 고스트 세포의 성장곡선에서 살모넬라균인 MMP13을 이용할 경우 OD_{600}값이 0.32 시작되어 0.54까지 증가한 후 감소되는 경향을 나타내었다. 24시간까지 증가하다가 감소하는 경향을 보였다. 생균수는 10^8에서 시작하여 3시간 후에 10^7으로 감소하고 48시간이 경과 후에는 10^4까지 감소하는 경향을 보였다.

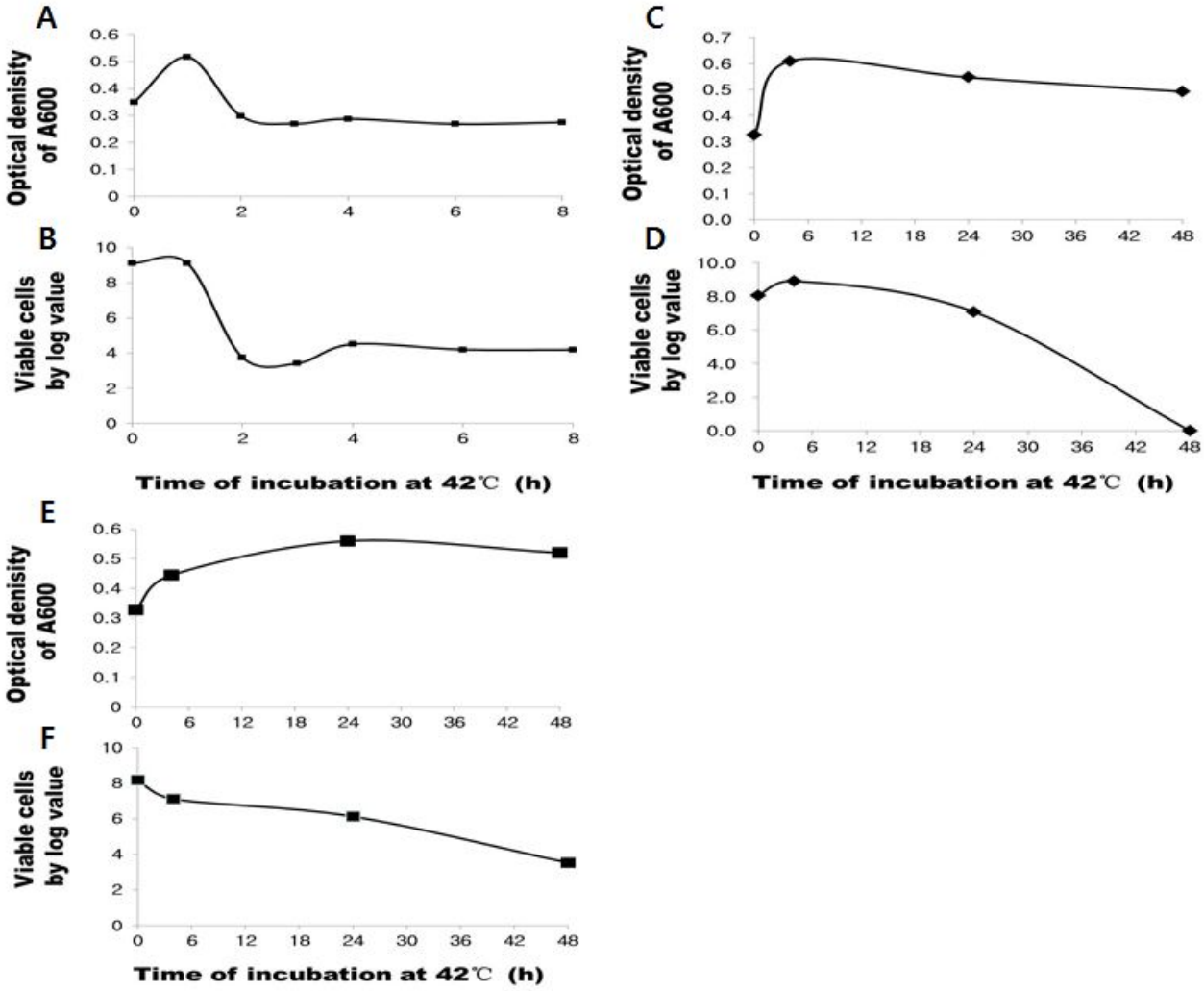


그림 14. 고스트 세포의 고스트화후 성장곡선과 생균수 측정 결과. A, Top10 [pMMP99]의 고스트화후 성장곡선; B, Top10 [pMMP99]의 생균수 측정; C, x7213 [pMMP101-1]의 고스트화후 성장곡선; D, x7213 [pMMP101-1]의 생균수 측정; E, MMP13 [pMMP99]의 고스트화후 성장곡선; F, MMP13 [pMMP99]의 생균수 측정. X축은 배양시간을 나타내며 Y축은 OD_{600}값 또는 생균수를 log값으로 나타내고 있다.

3) 고스트 세포의 challenge test 결과

마우스에 경구 (Oral)와 근육 (IM)으로 고스트 세포를 2주 간격으로 투여하였다. 한번 고스트 세포를 투여한 마우스와 두 번 고스트 세포를 투여한 마우스에 대해 살모넬라균에 대한 보호능력을 분석하기 위해 추가접종 후 4주째에 *S. typhimurium* x3339를 10^6의 용량으로 경구 도전실험을 하였다. PBS를 투여한 Control과 고스트 세포를 접종시킨 마우스의 challenge test 결과 보면 그림 15와 같았다. Control은 4일째부터 마우스가 폐사하는 것을 관찰할 수 있었고, 17일째 80%정도가 폐사 하였다. 경구로 한번 고스트 세포를 투여한 마우스는 11일째부

터 폐사하는 것을 관찰할 수 있었고, 30일이 경과한 후에 폐사율이 60%를 나타내었다. 그러나 경구로 두 번 고스트 세포를 접종한 마우스는 17일에 마우스가 폐사가 진행되었고 30일이 지났을 때 폐사율이 33%로 나타났다. IM으로 접종한 경우에는 한 번 접종한 경우에는 폐사가 16일째부터 시작되었지만 추가 접종한 경우는 10일째부터 폐사가 진행되었다. 최종 폐사율은 한번과 추가접종이 각각 40%와 50%를 나타내었다. 즉, IM으로 접종하는 경우에는 추가접종이 살모넬라에 대한 보호능력에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

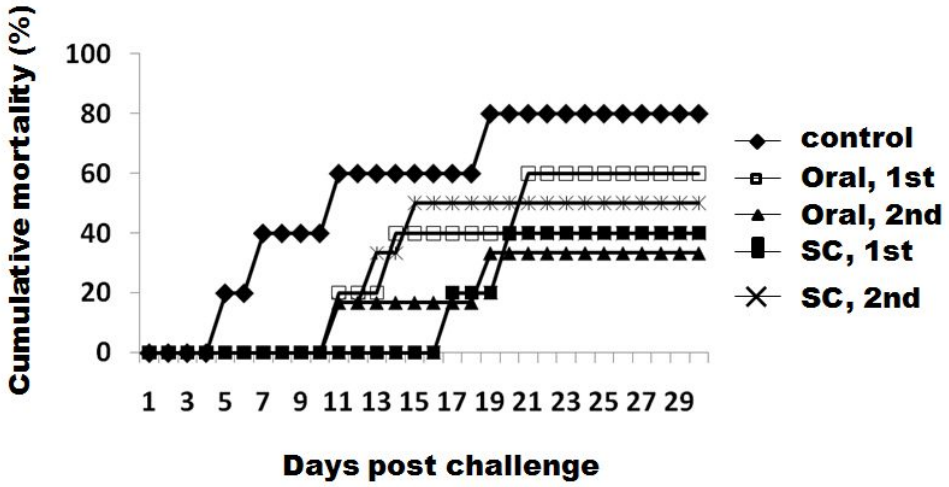


그림 15. 고트스 세포의 challenge test 결과. X축은 도전실험이 시작된 후 경과일수를 나타내고 Y축은 폐사율을 나타낸다. control, PBS 접종; Oral 1st, $1x10^9$ CFU/ml으로 한 번 경구 접종 ; Oral 2nd, $1x10^9$ CFU/ml으로 두 번 경구 접종; IM 1st, $1x10^9$ CFU/ml으로 한 번 근육 접종 ; IM 2nd, $1x10^9$ CFU/ml으로 두 번 근육 접종.

4) 외부항원의 발현정도 관찰 결과

Control (MMP13), pMMP72 plasmid에 intimin 유전자를 삽입시킨 pMMP124, pMMP81 plasmid에 FedA 유전자를 삽입시킨 pMMP128, FedF를 삽입시킨 pMMP129, F41를 삽입시킨 pMMP130, 그리고 LT-B를 삽입시킨 pMMP132의 발현정도를 관찰하였다. Dot blotting을 이용하여서 각각의 외부항원의 발현정도를 관찰하였는데, 그림 16에서 보는 바와 같이 control보다 외부항원인 FedA, FedF, F41, intimin, LT-B가 과발현 되는 것을 알 수 있었다. 즉, pMMP124, pMMP128, pMMP129, pMMP130, pMMP132 plasmids가 정상적으로 제작되었으면 정상적으로 기능한다는 것을 알 수 있었다.

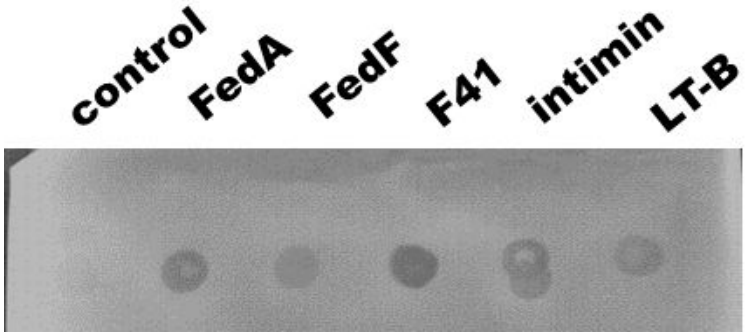


그림 16. 각 외부항원의 발현정도를 실험한 결과. 각 균주의 1x10^{7}개의 콜로니를 나이트로세포룰로즈 membrane위에 spoting한 후 1~2시간동안 자연건조 하였다. 이후의 절차는 일반적인 Western blottig 방법에 준하여 실시되었다. 1′Ab는 마우스 anti-His tag을 사용하였고, 2′Ab는 Goat anti 마우스 HRP conjucation된 것을 사용하였다. control, vector alone; FedA, pMMP81::FedA; FedF, pMMP81::FedF; F41, pMMP81::F41; intimin, pMMP72::intimin; LT-B, pMMP81::LT-B.

5) 고스트 세포의 표면 관찰 결과

고스트 세포를 전배양해서 100 mL의 액체배지에 1% 접종한 후 OD600값이 0.3정도 될 때까지 30℃에서 배양하였다. OD600값이 0.3이 되었을 때 배양액을 42℃ 배양기로 옮겨서 24시간 고스트화 하였다. 고스트화가 된 세포는 원심분리기를 이용해서 고스트 세포을 침전시켜 상등액을 완전히 제거하고 고정용액으로 고정화를 시킨 후 에탄올을 이용하여 탈수화를 시켰다. 건조시킨 고스트 세포의 표면을 SEM (Scanning Electron Microscopy)을 통해서 관찰한 결과를 보면 고스트 세포의 표면은 그림 17에서 보듯이 표면에 구멍이 뚫려져 있다는 것을 확인 할 수 있었다.(화살표) 그래서 asd에 의해 베이스 되는 고스트 체계가 정상적으로 형성 되었다는 것을 확인할 수 있었다.

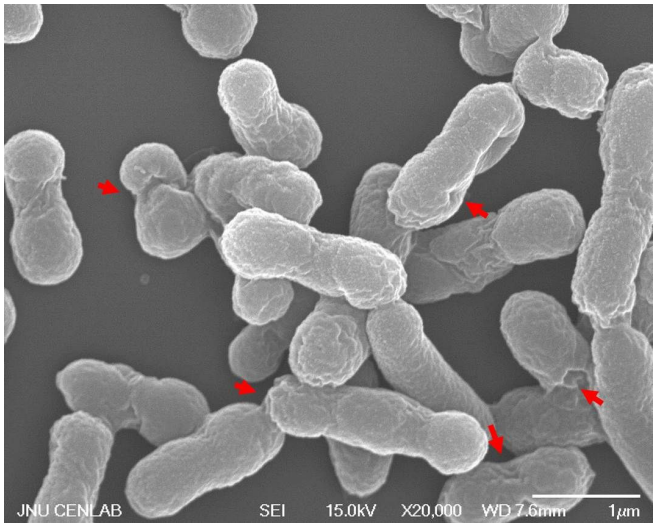


그림 17. SEM (Scanning Electron Microscopy) 통한 고스트 세포의 표면 관찰 결과. SEM 관찰을 위한 비율은 X20,000에 의해 실시되었다. 화살표는 세포에 구멍이 발생된 영역을 표시한다.

6) 고스트 세포를 접종한 마우스의 면역유도 실험 결과

고스트화한 백신에 intimin을 운반하는 백신을 마우스에 경구 (Orally)로 $1x10^8$, $1x10^9$, $1x10^{10}$으로 투여하였다. 고스트 세포를 접종한 마우스에 intimin에 따른 면역유도 반응을 확인하기 위해서 2주, 4주째에 혈청과 분변, 질세척액을 샘플링 하였다. 혈청에서는 IgG subtype인 Total IgG, IgG1, IgG2a를 분변과 질세척액에서는 sIgA의 면역유도 반응을 관찰하였다. 그림 18A, B, C, D, E는 고스트 세포를 경구로 투여한 후 2주째, 그림 18F, G, H, I, J는 4주째 결과를 나타내었다. 그림 18A와 F에서 보면 Total IgG의 면역유도 반응이 $1x10^9$이 2주째보다 4주째에 control보다 증가하였다. 그림 18B와 G를 보면 IgG1의 면역유도 반응에서 2주째에는 $1x10^8$, $1x10^9$이 증가하지만 4주째에는 $1x10^9$이 감소하는 양상을 보였다. 그림 18C와 H를 보면 IgG2a의 면역반응이 2주째나 4주째에 별다른 차이점을 보이지 않았다. 분변에서 IgA 면역유도 반응 결과인 그림 18D를 보면 2주째에 control보다 $1x10^8$과 $1x10^{10}$이 증가하는 양상을 보였다. control과 같은 양상은 보인 $1x10^9$은 실험적 오차로 보여진다. 하지만 4주째인 그림 18I를 보면 control과 같은 양상을 보였다. 질세척액에서 IgA의 면역유도 반응 결과인 그림 18E, J를 보면 분변에서 보인 양상처럼 2주째에 control보다 $1x10^8$과 1x1010이 증가하는 양상을 보였고, 4주째에서도 분변처럼 control과 같은 양상을 보였다.

고스트화한 백신을 마우스에 경구 (Orally)로 $1x10^8$, $1x10^9$, $1x10^{10}$으로 투여하였다. 고스트 세포를 접종한 마우스에 OMP에 의한 면역유도 반응을 확인하기 위해서 2주, 4주째에 혈청을 샘플링 하였다. 샘플링한 혈청에서는 IgG subtype인 Total IgG, IgG1, IgG2a 면역유도 반응을 관찰하였다. 그림 19A, B, C는 고스트 세포를 경구로 투여한 후 2주째, 그림 19D, E, F는 4주

째 결과를 나타내었다. 그림 19A, D에서 보면 Total IgG의 면역유도 반응이 $1x10^9$이 2주째보다 4주째에 control보다 증가하였다. 그림 19B, E를 보면 IgG1의 면역유도 반응에서 2주째에는 $1x10^8$, $1x10^9$이 증가하지만 4주째에는 $1x10^8$, $1x10^9$, $1x10^{10}$이 모두 감소하는 양상을 보였다. 그림 19C, F를 보면 IgG2a의 면역반응이 2주째에는 $1x10^8$, $1x10^9$에는 control과 비슷하게 $1x10^{10}$은 감소하는 양상을 보였다. 4주째에 $1x10^9$만이 control에 비해 증가하는 양상을 보였다.

고스트화한 백신을 마우스에 근육(IM)으로 $1x10^6$으로 투여하였다. 고스트 세포를 접종한 마우스에 면역유도 반응을 확인하기 위해서 2주, 4주째에 혈청과 분변, 질세척액을 샘플링하였다. 혈청에서는 IgG subtype인 Total IgG, IgG1, IgG2a를 분변과 질세척액에서는 sIgA의 면역유도 반응을 관찰하였다. 그림 20A, B, C, D, E는 고스트 세포를 경구로 투여한 후 2주째, 그림 20F, G, H, I, J는 4주째 결과를 나타내었다. 그림 20A, F에서 보면 Total IgG의 면역유도 반응이 $1x10^6$이 2주째에는 증가하지만 4주째에 control보다 감소하였다. 그림 20B, G를 보면 IgG1의 면역유도 반응에서 2주째와 4주째 모두 $1x10^6$이 감소하는 양상을 보였다. 그림 20C, H를 보면 IgG2a의 면역반응이 2주째나 4주째에 $1x10^6$이 감소하였다. 분변에서 IgA 면역유도 반응 결과인 그림 20D, I를 보면 2주째와 4주째 모두 $1x10^6$이 control보다 면역유도 반응이 감소하는 양상을 보였다. 질세척액에서 IgA의 면역유도 반응 결과인 그림 20E, J를 보면 분변에서 보인 양상처럼 2주째에 control과 $1x10^6$이 같은 양상을 보였으나, 4주째에는 control보다 $1x10^6$이 감소하는 양상을 보였다.

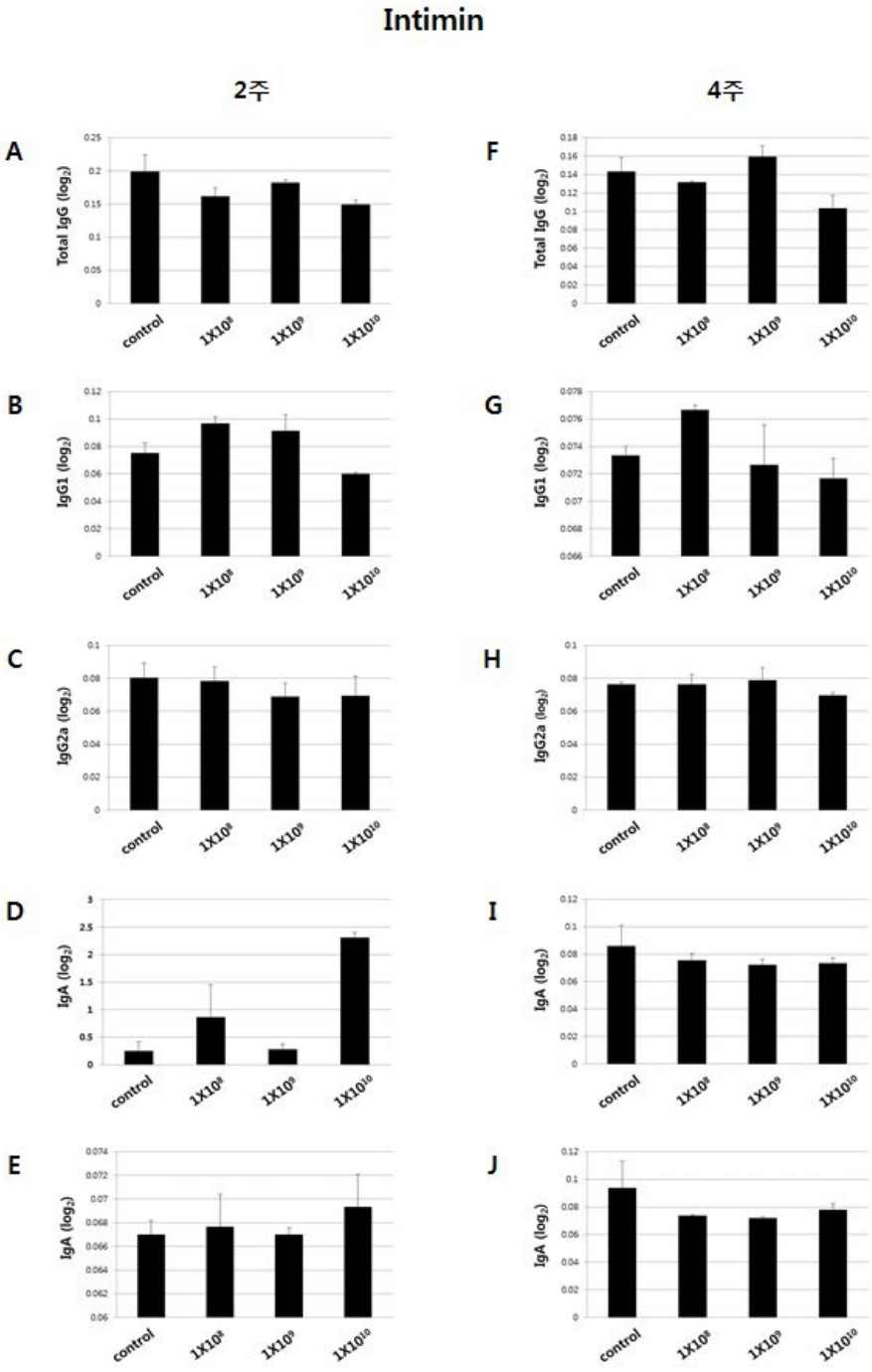


그림 18. 고스트화된 세포인 intimin을 경구 (Orally)로 투여한 후 결과. 항원인 Intimin을 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG, lgG1, IgG2a는 1:5000 비율로 혈청샘플에 처리하였고, IgA는 1:2000 비율로 분변과 질세척액에 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405nm에서 발현정도를 관찰하였다. A, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 2주째 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; B, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 2주째 혈청에서의 IgG1 면역유도 반응; C, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 2주째 혈청에서의 IgG2a 면역유도 반응; D, 고스트

세포를 마우스에 경구 접종 후 2주째 분변에서의 IgA 면역유도 반응; E, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 2주째 질세척액에서 IgA 면역유도 반응; F, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 4주째 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; G, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 4주째 혈청에서의 IgG1 면역유도 반응; H, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 4주째 혈청에서의 IgG2a 면역유도 반응; I, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 4주째 분변에서의 IgA 면역유도 반응; J, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 4주째 질세척액에서 IgA 면역유도 반응. X축은 고스트 세포의 농도를 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

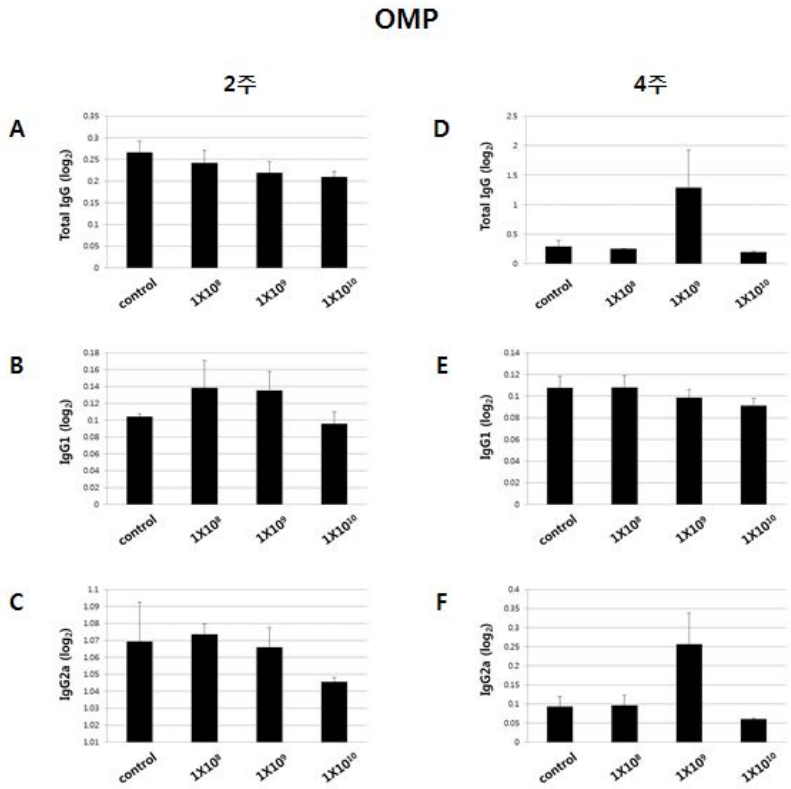


그림 19. 고스트화 세포를 경구 (Orally)로 투여한 후 OMP (outer membrane protein)에 항원에 대해 측정한 결과. 항원인 OMP를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG, lgG1, IgG2a는 1:5000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. A, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 2주째 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; B, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 2주째 혈청에서의 IgG1 면역유도 반응; C, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 2주째 혈청에서의 IgG2a 면역유도 반응; D, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 4주째 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; E, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 4주째 혈청에서의 IgG1 면역유도 반응; F, 고스트 세포를 마우스에 경구 접종 후 4주째 혈청에서의 IgG2a 면역유도 반응. X축은 고스트 세포의 농도를 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

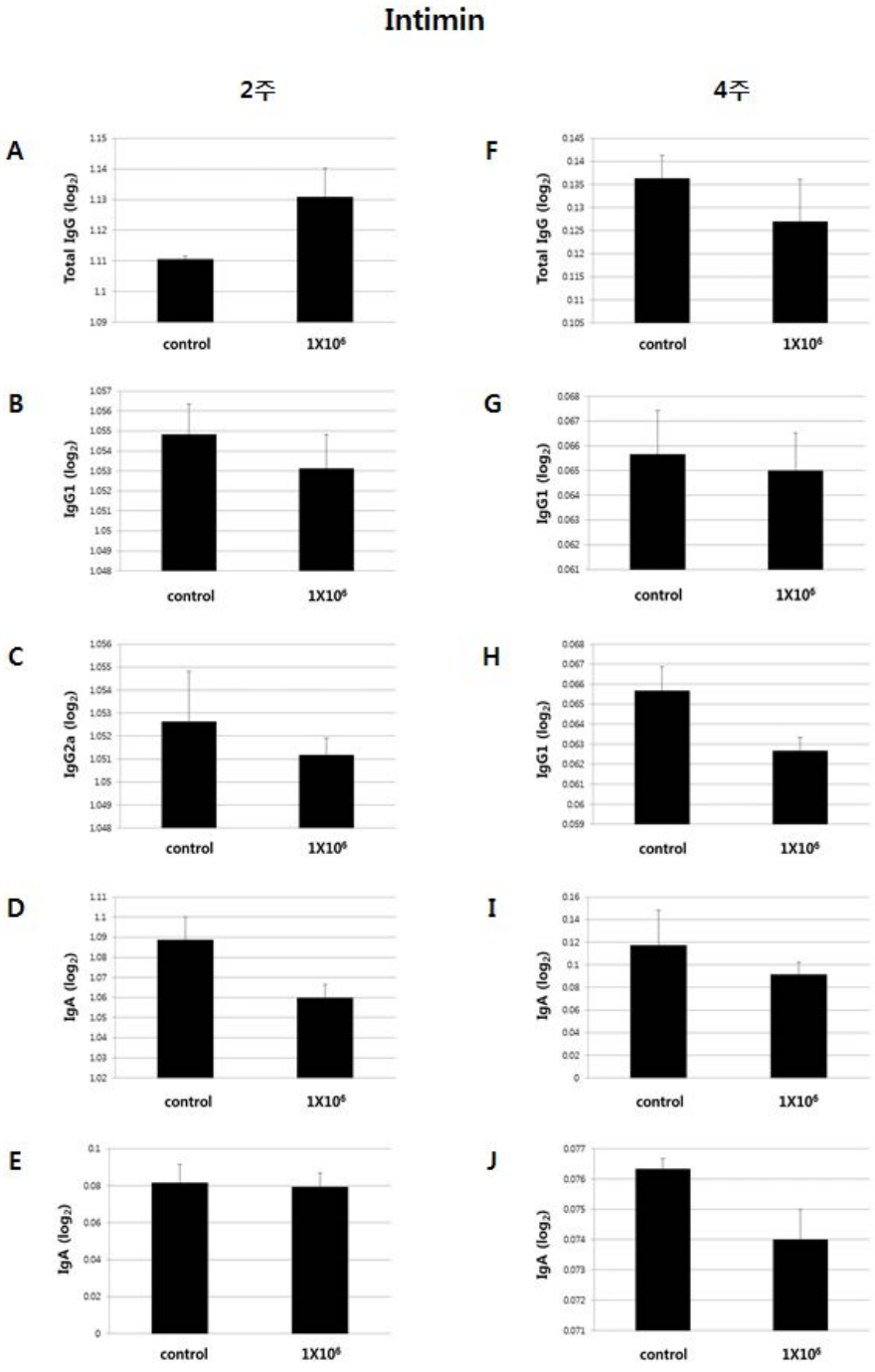


그림 20. Intimin을 운반하는 고스트화 세포를 근육 (IM)로 투여한 후 결과. 항원인 Intimin을 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG, lgG1, IgG2a는 1:5000 비율로 혈청 샘플에 처리하였고, IgA는 1:2000 비율로 분변과 질세척액에 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. A, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 2주째 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; B, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 2주째 혈청에서의 IgG1 면역유도 반응; C, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 2주째 혈청에서의 IgG2a 면역유도

반응; D, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 2주째 분변에서의 IgA 면역유도 반응; E, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 2주째 질세척액에서 IgA 면역유도 반응; F, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 4주째 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; G, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 4주째 혈청에서의 IgG1 면역유도 반응; H, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 4주째 혈청에서의 IgG2a 면역유도 반응; I, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 4주째 분변에서의 IgA 면역유도 반응; J, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 4주째 질세척액에서 IgA 면역유도 반응. X축은 고스트 세포의 농도를 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

그림 21A, B, C는 고스트 세포를 근육 (IM)으로 투여한 후 2주째, 그림 21D, E, F는 4주째 결과를 나타내었다. 그림 21A, D에서 보면 Total IgG의 면역유도 반응이 $1x10^6$이 2주째보다 4주째에 control보다 증가하였다. 그림 21B, E를 보면 IgG1의 면역유도 반응에서 $1x10^6$이 2주째보다 4주째에 control보다 증가하는 양상을 보였다. 그림 21C, F를 보면 IgG2a의 면역반응 역시 $1x10^6$이 2주째보다 4주째에 control보다 증가하는 양상을 보였다.

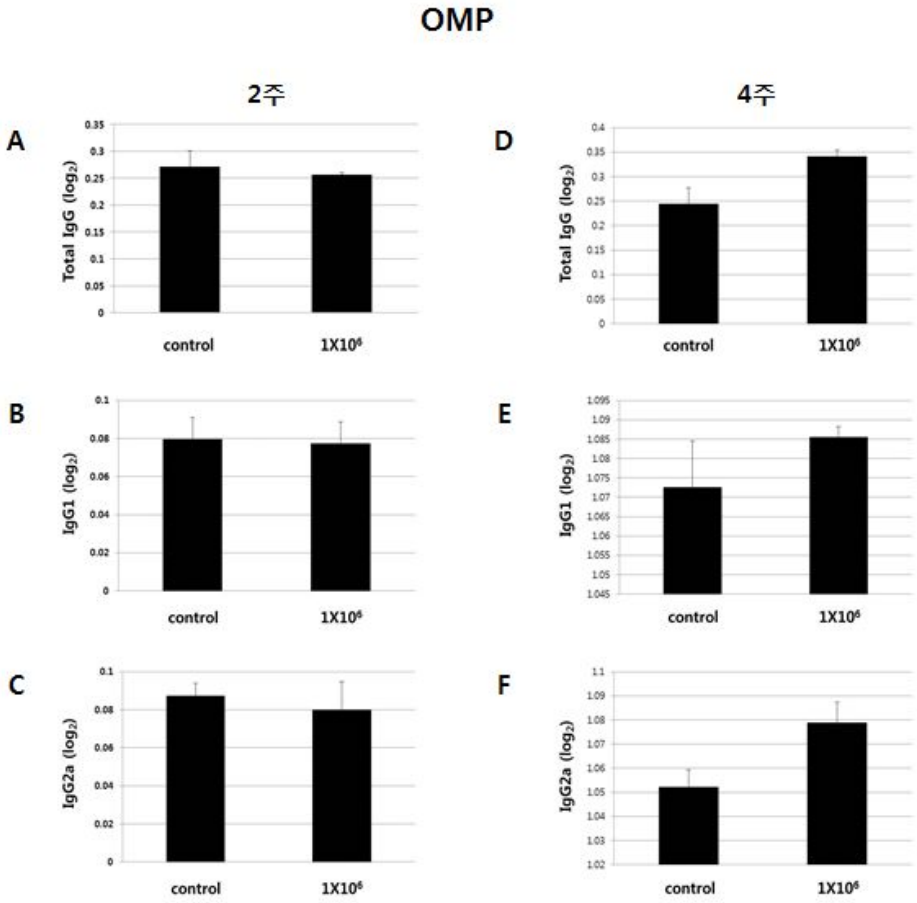


그림 21. 고스트화 세포를 경구 (Orally)로 투여한 후 OMP 항원으로 측정한 결과. 항원인 OMP를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG, lgG1, IgG2a는 1:5000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰

다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현 정도를 관찰하였다. A, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 2주째 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; B, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 2주째 혈청에서의 IgG1 면역유도 반응; C, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 2주째 혈청에서의 IgG2a 면역유도 반응; D, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 4주째 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; E, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 4주째 혈청에서의 IgG1 면역유도 반응; F, 고스트 세포를 마우스에 근육 접종 후 4주째 혈청에서의 IgG2a 면역유도 반응. X축은 고스트 세포의 농도를 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

6) Cell Proliferation Assay 측정 결과

고스트 세포를 경구로 투여 한 마우스에서 cell proliferation이 control보다 1일째에는 $1X10^8$, $1X10^9$, $1X10^{10}$에서 모두 증가되는 양상을 보였지만 특히, $1X10^{10}$이 매우 높게 증식되는 양상을 보였다 (그림 22). 2일째에는 1일째에 비교하여 증식률이 $1X10^8$, $1X10^9$에서 현저히 증가되는 양상을 보였지만 $1X10^{10}$은 1일째에 비교하여 두 배정도 감소되는 것으로 나타났다. 3일째에는 1일이나 2일에 비교하여 상대적으로 증식이 감소되는 것으로 나타났다. 그러므로 세포 증식을 관찰하기 가장 쉬운 일수는 고스트의 투여량이 낮은 농도에서도 증식률이 높게 나타나는 2일째가 가장 양호한 것으로 판단된다.

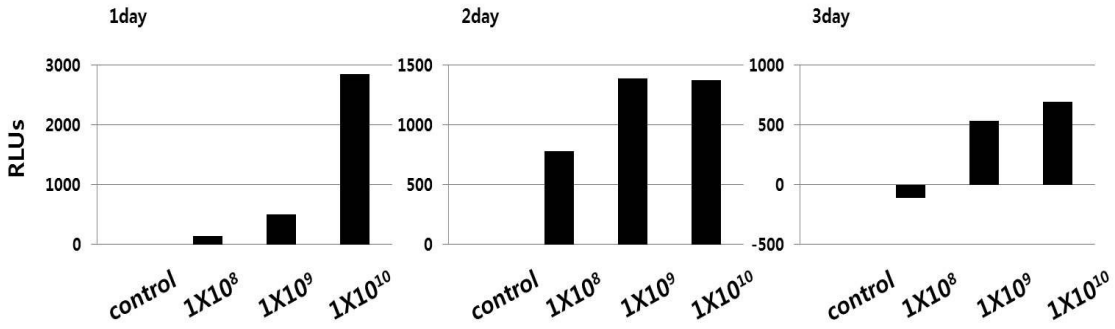


그림 22. Intimin에 대한 세포증식률 측정 결과. Intimin을 함유하는 고스트 세포를 마우스에 경구로 접종하여 5주 후에 지라를 분리하여 단일세포를 분리하였다. 분리한 단일세포에 intimin으로 자극하여 3일 동안 배양한 후 cell lysis reagent (ViaLight Plus kit, Lonza)를 이용해서 3일 동안 세포증식률 측정하였다. X축은 마우스에 투여한 고스트 세포의 농도이고, Y축은 루미노메타에 의해 측정된 루시페레이즈 활성도이다.

7) Real-time PCR을 이용한 Gene Expression 결과

고스트 세포를 처리한 마우스에서 면역반응을 관찰하기 위해 사이토카인 중에 IL-4, IL-5, IL-6, IFN-γ, TNF-α, GAPDH 등의 유전자 발현 변화에 대해 관찰하였다. 그림 23은 항

원인 intimin, FedA, FedF, F41을 처리했을 때, IL-4, IL-5, IL-6, IFN-ɣ, TNF-α을 관찰한 결과이다. 8일에는 고스트 세포가 처리된 샘플은 IL-4, IL-5, IL-6, IFN-ɣ, TNF-α 유전자들의 발현레벨이 control에 항원을 처리한 샘플보다 적게 발현되었다. 5주째에 항원인 intimin을 처리한 결과는 보면 IL-5 유전자의 발현레벨이 증가하였고 IL-6, IFN-ɣ, TNF-α는 control과 비슷하게 발현하였고 IL-4는 control보다 감소하였다. FedA의 경우에는 IL-4, IL-5, TNF-α 유전자들의 발현레벨이 조금 증가하는 양상을 보였다. FedF의 경우에서는 IL-4, IL-5, TNF-α 유전자들의 발현레벨이 증가하는 양상을 보였다. 항원인 F41을 처리한 결과는 보면, IFN-ɣ 유전자의 발현레벨이 control보다 증가하였고 IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α 유전자들의 발현레벨은 control보다 감소하는 양상을 보였다.

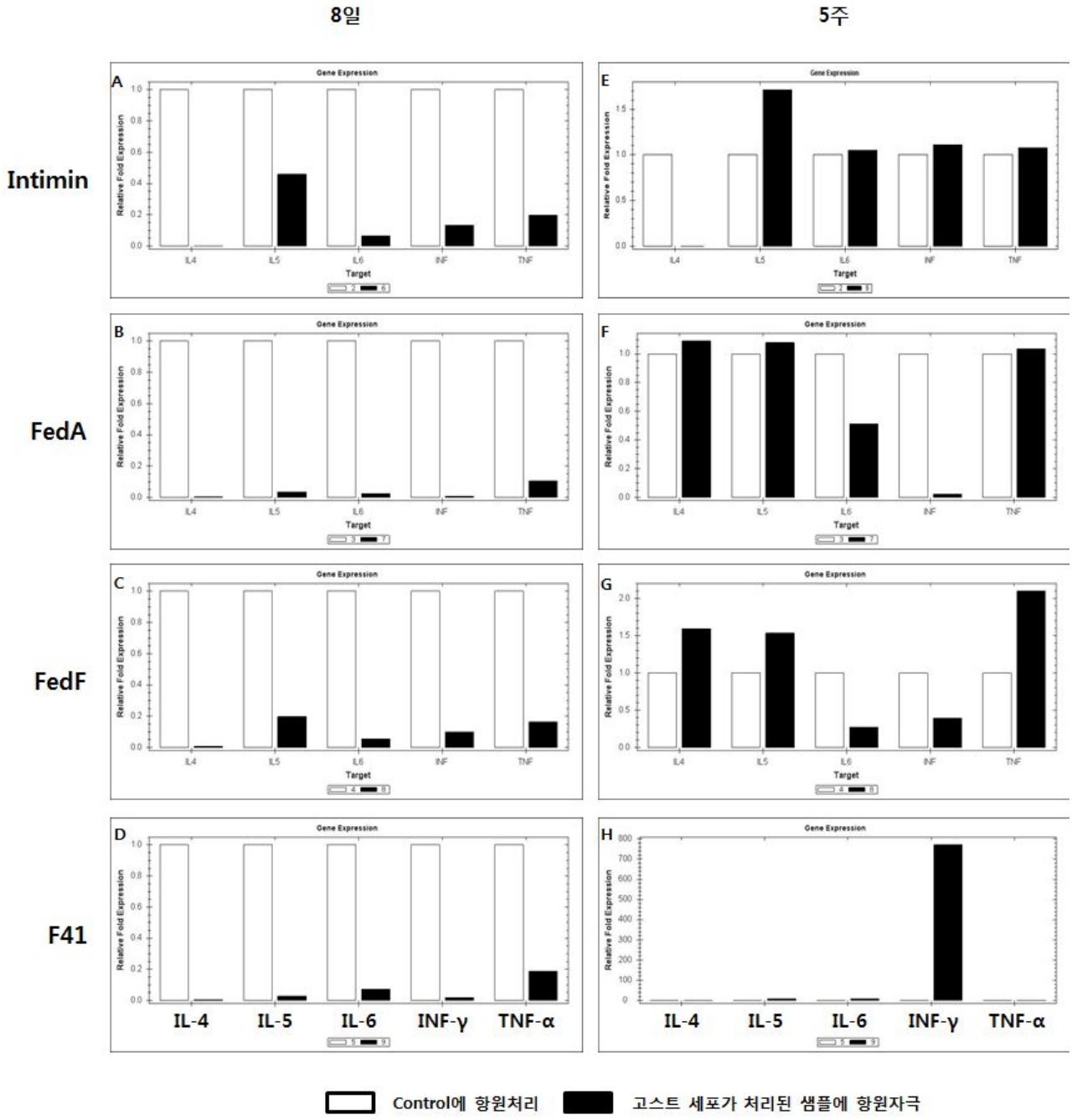


그림 23. 각 항원을 운반하는 고스트 세포를 처리한 마우스에서 사이토카인 발현의 분석. Intimin, FedA, FedF, F41을 각각 함유하는 고스트 세포를 마우스에 경구로 접종하여 8일, 5주 후에 지라를 분리하여 단일세포를 분리하였다. 분리한 단일세포에 각각 Intimin, FedA, FedF, F41으로 자극하여 3일 동안 배양한 후 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고 IL-4, IL-5, IL-6, IFN-ɣ, TNF-α, GAPDH의 유전자 발현 레벨을 관찰하였다. GAPDH는 유전자 발현 레벨의 기준으로 사용하였다. A, Intime를 자극한 후 8일 샘플; B, FedA를 자극한 후 8일 샘플; C, FedF를 자극한 후 8일 샘플; D, F41를 자극한 후 8일 샘플; E, Intime를 자극한 후 5주 샘플; F, FedA를 자극한 후 5주 샘플; G, FedF를 자극한 후 5주

샘플; H, F41를 자극한 후 5주 샘플. X축은 사이토카인 관련 유전자의 종류이고 Y축은 유전자 발현레벨을 나타내었다.

8) 개선된 고스트 시스템

고스트 시스템을 보다 온도에 안정적이고 발현이 더 많이 되는 고스트 시스템을 구축하기 위해서 개선된 고스트 시스템을 구축할 계획이다. Antigen delivery cassette와 Ghost cassette 두 개를 제작해서 개선된 고스트 시스템을 구축한다. 두 cassette가 서로 작용하여 온도에 대해서 안정성을 지니고 또한 항원의 발현을 최대한 함으로써 보다 더 나은 고스트 시스템을 구축할 수 있다. 먼저 Antigen delivery cassette를 보면 cI28::P_R 유전자가 삽입되어 진다. 그리고 ompA 또는 ssagfA를 삽입 시켜서 외부항원 점막에 부착할 수 있게 된다. 그리고 항원을 연결시켜 항생제가 없는 pYA3342 plasmid에 넣어서 Antigen delivery cassett 제작을 완성시킨다. 다음으로 Ghost cassette를 보면 E lysis 유전자와 pMMP44로부터 제한효소 NcoI/BglII를 사용해서 분리된 araC P_{araBAD}를 연결시켜서 Ghost cassette가 제작되어진다. Antigen delivery cassette의 작용기작을 보면 (그림 24B), 고스트 세포를 28℃에서 배양시키면 cI28이 활성화되고, 활성화된 cI28은 operater의 작용을 억제함으로써 Antigen의 발현을 turn off시킨다. 고스트 세포를 42℃에서 배양시키면 cI28이 비활성화되어 Antigen의 발현을 turn on 하게 된다. Ghost cassette의 작용기작을 보면 (그림 24C), 고스트 세포를 28℃에서 0.2% arabinose를 첨가하여 배양시키면 고스트 세포가 성장하게 되고 동시에 활성화된 cI28::P_R가 E lysis 유전자의 발현을 억제 시킨다. 하지만 약하게 E lysis 유전자이 발현되어지고 동시에 arabinose에 의해 작용되는 P_{araBAD}가 anti-E lysis 유전자가 발현한다. E lysis 유전자는 anti-E lysis 유전자에 의해서 억제되어 stringent E lysis 유전자의 발현을 조절하게 된다.

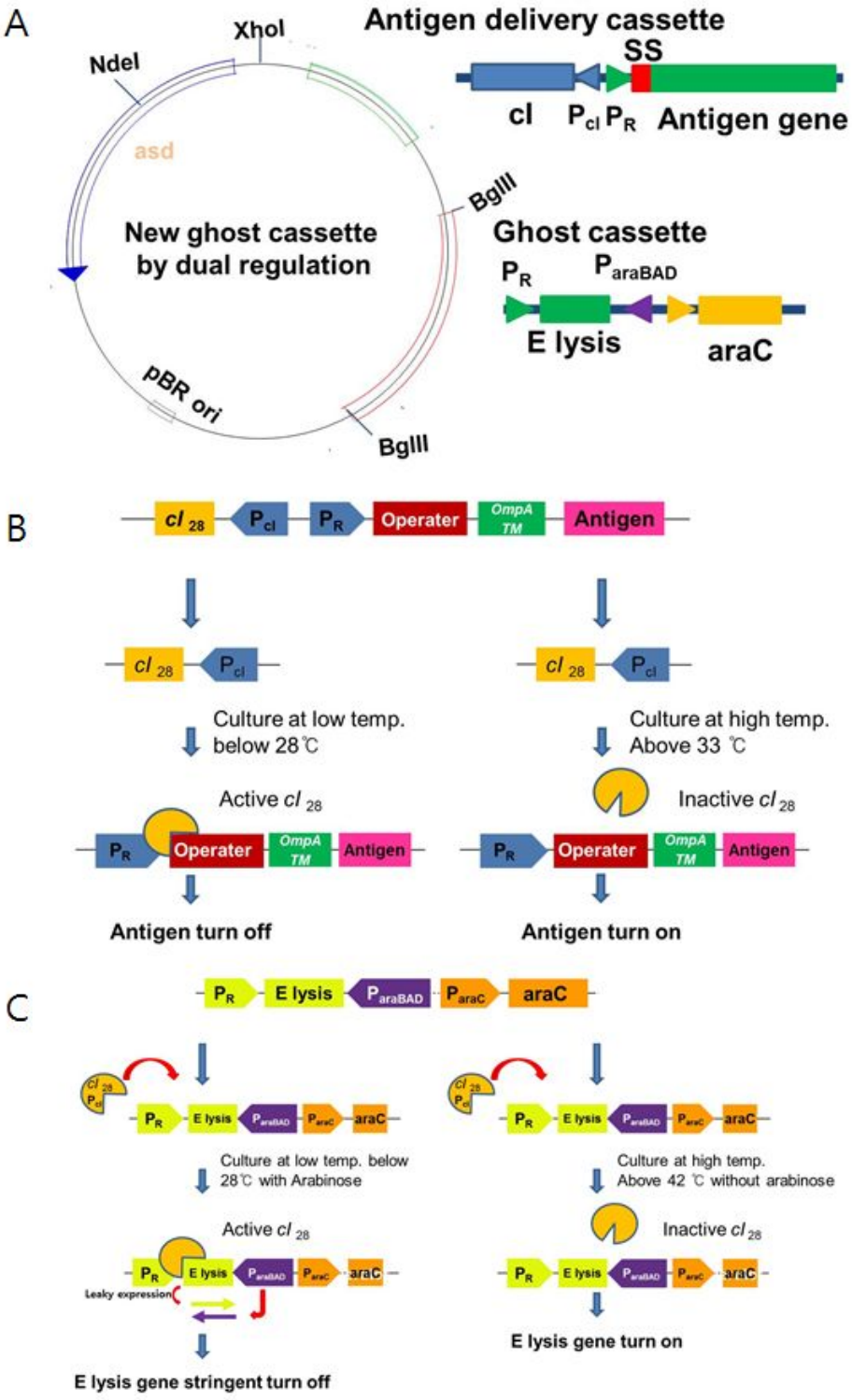


그림 24. 개선된 고스트 시스템의 모식도 및 작용기작. Vector map은 새로 개선되는 고스트 시스템이고 개선되어지는 고스트 카세트와 항원운반 카세트는 오른쪽 패널에 나타내어져 있다. 고스트 카세트는 온도 민감성 cI::P_R 시스템과 아라비노즈에 조절을 받는 안티센스 시스템에 의해서 이중으로 조절 받도록 구축 되어져 있다. 항원운반 카세트는 온도 민감성 cI::P_R에 의해서 조절되어진다. SS, ompA 시그널 염기서열; cI::P_R, 온도 민감성 프로모터와 억제자;

araC P_{araBAD}, 아라비노즈에 의해 유도되는 활성조절자. A, 개선된 고스트 시스템의 모식도; B, 개선된 Antigen delivery cassette의 작용기작; C, 개선된 Ghost cassette의 작용기작.

[2차년도]

[제1세부과제 : 전북대학교]

[5] 목적 동물에서의 백신 효능 예비 실험

5-1. 수행 방법

※ 목적동물에서의 백신의 효능 예비실험 및 백신 효능 시험을 수행함에 있어 "국가검정 동물의약품 검정기준" 중 "1-2-02-02 돼지 대장균(필러스) 불활화백신 검정기준"을 참조하여 실험을 성실히 수행하였다.

1. 실험 동물 :

1) 모돈 : 임신이 확인된 분만 9주전 모돈을 실험에 사용하였다.

2)자돈 : 각 그룹의 모돈에서 출생한 자돈을 실험에 사용하였다.

2. 백신 제조

1) 생균백신 준비

생균백신 준비를 위해서 각 항원별로 개발되어 보관중인 약독화 살모넬라균 (표 12)을 10㎖ LB Broth에 접종하여 37℃에서 200 rpm의 속도로 16시간 배양하였다. 이 배양액을 1/100 (volume)의 비율로 100㎖ LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 3 ~ 5 시간 동안 재배양하였다. 이 배양액을 4℃에서 4,000 rpm으로 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 멸균 PBS로 재부유시키는 방법으로 세척하였다. 2번 더 세척한 후 마지막 침전물은 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose) 소량으로 부유시켜 OD_{600}값을 측정하여 균수를 확인하였다. 10㎖ PBS-sucrose에 각 adhesin 발현 약독화 살모넬라균 및 LTB 발현 약독화 살모넬라균 이 각각 2.5×10^9 cfu가 되도록 혼합하여 생균백신으로 준비한 후 당일 접종하였다. 단 생균백신으로 1차 및 2차 모두를 경구로 접종할 경우에는 2차 경구 접종할 때에는 LTB 발현 약독화 살모넬라균을 제외한 생균백신을 접종하였다.

표 12. 실험에 사용된 균주와 플라스미드

Strain or plasmid	Description	Source or reference
Strains		
E. coli		
JOL416	Wild type F4 (K88ab)$^{+}$ETECisolatefrompig	This study
JOL417	Wild type F4 (K88ac)$^{+}$ETECisolatefrompig	This study
JOL412	Wild type F5 (K99)$^{+}$ETECisolatefrompig	This study
JOL415	Wild type F6 (Fas)$^{+}$ETECisolatefrompig	This study
JOL413	Wild type F41^{+}ETECisolatefrompig	This study
JOL206	Wild type intimin^{+}ETECisolatefrompig	This study
JOL489	Wild type F5^{+},F41^{+},LT^{+},stx2^{+}ETECisolatefrompig	This study
JOL564	Wild type F6^{+},stx^{+},stx2^{+}ETECisolatefrompig	This study
JOL599	Wild type F4^{+},LT^{+},STa^{+},STb^{+},EAST1^{+}ETECisolatefrompig	This study
JM109	*end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi,* *hsd*R17 (r_k^-,m_k^+), *rel*A1, *sup*E44, Δ(*lac-pro*AB), [F′ *tra*D36, *pro*AB, *laq*IqZΔM15]	Progma
BL21(DE3LysS	F$^-$,*omp*T, *hsd*S_B(r_B^-,m_B^-),*dcm, gal*, λ(DE3), pLysS, Cm^r	Progma
χ7213	*λpir thi-1 thr-1 leuB6 supE44 towA21 lacY1 recA* RP4-2 Tc::Mu *ΔasdA44*	Kim et al., 2007
JOL470	JM109 with pQE31-K88ab	This study
JOL471	JM109 with pQE9-K88ac	This study
JOL794	BL21 with pET-K99	This study
JOL945	BL21 with pET-fasA	This study
JOL796	BL21 with pET-F41	This study
JOL472	BL21 with pET-easA	This study
S. Tyhphmurium		
JOL401	Wild type isolate from chicken	This study
JOL912	*Δlon ΔcpxR Δasd,* a derivative of JOL401	Hur and Lee, 2011
JOL940	JOL912 containing pBP-K88ab	This study
JOL941	JOL912 containing pBP-K88ac	This study
JOL946	JOL912 containing pBP-K99	This study
JOL936	JOL912 containing pBP-fasA	This study
JOL947	JOL912 containing pBP-F41	This study
JOL948	JOL912 containing pBP-easA	This study
Plasmids		
pQE9	IPTG-inducible expression vector; Am^r	QIAEN
pQE31	IPTG-inducible expression vector; Am^r	QIAEN
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Km^r	Novagen
pQE31-K88ab	pQE31 derivative containing K88ab fimbrial gene	This study
pQE9-K88ac	pQE9 derivative containing K88ac fimbrial gene	This study
pET-K99	pET28a derivative containing K99 fimbrial gene	This study
pET-fasA	pET28a derivative containing *fasA*	This study
pET-F41	pET28a derivative containing F41 fimbrial gene	This study
pET-eaeA	pET28a derivative containing *eaeA*	This study
pYA3493	Asd$^+$,pBR322*ori*, β-lactamase signal sequence-based periplasmic secretion plasmid	Kim et al., 2007
pBP244	pYA3493 derivative containing *lepB, secA*, and *secB* genes	Kim et al., 2007
pBP-K88ab	pBP244 derivative containing K88ab fimbrial gene	This study
pBP-K88ac	pBP244 derivative containing K88ac fimbrial gene	This study
pBP-K99	pBP244 derivative containing K99 fimbrial gene	This study
pBP-fasA	pBP244 derivative containing *fasA*	This study
pBP-F41	pBP244 derivative containing F41 fimbrial gene	This study
pBP-eaeA	pBP244 derivative containing *easA*	This study

2) 사균백신 준비

사균백신 준비를 위해서는 상기와 같은 방법으로 약독화 살모넬라균을 준비하고 세척하였다. 마지막 세척 후 침전물을 멸균 PBS로 10^9 cfu/ml가 되도록 희석하여 포르말린의 최종농도가 1%가 되도록 첨가하였다. 실온에서 24시간 동안 반응시켜 불활화 시킨 다음 멸균 PBS로 3번 세척하였다. 이 부유액 100㎕를 Tryptic Soy Agar에 접종한 후 37℃에서 하룻밤 배양하여 균의 사멸 여부를 확인하였다. 백신균주의 불활화 여부를 확인한 후 각 약독화 살모넬라균이 2.5×10^9 cell 되도록 수산화 알미늄겔 10mg/ml에 혼합하여 사균 백신으로 준비한 다음 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. ELISA 항원 준비

병원성 대장균의 각 adhesin 항원 준비 : 시판되고 있는 kit를 이용하여 제작되어 보관중인 각 adhesin 발현 대장균을 LB agar에 접종하여 확인된 한 colony를 LB broth 200㎖에 접종하여 30℃에서 150rpm의 속도로 흔들어 주면서 하룻밤 배양하였다. 이 배양액에 IPTG의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 같은 조건으로 4시간 재배양하였다. 이 배양액을 8,000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물은 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)가 1mM이 되도록 첨가된 10㎖의 멸균 PBS로 재부유시킨 다음 -70℃에서 냉동하였다. 냉동된 부유액을 다시 37℃ water bath내에서 해동한 다음 -70℃에서 냉동하기를 2 ~ 3회 반복하였다. 마지막으로 해동한 후 부유액을 초음파처리하여 cell들을 분쇄한 다음 15,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상층액을 멸균 관에 옮겼다. 발현 단백질이 가용성일 경우에는 Buffer B (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 8.0) 4㎖를 상층액과 혼합하였고 불용성일 경우에는 6㎖의 Buffer B로 침전물을 재부유시킨 후 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이 반응액을 15,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 resin이 들어 있는 관으로 옮겨 단백질이 resin과 결합하도록 30분간 교반하였다. 이 반응액을 준비된 column에 충전시키고 천천히 흘려보냈다. 흘려보낸 이 액으로 column을 재충전한 다음 다시 천천히 흘려보냈다. 반응액을 흘려보낸 다음 Buffer C (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 6.3) 6㎖로 column을 3회 세정하여 resin과 결합하지 않은 기타 불필요한 단백질을 제거하였다. Elution buffer (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 4.5) 2㎖로 column을 충전시킨 후 20분간 반응시켜 발현 단백질을 resin으로부터 분리시킨 다음 elution buffer를 1㎖씩 첨가하여 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질을 SDS-PAGE에서 전기영동하여 발현 단백질을 확인하였으며 정량한 후 -70℃에 보관하며 ELISA 항원으로 사용하였다.

4. 모돈에 백신 접종 후 1주령 자돈에서의 도전균주에 대한 방어 여부 확인시험

(1) 예방접종 : 준비된 약독화 살모넬라 생균백신을 분만 9주 전 임신 모돈에 각각 경구접종한 후 다시 3주 후에 사균백신 1㎖을 각각의 모돈에 근육 (intramuscular; IM)으로 접종하였다. 대조군은 멸균 PBS로 위와 같은 방법으로 각각 접종하였다.

(2) 도전감염 : 예방접종 된 모돈에서 출생한 자돈이 1주령이 된 시점에 국내 돼지에서 발생빈도가 높은 4종의 병원성 대장균 혈청형 (F4, F5, F6, F41)을 섞어 경구 감염시킨 후 설사 유무로 방어 여부를 결정하였다 (표 13).

표 13. 예비실험 1 - 모돈에 백신접종 및 1주령 자돈에 도전감염 후 방어 여부 확인 예비실험 개요

그룹	접종 두수	예방접종		도전감염
		모돈		자돈
		분만 9주전	분만 6주전	1주령
예비실험군 1	3	경구접종 생균백신	근육접종 사균백신	F4, F5, F6, F41 발현 야외 균주가 각각 1×10^8 cfu가 되도록 혼합하여 경구접종
대조군	3	PBS	PBS	

(3) 가검물 채취 및 항체역가 측정

1) 모돈에서의 채혈 : 각 Group 별로 백신 접종 전 (0주), 1차 접종 후 3주 (2차 접종 전; 3주), 2차 접종 후 3주 (6주)그리고 분만 시점 (9주)에 각각 채혈하여 혈청을 분리하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

2) 초유 채취 : 각 그룹별로 분만하고 있는 동안에 초유를 채취하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

3) ELISA : 돼지 혈청 및 초유에서 각 접종 항원에 대한 serum IgG, mucosal IgG 및 sIgA를 측정하였다. 즉, 혈청 및 초유에서 각 항원에 특이한 항체역가를 측정하기 위해 sample well에는 정제된 항원 단백질을 100ng/well~500ng/well의 농도로, standard well에는 goat anti-pig IgG 또는 goat anti-pig IgA를 각각 10ng/well, 100ng/well의 농도로 분주한 후 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켜 coating 하였다. Plate는 PBS-Tween 20 (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (1% bovine serum albumin을 함유한 phosphate-buffered saline, pH7.4)로

blocking 하였다. Serum 및 초유 sample은 blocking buffer로 1:10부터 1: 1,280까지 단계 희석하여 100㎕씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. Peroxidase-conjugated goat anti-pig IgG HRP 또는 peroxidase-conjugated goat anti-pig IgA HRP를 1:100,000의 배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색시킨 후 3M H_2SO_4로 반응을 정지시켜 492nm에서 OD값을 측정하였다. 각 항원에 특이한 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정되었다.

5. 모돈 및 자돈에 백신 접종 후 5주령 자돈에서의 도전균주에 대한 방어 여부 확인 시험

(1) 예방접종 :

① 모돈 : 준비된 생균백신을 분만 9주 전 각 모돈에 경구접종한 후 다시 3주 후에 사균백신 1㎖을 각각의 모돈에 근육 접종하였다. 대조군은 멸균 PBS로 위와 같은 방법으로 각각 접종하였다.

② 자돈 : 백신이 투여된 모돈에서 출생한 자돈이 1주령이 되었을 때 사균백신을 1㎖씩 근육으로 접종하고 4주령일 때 (이유를 시작하는 날) 생균백신을 2㎖씩 경구접종하였다. 대조군에서 출생한 자돈은 멸균 PBS로 위와 같은 방법으로 각각 접종하였다.

(2) 도전감염 : 이유한 지 1주일이 지난 후 이유 자돈를 반으로 나눠 한 군에는 발생빈도가 높은 2종의 병원성 대장균 혈청형 (F4, F18)으로 경구 감염시킨 후 설사 유무로 방어 여부를 확인하여 도전 균주에 대한 방어 여부를 결정하였다 (표 14).

표 14. 예비실험 2 - 모돈 및 자돈에서의 백신접종 및 5주령 자돈에서 도전감염 후 설사 여부에 따른 백신 효능 예비실험 개요

그룹	접종두수	예방접종				도전감염
		모돈		자돈		자돈
		분만 9주전	분만 6주전	1주령	4주령	5주령
예비실험군 2	3	경구접종 생균백신	근육접종 사균백신	근육접종 사균백신	경구접종 생균백신	F4와 F18 발현 야외 균주가 각각 1×10^9 cfu가 되도록 혼합하여 경구접종
대조군	3	PBS	PBS	-	-	

(3) 가검물 채취 및 항체역가 측정

1) 자돈에서의 채혈 : 자돈이 5주령이 되었을 때 도전감염 전에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

2) ELISA : 자돈 혈청에서 K88ab, K88ac, FedA 및 FedF에 대한 serum IgG를 위의 ELISA와 동일한 방법으로 측정하였다.

5-2. 결과

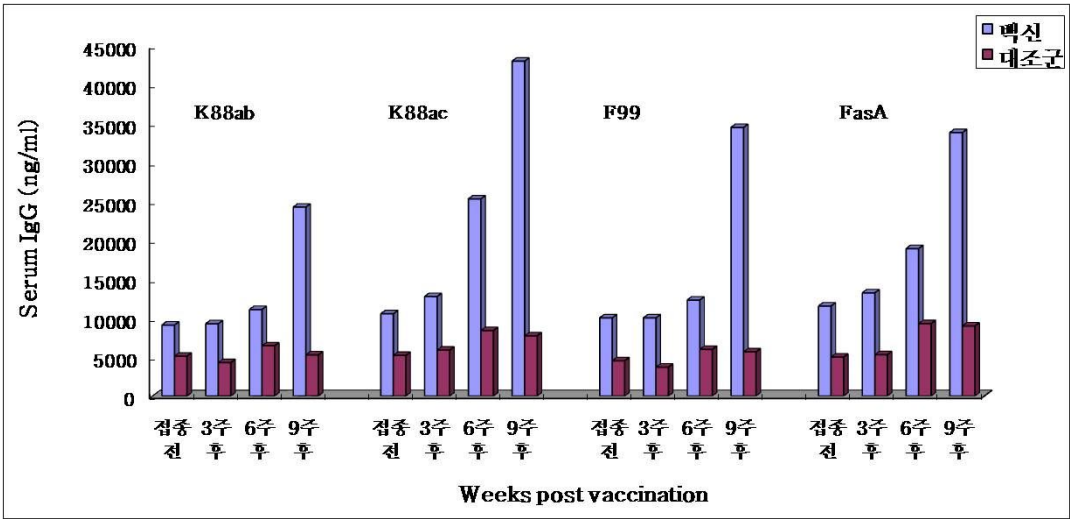
1. 모돈에 백신 접종 후 1주령 자돈에서의 도전균주에 대한 방어 여부 확인시험

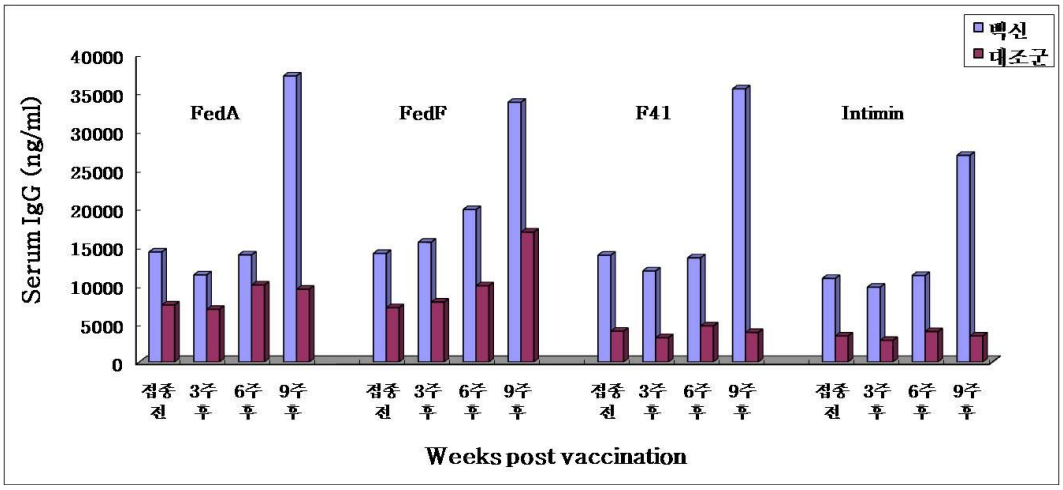
(1) ELISA를 이용한 면역 항체 역가

1) 모돈 혈청에서의 면역 항체 역가

① 대장균의 각 부착인자 항원에 대한 항체 역가

대장균의 각 부착인자 항원에 대한 항체는 모든 항원에 있어 2차 접종 후 3주 (1차 접종 후 6주)까지 뚜렷한 항체증가가 관찰되지 않았다. 하지만 분만시에 IgG 항체가 대조군에 비해 월등히 증가되는 것이 관찰되었다.

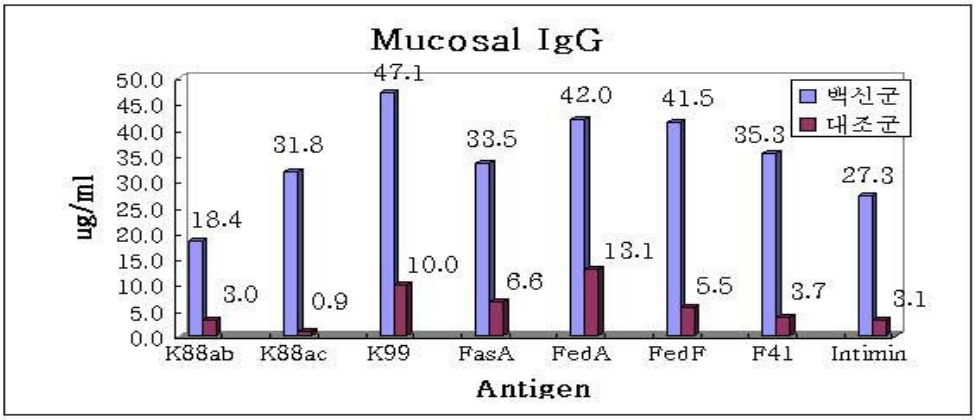




2) 초유에서의 면역 항체 역가

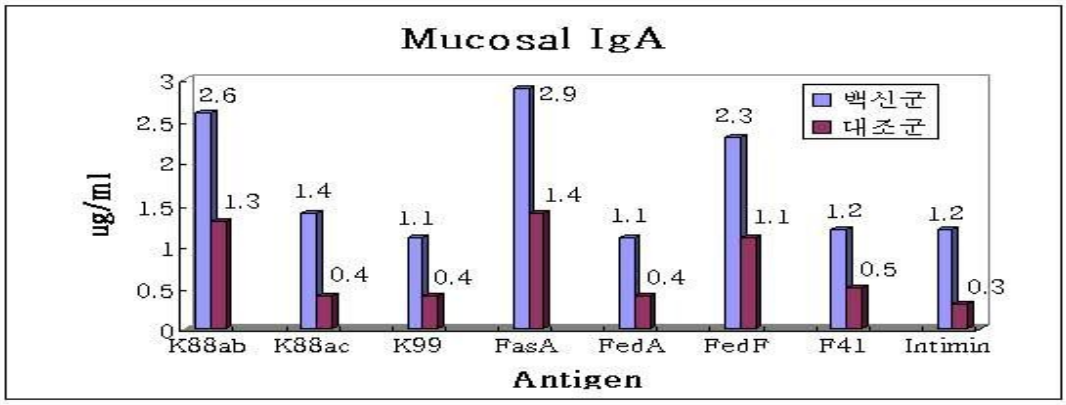
① 초유에서의 mucosal IgG

모든 대장균의 각 부착인자 항원에 대해 백신 접종 모돈에서 대조군보다 월등히 높은 항체 역가가 관찰되었다.



2) 초유에서의 sIgA

모든 대장균의 각 adhesin 항원에 대해 백신 접종 모돈에서 대조군보다 월등히 높은 항체 역가가 유도됨을 확인할 수 있다.



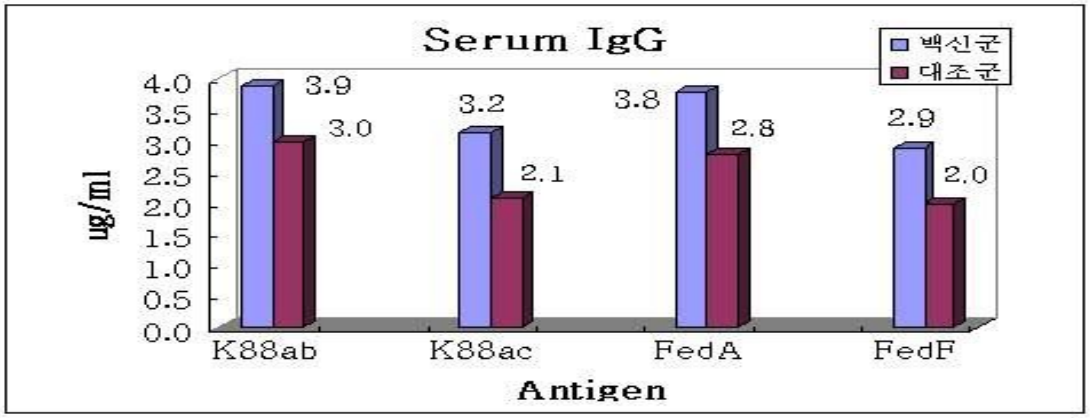
3) 1주령 자돈에서 도전감염 후 방어 능력

1주령 자돈에서 주로 문제가 되는 대장균 혈청형 F4, F5, F6, F41을 동량 혼합하여 경구 감염시킨 후 설사여부를 확인하여 보았다. 그 결과 모돈에 백신을 접종한 후 출생한 자돈에서는 설사가 관찰되지 않았다. 그렇지만 백신을 접종하지 않은 모돈에서 출생한 자돈은 도전감염 후 3일째에 심한 설사가 관찰되어 항생제 치료를 받았다 (표 15).

2. 모돈 및 자돈에 백신 접종 후 5주령 자돈에서의 도전균주에 대한 방어 여부 확인 시험

(1) ELISA를 이용한 자돈에서의 면역 항체 역가

대조군에 비해 항체 역가가 대체로 높았다. 대조군 또한 이번 실험 기간을 제외하고 시판되는 대장균 백신을 계속적으로 투여한 경우로 challenge 시점까지 높은 항체 역가를 보유할 가능성이 있다고 생각되었다. 따라서 다음 실험에서는 대장균 백신을 전혀 투여하지 않은 모돈에서 출생한 이유 자돈에서의 실험이 필요하다고 생각되었다.



(2) 이유 자돈에서의 도전감염 후 방어 시험

이유 7일 후 (5주령) 이유자돈에서 문제가 되는 대장균 혈청형 F4와 F18을 동량 혼합하여 경구 감염시킨 군에서의 도전감염 후 설사 유무를 확인하여 보았다. 그 결과 자돈에 백신을 투여한 군 모두에서는 설사를 관찰할 수 없었다. 하지만 백신을 투여하지 않은 군에서는 대장균에 의한 약한 설사가 관찰되었고 설사 분변에서 접종 균을 분리 동정할 수 있었다 (표 15).

표 15. 예비실험 자돈에서 도전감염한 후 병원성 대장균에 대한 방어 효과

그룹		도전감염 두수	설사 두수	설사 정도	균 분리 현황	기타
예비실험군 1	대장균 접종 (F4, F5, F6, F41 접종)	4	0	-	-	
대조군	대장균 접종 (F4, F5, F6, F41 접종)	5	5	상	모두 F4 분리	항생제 치료
예비실험군 2	대장균 (F4, F18 접종)	4	0	-	-	
대조군	대장균 (F4, F18 접종)	3	3	하	F4, F18 분리	항생제 치료

[6] 목적동물에서의 접종 경로별 백신의 효능 시험

6-1. 수행 방법

1. 실험동물 :

(1) 모돈 : 임신이 확인된 분만 8주 전 모돈을 실험에 사용하였다.

(2) 자돈 : 각 그룹의 모돈에서 출생한 자돈을 실험에 사용하였다.

2. 백신제조 : 실험 5]에서 준비한 과정과 동일한 방법으로 생균 및 사균을 준비하여 실험에 사용하였다.

3. 모돈 예방접종 : 준비된 약독화 살모넬라 생균 및 사균 백신을 분만 8주 및 5주전에 표 4에서 설명한 방법에 따라 각각 예방접종하였다. 대조군은 PBS-sucrose (경구접종)로 경구 접종하였다 (표 16).

4. 도전감염 : 예방 접종된 모돈에서 출생한 자돈이 1주령이 된 시점에 국내 돼지에서 발생빈도가 높은 병원성 대장균 (F4, F5, F6, F41)으로 경구 감염시킨 후 설사 유무로 방어 여부를 측정하였다 (표 16).

표 16. 모돈에서 접종 경로별 백신접종 및 자돈에서의 도전감염 실험 개요

그룹	접종 두수	예방접종		도전감염
		모돈		자돈
		분만 8주전	분만 5주전	1주령
A	3	근육접종 사균백신	경구접종 생균백신	F4, F5, F6, F41 발현 병원성 대장균을 각각 1×10^9 cfu가 되도록 혼합하여 경구접종
B	3	경구접종 생균백신	경구접종 생균백신	
C	3	경구접종 생균백신	근육접종 사균백신	
D	3	20% sucrose	20% sucrose	

5. 가검물 채취 및 항체역가 측정

(1) 모돈에서의 채혈 : 각 그룹 별로 백신 접종 전 (0주), 1차 접종 후 3주 (2차 접종 전; 3주), 2차 접종 후 2주 (5주) 그리고 분만 시점 (8주)에 각각 채혈하여 혈청을 분리하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

(2) 초유 채취 : 각 그룹 별로 분만하고 있는 동안에 초유를 채취하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

(3) 자돈에서의 채혈 : 자돈이 1주령이 되었을 때 도전감염 전에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

(4) ELISA : 모돈 초유에서 각 접종 항원에 대한 mucosal IgG 및 sIgA를 측정하였고 모돈 및 자돈의 혈청에서 각 항원에 대한 특이 serum IgG 및 IgA를 실험 5]에서와 같은 방법으로 각각 측정하였다.

6-2, 결과

1. 면역 항체 역가 측정

(1) 모돈 혈청에서의 항체 역가

백신 접종군 (Group A, B, C) 모두에서 각 adhesin에 대한 특이 serum IgG는 백신을 1차 접종한 3주 후부터 증가하기 시작하여 대다수의 adhesin (K88ac와 F41 제외)에 대한 항체 역가는 분만시점에 최고의 역가가 관찰되었다 (그림 25). Serum IgA의 경우에는 모든 adhesin에서 백신 접종 후 분만 시점에 높은 항체 역가 유도되었다. 하지만 대조군에서의 serum IgG 및 IgA 항체 역가는 접종 전부터 분만시점까지 모든 adhesin에 대해 거의 변화가 없었다 (그림 26).

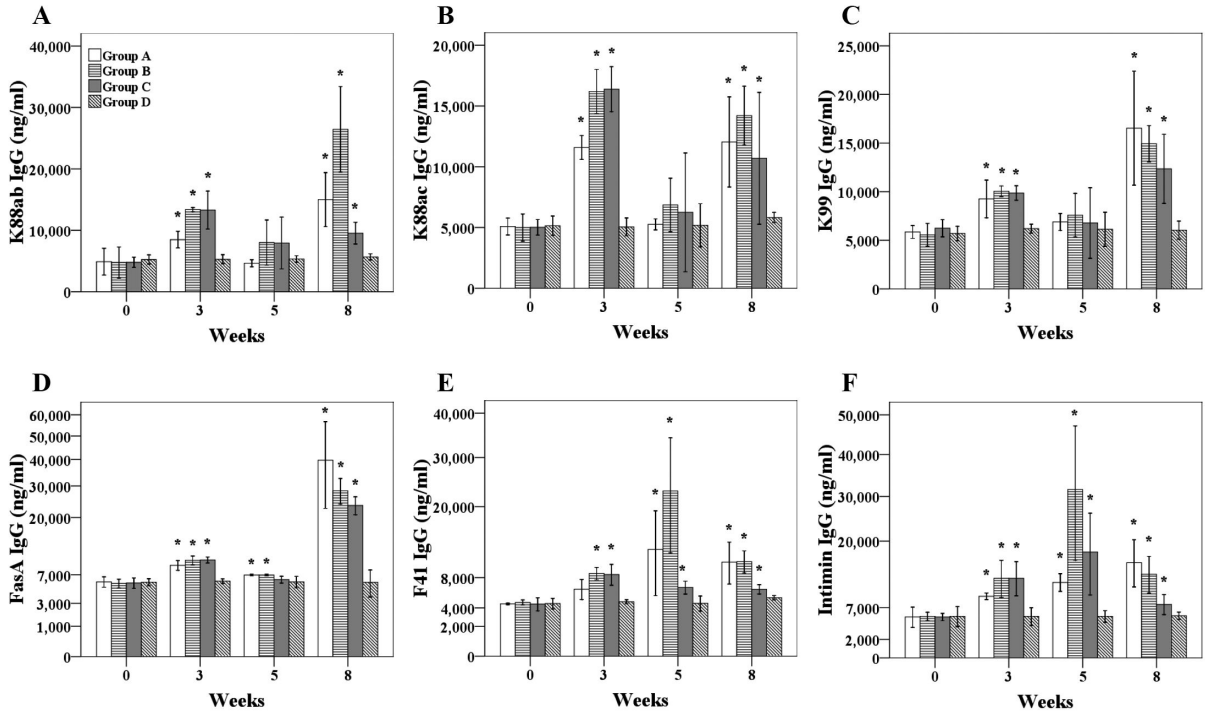


그림 25. Serum IgG to K88ab, K88ac, K99, FasA, F41 and intimin adhesin antigens in sows immunized with the polyvalent vaccine candidates express and secrete each adhesin antigen by various routes. (A), K88ab-specific IgG; (B), K88ac-specific IgG; (C), K99-specific IgG; (D), FasA-specific IgG; (E), F41-specific IgG and (F), intimin-specific IgG. Group A sows (□) were intramuscularly primed and orally boosted. Group B sows (目) were orally primed and boosted. Group C sows (■) were orally primed and intramuscularly boosted. Group D sows (▨) were administered with PBS as a control. Data are the mean of all sows in each group; error bars show standard deviation. Asterisks indicate significant difference between the values of immunized groups with the vaccine candidate ($^{*}P \leq 0.05$) and those of the control group.

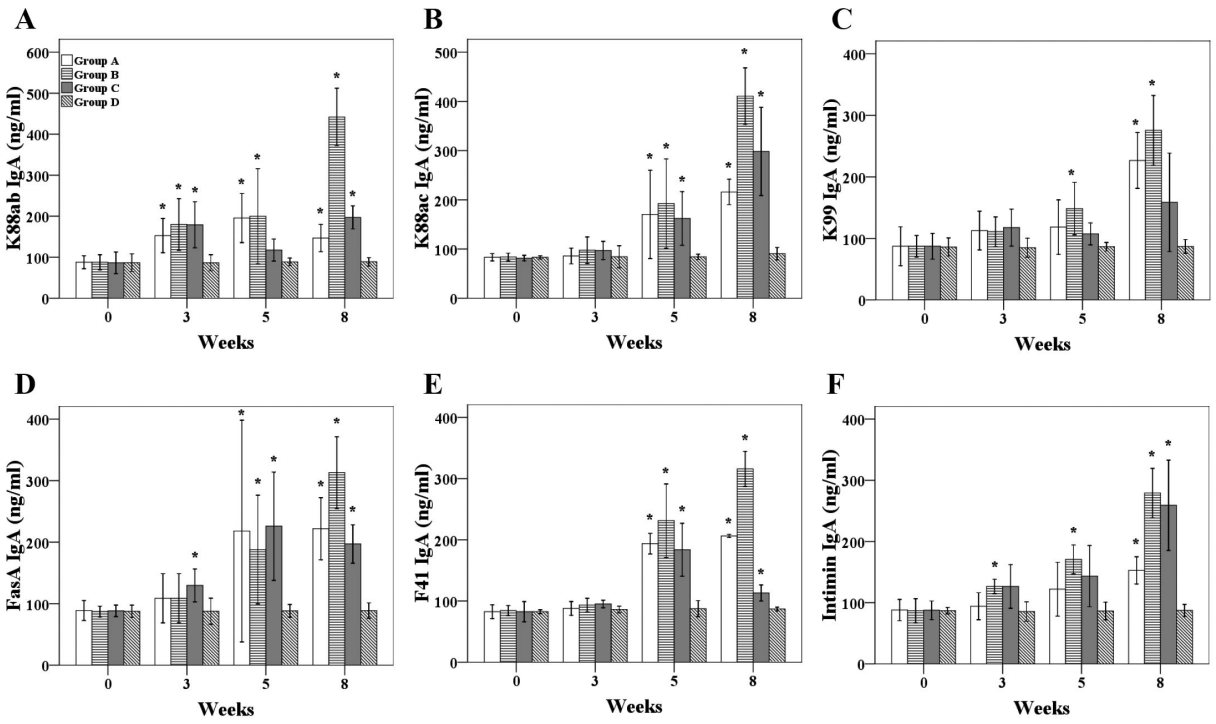


그림 26. Serum IgA to K88ab, K88ac, K99, FasA, F41 and intimin adhesin antigens in sows immunized with the polyvalent vaccine candidates express and secrete each adhesin by various routes. (A), K88ab-specific IgA; (B), K88ac-specific IgA; (C), K99-specific IgA; (D), FasA-specific IgA; (E), F41-specific IgA and (F), intimin-specific IgA. Group A sows (□) were intramuscularly primed and orally boosted. Group B sows (目) were orally primed and boosted. Group C sows (■) were orally primed and intramuscularly boosted. Group D sows (▨) received PBS controls. Data are the mean of all sows in each group; error bars show SD. Asterisks indicate significant difference between the values of immunized groups with the vaccine candidate ($^{*}P \leq 0.05$) and those of the control group.

(2) 초유에서의 항체 역가 측정

초유에서 mucosal IgG의 경우 백신 접종군 (Group A, B, C)의 mucosal IgG는 대조군 (Group D)에 비해 최소 1.3배 이상의 항체 역가가 관찰되었고, sIgA의 경우에는 백신 접종군이 대조군에 비해 최소 1.4배 이상의 항체 역가가 관찰되었다. 특히 1차와 2차 모두 경구로 접종한 Group B에서 전신 및 점막에서의 항체 역가가 Group A와 C에서의 항체 역가 보다 높거나 같은 수준으로 관찰되었다 (그림 27).

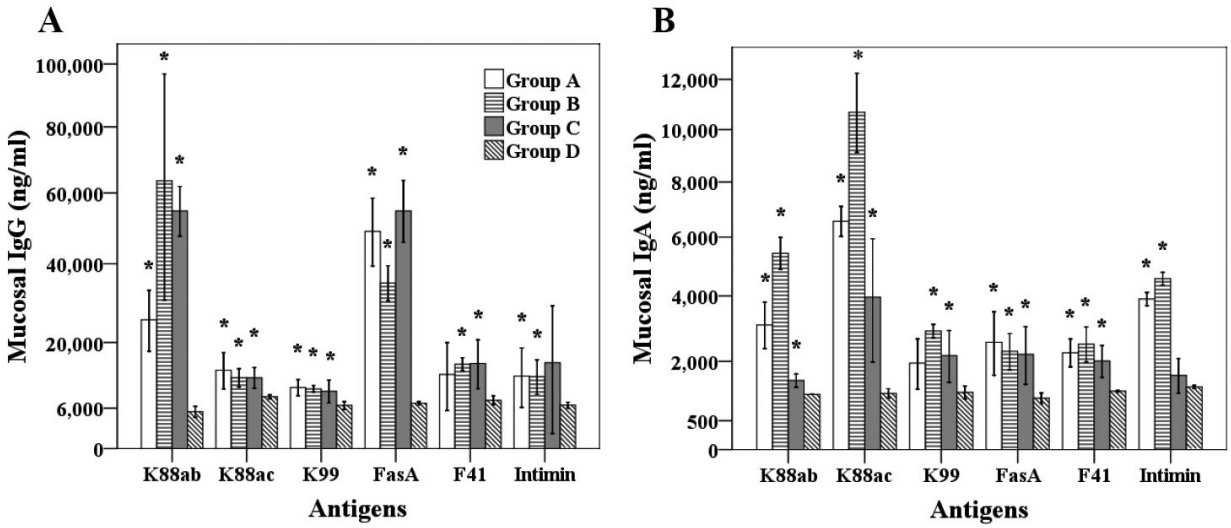


그림 27. Colostrum immune responses to K88ab, K88ac, K99, FasA, F41 and intimin adhesin antigens in sows immunized with the polyvalent vaccine candidates express and secrete each adhesin by various routes. (A), Colostrum IgG to each adhesin antigen and (B), colostrum sIgA to each adhesin antigen. Data are the mean of all sows in each group; error bars show SD. Asterisks indicate significant difference between the values of immunized groups with the vaccine candidate ($^{*}P \leq 0.05$) and those of the control group.

(3) 1주령 자돈의 혈청에서의 면역반응

그림 28에서 보는 바와 같이 백신 접종된 모든 그룹의 신생자돈으로의 serum IgG 및 IgA의 항체 역가는 대조군에서보다 통계학적으로 유의 있게 높았다. 특히, serum IgA는 대조군에 비해 최소 2.2배 이상 증가한 결과가 관찰되었다.

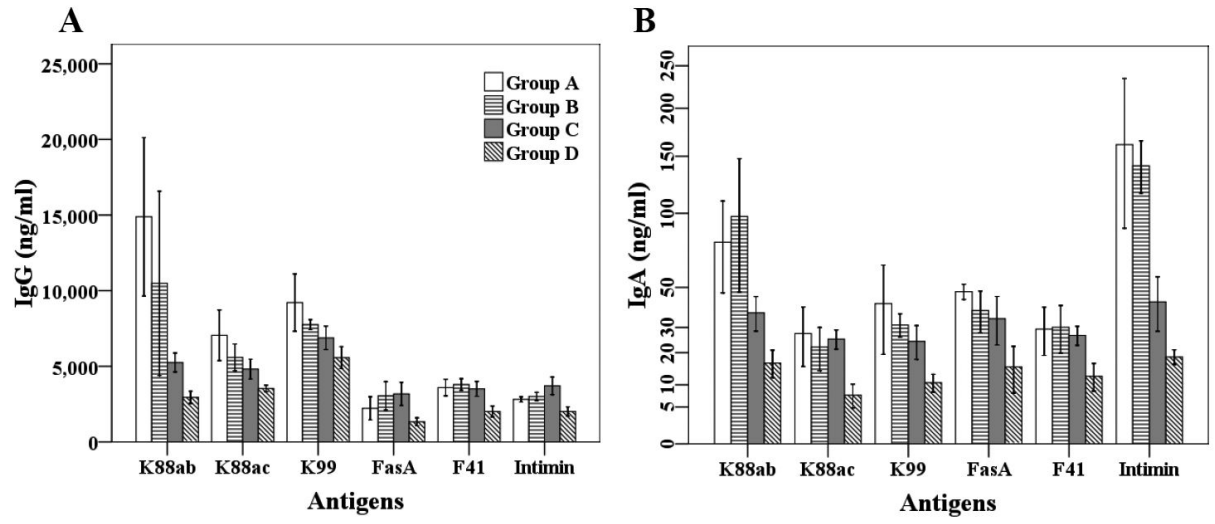


그림 28. Immune responses to K88ab, K88ac, K99, FasA, F41 and intimin adhesin

antigens in suckling piglets from each group of sows immunized with the polyvalent vaccine candidates express and secrete each adhesin by various routes. (A), Serum IgG to each adhesin antigen and (B), Serum IgA to each adhesin antigen. Data are the mean of all sucking piglets in each group; error bars show SD. Asterisks are not marked because serum IgG and IgA levels in all suckling piglets of immunized sows are significantly higher than those in suckling piglets of control group sows ($P < 0.01$).

2. 1주령 자돈에 도전감염 후 방어 시험

모돈에 분만 8주와 5주 전에 각각 예방접종한 후 출생한 자돈이 1주령이 되었을 때 병원성 대장균 야외분리주로 경구 감염시켜 폐사 및 설사 유무를 확인하여 백신의 효능을 비교하여 보았다. Group A (1차는 사균백신을 근육으로, 2차는 생균백신을 경구로 예방접종한 군)의 자돈에 병원성 대장균으로 도전감염 한 9두와 살모넬라균으로 도전감염 한 5두 모두에서 폐사뿐만 아니라 설사도 관찰되지 않았다. Group B (1차와 2차 모두 생균백신을 경구로 예방접종한 군)의 자돈 또한 병원성 대장균으로 도전감염 한 7두와 살모넬라균으로 도전감염 한 7두 모두에서 폐사 및 설사가 관찰되지 않았다. 하지만 Group C (1차는 생균백신을 경구로, 2차는 사균백신을 근육으로 예방접종한 군)는 병원성 대장균으로 도전감염 한 8두 중 1두에서, 살모넬라균으로 도전감염 한 12두 중 4두에서 각각 설사가 관찰되었다. 그리고 대조군인 Group D는 병원성 대장균으로 도전감염 한 자돈 20두 중 5두가 폐사하였고 15두는 심한 설사가 관찰되었을 뿐만 아니라 살모넬라균으로 도전감염 한 6두 모두에서 심한 설사가 관찰되었다. 설사하는 자돈의 분변으로부터 균 분리 및 동정을 수행하여 도전감염 시킨 야외 분리균주가 각각 분리되었다 (표 17).

표 17. 다양한 경로로 예방접종 된 모돈에서 출생한 자돈에서의 challenge 후 병원성 대장균에 대한 방어 효과

Sow group[a]	Piglets number	Diarrhea (%)	Dead (%)
A	9	0	0
B	7	0	0
C	8	0	0
D	20	20 (100%)	5 (25%)

Clinical signs in suckling piglets from each group sows after challenge with 4 virulent strains.

[a] The sows of group A were intramuscularly primed and boosted orally, group B were both primed and boosted by the oral route, group C were orally primed and boosted intramuscularly, and group D were administered with PBS as the control.

[7] 자돈에서의 백신 효능 시험

7-1. 수행방법

1. 실험 동물 :

(1) 모돈 : 임신이 확인된 분만 8주 전 모돈

(2) 자돈 : 각 백신 접종 그룹의 모돈에서 출생한 자돈

2. 백신 제조 : 위 실험 5]의 백신 제조 과정과 동일한 방법으로 백신을 제조하여 실험에 사용

3. 예방접종

① 모돈 : 생균백신을 분만 8주 및 5주 전 각각 모돈에 경구 접종하였다. 대조군은 멸균 PBS-sucrose로 위와 같은 방법으로 각각 접종하였다.

② 자돈 :

a. Group E : 백신을 접종한 모돈에서 출생한 자돈이 2주령이 되었을 때 사균백신을 근육으로 1㎖씩 접종하였다. 대조군 (Group F)에서 출생한 자돈은 멸균 PBS로 위와 같은 방법으로 각각 접종하였다.

4. 도전감염 :

① 병원성 대장균으로의 도전감염 : Group E와 F의 자돈이 5주령이 되었을 대 병원성 대장균 (F4, F5, F6, F18, F41)을 동량씩 섞어 혼합한 후 경구 감염시킨 후 설사 유무로 방어 여부를 확인하여 백신의 효과를 측정하였다 (표 18).

표 18. 모돈 및 자돈에서의 백신접종 및 자돈에서의 도전감염 실험 개요

그룹	접종 두수	예방접종			도전감염
		모돈		자돈	자돈
		분만 예정일 8주전	분만 예정일 5주전	2주령	5주령
E	6	경구접종 생균백신	경구접종 생균백신	근육접종 사균백신	F4, F5, F6, F18, F41 발현 야외 병원성 대장균이 각각 1×10^9 cfu가 되도록 혼합하여 경구접종
F	16	20% sucrose	20% sucrose	멸균 PBS	

5. 가검물 채취 및 항체역가 측정

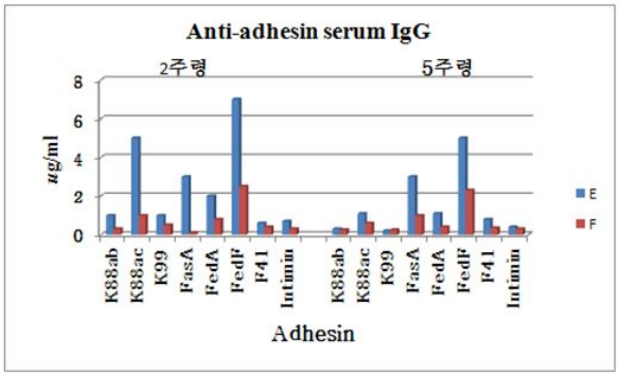
(1) 자돈에서의 채혈 : 자돈이 2주령 (접종 전), 5주령 (도전감염 전) 째에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

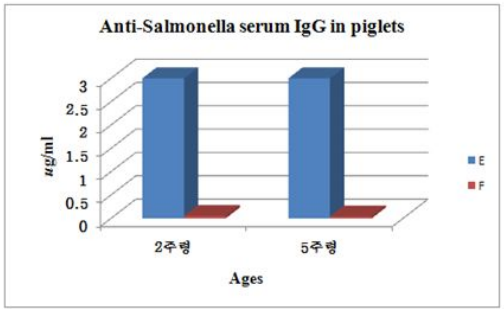
(2) ELISA : 자돈의 혈청에서 각 항원에 대한 특이 serum IgG와 *S.* Typhimurium의 LPS에 대한 serum IgG 및 IgA를 각각 측정하였다. 측정 방법은 실험 5]의 ELISA에서와 같은 방법으로 측정하였다.

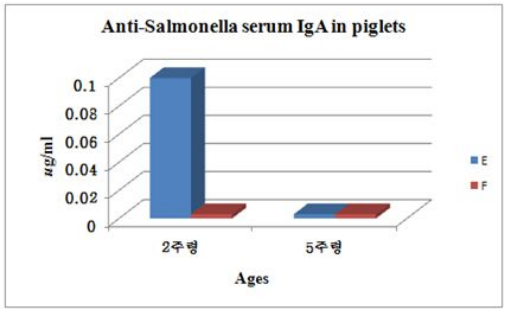
7-2. 결과

1. 자돈 혈청에서의 항체 역가

Group E (분만 8주와 5주 전 모돈에 생균백신을 1차와 2차 모두 경구로 예방접종하고 출생한 자돈이 2주령일 때 사균백신을 근육으로 예방접종한 군)의 경우 생후 2주령에서 모든 adhesin 항원에 대한 serum IgG는 Group F에 비해 최소 1.5배(F41)에서 최고 30배 (FasA) 높은 항체 역가가 관찰되었다. 생후 5주령에서의 serum IgG는 K99을 제외한 다른 모든 adhesin에 대해 Group F에 비해 최소 1.2배 (K88ab)에서 약 3배 (FedA) 이상의 항체 역가가 관찰되었다. 그리고 FasA와 F41을 제외한 나머지 adhesin에 대한 IgG는 2주령에 비해 대체로 5주령일 때에 감소하는 경향을 보였다.







2. 5주령 자돈에 야외 독성 균주를 혼합하여 도전감염 후 방어 여부 확인 시험

자돈에 예방접종을 한 다음 도전감염 후의 임상증상을 보면 Group E 및 Group F의 자돈 모두에서 폐사는 관찰되지 않았다. 하지만 Group E는 병원성 대장균으로 도전감염 한 후 이들 균에 의한 설사가 관찰되지 않았다. 하지만 Group F는 병원성 대장균으로 도전감염 한 16두 중 7두에서 설사가 관찰되었고 도전감염 한 균도 각각 분리되었다. 이상의 결과로 자돈에서의 예방접종 또한 모돈에서와 마찬가지로 탁월한 면역반응 유도와 더불어 병원성 대장균에 대한 우수한 방어 효과를 확인할 수 있었다 (표 19).

표 19. 예방접종 된 자돈에서 도전감염 한 후 병원성 대장균에 대한 방어 효과

그룹	접종두수	도전감염	임상증상		설사 분변에서의 균 분리
		자돈	폐사	설사	
		5주령			
E	6	F4, F5, F6, F18, F41 발현 병원성 대장균을 각각 1×10^9 cfu로 경구접종	0	0	-
F	16		0	7	병원성대장균

7-3. 결론

실험동물인 마우스에서의 실험결과를 토대로 금번에는 목적동물인 돼지에 다양한 경로로 예방접종을 실시한 후 모돈에서의 항체 형성 여부와 자돈에서의 야외주에 대한 방어 능력 여부를 확인하였다. 다양한 경로로 모돈에 예방접종한 후 모돈에서 각 대장균 adhesin 항원에 대한 항체 유도를 ELISA로 확인하여 본 결과 접종 전에 비해 각 대장균 항원에 대해 항체가

유도됨을 확인할 수 있었다. 특히 1차 및 2차 모두를 생균백신으로 경구접종한 경우에 다른 접종방법에 비해 같거나 높은 면역반응을 유도함을 확인할 수 있었다. 더불어 모돈에 다양한 방법으로 예방접종 한 후 출생한 자돈을 대상으로 병원성 대장균 야외 분리주로 방어능을 확인하여 본 결과 1차 및 2차 모두를 생균백신으로 그리고 1차는 사균백신을, 2차는 생균백신을 접종한 모돈에서 출생한 자돈은 모두 병원성 대장균을 방어하였다. 따라서 개발백신은 1차 및 2차 모두를 생균백신으로 경구접종하거나 도는 1차는 사균백신을 근육으로 2차는 생균백신으로 경구접종 하여야 병원성 대장균을 방어할 수 있음을 확인하였다.

모돈에 백신을 접종 한 후 출생한 자돈에 사균백신을 근육으로 1차만 또는 1차는 사균백신을 2차는 생균백신을 경구로 접종하여 면역반응 유도와 방어 여부를 확인하여 본 결과 백신접종한 자돈 모두에서 면역반응을 유도함을 확인할 수 있었다. 더불어 병원성 대장균으로 도전감염 하여 이들 균에 의한 설사 여부로 방어를 확인하여 본 결과 백신접종한 자돈 모두 설사 및 균이 분리되지 않아 이들 병원성 세균을 방어함을 확인할 수 있었다. 이 결과는 개발백신은 모돈뿐만 아니라 자돈에서도 병원성 대장균에 대한 예방백신으로 사용할 수 있음이 확인되었다.

[8] Ghost vector를 이용한 신생자돈 설사 예방 백신 개발

8-1. 수행방법

1. 백신 제조를 위한 클로닝.

(1) 각 부착인자 단백 항원 확보 (만든 대장균에서 항원 정제)

시판되고 있는 키트를 이용하여 제작되어 보관 중인 각 부착인자 발현 대장균을 LB agar에 접종하여 확인된 한 colony를 LB broth 200㎖에 접종하여 30℃에서 150rpm의 속도로 흔들어 주면서 하룻밤 배양하였다. 이 배양액에 IPTG의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 같은 조건으로 4시간 재배양하였다. 이 배양액을 4,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물은 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)가 1mM이 되도록 첨가된 10㎖의 멸균 PBS로 재부유시킨 다음 -70℃에서 냉동하였다. 냉동된 부유액을 다시 37℃ water bath내에서 해동한 다음 -70℃에서 냉동하기를 2 ~ 3회 반복하였다. 마지막으로 해동한 후 부유액을 초음파 처리하여 cell들을 분쇄한 다음 15,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상층액을 멸균 관에 옮겼다. 발현 단백질이 가용성일 경우에는 Buffer B (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 8.0) 4㎖를 상층액과 혼합하였고 불용성일 경우에는 6㎖의 Buffer B로 침전물을 재부유시킨 후 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이 반응액을 15,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 resin이 들어 있는 관으로 옮겨 단백질이 resin과 결

합하도록 30분간 교반하였다. 이 반응액을 준비된 column에 충전시키고 천천히 흘려보냈다. 흘려보낸 이 액으로 column을 재충전한 다음 다시 천천히 흘려보냈다. 반응액을 흘려보낸 다음 Buffer C (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 6.3) 6㎖로 column을 3회 세정하여 resin과 결합하지 않은 기타 불필요한 단백질을 제거하였다. Elution buffer (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 4.5) 2㎖로 column을 충전시킨 후 20분간 반응시켜 발현 단백질을 resin으로부터 분리시킨 다음 elution buffer를 1㎖씩 첨가하여 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질을 SDS-PAGE에서 전기영동하여 발현 단백질을 확인하였으며 정량한 후 -70℃에 보관하며 ELISA 항원으로 사용하였다.

(2). 백신 개발을 위한 클로닝

ETEC의 부착인자 중 각 후보 항원 (K88ab, K88ac, K99, FasA)들을 *agf* system을 이용하여 표면에 항원의 발현을 증가시키도록 개발된 대장균 및 살모넬라균 shuttle vector인 pMMP81 에 각각 cloning 시킨 후 *Salmonella* Typhimurium을 형질전환 시킨 후 Ghost vaccine의 제조를 위해 pMMP99(Ghost T-esay vector)을 Transfer하여 ghost system을 도입하였다. 먼저 확인된 각 fimbriae gene을 pMMP81에 EcoRI-HindIII 제한효소로 절단한 후 agarose gel에서 전기영동한 뒤, AccuPrep gel purification kit를 이용하여 agarose gel로 부터 절단된 adhesin과 pMMP81 절편을 정제하고 T4 DNA ligase를 이용하여 4℃에서 하룻밤 ligation하였다. 이 ligation 된 반응액으로 *E. coli* X6212에 형질전환시켜 DAP을 첨가하지 않은 LB agar에 골고루 펴서 말린 다음 하룻밤 배양하여 pMMP81에 의하여 형질전환 된 균주를 선택하였다. 각 adhesin의 확인은 *E. coli* X6212로부터 plasmid를 분리하여 각 adhesin에 해당하는 제한 효소로 절단한 후 agarose gel에서 전기 영동하였고 최종 확인된 JOL1279 (*E. coli* X6212 K88ab in pMMP 81 *agf*ss), JOL1280 (K88ac), JOL1281 (K99), JOL1282 (FasAs)를 얻었다. 그 후 electropoartion방법에 의하여 JOL1255 (△*asd*)를 10% glycerol 함유 증류수로 두 번 세척한 뒤 cuvette에 넣고 정제된 플라스미드 0.1 ug과 섞은 뒤 Bio-Rad MicroPulser (Bio-Rad, USA)의 Pre-Programmed Settings 중 Ec2에 따라 전기충격을 가하고 회수하여 DAP을 넣지 않은 LB broth 1ml에 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 형질전환 된 살모넬라 균을 선별하기 위해 배양된 균액 100ul를 다시 DAP을 첨가하지 않은 LB agar에 골고루 펴서 말린 다음 하룻밤 배양 후 형성된 콜로니를 선별하였다. 그 후 선발된 콜로니에 위와 같은 방법으로 정제된 T-easy ghost Lysis vector (pMMP99 amp resistance)를 Transfer 하여 37℃ ampicillin이 첨가된 agar에서 배양된 다수의 콜로니를 선별하여 각각의 colony를 ampicillin이 첨가된 LB Agar에 접종 한 후 44℃와 37℃에서 배양 하였다. 44℃에서 하룻밤 배양된 플레이트 중 Lysis gene에 의하여 사멸되어 새롭게 콜로니를 형성하지 않았으나 37℃ 에서 하룻밤 배양되어 콜로니를 형성하며 자라난 균주를 최종 선택하여 JOL1285, JOL1285, JOL1287, JOL1288를 얻었다 (표 20).

표 20. 실험에 사용된 균주 및 플라스미드

Strain/Plasmid	Description	Source
Strains		
E. coli		
JOL416	Wild type F4ab (K88ab)$^+$ETECisolatefrompig	Lab stock
JOL417	Wild type F4ac (K88ac)$^+$ETECisolatefrompig	Lab stock
JOL412	Wild type F5 (K99)$^+$ETECisolatefrompig	Lab stock
JOL413	Wild type F6 (Fas)$^+$ETECisolatefrompig	Lab stock
χ7213	*λpir thi-1 thr-1 leuB6 supE44 towA21 lacY1 recA* RP4-2 Tc::Mu *ΔasdA4*	Lab stock
χ6212	*Φ*80d lacZ ΔM15 *deoR Δ(lacZYA-argF)U169 supE44λ$^-$gyrA96recA1relA1endA1ΔasdA4 Δzhf-2::Tn10 hsdR17* (R^-M^+)	Lab stock
JOL1279	χ6212 K88ab in pMMP81	This study
JOL1280	χ6212 K88ac in pMMP81	This study
JOL1281	χ6212 K99 in pMMP81	This study
JOL1282	χ6212 FasA in pMMP81	This study
S. Tyhphmurium		
JOL401	Wild type isolate from chicken	Lab stock
JOL1255	*Δasd* a derivative of JOL401	This study
JOL1285	JOL401 containing pMMP81-K88ab, pMMP99	This study
JOL1286	JOL401 containing pMMP81-K88ac, pMMP99	This study
JOL1287	JOL401 containing pMMP81-K99, pMMP99	This study
JOL1288	JOL401 containing pMMP81-FasA, pMMP99	This study
Plasmids		
T-vector	Cloning vector; pUC*ori* Amp^R	Promega
pMMP99	A derivative of T-easy carrying ghost cassette	This study
pYA3332	a vector containing p15A origin	This study
pMMP81	x7213 [pYA3332::ss agfA/His]	This study
pQE31	IPTG-inducible expression vector; Km^r	Lab stock
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Amp^r	Lab stock

3. Western blot을 이용한 후보 항원의 ghost bacteria 백신 세포 외막에서의 발현 여부 확인

제작된 백신 균주가 해당 부착인자를 세포 밖 Outer membrane protein (OMP)으로 발현하는지를 확인하기 위하여 각 백신 후보균주를 100㎖ LB broth에 하룻밤 배양 한 후 7,000 rpm에서 원심분리하여 pellet을 준비하였다. 각 sample pellet은 sonication을 하여 분쇄 후 원심하여 상청액은 버리고 pellet을 SDS-PAGE용 Sample buffer로 재부유시켜 실험에 사용하였다. 94℃에서 5분간 boiling 한 후 SDS-PAGE한 다음 PVDF membrane으로 옮겨 bolocking buffer (3% skim milk in PBST)로 하룻밤 반응시켰다. 다음 날 준비한 각 fimbriae에 대한 Anti-His(Igtherapy, Korea)을 1:5,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 1:5,000으로 희석된 2차 항체 (goat anti-mouse IgG (H+L), HRP-conjugated)로 1시간 반응시켰다. WEST-oneTM Western Blotting System (Intron Biotechnology, Korea)으로 발색하여 각 항원의 크기 (K88ab; 883bp-29.4kD, K88ac; 816bp-27.2kD, K99; 546bp-18.2kD, FasA; 585-19.5kD)를 확인하여 발현을 확인하였다.

8-2. 결과

1. ETEC fimbriae 발현 ghost vaccine들의 ghost 여부 확인

K88ab, K88ac, K99 및 FasA ETEC를 발현하는 *Salmonella* Typhimurium 균주를 Ghost vaccine으로 만들기 위하여 E lysis gene을 가진 pMMP99 vector를 건설하여 형질전환 하였다. Ghost vaccine의 배양온도를 28℃에서 44℃로 온도를 증가시켜 E lysis gene을 활성화 시키고 48시간 배양하여 완전히 ghost화를 유도하여 제작하였다. 완성된 Ghost vaccine의 세포수를 확인 한 결과 같은 조건을 준 일반적인 살모넬라의 CFU가 lone이 되었을 때 백신의 경우 10^{-3}cells/ml 이하로 세포사 되었다.

2. Western blot을 이용한 ETEC fimbria 발현 확인

ETEC 부착인자 항원발현 여부를 검증하기 위하여 세포막을 분리하고 15% 겔에 전기영동 하였다. 이후 PVDF에 전사하여 membrane에 Anti-His monoclonal Antibody (Anti-His_6 IGterapy, Korea)를 이용하여 전기영동한 각각의 샘플 사이즈에서 발현된 K88ab, K88ac, K99 및 FasA의 크기를 확인한 결과는 그림 29와 30에서와 같았다.

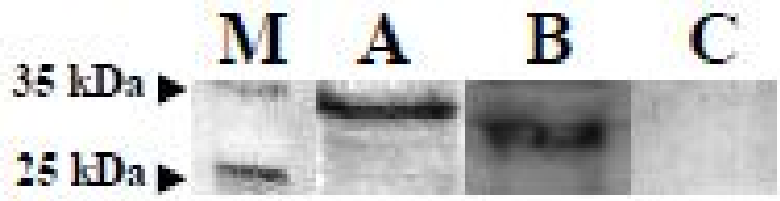


그림 29. Identification of recobminant ETEC expression in *Salmonella* Typhimurium by western blot. Lane M: molecular size marker; lane A: *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine expressing K88ab; lane B: *Salmonella* Typhimurium Ghost vaccine expressing K88ac; lane C: Vector control

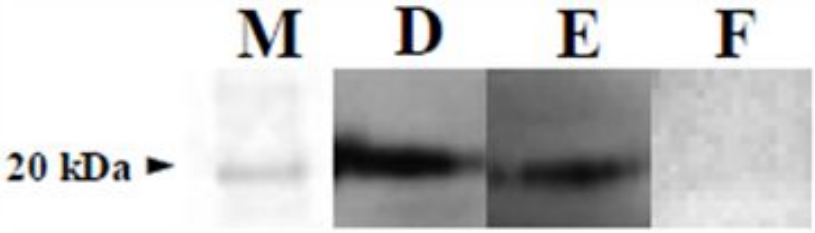


그림 30. Identification of recobminant ETEC expression in *Salmonella* Typhimurium by western blot. Lane M: molecular size marker; lane D: *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine expressing K99; lane E: *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine expressing FasA.

[9] 개발된 ghost 백신의 마우스에서의 면역 유도 실험

9-1-1] 접종량 결정을 위한 실험

Ghost vaccine의 안전한 접종량을 결정하기 위하여 K88ab ETEC fimbria를 delivery하는 *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine을 경구 또는 Intramuscular로 다양한 접종량으로 접종한 후 접종량에 따른 폐사율과 임상증상 및 면역반응을 측정하였다.

9-1-1. 수행방법

1. 실험동물

5주령의 BALB/c 암컷 마우스 70두를 구입하여 전북대학교 실험동물사육장에서 사육하면서 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

2. 실험에 사용된 균주 및 플라스미드

실험에 사용된 균주와 플라스미드는 표 20의 Genetic modification에 기초한 생균 *Salmonella* Typhimurium delivery system을 이용한 주요 소화기 질병 동시 예방을 위하여 제조된 ghost vaccine delivery system으로 ETEC를 발현하는 *Salmoenlla* Typhimurium ghost vaccine중 항원 fimbriae K88ab를 발현하는 JOL1285 균주를 Ghost vaccine으로 제조하여 사용하였다.

3. 백신 준비

제조된 Ghost vaccine delivery system으로 ETEC를 발현하는 *Salmonella* Typimurium ghost vaccine의 Stock 균주를 ampicilin이 첨가된 LB agar에서 키워 선택한 콜로니 하나를 $O.D_{600}$ 값이 0.5를 넘지 않게 ampicilin이 첨가된 LB broth 200ml에서 3시간 이하로 배양하였다. 배양된 세포수를 파악하기 위하여 NaCl saline으로 희석하여 도말한 뒤 CFU를 확인하였다. 이후 44℃ Shaking incubator로 옮겨 48시간 이상 완전히 Lysis시켰다. 이후 contamination이나 mutant를 확인하기 위해 다시 spreading하여 자라지 않았다면 (혹은 10^{-3}cells/ml이하일 경우) Centrifuge하여 PBS에 부유한 뒤 12시간 이상 냉동 보관하여 사용하였다.

4. 백신접종

실험군 및 접종 방법은 아래 표 21 및 22와 같았다. 근육접종과 경구접종을 하였으며 각 그룹은 적어도 백신 접종 전 4시간 동안은 절식을 시켰으며 백신접종 1시간 후에 사료를 공급하였다.

표 21. Ghost vaccine의 접종량 결정을 위해 근육으로 백신접종 개요

그룹	두수	접종균주	접종량	접종 경로
A	8	Control	멸균 PBS 접종	근육
B	6	K88ab	1×10^7 cells in 100㎕ 멸균 PBS	
C	6	K88ab	5×10^7 cells in 100㎕ 멸균 PBS	
D	6	K88ab	1×10^8 cells in 100㎕ 멸균 PBS	
E	6	K88ab	5×10^8 cells in 100㎕ 멸균 PBS	
F	6	K88ab	1×10^9 cells in 100㎕ 멸균 PBS	

표 22. Ghost vaccine의 접종량 결정을 위한 경구로 백신접종 개요

그룹	두수	접종균주	접종량	접종 경로
A	8	Control	멸균 PBS 접종	경구
B	8	K88ab	1×10^8 cells in 20㎕ 20% sucerose 함유 멸균 PBS	
C	8	K88ab	1×10^9 cells/20㎕ 20% sucerose 함유 멸균 PBS	
D	8	K88ab	1×10^{10} cells/20㎕ 20% sucerose 함유 멸균 PBS	

5. 가검물 채취

접종 전 그리고 접종 후 2, 4주째에 sIgA 측정을 위해 분변을 그리고 IgG 측정을 위하여 혈액을 채취하였다. 분변의 경우 분변은 무게를 잰 후 sodium azide가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/㎖가 되도록 부유시킨 후 13,200 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

6. ELISA

Salmonella Typhimurium 세포 표면에 발현된 fimbria K88ab 항원에 대해 특이한 sIgA항체와 IgG항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. Sample well에는 정제된 항원 단백질을 500ng/well의 농도로, standard well에는 goat anti-mouse IgG 또는 goat anti-mouse sIgA를 각각 200ng/well의 농도로 분주 한 후 4℃에서 하룻밤동안 coating 하였다. Coating 된

plate는 Tween 20이 0.05% 함유된 PBS (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (3% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum은 PBST로 1:100 으로 Fecal은 1:3로 각각 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 1시간30분 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, HRP 그리고 Fecal Sample의 경우에는 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA HRP를 1:5,000의 배율로 희석하여 각 well에 100 μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응 시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색 후 3M H_2SO_4로 stop후 492nm에서 OD값을 측정하였다. 각 항원 specific한 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정하였다.

7. 임상증상

백신 접종 후 발열, 의기소침, 설사, 식욕감퇴, 폐사와 같은 부작용에 대한 임상 증상을 백신 접종 후 14일 간 매일 2회 (아침, 저녁) 씩 관찰하였다.

9-1-2. 결과

1. 백신 접종 후 임상 증상

K88ab를 발현하는 *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine을 접종한 접종군과 PBS를 접종한 대조군에서 임상증상을 확인한 결과, 근육으로 접종한 마우스의 경우 대조군인 그룹 A에서 어떠한 임상 증상도 나타나지 않은데 반하여 백신을 접종한 그룹 B와 그룹 C는 그리고 그룹 D에서는 접종 후 약 하루 동안 활동이 둔화 되었다가 48시간 뒤에는 완전히 회복되었다. 그러나 그룹 E와 그룹 F의 경우 depression이 심각하게 유지되었고 그룹 F에서 60%의 폐사가 관찰되었다. 경구로 접종한 마우스 그룹에서는 모든 접종 군에서 어떠한 임상 반응도 나타나지 않았다.

2. ELISA를 이용한 면역 반응 결과

(1) 근육 접종의 경우

각 ELISA로 측정한 각 Fimbria에 대한 면역반응은 다음과 같았다. K88ab 항원에 대한 IgA와 IgG의 항체 역가는 백신 접종군에서 근육으로 $1x10^8$cells/100μl을 투여한 그룹 D의 경우 IgG 항체 역가가 그룹 E를 제외한 모든 그룹 중에서 가장 우수하였으며 점막면역을 위한 sIgA항체가 컨트롤에 비해 높은 항체가를 나타냈다. 그룹 E와 그룹 F의 경우 항체가가 높더라도 심각한 depression이 유지되고 폐사가 관찰되었으며 ELISA로 측정한 점막 면역을 위

한 sIgA 항체가 그룹 D에서 더 유효하다고 판단되었다 따라서 근육에서의 적절한 투여량을 1x10^{8}cells/100μl로 결정하였다 (그림 31).

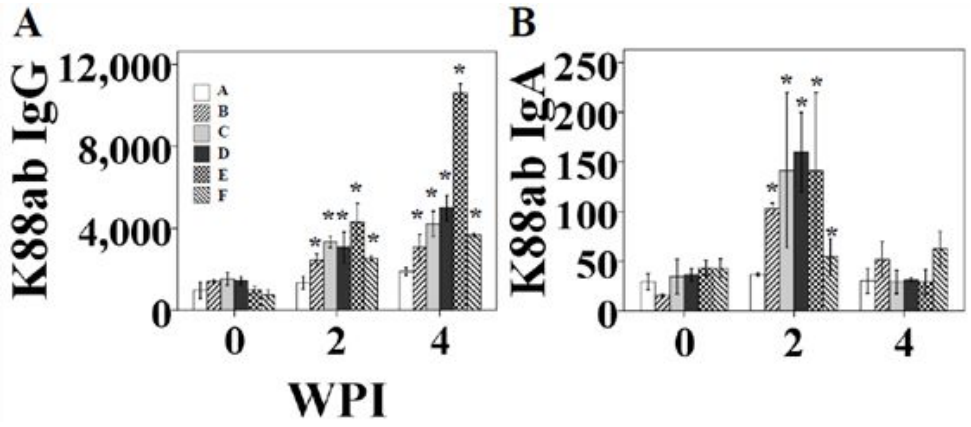


그림 31. The effect of vaccine immunization with IM. *Salmonella* Typhimurium expression K88ab ghost vaccine-specific Serum IgG antibody titers (A), Fecal IgA antibody titers (B). Group A: PBS control, Group B: immunized with a 1x10^{7}cells/100μl, Group C: immunized with a 5x10^{7}cells/100μl, Group D: immunized with a 1x10^{8}cells/100μl, Group E: immunized with a 5x10^{8}cells/100μl, Group F: immunized with a 1x10^{9}cells/100μl. Plasma IgG and scretory IgA concentration (μg/ml). Asterisks indicate significant difference between each immunized and control group ($^*p \leq 0.05$)

(2) 경구 접종의 경우

경구접종의 경우에는 1x10^{9}cells/20μl을 투여한 그룹 C에서 유효한 항체가를 확인하여 최종 투여량으로 결정하였다 (그림 32)..

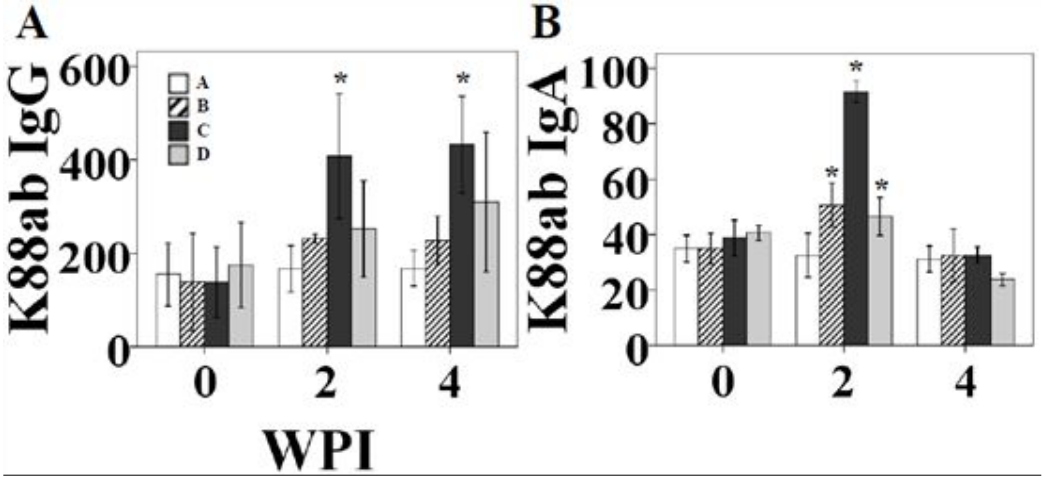


그림 32. The effect of vaccine immunization with Oral. *Salmonella* Typhimurium expression K88ab ghost vaccine-specific Serum IgG antibody titers (A), Fecal IgA antibody titers(B). Group A: PBS control, Group B: immunized with a 1x10^{8}cells/20μl, Group C:

immunized with a $1x10^9$cells/20μl, Group D: immunized with a $1x10^{10}$cells/20μl, Plasma IgG and scretory IgA concentration (μg/ml). Asterisks indicate significant difference between each immunized and control group ($^*p \leq 0.05$).

9-2] Ghost vaccine의 접종 경로에 따른 면역반응 확인 및 경로 최적화 실험

Ghost vaccine을 다양한 경로로 접종한 후 유도되는 전신 및 점막 면역반응을 기초로 하여 접종 경로를 결정하기 위해 K88ab, K88ac, K99, FasA ETEC fimbria를 각각 발현하는 *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine을 경구 또는 근육으로 접종하였다

9-2-1. 수행방법

1. 실험동물

5주령의 BALB/c 암컷 마우스 80두를 구입하여 전북대학교 실험동물사육장에서 사육하면서 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

2. 실험에 사용된 균주 및 플라스미드

실험에 사용된 균주와 플라스미드는 표 20에 설명되어있는 균주를 Ghost vaccine으로 제조하여 사용하였다.

3. 백신 준비

K88ab, K88ac, K99 그리고 FasA를 발현하는 *Salmonella* Typimurium ghost vaccine의 Stock 균주를 ampicilin이 첨가된 LB agar에서 키워 선택한 콜로니 하나를 $O.D_{600}$ 값이 0.5를 넘지 않게 ampicilin이 첨가된 LB broth 200ml에서 3시간 이하로 키운뒤 배양된 세포수를 파악하기 위하여 NaCl saline으로 희석하여 도말한뒤 CFU를 확인하였다. 이후 44℃ Shaking incubator로 옮겨 48시간이상 완전히 Ghost화 시킨 후 contamination이나 mutant가 되지 않았나 확인하기 위해 다시 spreading하여 자라지 않았다면 (혹은 10^{-3}cells/ml이하일 경우) 원심분리하여 침전물을 멸균 PBS로 부유한 뒤 12시간 이상 냉동보관하여 Ghost vaccine으로 실험에 사용하였다.

4. 백신접종

실험군 및 접종 방법은 아래 표 23 및 24와 같았다. 근육접종과 경구접종을 하였으며 각 그룹은 적어도 백신 접종 전 4시간 동안은 절식을 시켰으며 백신접종 1시간 후에 사료를 공급하였다.

표 23. ghost vaccine의 접종 경로를 결정을 위한 IM 접종 개요.

그룹	두수	접종균주	접종량	접종 경로
A	8	K88ab	1 $\times 10^8$ cells in 100㎕ 멸균 PBS	근육
B	8	K88ac	1 $\times 10^8$ cells/100㎕	
C	8	K99	1 $\times 10^8$ cells/100㎕	
D	8	FasA	1 $\times 10^8$ cells/100㎕	
E	8	Control	멸균 PBS 접종	

표 24. Ghost vaccine의 접종 경로 결정을 위한 Oral 접종 개요.

그룹	두수	접종균주	접종량	접종 경로
A	8	K88ab	1 $\times 10^9$ cells in 20㎕ 20% sucerose 함유 멸균 PBS	경구
B	8	K88ac	1 $\times 10^9$ cells/20㎕	
C	8	K99	1 $\times 10^9$ cells/20㎕	
D	8	FasA	1 $\times 10^9$ cells/20㎕	
E	8	Control	멸균 PBS 접종	

5. 가검물 채취

접종 전 그리고 접종 후 2, 4, 6주째에 sIgA 측정을 위해 분변을 그리고 IgG 측정을 위하여 혈액을 채취하였다. 분변의 경우 분변은 무게를 잰 후 sodium azide가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/㎖가 되도록 부유시킨 후 13,200×rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심 분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

6. ELISA

Salmonella Typhimurium 세포 표면에 발현된 fimbria K88ab, K88ac, K99 그리고 FasA 각 항원에 대해 특이한 sIgA항체와 IgG항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. 수행 방법은 접종량을 결정짓기 위한 실험 9-1-1의 ELISA 방법과 동일하게 수행하였다.

7. Splenocyte proliferation assay

접종 후 4주째에 마우스를 희생시켜 무균 적으로 spleen을 채취한 후 분쇄하고 조직 내 세포를 꺼내 cell stainer로 남은 조직을 제거하였다. Centrifuge로 세포를 가라앉힌 뒤 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin 그리고 100ug/ml streptomycine이 포함되어 있는 RPMI (RPMI 1640 supplemented. Sigma) (이하 모둔 RPMIfk 칭함)로 부유시켜 재차 cell을 centrifuge로 침전시킨 뒤 RBC Lysis buffer통해 cell을 부유시켜 RBC를 용혈시켰다. 이후 원심분리한 세포 침전물을 멸균 PBS로 세척하고 이와 같은 과정을 두 차례 더 반복한 뒤 RPMI에 부유된 splenocyte cell 수를 측정하여 각 그룹에 해당하는 항원과 함께 최종 Cells수가 $1x10^7$이 되도록 24 well cultrue plate에 분주하여 실험에 사용하였다.

1) LPA (The lymphocyte proliferative responses assay)

Splenocyte를 통해 구해진 각 그룹별 면역세포들을 72시간 동안 항원으로 자극하고 분화된 세포를 cell proliferation and cytotoxicity bioassay kit (Lonza. USA)을 사용하여 측정하여 컨트롤과의 상대적인 자극에 대한 반응 여부를 비교하였다.

2) FACS (Facial Action Coding System)

Splenocyte를 통해 구해진 각 그룹별 면역세포들을 12시간 동안 항원으로 자극하고 분화된 세포를 수거하여 각각 isolation과 standard sample과 분석할 sample로 나누어 각각의 antibody solution을 분주한 뒤 어두운 상태에서 ice incubation 하고 세 번 PBS로 세척하여 fluorescence activated cell sorting (BD, USA)를 이용하여 측정하였다. Monoclonal antibody는 CD3 (PE-cy5), CD4 (FITC), CD8 (PE) 및 CD45r (APC; B cells) (Chin'ombe et al., 2009; Huang et al., 2010; Yamamoto et al., 2010)을 사용하였다.

9-2-2. 결과

1. 접종 경로별 유도된 면역 반응

(1) 근육 접종의 경우

근육접종과 경구접종 중 최적의 접종 경로를 결정하기 위해 안전성 테스트를 거쳐 얻어낸 최종 접종량을 각각의 루트에 맞게 접종하고 그에 따른 항체 역가를 ELISA를 통해 측정하였다. 그 결과 Ghost vaccine을 근육으로 접종한 실험군에서 K88ab, K88ac, K99 및 FasA

ETEC 항원에 대하여 sIgA가 접종 후 2주차에 대조군 그룹에 비하여 항체역가가 매우 상승하였다. 그리고 Ghost vaccine의 접종 후 4주부터는 대조군과 비슷하게 유지하였으며, IgG의 경우 실험한 6주간 계속 항체 역가를 증가시키며 높은 항체역가가 관찰되었다 (그림 33).

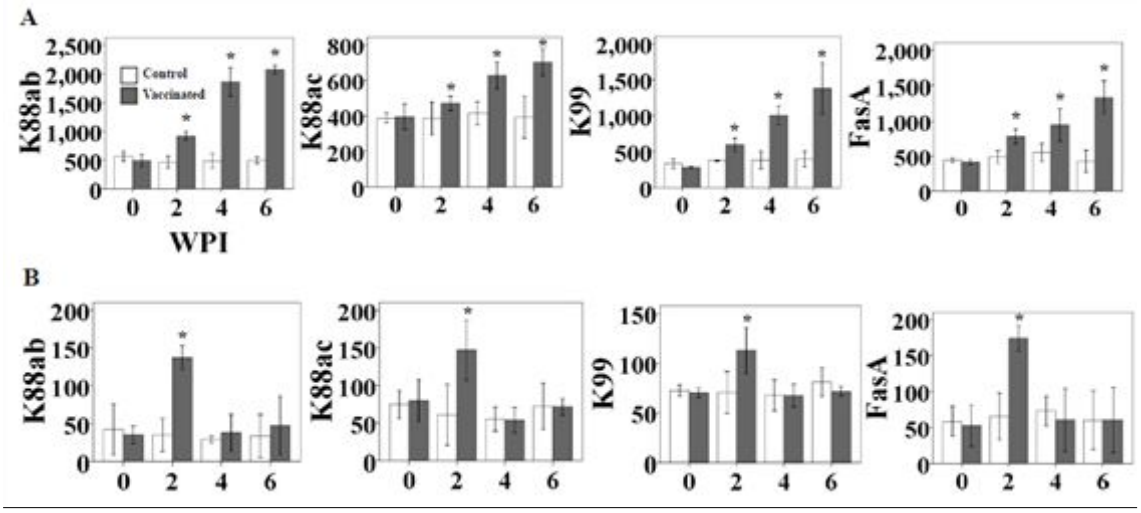


그림 33. The effect of vaccine immunization with IM. *Salmonella* Typhimurium expression ETEC ghost vaccine-specific Serum IgG antibody titers(A), Fecal IgA antibody titers(B). Plasma IgG and scretory IgA concentration (μg/ml). Asterisks indicate significant difference between each immunized and control group ($^{*}p \leq 0.05$).

(2) 경구 접종의 경우

경구로 Ghost vaccine을 접종한 실험군에서는 K88ab, K88ac, K99 및 FasA ETEC 항원에 대하여 접종 후 2주차가 되었을 때 근육접종과 마찬가지로 sIgA가 대조군에 비하여 유의있게 증가하였으나 상승폭이 낮고 개체차가 컸다. 또한 혈청 IgG도 K88ab 항원을 제외하고 6주간 항체 역가가 상승하였으나 근육 접종시 IgG 역가의 상승폭에 크게 못 미치는 것으로 미루어 보아 항체 역가를 통한 Ghost vaccine의 최적 경로는 근육접종으로 결정하였다 (그림 34).

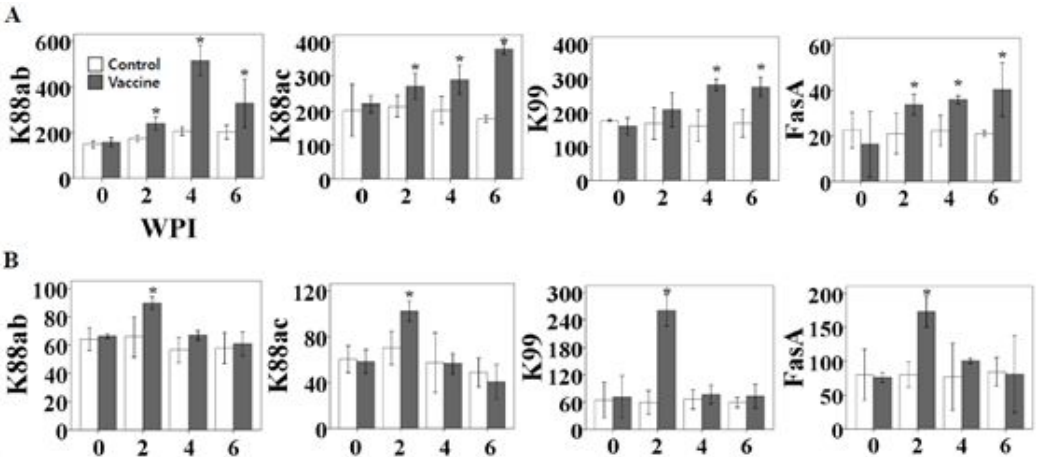


그림 34. The effect of vaccine immunization with Oral. *Salmonella* Typhimurium expression ETEC ghost vaccine-specific Serum IgG antibody titers(A), Fecal IgA antibody titers(B). Plasma IgG and scretory IgA concentration (μg/ml). Asterisks indicate significant difference between each immunized and control group ($^{*}p \leq 0.05$).

2. Splenocyte proliferation assay

근육 접종그룹과 경구 접종그룹에 각각 Splenocyte proliferation assay 실험을 수행하였다. Splenocyte를 통해 얻어진 그룹별 면역세포들을 48시간동안 K88ab 그리고 K88ac 항원으로 자극하고 분화된 세포를 대조군과의 상대적인 자극에 대한 반응 여부를 비교하였다. 근육 접종군에서 대조군 면역세포변화를 기준으로 실험군의 자극에 대한 면역세포의 반응이 유의있게 증가하였다. 경구 접종군에서도 대조군에 비해 실험군의 면역세포반응이 증가하였으나 K88ab와 K88ac 두 항원에 대한 자극에서 개체차가 심하게 나타났다. 이 실험결과는 ELISA의 실험 결과와 일치하였다 (그림 35).

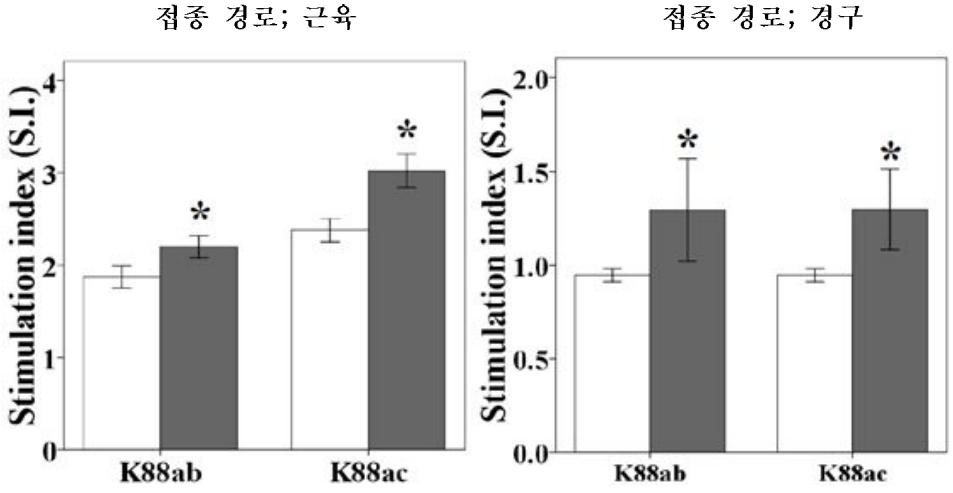


그림 35. antigene-specific proliferation of lymphocyte from spleen in mouse

immunized with vaccine candidate K88ab, K88ac. Asterisks indicate significant difference between each immunized and control group ($^{*}p \leq 0.05$).

3. FACs 결과

Ghost vaccine의 접종 후 4주 째에 면역세포의 각 항원 자극에 대한 반응을 FACS를 통해 확인하였다. 대조군 그룹에 비하여 K88ac 그리고 FasA 항원으로 12시간 자극한 Ghost vaccine 접종군에서 $CD4^{+}$ T cells 의 percentage가 근육으로 접종한 그룹 (41%)이 대조군 (32%)에 비해 유의 있게 증가하였다 (그림 12). CD8+ T cells의 증가 역시 근육으로 접종하였을 때 근육 접종군이 (12%) 대조군 (9%)보다 높게 증가하였다. 이와 함께 항체 증가를 확인하기 위하여 측정한 B cells의 percentage가 대조군 (23%)에 비하여 근육 접종군 (32%)이 크게 증가하였다 (그림 36).

- The relate proportion of spleen CD4+ and CD8 T cell subsets (그림 36, 37)

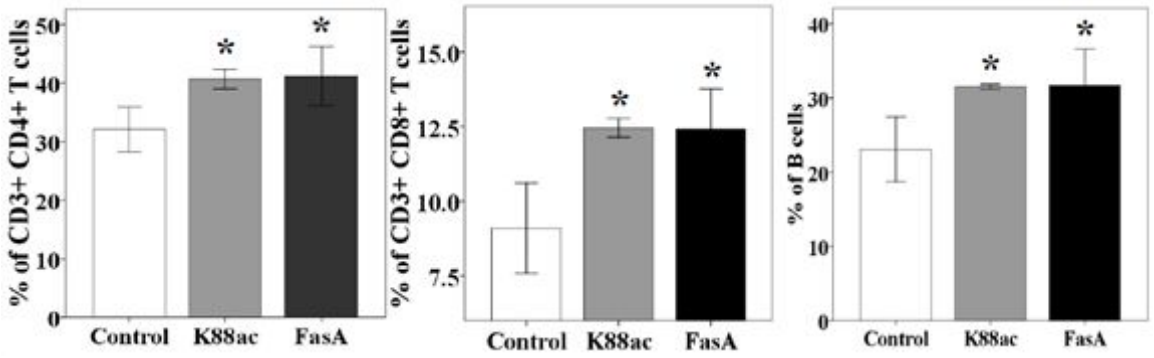


그림 36. Measurements of CD3+, CD4+, CD8+ T cell and CD45r responses. the immunized mouse splenocytes were stimulated with K88ac and FasA and then stained with PE-cy5-rat anti mouse CD3+, FITC-rat anti-mouse CD4+, PE-rat anti-mouse CD8+ and APC-rat anti-mouse CD45r antibody. CD45r expression by specific B cells was detected by flow cytometry. Each graphs represent K88ac and FasA of CD3+CD4+ lymphocytes, CD3+CD8+ lymphocytes and CD45r lymphocytes subpopulation in immunized JOL1286 and JOL1288 by Oral rout. the data are from three indepoendent experiments. Asterisks indicate significant difference between each immunized and control group ($^{*}p \leq 0.05$) examined by flow cytometry.

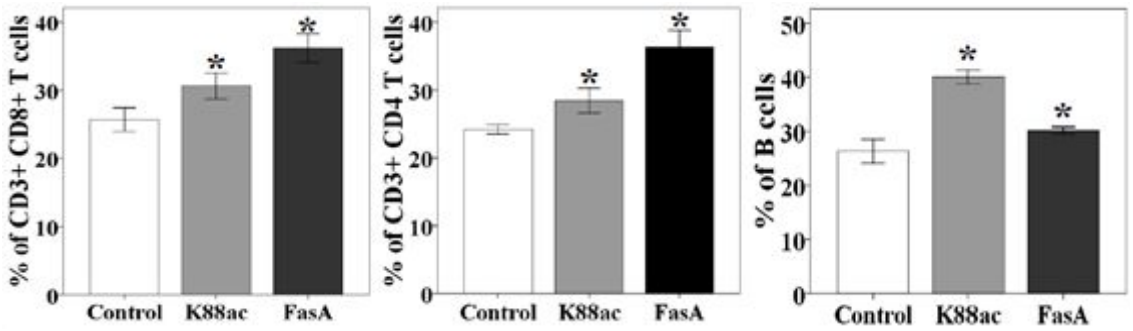


그림 37. Measurements of CD3+, CD4+, CD8+ T cell and CD45r responses. the immunized mouse splenocytes were stimulated with K88ac and FasA and then stained with PE-cy5-rat anti mouse CD3+, FITC-rat anti-mouse CD4+, PE-rat anti-mouse CD8+ and APC-rat anti-mouse CD45r antibody. CD45r expression by specific B cells was detected by flow cytometry. Each graphs represent K88ac and FasA of CD3+CD4+ lymphocytes, CD3+CD8+ lymphocytes and CD45r lymphocytes subpopulation in immunized JOL1286 and JOL1288 by Oral rout. the data are from three indepoendent experiments. Asterisks indicate significant difference between each immunized and control group ($^{*}p \leq 0.05$) examined by flow cytometry.

위와 같은 결과를 종합한 결과 경구 접종루트의 경우 각 개체간의 차가 심하고 항원간의 일정함이 낮아 최적의 접종 경로는 근육접종으로 결정하였다.

9-3] 각 부착인자 발현 ghost vaccine의 combination 후 근육 접종 후 면역반응 유도 실험.

K88ab, K88ac, K99 및 FasA의 ETEC를 fimbria 발현하는 각각의 Ghost vaccine들을 혼합하여 전에 실험된 결과에 따라 1 $\times 10^{8}$ cells/100$\mu\ell$으로 근육접종 하여 각 fimbria에 대한 면역반응의 유도 여부를 조사하였다.

9-3-1. 수행방법

1. 실험동물

5주령의 BALB/c 암컷 마우스를 18두를 구입하여 전북대학교 실험동물사육장에서 사육하면서 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

2. 실험에 사용된 균주 및 플라스미드

각 ETEC fimbria를 발현 하는 *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine candidates

3. 백신 준비

K88ac, K99, FasA, F41을 발현하는 각 ghost vaccine을 각각 2.5x10^6 cells/25μl로 농축한 후 혼합하여 접종 량이 총 1×10^8 cells/100㎕이 되게 하였다.

4. 백신접종

실험군 및 접종 방법은 아래 표 25와 같이 근육접종을 하였다.

표 25. 각 ETEC fimbria 발현 ghost vaccine의 combination 후 근육 접종 개요

그룹	두수	접종균주	접종량	접종 경로
A	10	K88ac+K99+FasA+F41	1 ×10^8 cells in 100㎕ 멸균 PBS	근육
E	8	Control	멸균 PBS 접종	

5. 가검물 채취

접종 전 그리고 접종 후 2, 4, 6주째에 sIgA 측정을 위해 분변을 그리고 IgG 측정을 위하여 혈액을 채취하였다. 분변의 경우 분변은 무게를 잰 후 sodium azide가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/㎖가 되도록 부유시킨 후 13,200×rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심 분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

6. ELISA

Salmonella Typhimurium 세포 표면에 발현된 fimbria K88ab, K88ac, K99 그리고 FasA 각 항원에 대해 특이한 sIgA항체와 IgG항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. 수행 방법은 접종량을 결정짓기 위한 실험 9-1-1의 ELISA 방법과 동일하게 수행하였다.

7. Immunohisto chemistry (IHC)

접종 후 2주째에 24시간 절식시킨 마우스를 희생시켜 멸균된 상태로 intestine 을 분리하였다. 공장과 회장을 Frozen section compound (Surgipath® FSC22®. Leica Microsystems. USA)를 이용하여 -70℃에 보관하여 실험에 사용하였다. 블럭을 7μm로 frozen section (Mircrom HM520 Thermo USA) 하여 건조하여 -20℃에 보관하였다. Tissue Sample을 Methanol과 Acetone을 1 대 1의 비율로 섞어 -20℃ 에서 10분간 고정한 뒤 0.01M PBS로 5분간 세 차례 세척하고 0.1M PBS에 0.5%로 희석시킨 과산화수소에 10분간 반응시킨 다음 0.01M PBS로 세 차례 세척하였다. 이후 peroxidase-blocking regent (DAKO) 100ul를 조직위에 떨어트려 1시간 반응시킨 뒤 다시 세척하고 각각의 항원을 0.1M PBS에 50ug/ml로 희석하여 100ul를 떨어트려 2시간 상온에서 반응시켰다. 세척 후 해당 항원에 따른 polyclonal anti-rabbit IgG를 capture하기 위해 상온에서 2시간 반응시켰다. 세척 후 2차 항체 anti-rabbit Ig(Vector ILaboratories, Inc.)를 실온에서 1시간 반응하고 다시 세척 후 사용 직전에 제조된 AEC substrates를 즉시 반응시켰다. Hematoxilin으로 염색하여 광학현미경 (DP72. OLYMPUS. Japan)의 200배와 400 배율로 각각 확인하였다.

8. Splenocyte proliferation assay

접종 후 4주차가 된 마우스를 희생시켜 무균 적으로 spleen을 채취한 후 분쇄하고 조직 내 세포를 꺼내 cell stainer로 남은 조직을 제거하였다. 원심분리하여 세포를 가라앉힌 뒤 RPMI {모든 RPMI [RPMI 1640 supplemented. Sigma]는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin 그리고 100ug/ml streptomycine이 포함되어 있다.}로 부유시켜 재차 cell을 centrifuge로 가라앉힌 뒤 RBC Lysis buffer통해 cell을 부유시켜 RBC를 용혈시켜 제거 하였다. 이후 원심분리 한 세포 침전물을 멸균 PBS로 세척하고 이와 같은 과정을 두 차례 더 거친 뒤 RPMI에 부유된 splenocyte cell 수를 측정하여 각 그룹에 해당하는 항원과 함께 최종 Cells수가 $1x10^7$이 되도록 24 well cultrue plate에 분주하여 48시간 배양하였다. 배양 후 RNeasy plus mono kit (Qiagen사)를 사용하여 각 항원으로 반응시킨 splenocyte로부터 total RNA를 추출하였다. 추출 된 total RNA는 적절한 농도 값을 확인한 뒤(NanoDrop) cDNA reverse transcription kit (High capacity cDNA REverse transcription kit. AB 사)을 이용하여 cDNA로 합성하여 냉동보관하고 real-time PCR 기기를 이용하여 IL-4, IFN-r (Real-Time PCR set은 QuantiTect Primer assay IL4, IFN-r, GAPDH 그리고 QuantiTect SYBR green PCR Kit으로 AB사의 Step One plus Real Time PCR system을 사용하였다.)를 측정하였다.

9-3-2. 결과

1. 백신 접종 후 면역 반응

K88ab, K88ac, K99 그리고 FasA ghost vaccine을 혼합하여 1x10^{8}cells/100μl을 근육 접종하였다. 접종 전 그리고 접종 후 2주 간격으로 8주간 가검물을 채취한 샘플로 ELISA를 수행한 결과 8주간 모든 항원의 IgG의 역가가 지속적으로 상승 유지하였다. 특히 K88ab와 FasA 항원의 IgG역가가 매우 높았으며 K88ac 그리고 K99 역시 매우 높아 모든 항원에 대해 유의 있게 나타났다. sIgA의 측정 결과 역시 Ghost vacccine의 접종 후 2주차에 점막 면역을 위한 sIgA 역가가 대조군에 비해 유의하게 나타났다 (그림 38).

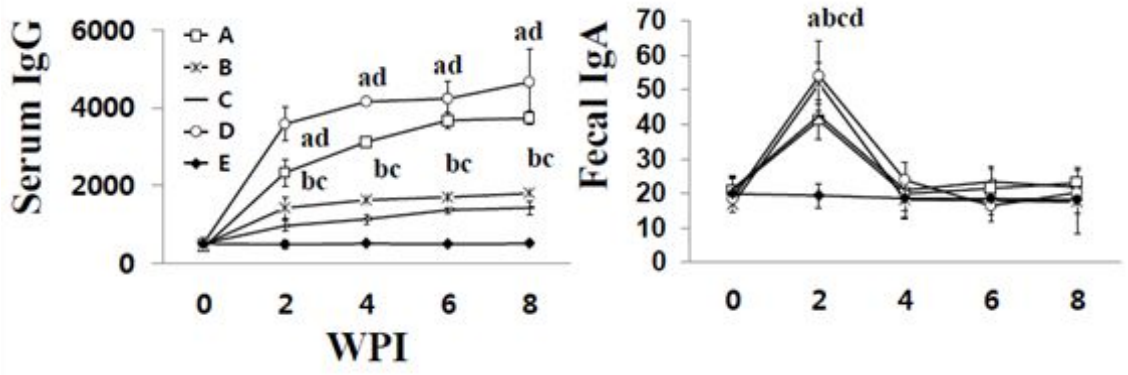


그림 38. Antibody responses to mixture consisting *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine expression ETEC as K88ab, K88ac, K99 and FasA-specific Serum IgG antibody titers(A), Fecal IgA antibody titers(B). Group A: measurment of specific K88ab antibody, Group B: measurment of specific K88ac antibody, Group C: measurment of specific K99 antibody, Group D: measurment of specific FasA antibody, Group E: PBS control Plasma IgG and scretory IgA concentration (μg/ml). Lower case letters indicate a significant difference ($^*p \leq 0.05$) between each immunized and control group (a: group A, b: group B, c: group C, d: group D).

2. Real-time PCR 결과

항체의 분비 과정의 면역 경로를 추정하기 위하여 세포성과 체액성 면역 반응에 관련된 싸이토카인 IFN-r와 IL4를 측정하였다. 각 그룹의 마우스에서 분리한 비장을 마지막 접종 후 4주차에 분리하여, splenocyte proliferation assay를 수행하여 얻어낸 lymphocyte를 대상으로 항원으로 자극하여 면역세포의 백신에 의한 항원 자극 후 자극된 Splonocyte에 의하여 분비된 IFN-r의 값이 접종하지 않은 그룹에 비해 접종한 그룹에서 유의있게 나타났다 (그림 39).

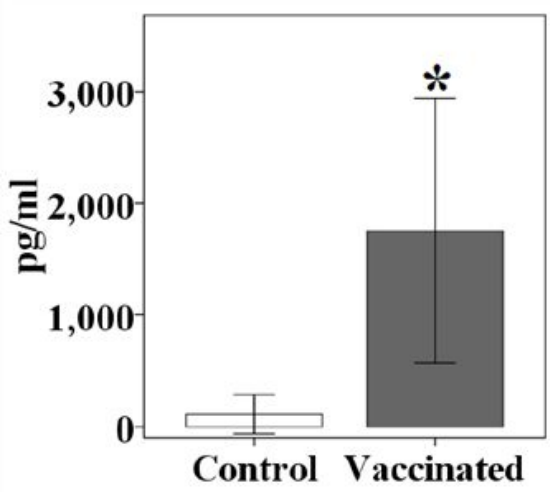


그림 39. Production of IFN-r by splenocytes from vaccinated rats. IFN-r was determined by Real-Time PCR. lymphocyte were collected from 12h of K88ac-stimulated spleoncytes culture. Asterisks indicate significant difference between immunized and control group ($p \leq 0.05$).

3. Immunohisro chemistry 결과

항원을 종합하여 접종하였을 때 각 항원에 대한 IgA를 분비하는 소장에서의 B cells을 specific polyclonal Anti-rabbit IgA를 통하여 확인하였다. 그림 40과 41에서 보는 바와 같이 그 결과 대조군 그룹의 substrate의 반응이 미약한대에 반하여 실험군의 반응이 유의 있게 나타났다. 또한 실제적인 항체 분비여부를 확인하기 위해 K88ab와 K88ac로 sIgA 항체 역가가 ELISA 상에서 가장 높았던 2주차에 마우스를 희생시켜 얻어진 조직위에 반응 시킨 뒤 각 항원에 대한 항체와 2차 항체를 통해 Immunohisto chemistry를 수행하였다. 그 결과 Ghost vaccine을 접종 한 실험군에서 항체의 반응을 볼 수 있었다 (표 26).

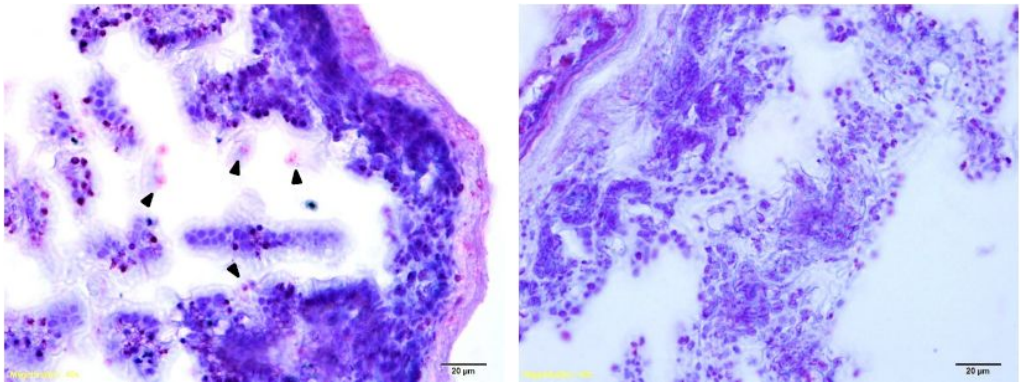


그림 40. Immunohistochemistry analysis after 2 weeks vacination (magnification in 400x) Number of IgA-secreting cells in the intestine following IM immunization in each

experimental group. A : PBS control, B : IM Ghost vaccination with *Salmonella* Typhimurium expressing K88ab antigene conjugation.

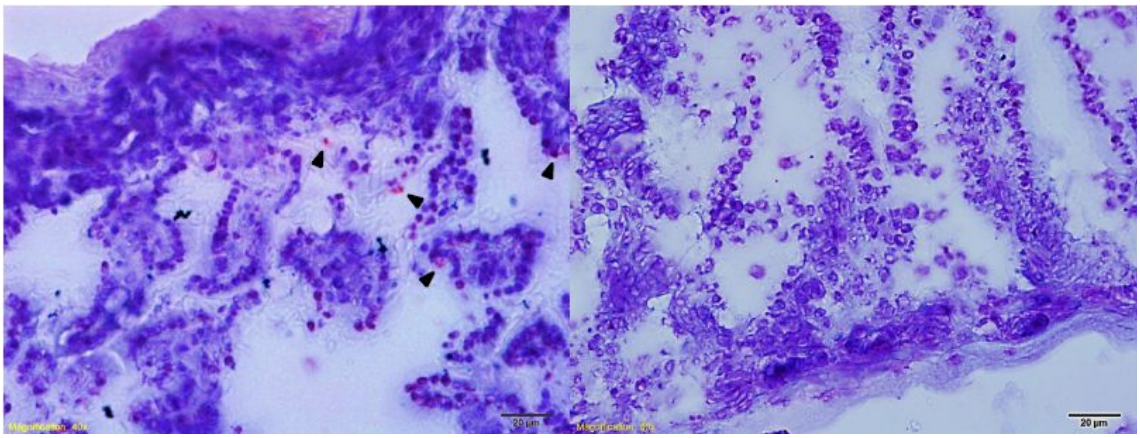


그림 41. Immunohistochemistry analysis after 2 weeks vacination (magnification in 400x) Number of IgA-secreting cells in the intestine following IM immunization in each experimental group. A : PBS control, B : IM Ghost vaccination with *Salmonella* Typhimurium expressing K88ab antigene conjugation.

표 26. Immunohistochemistry. Number of IgA-secreting cells in the intestine following IM immunization in each experimental group. Control : PBS control, Vaccine : IM Ghost vaccination with *Salmonella* Typhimurium expressing ETEC antigene conjugation vaccine values are mean ± SD ($^{*}P \leq 0.05$). Results are densities determined in six random fields from three individual mice

Exp. Groups	Mean no. of cells/mm^2±SD.	
	K88ab	K88ac
Control	0.24 ± 0.20	0.26 ± 0.23
Vaccine	2.13 ± 1.19*	3.02 ± 1.65*

9-4] 각 부착인자를 ghost vaccine들을 combination 한 후 접종 횟수 결정을 위한 실험

각 해당 항원 발현 ghost vaccine 균주들의 혼합하여 근육접종으로 1회, 2회, 3회 접종한 다음 유도된 면역 반응을 확인하여 가장 적합한 접종 횟수를 확인하기 위한 실험.

9-4-1. 수행방법

1. 실험동물

5주령의 BALB/c 암컷 마우스를 40두를 구입하여 전북대학교 실험동물사육장에서 사육하면서 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

2. 실험에 사용된 균주 및 플라스미드

각 ETEC fimbria를 발현 하는 *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine candidates

3. 백신 준비

K88ab, K88ac, K99, FasA 을 발현하는 각 ghost vaccine을 각각 2.5x10^7 cells/25μl로 농축한 후 혼합하여 접종 량이 총 1×10^8 cells/100$\mu\ell$이 되게 한 뒤 -20℃에 보관하여 사용하였다.

4. 백신접종

실험군 및 접종 방법은 아래 표 27과 같이 근육 접종을 하였다.

표 27. K88ab, K88ac, K99 및 FasA 부착인자를 발현하는 고스트 사균 백신을 혼합한 후 근육 접종

그룹	두수	접종균주	접종량			접종경로
			1차 접종	2차 접종	3차 접종	
A	10	Control	PBS	PBS	PBS	근육
B	10	K88ab+K88ac+K99+FasA	1×10^8 cells in 100$\mu\ell$	-	-	근육
C	10	K88ab+K88ac+K99+FasA	1×10^8 cells in 100$\mu\ell$	1×10^8 cells in 100$\mu\ell$	-	근육
D	10	K88ab+K88ac+K99+FasA	1×10^8 cells in 100$\mu\ell$	1×10^8 cells in 100$\mu\ell$	1×10^8 cells in 100$\mu\ell$	근육

5. 가검물 채취

접종 전 그리고 마지막 접종 후 8주째까지 2주 간격으로 sIgA 측정을 위해 분변을 그리고 IgG 측정을 위하여 혈액을 채취하였다. 분변의 경우 분변은 무게를 잰 후 sodium azide가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/㎖가 되도록 부유시킨 후 13,200×rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심 분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

6. ELISA

Salmonella Typhimurium 세포 표면에 발현된 fimbria K88ab, K88ac, K99 그리고 FasA 각 항원에 대해 특이한 sIgA항체와 IgG항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. 수행 방법은 접종량을 결정짓기 위한 실험 2]-1의 ELISA 방법과 동일하게 수행하였다.

9-4-2. 결과

9-3]에서 얻어진 결과로 유추하였을 때 K88ab, K88ac, K99 그리고 FasA ETEC 항원을 발현하는 Ghost vaccine들을 혼합하여 접종하였을 때 sIgA의 역가가 접종 후 2주차가 되었을 때 가장 높은 역가를 나타낸 뒤 접종 후 4주차에는 대조군과 비슷해 졌다. 이러한 sIgA의 역가를 더 오래 유지하기 위하여 접종을 두 차례 그리고 세 차례로 늘리는 백신 부스터 실험을 시행하였다. 총 4 그룹으로 나누어 A 그룹이 대조군일 때 나머지 B, C 그리고 D 그룹의 실험군을 마지막 접종 후 8주간 가검물을 채취하여 ELISA를 수행하였다. 그 결과 혈청에서 얻어진 IgG의 ELISA 수행 결과 B, C 그리고 D 실험그룹은 마지막 접종 후 8주간 역가를 유지하였다 (그림 42). 한번 접종한 B 그룹의 sIgA가 2주에서 한번 역가를 상승 시킨 뒤 떨어지는데 반해 부스터를 시행한 두 그룹에서 그 역가가 약간의 상승 후 유지되어 백신의 지속적인 효과를 볼 수 있었다 (그림 43).

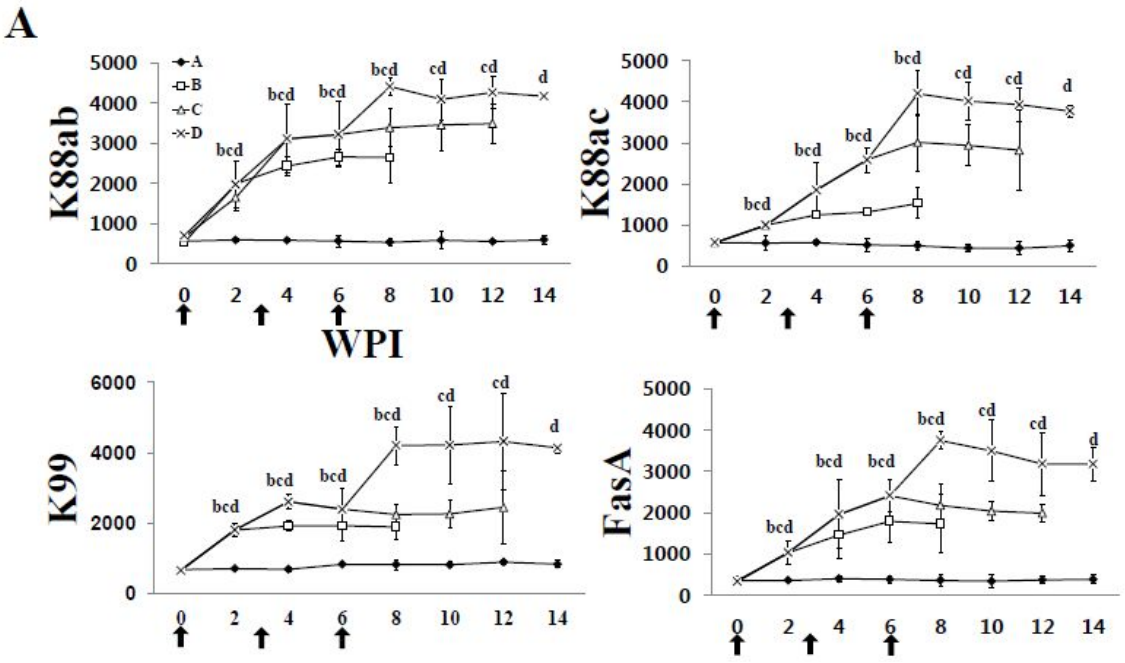


그림 42. Mean total *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine expression ETEC as K88ab, K88ac, K99 and FasA-specific Serum IgG antibody titers at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 weeks post-primerary immunization(A). group A: PBS control, Group B: Prime immunization on 0 weeks, Group C: Prime-booster immunization on 0, 3 weeks Group D; prime-2^{nd} booster immunization on 0, 3, 6weeks. Plasma IgG concentration (μg/ml). Lower case letters indicate a significant difference ($^{*}p \leq 0.05$) between each immunized and control group A (b: group B, c: group C, d: group D).

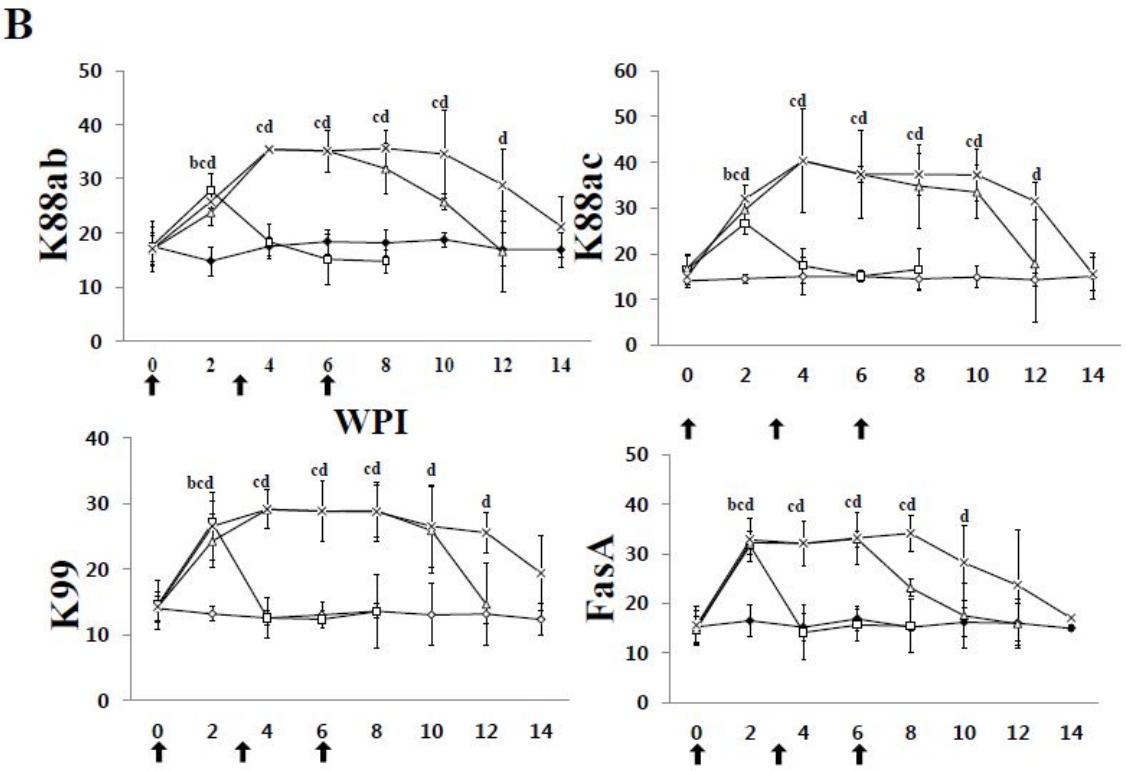


그림 43. Mean total *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine expression ETEC as K88ab, K88ac, K99 and FasA-specific Fecal IgA antibody titers at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 weeks post-primerary immunization (B). group A: PBS control, Group B: Prime immunization on 0 weeks, Group C: Prime-booster immunization on 0, 3 weeks Group D; prime-2nd booster immunization on 0, 3, 6weeks. scretory IgA concentration (μg/ml). Lower case letters indicate a significant difference ($^{*}p \leq 0.05$) between each immunized and control group A (b: group B, c: group C, d: group D).

9-5] 결론

Ghost system은 E lysis gene을 base로 하여 해당 일정한 온도가 되면 활성화 되어 숙주에 구멍을 뚫게 만든다. 그리고 그 안의 세포질을 빠져나가게 하여 숙주 균을 화학적 처리나 물질적 스트레스 없이 자연적으로 사멸시킨다. 따라서 숙주가 가진 Outer membrane protein의 항원성을 그대로 유지 할 수 있으며 내부에 세포질이 없어 더 높은 항원 제시 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 특징을 이용하여 돼지에서 주로 설사 및 부종병과 같은 다양한 장관 감염을 일으키는 장독성 대장균(Enteropathgenic Escherichia coli; ETEC)의 주요 인자 adhesin (fimbriae) F4(K99) F5(K99) F6(987P)를, Salmonella delivery system을 이용하여 발현시켜 Salmonella와 ETEC를 동시에 예방할 수 있는 다가 백신을 개발하였다. 먼저 개발백신의 목적동물에서의 효능을 검증하기 위하여 실험동물인 마우스에서 효과를 확인하였다. 제작된

ETEC를 발현하는 *Salmonella* Typhimurium Ghost vaccines의 적절한 dose를 확인하였으며 그에 따른 적절한 접종 경로를 찾았다. 특히 IM으로 접종하였을 때 CD4+ CD8+ 의 cell population이 동시에 컨트롤에 비해 보다 의의있게 증가하였다. 또한 항체분비를 위한 B cells 의 항원 자극에 대한 cell population 역시 컨트롤 그룹에 비해 증가하였다. 게다가 cell-meidated immune response의 결과 모든 항원에 대한 자극에 의의있게 반응하였다. 특히 점막면역에서 방어에 중점적인 역할을 수행하는 SIgA의 항체 역가는 접종 후 2주차에 그 효과가 가장 높았다. 이 항체를 유지하기 위하여 수행한 2차접종의 결과 그 항체 역가를 최고 6주까지 유지하여 백신이 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 항체 반응의 실질적인 점막에서의 발현을 IHC로 확인할 수 있었다. 따라서 ETEC를 발현하는 Salmoenlla Typhimurium Ghost Vaccines 은 IM으로 $1x10^8$cells/100μl의 dose로 2차 접종하는 것이 적절하다고 판단되었다.

[제1협동과제 : 경남과학기술대학교]

[10] 실험동물에서의 ghost 백신 면역 반응 유도 및 최적화 시험

10-1. 실험방법

1. 사용된 균주 및 플라즈미드

사용된 균주 및 플라즈미드는 표 28에 정리되어 있다. *E. coli* 및 *Salmonella* strain은 현재 연구실에 보관중인 균주 또는 전북대학교 수의과 대학에서부터 분양받은 균주를 사용하였다.

2. PCR (polymerase chain reaction) 및 DNA 조작

목적으로 하는 DNA절편들은 PCR을 사용하여 증폭하였다. PCR을 위한 효소로서 Tag DNA polymerase는 EX-Tag (TaKaRa), Eco-Tag (Solgent)를 사용하였고, *Pfu* DNA polymerase는 invitrogen로부터 구입하여 사용하였다. 목적으로 하는 DNA segment가 insertion되어 있는 recombinant plasmid들은 제한 효소 절단, PCR 및 DNA sequencing (Macrogen)으로 확인하였다.

3. 고스트 세포의 살모넬라균에 대한 보호능력 확인

고스트 세포가 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰하기 위해서 도전실험을 다음과 같이 실시하였다. $1x10^9$ CFU/ml 과 $1X10^8$ CFU/ml 고스트 세포를 경구와 근육으로

각각 접종하고 동량으로 2주 간격으로 2회 추가 접종하였다. 고스트 세포 접종 10주후에 *S. typhimurium* x3339를 $1.8x10^6$으로 경구로 투여하였다. 접종하기 전에 4시간이상 절수 및 절식을 시켰고 접종 후 1시간 후 음수 및 사료를 제공하였다. 접종을 실시한 후 4주 동안 마우스를 관찰하였다.

표 28. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description
E.coli	
Top10	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG
DH5α	*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*
χ7213	*hi-1 thr-1 leuB6 supE44 tonA21 lacY1 recA RP4-2-Tc::Mu λpir, Δasd Δzhf-2::Tn10*
χ6212	*Φ*80d lacZ ΔM15 *deoR Δ(lacZYA-argF)U169 supE44λ⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 ΔasdA4 Δzhf-2::Tn10 hsdR17* (R^- M^+)
JOL500	$F18^+$,LT^+,STa^+,STb^+,$stx2^+$,$stx2e^+$ETECisolatefrompig
JOL599	F4, Sta, Stb, LT
Salmonella	
MMP13	*S. typhimurium* JOL401 *asd*A16
S.typhimurium x8554	
S.typhimurium x3339	Animal-passaged isolate of wild-type strain SL1344
plasmids	
pET28a	a overexpression vector containing pBR322 origin
pBSL14	a vector containing polylinker of the pUC18
pBP527	a temperature sensitive vector containing R101 origin
pYA3332	a vector containing p15A origin
pYA3342	a vector containing pBR origin
pMMP167	x6212 [pYA3342(partial)::asd cI PR28]
pMMP172	x6212 [pMMP167::cI PR28 E lysis::ara]
PMMP184	x6212 [pMMP172::PR28 ompA TM]
pMMP187	x6212 [pMMP184::p15A ori]
pMMP132	x6212 [pMMP81::LT-B]

4. 고스트 세포의 마우스 vaccination

동결 건조된 고스트 세포를 농도별로 희석하여 일주일간 순화된 BALB/c 마우스에 경구 또는 근육으로 접종하였다. 접종량은 경구가 $1X10^9$ CFU/ml로 투여하였고, 근육으로는 10^8 CFU/ml 로 접종하였다. 접종하기 전에 4시간이상 절수 및 절식을 시켰고 접종 후 1시간 후 음수 및 사료를 제공하였다. 접종을 실시한 후 10주 동안 마우스를 관찰하였고 혈액중의 면역글로불린 함량을 측정하기 위한 혈액의 채취는 2주, 4주, 6주, 8주, 10주에서 실시하였다. 또한 분비액 중에 sIgA를 측정하기 위해 질세척액과 분변을 2주, 4주, 6주, 8주, 10주에서 채취하였

다. 사이토카인 함량을 측정하기 위해 지라의 절취는 5주에 실시하였다.

5. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

LPS을 200ng/100ul 농도로 0.05M carbonate 용액 (pH 9.6) 에 넣어서 4℃에서 overnight 시켜서 plate의 표면에 항원을 코팅 시켰다. 코팅용액을 버리고 1xPBS (pH 7,4) 용액으로 한번 washing을 하였다. 1xPBS (pH 7,4) 용액을 완전히 제거한 후 1% skim milk 용액으로 상온에서 30분 blocking 시켰다. Blocking 용액인 1% skim milk 용액을 버리고 새로운 1% skim milk 용액을 넣은 후 샘플(혈액(1:50), 분변(1:2), 질분비액(1:2))을 넣고 2시간 37℃에서 반응 시켰다. 1xPBS (pH 7,4) 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1xPBS (pH 7,4) 용액을 완전히 제거한 후, 2차 항체인 IgG (1:2,000), lgG1 (1:2,000), IgG2a (1:2,000), IgA (1:2000)을 상온에서 2시간 반응 시켰다. 1xPBS (pH 7,4) 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1xPBS (pH 7,4) 용액을 완전히 제거한 후 반응 기질 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405nm에서 발현정도를 관찰하였다.

6. FACS (Fluorescense activated cell sorter)

마우스에 고스트 세포를 경구 및 근육으로 투여하고 5주가 경과한 후 지라 (spleen)을 채취해서 spleen으로부터 분리한 splenocyte을 100ul을 E-tube에 넣고 antibody을 포함하는 형광염색시약을 100ul 넣고 빛이 안 들어가게 호일로 싸서 4℃에서 30분 보관한다. 원심분리 3000rpm, 10분, 4℃시킨다. 상층액을 버리고 2ml의 PBS을 넣어 FACS전용 tube로 옮겨서 관찰했다.

7. RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

마우스에 고스트 세포를 경구 및 근육으로 투여하고 5주가 경과한 후 지라 (spleen)을 채취해서 tissue RNA isolation Kit인 Hybrid-R (Geneall)을 이용해서 RNA를 추출하였다. RTase (ReverTra Ace, TOYOBO)을 이용해서 추출한 RNA 2 ug을 사용해서 cDNA를 합성하였다. mIL-1β, mIL-2, mIL-4, mIL-6, mIL-8, mIFN-ɣ, mTNF-α, mActin 올리고머를 이용해서 PCR을 수행하였다. PCR 조건을 보면, predenaturation, 95℃, 2 min; denaturation, 94℃, 30 sec; annealing, 55℃, 30 sec; extension, 72℃, 45 sec로 PCR를 수행하였다. 결과 확인은 2% agrose gel을 이용해서 확인하였다.

8. 고스트 세포의 목적동물 vaccination

경상남도 함양군에 위치한 천령포크의 농장에서 고스트 세포의 목적동물 vaccination을 시행하였다. 1차 실험에서 모돈 12마리에 $5X10^9$ CFU/2mL로 고스트 세포를 경구와 근육으로 분만 5주, 2주전에 접종하였다. 고스트 세포를 백신화 시키기 전 모돈에서 채혈을 하였고 분만 후 1주안에 채혈을 수행하였다. 자돈은 1주령, 3주령, 5주령에서 채혈을 수행하였다. 2차 실험에서는 모돈 12마리에 $5X10^9$ CFU/2mL로 고스트 세포를 경구와 근육으로 분만 5주, 2주전에 접종하였다. 자돈 1주령에서도 $5X10^9$ CFU/2mL으로 고스트 세포를 근육으로 접종하였다. 고스트 세포를 백신화 시키기 전 모돈에서 채혈을 하였고 분만 후 1주안에 채혈을 수행하였다. 자돈은 1주령, 3주령, 5주령에서 채혈을 수행하였다. 3차 실험에서는 자돈 1주령, 3주령에서만 $5X10^9$ CFU/2mL로 고스트 세포를 경구와 근육으로 접종하였고, 1주령, 3주령, 5주령 때 채혈을 수행하였다.

9. 고스트화된 목적동물에서 살모넬라균에 대한 보호능력 확인

고스트 세포가 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰하기 위해서 도전실험을 다음과 같이 실시하였다. 자돈 5주령일때 JOL500과 JOL599 cell을 $5x10^9$ CFU/10ml으로 2ml씩 경구로 투여하였다. 접종후 3-5일 사이에 항문에 수송배지를 사용해서 분변내에 대장균의 유무를 확인하기 위해서 EMB (Eosin methylene blue) agar와 BAP (Blood agar plate)을 이용해서 선별하였다. FedA, K88ab의 primer를 이용하여 대장균의 유무를 확인하였다.

10-2. 결과

1. 고스트 세포의 구축

pMMP184 plasmid의 골격은 pYA3342이고 pBR ori, MCS 및 *asd* 유전자는 pYA3342로부터 유래 되어졌다 또한, 플라즈미드의 카피수를 낮추기 위해 p15A ori 기원으로 제작된 벡터가 pMMP187이다(그림 44). 고스트 cassette가 PYA3342에 삽입되어져 있다. 고스트 cassette의 구성은 cI-P_{R28} E lysis로 되어 있으면 cI는 P_R 프로모터에 온도 의존적 억제자로서 작용한다. E lysis는 박테리오페이지 ∅X174의 세포용균 단백질로서 온도 의존적으로 발현되어져서 표적 세포를 용균 시키게 한다. 외부항원의 발현을 위해서 arabinose에 발현이 조절되는 araC을 삽입함으로써 상호보완적인 체계를 구축하였다.

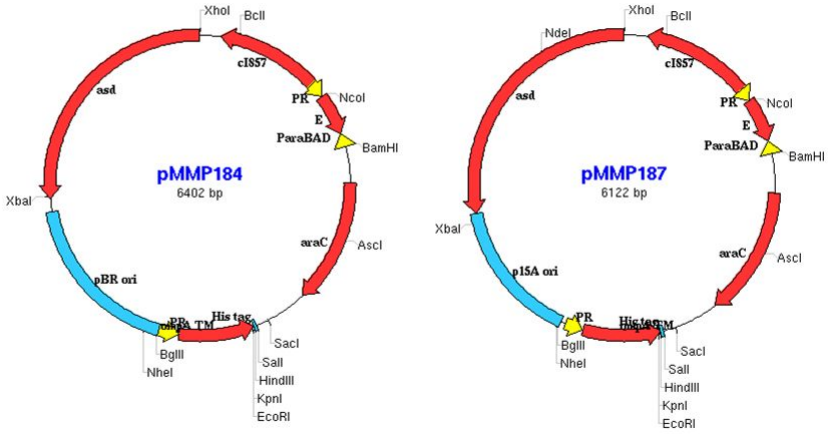


그림 44. pMMP184 및 pMMP187 plasmids의 모식도. pBR ori; 복제기점.

2. 백신 후보 균주들로부터 신생 자돈의 설사와 관련된 FedA, FedF, F41, intimin 발현 결과

구축한 벡터의 시그널 펩티드와 His-epitope를 통해 외부 단백질의 발현을 알아보기 위해 FedA, FedF, F41, intimin 유전자를 제작된 벡터 pMMP184에 제한효소 EcoRI과 HindIII로 절단하여 라이게이션하였다. 상기 라이게이션된 산물은 *asd* 돌연변이주인 *E.coli* x6212에 형질전환하여 EcoRI과 HindIII로 절단한 후 삽입물을 확인하였다. 클로닝된 이들 재조합산물은 각각 MMP13에 형질전환하여 ghost cell을 구축하였다. 상기 형질전환된 *E.coli* x6212에서 FedA, FedF, F41, intimin의 발현량을 측정하기 위해 western blot를 실시하였다. 1차 항체는 상업적으로 판매하고 있는 mouse에서 발현된 His-epitope 항체(IgG Therapy Co.)를 1차 항체로 사용하였다. 2차 항체는 염소에서 발현된 항 mouse IgG에 HRP(horseradish peroxidase)에 접합한 항체를 사용하였다. 그 결과, FedA, FedF, F41, intimin의 발현의 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 45).

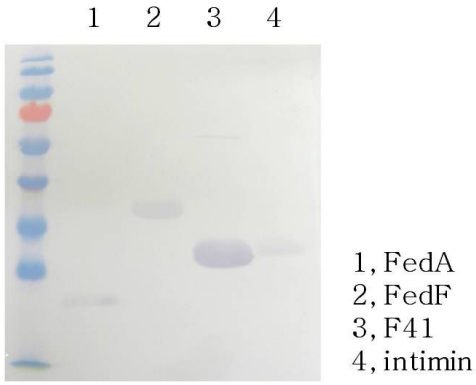


그림 45. 각 외부항원인 FedA, FedF, F41, intimon의 발현정도를 실험한 결과. 각 균주를 배양기에서 키운 후, 일반적인 western blotting 방법에 준하여 실시되었다. 1′Ab는 마우스 anti-His tag을 사용하였고, 2′Ab는 Goat anti 마우스 HRP conjucation된 것을 사용하였다.

3. ELISA를 통한 근육으로 고스트 백신을 투여한 마우스의 면역유도 결과

접종 전 그리고 접종 후 2, 4, 6, 8, 10주째에 혈청, vaginal washing samples, fecal samples을 채취하였다. 고스트 백신을 접종 후에 1, 3주에 2주 간격으로 2번 더 접종 하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. fecal samples은 무게를 잰 후 PBS로 100mg/㎖가 되도록 부유시킨 후 최고속도에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. Vaginal washing samples은 100 ul PBS로 질내부를 세척한 후 사용하였다.

혈청, Fecal samples, vaginal washing samples (2, 4, 6, 8, 10주)에서 *Salmonella* LPS에 specific한 항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. sample well에는 Salmonella LPS를 200ng/well 의 농도로, standard well에는 goat anti-mouse IgG/IgG1/IgG2a 혹은 rabbit anti-mouse IgA를 각각 200ng/well의 농도로 분주 한 후 4℃ overnight 하여 coating 하였다. Coating 된 plate는 PBS로 3번 washing 한 후 blocking buffer (1% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum은 PBS로 1:50으로 vaginal washing samples과 fecal samples은 1:2로 각각 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 2시간~4시간 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a HRP 그리고 IgA level에 대해서는 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA HRP를 1:2,000의 배율로 희석하여 각 well에 100㎕씩 분주한 후 37℃에서 2시간 동안 반응 시켰다. PBS 용액을 완전히 제거한 후 반응 기질 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405nm에서 발현정도를 관찰하였다.

그 결과 그림 46, 47, 48에 나타난 바와 같이, 혈청에서의 IgG, IgG1, IgG2a의 발현이 고스트 백신을 투여한 후 4주째부터 Control에 비해서 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 그림 49에 나타난 바와 같이, fecal samples에서의 sIgA의 발현은 FedA의 경우 4주째와 6주째에 발현이 증가하고 감소하는 것 확인할 수 있었고, intimin은 4주째에만 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. vaginal washing samples 에서의 sIgA의 발현을 보면, FedA, FedF, F41, intimin의 항원이 투여된 마우스에서 4주째에 발현이 증가하다가 점차적으로 발현이 감소하는 패턴을 보였다 (그림 50). 그리고 각 항원에서의 발현정도를 보면 그림 51, 52, 53에서 나타난 바와 같이, 혈청에서는 고스트 백신을 투여한 후 total IgG는 4주째부터 발현이 점차 증가하고 IgG1, IgG2a는 6주째부터 발현이 증가하는 패턴을 보였다. 또한 fecal samples에서의 sIgA의 발현을 보면, FedA, FedF, intimin는 6주째부터 증가하고, F41는 발현이 일정하게 증가하지는 안고 증가하다가 감소하다 다시 증가하는 경향을 보였다. vaginal washing samples 에서의 sIgA의 발현을 보면, FedA는 control로 발현에서 차이점을 찾을 수 없었고

FedF는 6주째에 발현이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 마지막으로 F41, intimin은 4주째에 증가하다가 6주째에 최고점을 찍고 다시 감소하는 패턴을 보였다

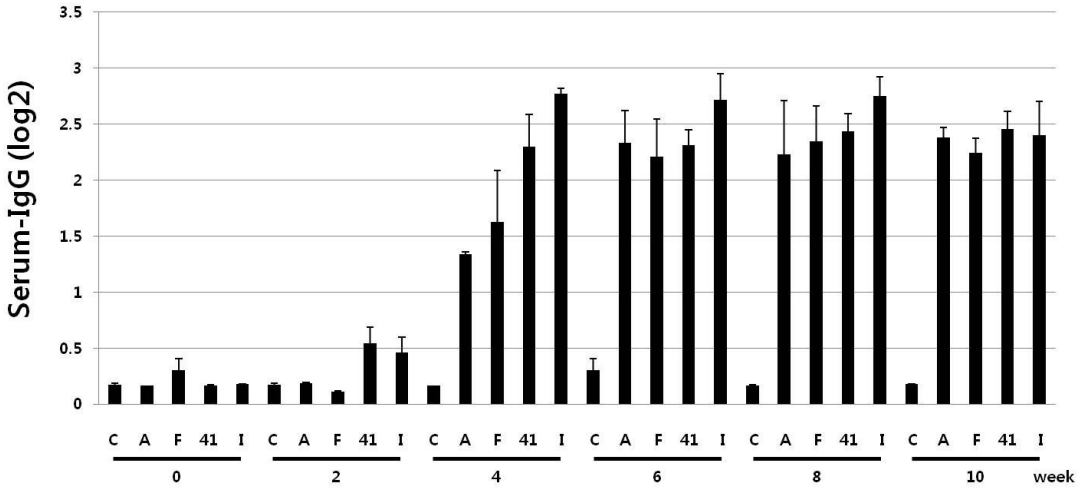


그림 46. 고스트백신을 근육주사(IM)로 투여한 후 혈청으로부터 LPS (Lipopolysaccharides)에 항원에 대해 Total IgG 측정한 결과. LPS를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG, 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. C, PBS만 IM으로 투여한 마우스; A, FedA 항원을 IM으로 투여한 마우스; F, FedF 항원을 IM으로 투여한 마우스; 41, F41 항원을 IM으로 투여한 마우스; I, intimin 항원을 IM으로 투여한 마우스. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도 반응의 정도를 log값 나타내었다.

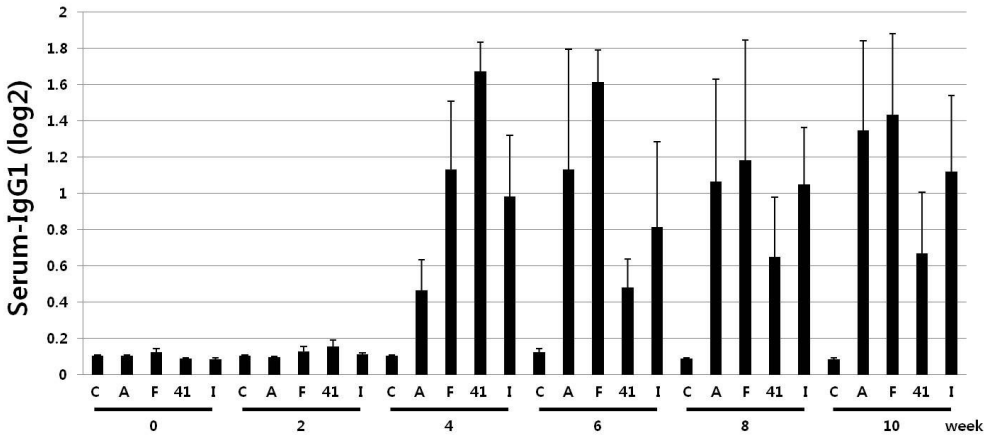


그림 47. 고스트백신을 근육주사(IM)로 투여한 후 혈청으로부터 LPS에 대해 IgG1 측정한 결과. LPS를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 IgG1, 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. C, PBS만 IM으로 투여한 마우스; A, FedA 항원을 IM으로 투여한 마우스; F, FedF 항원을 IM으로 투여한

마우스; 41, F41 항원을 IM으로 투여한 마우스; I, intimin 항원을 IM으로 투여한 마우스. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

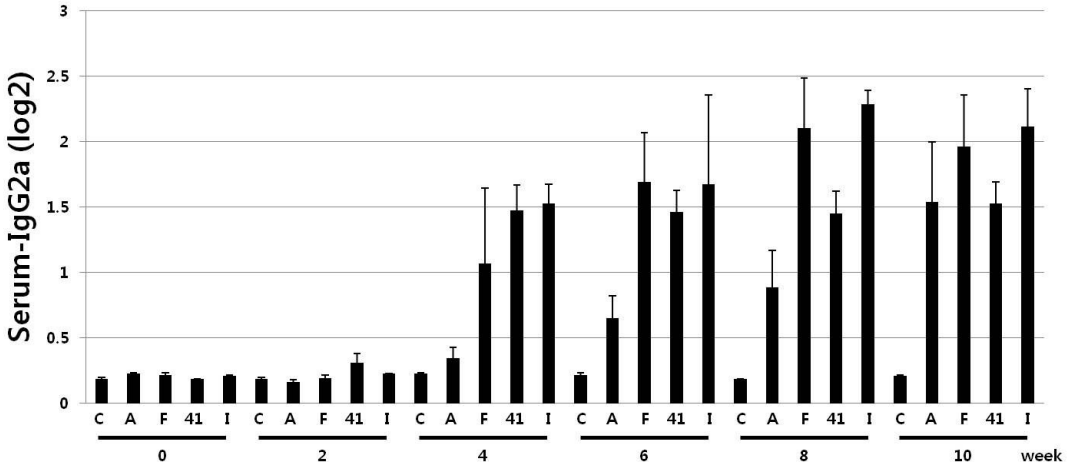


그림 48. 고스트백신을 근육주사(IM)로 투여한 후 혈청으로부터 LPS에 대해 IgG2a 측정한 결과. LPS를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 IgG2a, 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. C, PBS만 IM으로 투여한 마우스; A, FedA 항원을 IM으로 투여한 마우스; F, FedF 항원을 IM으로 투여한 마우스; 41, F41 항원을 IM으로 투여한 마우스; I, intimin 항원을 IM으로 투여한 마우스. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

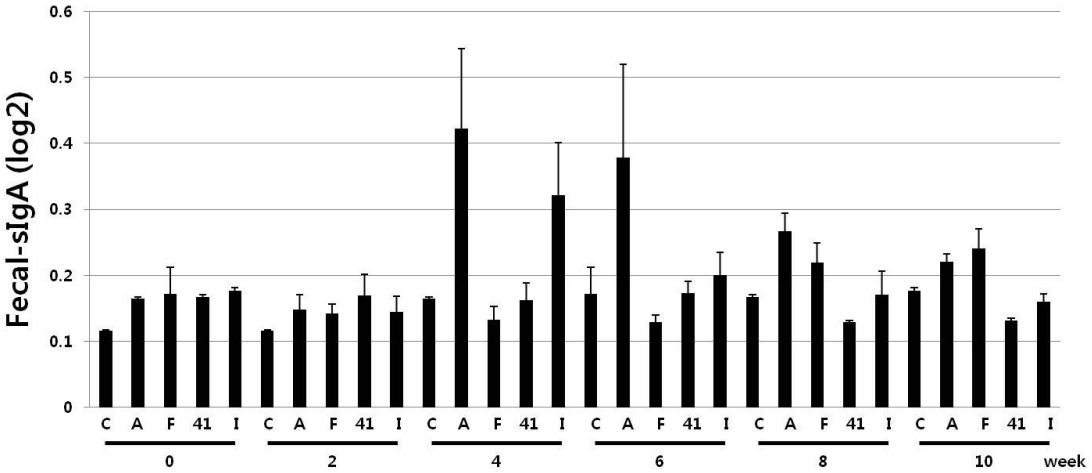


그림 49. 고스트 백신을 근육주사(IM)로 투여한 후 fecal samples로 부터의 LPS 항원에 대해 sIgA측정한 결과. LPS를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 sIgA, 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였

다. C, PBS만 IM으로 투여한 마우스; A, FedA 항원을 IM으로 투여한 마우스; F, FedF 항원을 IM으로 투여한 마우스; 41, F41 항원을 IM으로 투여한 마우스; I, intimin 항원을 IM으로 투여한 마우스. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

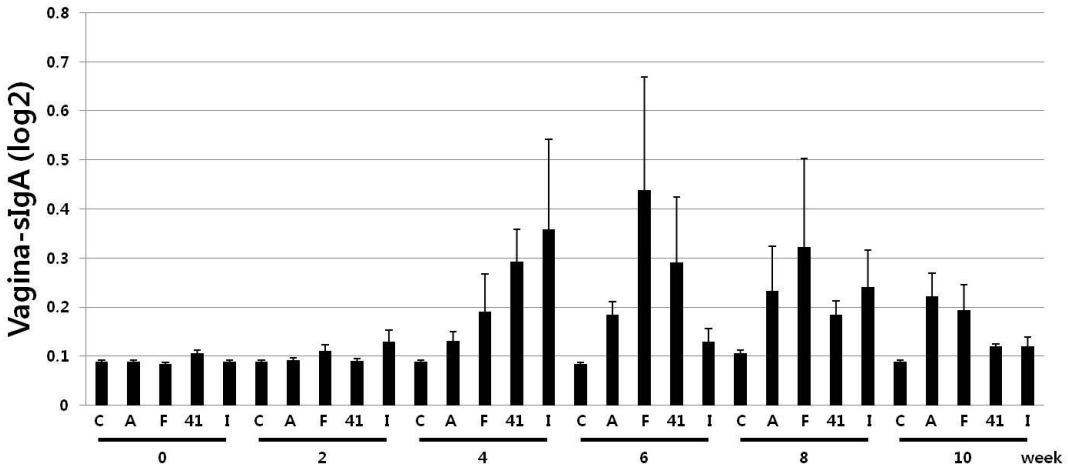


그림 50. 고스트 백신을 근육주사(IM)로 투여한 후 vaginal washing samples 부터의 LPS에 대해 sIgA측정한 결과. LPS를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 sIgA, 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. C, PBS만 IM으로 투여한 마우스; A, FedA 항원을 IM으로 투여한 마우스; F, FedF 항원을 IM으로 투여한 마우스; 41, F41 항원을 IM으로 투여한 마우스; I, intimin 항원을 IM으로 투여한 마우스. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

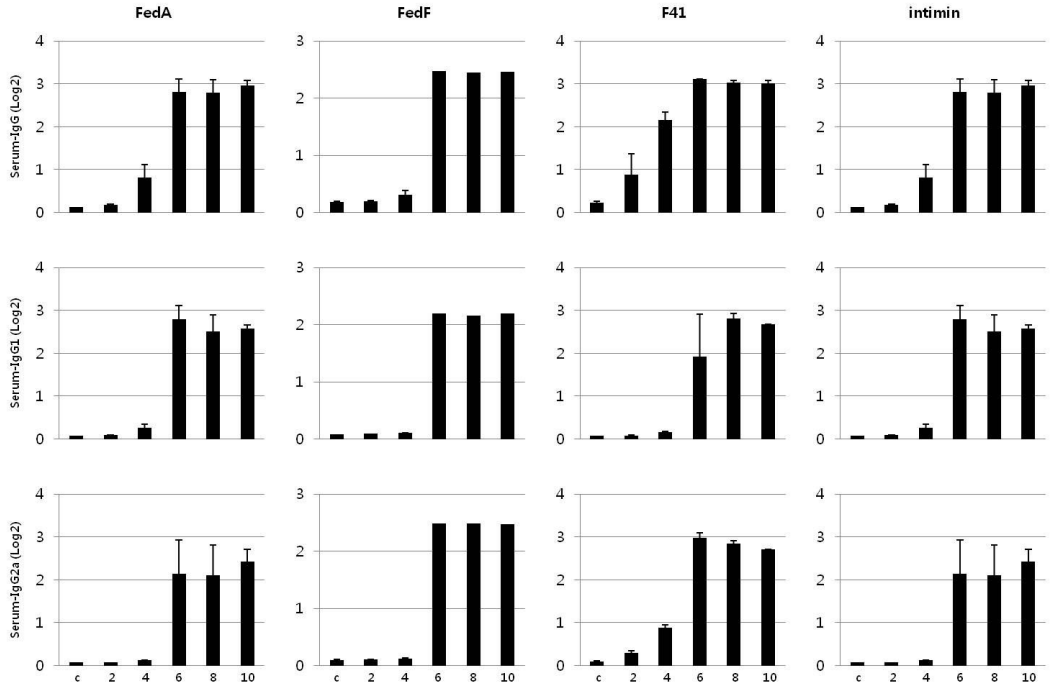


그림 51. 고스트 백신을 근육주사(IM)로 투여한 후 혈청으로 각 항원에 대해 IgG subtype 측정한 결과. 각 항원을 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG, lgG1, IgG2a는 1:2,000 비율로 혈청샘플에 처리 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

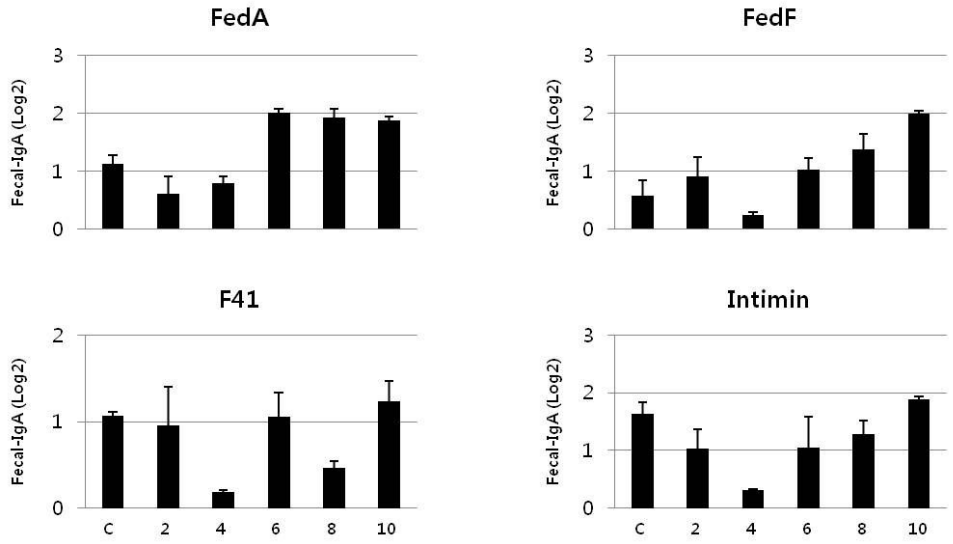


그림 52. 고스트 백신을 근육주사(IM)로 투여한 후 Fecal로 각 항원에 대해 sIgA 측정한 결과. 각 항원을 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 sIgA는 1:2,000 비율로 Fecal sample에 처리 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

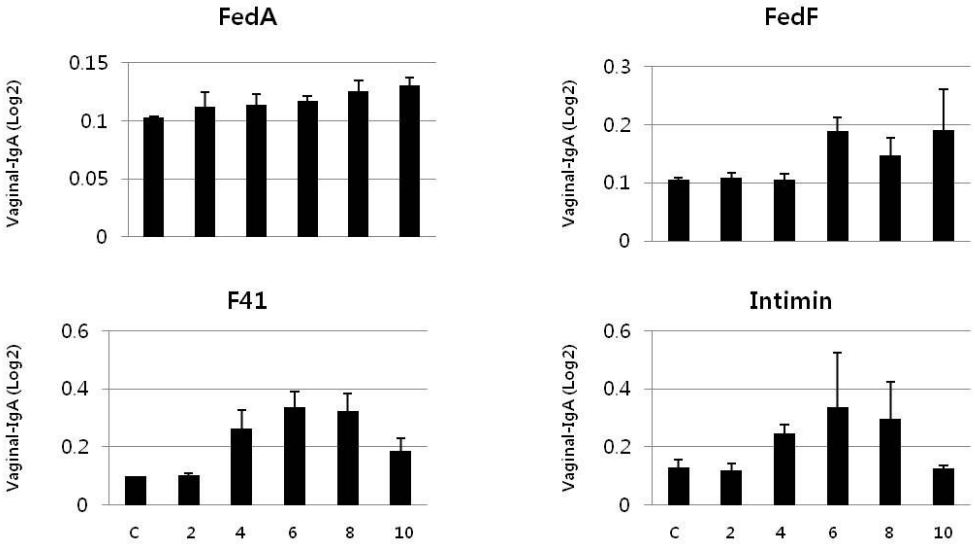


그림 53. 고스트 백신을 근육주사(IM)로 투여한 후 vaginal washing samples로부터 각 항원에 대해 sIgA 측정한 결과. 각 항원을 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 sIgA는 1:2,000 비율로 vaginal washing samples에 처리 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

4. 근육으로 고스트 백신을 투여한 마우스에서 T-cell과 B-cell의 분포도 확인 실험

고스트 백신을 투여한 마우스에서 T-cell과 B-cell의 분포도를 알아보기 위해서 FACS를 시행하였다. 마우스에 고스트 백신을 투여한 후 5주째에 고스트 백신을 투여한 마우스와 PBS만 투여한 마우스로부터 spleen을 재취한 후 spleen으로부터 splenocyte를 각각 분리하였다. 분리한 splenocyte에 mouse T lymphocyte subset antibody cocktail 과 Mouse B lymphocyte subset antibody cockail 을 이용해서 형광물질을 부착시킨 후 T-cell과 B-cell의 분포를 확인하였다. 그 결과 그림 54에 나타난 바와 같이, T-cell 분포를 보면 다음과 같다. FedA, FedF, F41, intimin의 항원이 투여된 마우스에서 PE-Cy7 CD3e에서의 분포가 control인 isotype control보다 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 그림 55에 나타난 바와 같이, B-cell의 분포를 보면 다음과 같다. 그림 54의 결과인 T-cell의 분포와는 다르게 PE-Cy7 CD45R/B220와 PE-CD23의 분포에는 아무런 영향을 주지 않았다.

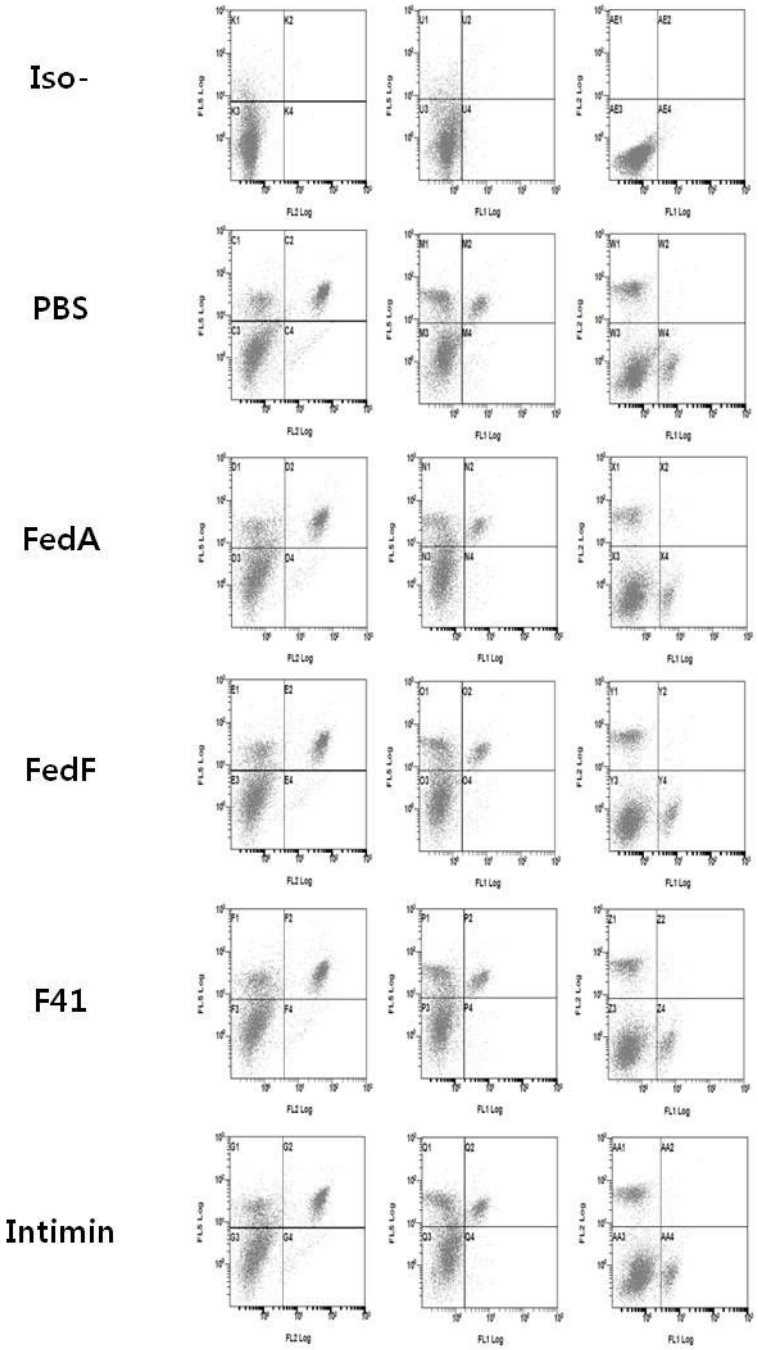


그림 54. 고스트백신을 근육주사(IM)로 투여한 각 항원별 마우스의 spleen으로부터 분리한 splenocyte의 T-cell을 분포. 마우스에 고스트 백신을 투여한 후 5주째에 고스트 백신을 투여한 마우스와 PBS만 투여한 마우스로부터 spleen을 재취한 후 splenocyte를 각각 분리하였다. 왼쪽 그림은 X축이 PE CD4PE-Cy7 CD3e을 나타내고 Y축은 PE-Cy7 CD3e를 나타낸다. 가운데 그림은 X축이 FITC CD8a을 나타내고 Y축은 PE-Cy7 CD3e를 나타낸다. 오른쪽 그림은 X축이 FITC CD8a을 나타내고 Y축은 PE CD4를 나타낸다. -iso, Isotype; PBS, PBS만 투여한 마우스를 나타낸다.

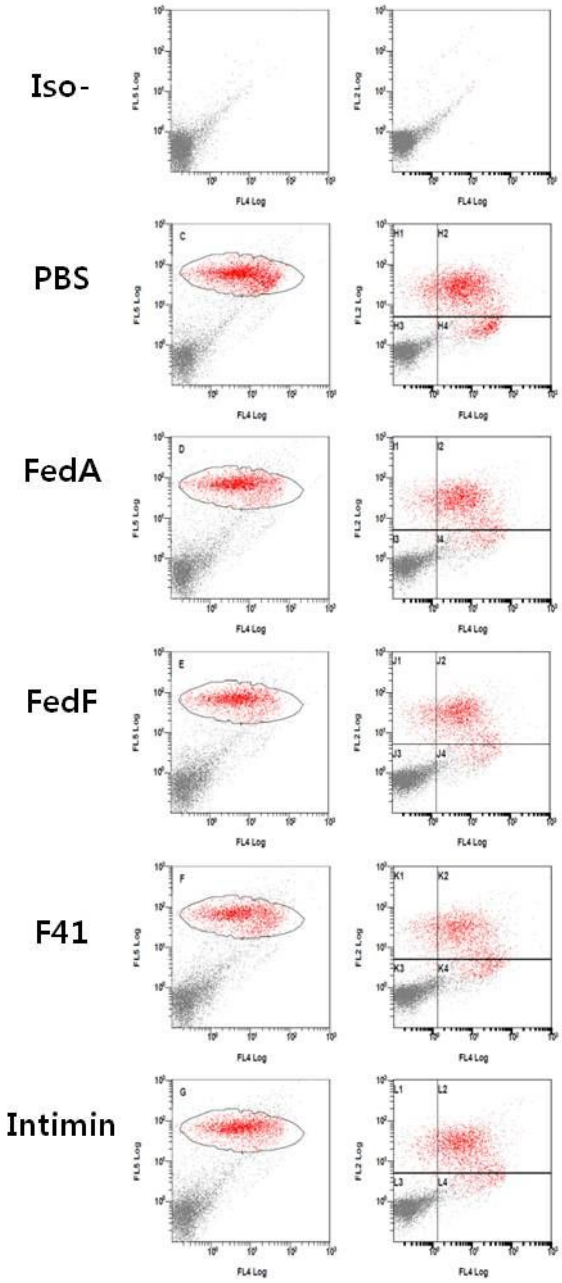


그림 55. 고스트백신을 근육주사(IM)로 투여한 각 항원별 마우스의 spleen으로부터 분리한 splenocyte의 B-cell을 분포. 마우스에 고스트 백신을 투여한 후 5주째에 고스트 백신을 투여한 마우스와 PBS만 투여한 마우스로부터 spleen을 재취한 후 splenocyte를 각각 분리하였다. 왼쪽 그림은 X축이 APC sIgM을 나타내고 Y축은 PE-Cy7 CD45R/B220를 나타낸다. 오른쪽 그림은 X축이 APC sIgM을 나타내고 Y축은 PE CD23APC sIgM를 나타낸다. -iso, Isotype; PBS, PBS만 투여한 마우스를 나타낸다.

5. 근육으로 접종한 고스트 백신이 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰 실험

고스트 백신이 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰하기 위해서 도전실험을 다음과 같이 실시하였다. *S.typhimurium* X3339를 LB broth에 접종하여 37℃ 배양기에서 A600 0.8 OD 값이 되도록 배양한 후 멸균 PBS로 20 ㎕안에 2 × 10^7CFU가 되도록 희석한 후 접종 10주째에 20 ㎕씩 경구 접종하였다. 경구로 도전감염 후 30일 동안 매일 2회씩 폐사 여부를 확인하였다.

그 결과 그림 56에 나타난 바와 같이, control 마우스는 살모넬라균을 투여한지 10일째에 폐사하기 시작해서 14일째에는 모든 control 마우스가 폐사하였다. Intimin의 항원을 투여한 마우스의 경우 생존율이 25% 정도로 낮은 생존율을 보였다. 그에 반해 FedA, FedF, F41의 항원을 투여한 마우스는 10-11일째에 폐사가 일어나지만, 14일째부터는 폐사가 일어나지 않고 생존율이 50%정도 되는 것을 확인할 수 있었다.

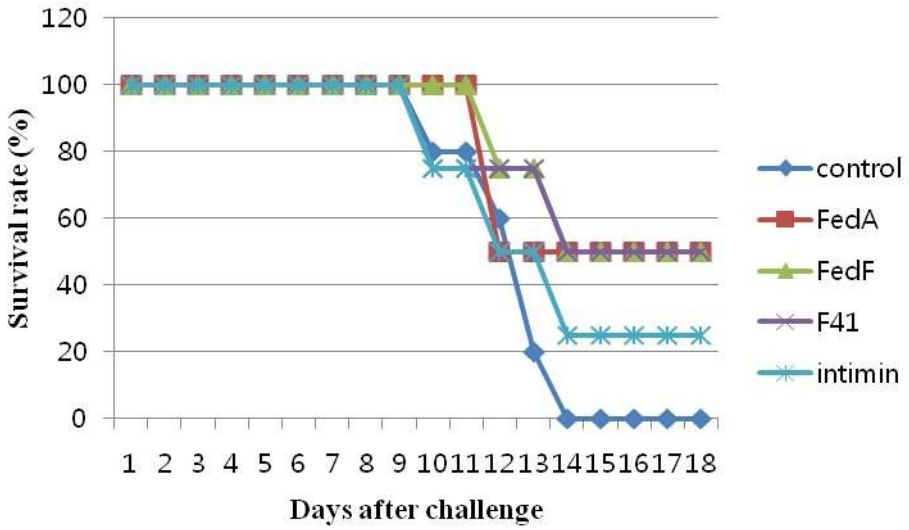


그림 56. 각 항원별로 고스트 세포의 challenge test 결과. X축은 도전실험이 시작된 후 경과일수를 나타내고 Y축은 생존율을 나타낸다. control, PBS 접종; IM, 1x10^8CFU/ml으로 세 번 근육 접종 (FedA, FedF, F41, Intimin).

6. RT-PCR을 이용한 Gene Expression 결과

고스트 세포를 근육으로 처리한 마우스에서 면역반응을 관찰하기 위해 사이토카인 중에 mIL-2, mIL-4, mIL-6, mIL-8, mIFN-ɣ, mTNF-α, mActin등의 유전자 발현 변화에 대해 관찰하였다. 그림 57은 항원인 FedA, FedF, F41, intimin을 처리하고 5주후에, mIL-2, mIL-4, mIL-6, mIL-8, mIFN-ɣ, mTNF-α을 관찰한 결과이다. 5주째에 mIL-6와 mIFN-ɣ 유전자의 발현레벨이 증가하였고, 나머지 mIL-2, mIL-4, mIL-8, mTNF-α는 control과 비슷하게 발현하

였다.

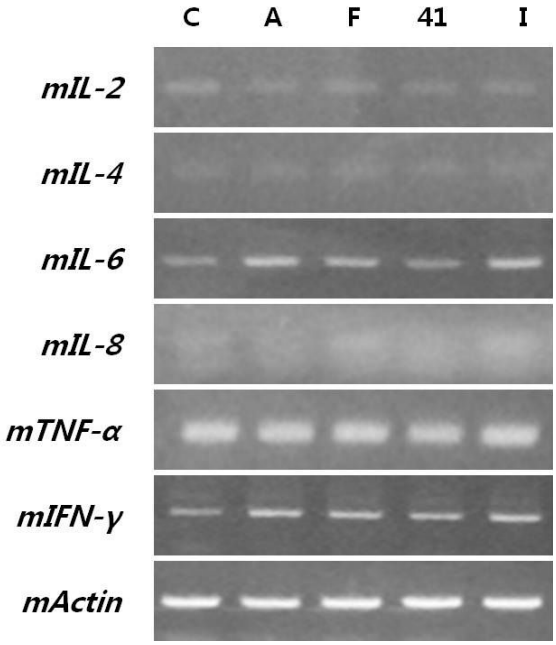


그림 57. 각 항원을 운반하는 고스트 세포를 처리한 마우스에서 사이토카인 발현의 분석. Intimin, FedA, FedF, F41를 각각 함유하는 고스트 세포를 마우스에 근육로 접종하여 5주 후에 지라를 분리하여 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고 mIL-2, mIL-4, mIL-6, mIL-8, mIFN-ɣ, mTNF-α, mActin의 유전자 발현 레벨을 관찰하였다. mActin는 유전자 발현 레벨의 기준으로 사용하였다. C, control 샘플; A, FedA를 자극한 후 5주째 샘플; F, FedF를 자극한 후 5주째 샘플; F41, F41를 자극한 후 5주째 샘플; I, Intime를 자극한 후 5주째 샘플 나타내었다.

7. 경구로 고스트 세포를 접종한 마우스의 면역유도 실험 결과

접종 전 그리고 접종 후 2, 4, 6, 8, 10주째에 혈청, vaginal washing samples, fecal samples을 채취하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

혈청 samples (2, 4, 6, 8, 10주)에서 *Salmonella* LPS에 specific한 항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. sample well에는 Salmonella LPS를 200ng/well 의 농도로 분주 한 후 4℃ overnight 하여 coating 하였다. Coating 된 plate는 PBS로 3번 washing 한 후 blocking buffer (1% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum은 PBS로 1:50으로 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 2시간~4시간 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG HRP를 1:2,000의 배율로 희석하여 각 well에 100 μ씩 분주한 후 37℃에서 2시간 동안 반응 시켰다. PBS 용액을 완전히 제거한 후 반응 기질 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분

동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405nm에서 발현정도를 관찰하였다.

그 결과 혈청에서의 Total IgG 발현을 보면, 그림 58에서 나타난 바와 같이, LPS로 관찰했을 경우에는 FedA는 4주째, F41는 8주째, intimin 6주째부터 증가하는 경향을 보였다. 그에 반해 FedF는 6주째 증가하다가 8주째 최고점을 도달하고 다시 감소하는 패턴을 보였다. 각 항원에서의 발현을 알아보면, 그림 59에서 나타난 바와 같이, control과 별다른 차이점을 찾을 수 없었다.

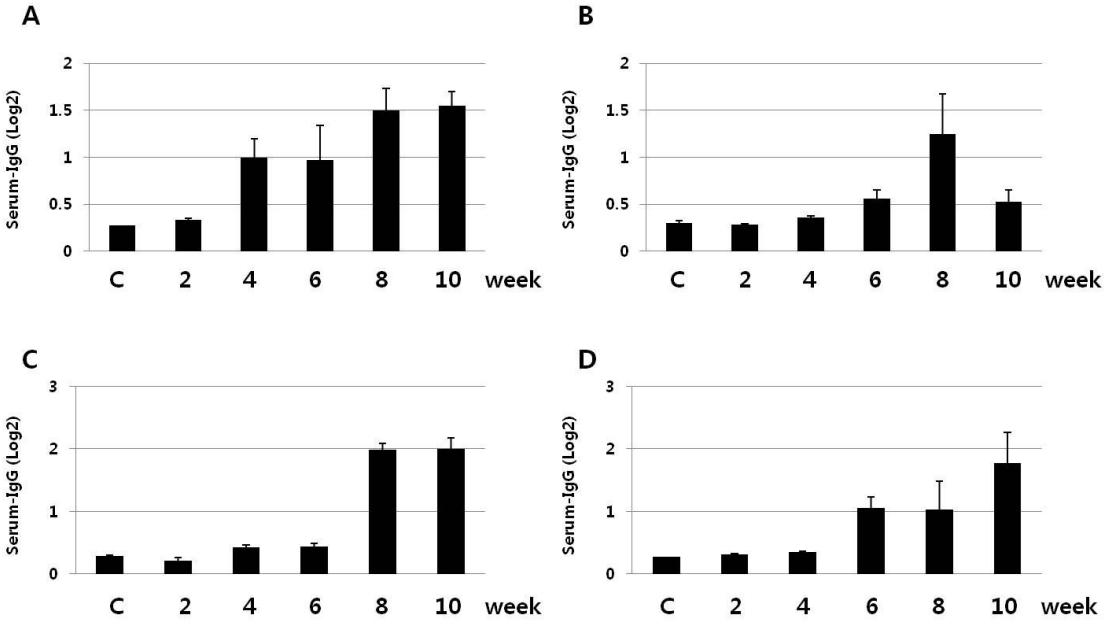


그림 58. 고스트화 세포를 경구 (Orally)로 투여한 후 LPS (Lipopolysaccharides) 항원에 대해 Total IgG 측정한 결과. 항원인 LPS를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2'Ab인 Total IgG는 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. A, 고스트 세포인 FedA를 마우스에 경구 접종 한 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; B, 고스트 세포인 FedF를 마우스에 경구 접종 한 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응; C, 고스트 세포인 F41를 마우스에 경구 접종 한 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응응; D, 고스트 세포인 intimin를 마우스에 경구 접종 한 혈청에서의 Total IgG 면역유도 반응. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

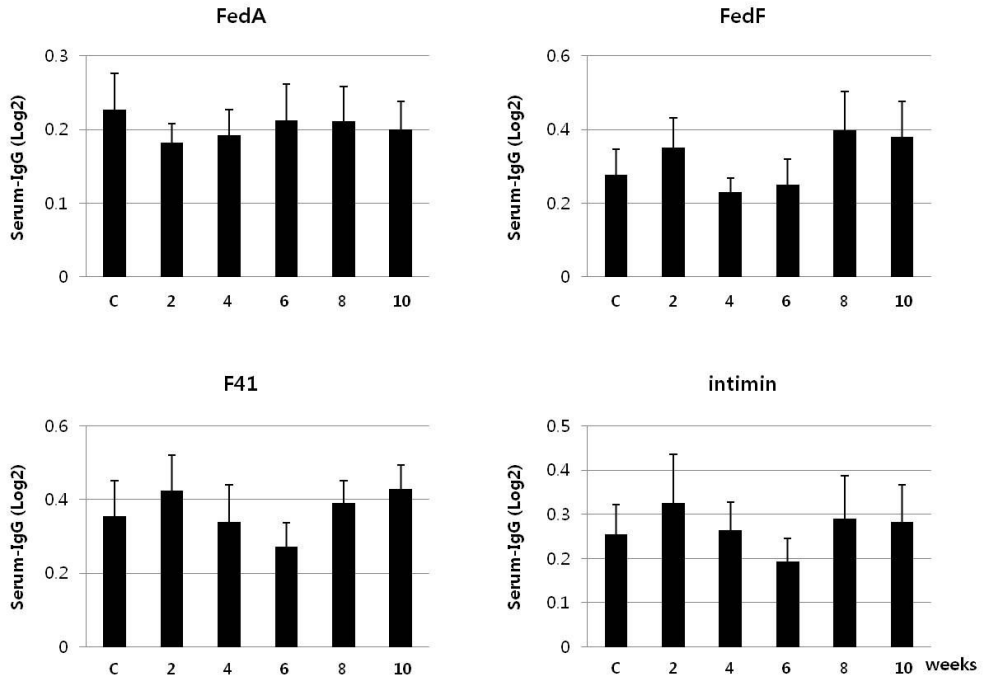


그림 59. 고스트화 세포를 경구 (Orally)로 투여한 후 혈청으로부터 각 항원에 대해 Total IgG 측정한 결과. 각 항원을 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG는 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

8. 경구로 고스트 백신을 투여한 마우스에서 T-cell과 B-cell의 분포도 확인 실험

고스트 백신을 투여한 마우스에서 T-cell과 B-cell의 분포도를 알아보기 위해서 FACS를 시행하였다. 마우스에 고스트 백신을 경구로 투여한 후 5주째에 고스트 백신을 투여한 마우스와 PBS만 투여한 마우스로부터 spleen을 재취한 후 spleen으로부터 splenocyte를 각각 분리하였다. 분리한 splenocyte에 mouse T lymphocyte subset antibody cocktail 과 Mouse B lymphocyte subset antibody cockail 을 이용해서 형광물질을 부착시킨 후 T-cell과 B-cell의 분포를 확인하였다. 그 결과 그림 60에 나타난 바와 같이, T-cell 분포를 보면 다음과 같다. FedF 항원만 투여된 마우스에서 PE CD4와 PE-Cy7 CD3e에서의 분포가 control 보다 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만 다른 항원에서는 별다른 차이점을 찾을 수 없었다. 그림 61에 나타난 바와 같이, B-cell의 분포를 보면 다음과 같다. FedA, F41, intimin 항원이 투여된 마우스에서 PE-Cy7 CD45R/B220와 APC sIgM의 분포에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

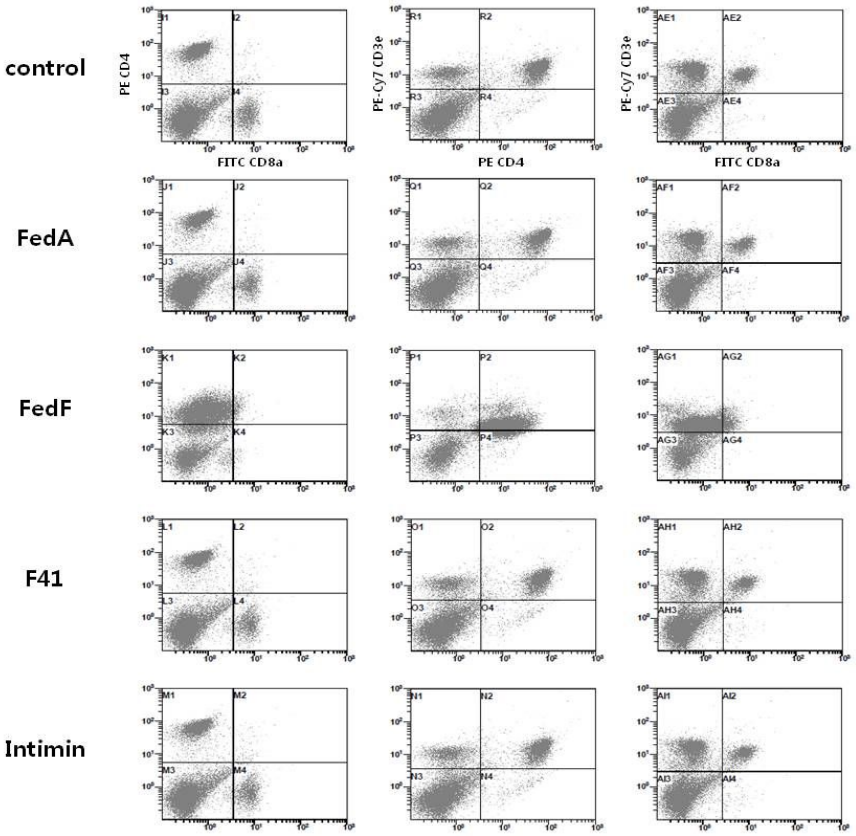


그림 60. 고스트백신을 경구(Oral)로 투여한 각 항원별 마우스의 spleen으로부터 분리한 splenocyte의 T-cell을 분포. 마우스에 고스트 백신을 경구로 투여한 후 5주째에 고스트 백신을 투여한 마우스와 PBS만 투여한 마우스로부터 spleen을 재취한 후 splenocyte를 각각 분리하였다. 왼쪽 그림은 X축이 FITC CD8a을 나타내고 Y축은 PE CD4를 나타낸다. 가운데 그림은 X축이 PE CD4을 나타내고 Y축은PE-Cy7 CD3를 나타낸다. 오른쪽 그림은 X축이 FITC CD8a을 나타내고 Y축은 PE-Cy7 CD3를 나타낸다. -iso, Isotype; PBS, PBS만 투여한 마우스를 나타낸다.

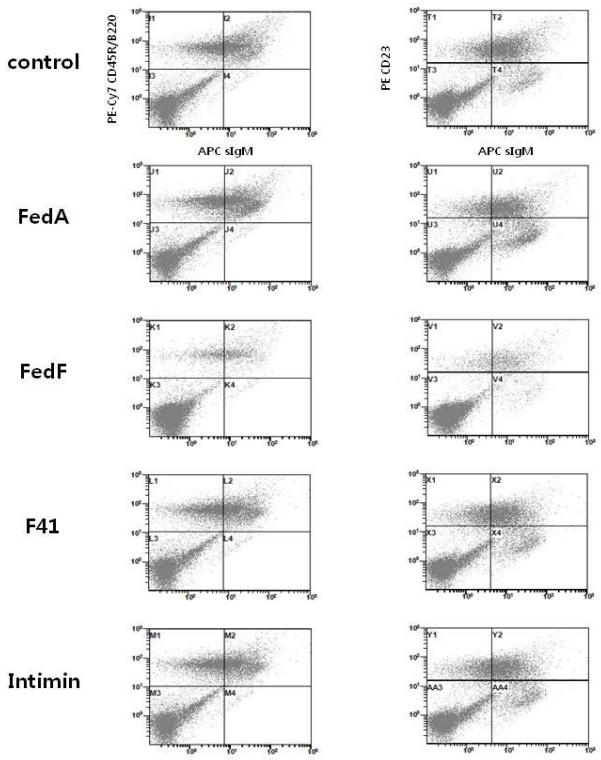


그림 61. 고스트백신을 경구(Oral)로 투여한 각 항원별 마우스의 spleen으로부터 분리한 splenocyte의 B-cell을 분포. 마우스에 고스트 백신을 경구로 투여한 후 5주째에 고스트 백신을 투여한 마우스와 PBS만 투여한 마우스로부터 spleen을 재취한 후 splenocyte를 각각 분리하였다. 왼쪽 그림은 X축이 APC sIgM을 나타내고 Y축은 PE-Cy7 CD45R/B220를 나타낸다. 오른쪽 그림은 X축이 APC sIgM을 나타내고 Y축은 PE CD23를 나타낸다. control, PBS만 투여한 마우스를 나타낸다.

9. 경구로 접종한 고스트 백신이 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰 실험

고스트 백신이 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰하기 위해서 도전실험을 다음과 같이 실시하였다. *S.typhimurium* X3339를 LB broth에 접종하여 37℃ 배양기에서 A600 0.8 OD값으로 배양한 후 멸균 PBS로 20 ㎕안에 2 × 10^7CFU가 되도록 희석한 후 접종 10주째에 20 ㎕씩 경구 접종하였다. 경구로 도전감염 후 18일 동안 매일 2회씩 폐사 여부를 확인하였다.

그 결과 그림 62 나타난 바와 같이, control 마우스는 살모넬라균을 투여한지 9일째에 폐사하기 시작해서 16일째에는 모든 control 마우스가 폐사하였다. FedA, F41의 항원을 투여한 마우스의 경우 생존율이 25% 정도로 낮은 생존율을 보였다. 그에 반해 FedF, intimin의 항원을 투여한 마우스는 9일째에 폐사가 일어나지만, 13일째부터는 폐사가 일어나지 않고 생존율이 50%정도 되는 것을 확인할 수 있었다.

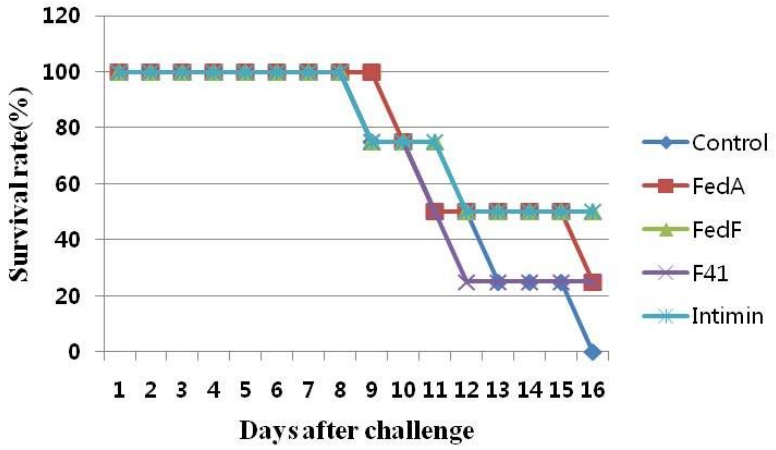


그림 62. 각 항원별로 고스트 세포의 challenge test 결과. X축은 도전실험이 시작된 후 경과일수를 나타내고 Y축은 생존율을 나타낸다. control, PBS 접종; Oral, $1x10^9$CFU/ml으로 세 번 경구로 접종 (FedA, FedF, F41, Intimin) 하였다.

10. RT-PCR을 이용한 Gene Expression 결과

고스트 세포를 경구로 처리한 마우스에서 면역반응을 관찰하기 위해 사이토카인 중에 mIL-4, mIL-5, mIL-6, mIFN-ɣ, mTNF-α, mActin등의 유전자 발현 변화에 대해 관찰하였다. 그림 63은 항원인 FedA, FedF, F41, intimin을 처리하고 5주후에, mIL-2, mIL-4, mIL-6, mIL-8, mIFN-ɣ, mTNF-α을 관찰한 결과이다. 5주째에 mIL-6의 유전자의 발현레벨이 증가하였고, 나머지 mIL-4, mIL-5, mIFN-ɣ, mTNF-α는 control과 비슷하게 발현하였다.

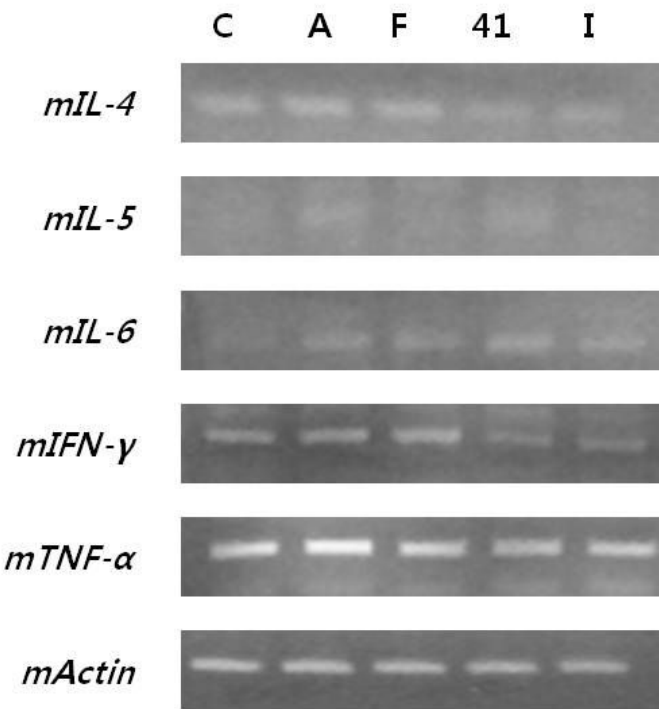


그림 63. 각 항원을 운반하는 고스트 세포를 처리한 마우스에서 사이토카인 발현의 분석. FedA, FedF, F4, intimin를 각각 함유하는 고스트 세포를 마우스에 경구로 접종하여 5주 후에 지라를 분리하여 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고 mIL-4, mIL-5, mIL-6, mIFN-ɣ, mTNF-α, mActin의 유전자 발현 레벨을 관찰하였다. mActin는 유전자 발현 레벨의 기준으로 사용하였다. C, control 샘플; A, FedA를 자극한 후 5주째 샘플; F, FedF를 자극한 후 5주째 샘플; F41, F41를 자극한 후 5주째 샘플; I, Intime를 자극한 후 5주째 샘플 나타내었다.

11. ELISA를 통한 근육으로 4가지 항원을 함께 고스트 백신을 투여한 마우스의 면역유도 결과

접종 전 그리고 접종 후 2, 4, 6, 8, 10주째에 혈청, vaginal washing samples, fecal samples을 채취하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

혈청, Fecal samples, vaginal washing samples (2, 4, 6, 8, 10주)에서 *Salmonella* LPS에 specific한 항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. sample well에는 *Salmonella* LPS를 200ng/well 의 농도로 분주 한 후 4℃ overnight 하여 coating 하였다. Coating 된 plate는 PBS로 3번 washing 한 후 blocking buffer (1% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum은 PBS로 1:50으로 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 2시간~4시간 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG HRP를 1:2,000의

배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 2시간 동안 반응 시켰다. PBS 용액을 완전히 제거한 후 반응 기질 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405nm에서 발현정도를 관찰하였다.

그 결과 그림 64에 나타난 바와 같이, 혈청에서의 total IgG의 발현을 4가지 항원을 함께 고스트 백신으로 1번, 2번, 3번 투여한 경우 Control과 비교했을 경우 2주째부터 조금씩 증가하는 경향이 보이다가 8주째에서 total IgG의 발현이 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

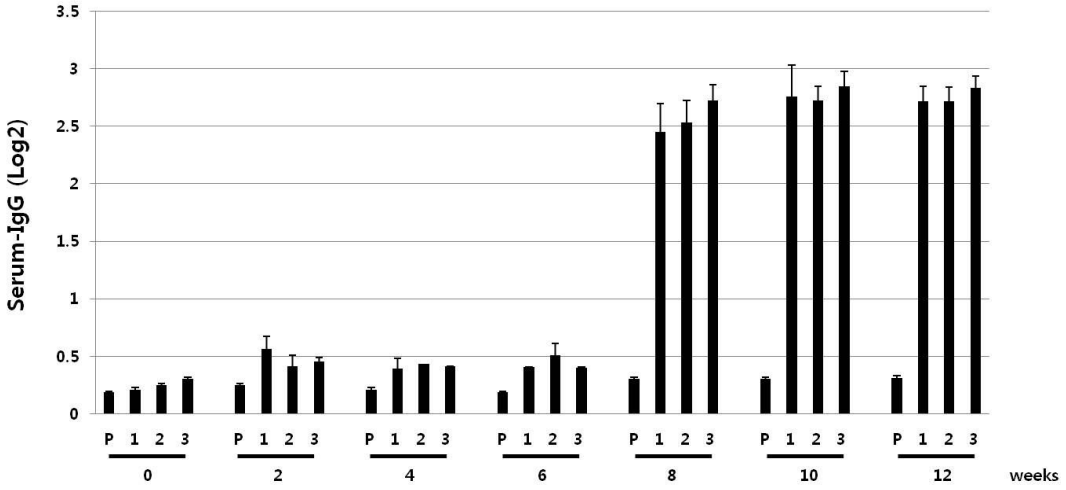


그림 64. 4가지의 항원을 함께 고스트 백신을 근육주사(IM)로 투여한 후 혈청으로부터 LPS에 항원에 대해 Total IgG 측정한 결과. LPS를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG, 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. P, PBS만 투여한 마우스 샘플; 1, 고스트 백신을 1번 투여한 마우스 샘플; 2, 고스트 백신을 2번 투여한 마우스 샘플; 3, 고스트 백신을 3번 투여한 마우스 샘플. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

12. 4가지 항원을 포함한 고스트 백신을 근육으로 투여한 마우스에서 T-cell과 B-cell의 분포도 확인 실험 결과

4가지 항원을 모두 포함해서 고스트 백신을 투여한 마우스에서 T-cell과 B-cell의 분포도를 알아보기 위해서 FACS를 시행하였다. 마우스에 고스트 백신을 1, 2, 3번 투여한 후 5주째에 고스트 백신을 투여한 마우스와 PBS만 투여한 마우스로부터 spleen을 재취한 후 spleen으로부터 splenocyte를 각각 분리하였다. 분리한 splenocyte에 mouse T lymphocyte subset antibody cocktail 과 Mouse B lymphocyte subset antibody cockail 을 이용해서 형광물질을

부착시킨 후 T-cell과 B-cell의 분포를 확인하였다. 그 결과 그림 65에 나타난 바와 같이, T-cell 분포를 보면 다음과 같다. 고스트 백신이 투여된 마우스에서 PE CD4, PE-Cy7 CD3e, FITC CD8a에서의 분포가 control 보다 증가하는 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, 투여 횟수를 증가할수록 PE CD4, PE-Cy7 CD3e, FITC CD8a의 분포가 증가하는 경향을 보이고 있다. 또한 그림 66에 나타난 바와 같이, B-cell의 분포를 보면 다음과 같다. 고스트 백신을 투여한 마우스에서 PE-Cy7 CD45R/B220, PE-CD23의 분포가 control보다 감소하는 경향을 보이고 있다.

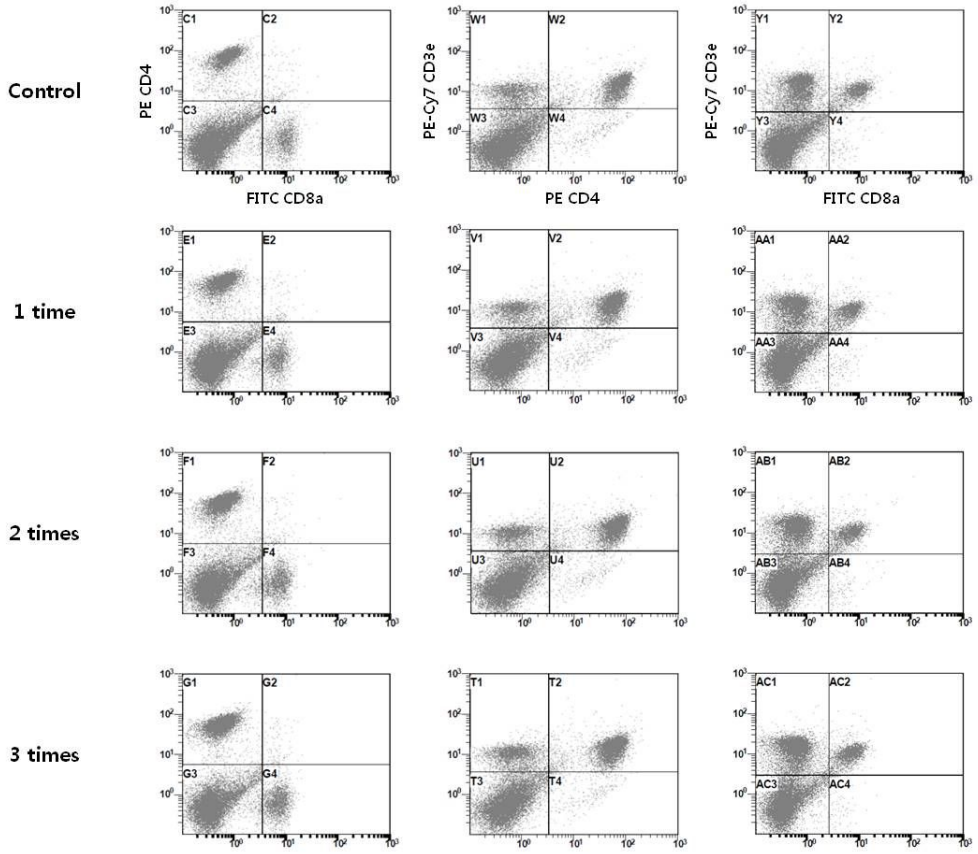


그림 65. 4가지 항원을 포함한 고스트 백신을 근육(IM)로 투여한 각 항원별 마우스의 spleen으로부터 분리한 splenocyte의 T-cell을 분포. 마우스에 고스트 백신을 근육으로 1번, 2번, 3번 투여한 후 5주째에 고스트 백신을 투여한 마우스와 PBS만 투여한 마우스로부터 spleen을 재취한 후 splenocyte를 각각 분리하였다. 왼쪽 그림은 X축이 FITC CD8a을 나타내고 Y축은 PE CD4를 나타낸다. 가운데 그림은 X축이 PE CD4을 나타내고 Y축은 PE-Cy7 CD3를 나타낸다. 오른쪽 그림은 X축은 FITC CD8a을 나타내고 Y축은 PE-Cy7 CD3를 나타낸다. control, PBS만 투여한 마우스 샘플; 1 time, 고스트 백신을 1번 투여한 마우스 샘플; 2 times, 고스트 백신을 2번 투여한 마우스 샘플; 3 times, 고스트 백신을 3번 투여한 마우스 샘플을 나타낸다.

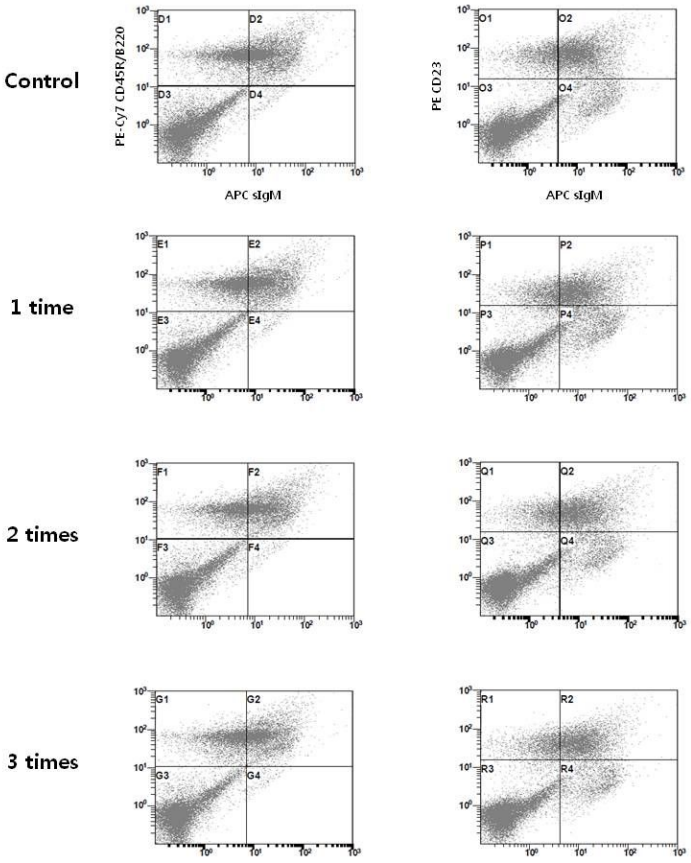


그림 66. 4가지 항원을 포함한 고스트 백신을 근육(IM)로 투여한 각 항원별 마우스의 spleen으로부터 분리한 splenocyte의 T-cell을 분포. 마우스에 고스트 백신을 근육으로 1번, 2번, 3번 투여한 후 5주째에 고스트 백신을 투여한 마우스와 PBS만 투여한 마우스로부터 spleen을 재취한 후 splenocyte를 각각 분리하였다. 왼쪽 그림은 X축이 APC sIgM을 나타내고 Y축은 PE-Cy7 CD45R/B220를 나타낸다. 오른쪽 그림은 X축이 APC sIgM을 나타내고 Y축은 PE CD23를 나타낸다.

13. 근육으로 접종한 4가지 항원을 포함하는 고스트 백신이 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰 실험

고스트 백신이 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰하기 위해서 도전실험을 다음과 같이 실시하였다. *S.typhimurium*X3339를 LB broth에 접종하여 37℃ 배양기에서 24시간 배양한 후 멸균 PBS로 20 ㎕안에 2 × 10^7CFU가 되도록 희석한 후 접종 12주째에 20 ㎕씩 경구 접종하였다. 경구로 도전감염 후 21일 동안 매일 2회씩 폐사 여부를 확인하였다.

그 결과 그림 67에 나타난 바와 같이, control 마우스는 살모넬라균을 투여한지 8일째에 폐사하기 시작해서 20일째에는 모든 control 마우스가 폐사하였다. 4가지의 항원을 모두 포함하는 고스트 백신을 투여한 마우스sms 22.2%-44.4%정도의 생존율을 보였다. 고스트 백신을

1, 2번 투여한 마우스는 44.4%정도의 생존율을 보였으나, 3번 고스트 백신을 투여한 마우스의 경우 생존율이 22.2%로 낮은 생존율을 보였다.

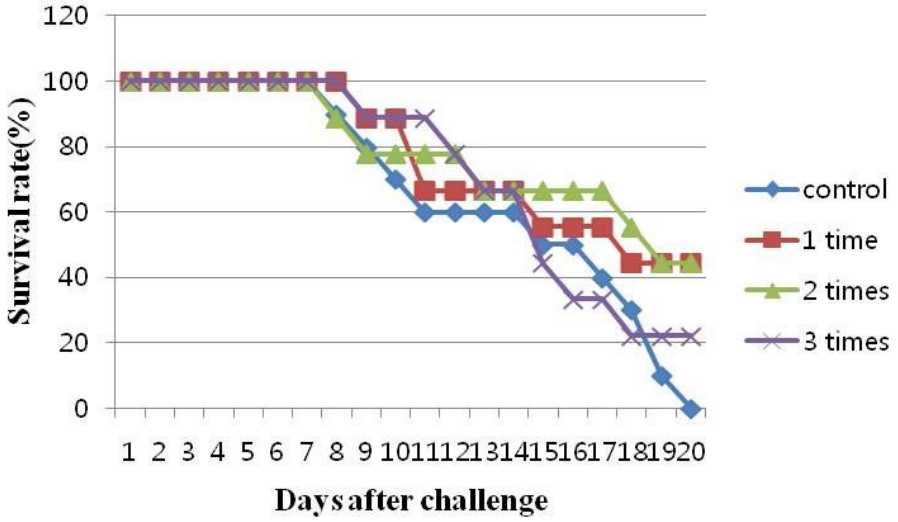


그림 67. 각 항원별로 고스트 세포의 challenge test 결과. X축은 도전실험이 시작된 후 경과일수를 나타내고 Y축은 생존율을 나타낸다. control, PBS만 투여한 마우스; 1 time, 고스트 백신을 1번 투여한 마우스; 2 times, 고스트 백신을 2번 투여한 마우스; 3 times, 고스트 백신을 3번 투여한 마우스를 나타낸다.

14. RT-PCR을 이용한 Gene Expression 결과

4가지 항원을 포함한 고스트 세포를 근육으로 처리한 마우스에서 면역반응을 관찰하기 위해 사이토카인 중에 mIL-1β, mIL-2, mIL-4, mIL-6, mIL-8, mIFN-ɣ, mTNF-α, mActin등의 유전자 발현 변화에 대해 관찰하였다. 그림 68은 4가지의 항원을 1번, 2번, 3번 처리하고 5주후에, mIL-1β, mIL-2, mIL-4, mIL-6, mIL-8, mIFN-ɣ, mTNF-α을 관찰한 결과이다. 5주째에 mIL-6와 mIL-8, mIFN-ɣ 유전자의 발현레벨이 증가하였고, 나머지 mIL-1β, mIL-2, mIL-4, mTNF-α는 control과 비슷하게 발현하였다.

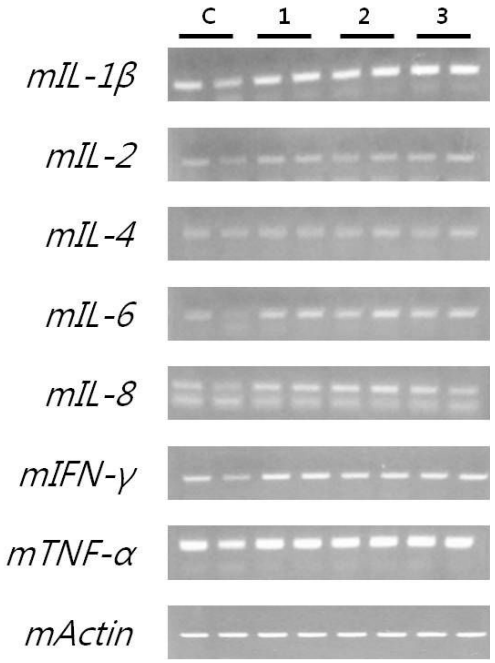


그림 68. 4가지 항원을 포함한 고스트 세포를 처리한 마우스에서 사이토카인 발현의 분석. FedA, FedF, F4, Intimin를 항원을 포함하는 고스트 세포를 마우스에 근육로 접종하여 5주 후에 지라를 분리하여 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고 mIL-1β, mIL-2, mIL-4, mIL-6, mIL-8, mIFN-ɣ, mTNF-α, mActin의 유전자 발현 레벨을 관찰하였다. *mActin*는 유전자 발현 레벨의 기준으로 사용하였다. C, control 샘플; 1, 고스트 세포를 한 번 처리한 샘플; 2, 고스트 세포를 두 번 처리한 샘플; 3, 고스트 세포를 세 번 처리한 샘플 나타내었다.

15. ELISA를 통한 고스트 백신을 투여한 목적동물 자돈의 면역유도 결과

1차 실험에서 모돈 12마리에 $5X10^9$ CFU/2mL로 고스트 세포 (FedA, FedF, K88ab, K88ac)를 경구와 근육으로 분만 5주, 2주전에 접종하였다. 고스트 세포를 백신화 시키기 전 모돈에서 채혈을 하였고 분만 후 1주안에 채혈을 수행하였다. 자돈은 1주령, 3주령, 5주령에서 채혈을 수행하였다. 2차 실험에서는 모돈 12마리에 $5X10^9$ CFU/2mL로 고스트 세포 (FedA, FedF, K88ab, K88ac)를 경구와 근육으로 분만 5주, 2주전에 접종하였다. 자돈 1주령에서도 $5X10^9$ CFU/2mL으로 고스트 세포를 근육으로 접종하였다. 고스트 세포를 백신화 시키기 전 모돈에서 채혈을 하였고 분만 후 1주안에 채혈을 수행하였다. 자돈은 1주령, 3주령, 5주령에서 채혈을 수행하였다. 3차 실험에서는 자돈 1주령, 3주령에서만 $5X10^9$ CFU/2mL로 고스트 세포를 경구와 근육으로 접종하였고, 1주령, 3주령, 5주령 때 채혈을 수행하였다.

혈청에서 *Salmonella* LPS에 specific한 항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. sample well에는 Salmonella LPS를 200ng/well 의 농도로 분주 한 후 4℃ overnight 하여

coating 하였다. Coating 된 plate는 PBS로 3번 washing 한 후 blocking buffer (1% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum은 PBS로 1:50으로 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 2시간~4시간 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-swine IgG(H+L) HRP을 1:2,000의 배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 2시간 동안 반응 시켰다. PBS 용액을 완전히 제거한 후 반응 기질 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405nm에서 발현정도를 관찰하였다.

그 결과 그림 69에 나타난 바와 같이, 1차 목적동물실험 자돈 혈청에서의 Total IgG의 발현이 분만 1주령에서는 Control과 고스트 백신을 근육 또는 경구로 투여한 모돈에서 태어난 자돈에서 비교적 높게 발현되지만 고스트 백신을 투여한 모돈에서 태어난 자돈이 더 많이 발현되는 패턴을 보였다. 3주령에서는 1주령에 비해서 발현량이 감소하였지만, control과 비교해 보았을때 고스트 백신을 투여한 모돈에서 태어난 자돈이 보다 더 많이 IgG가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 2차 목적동물 실험 자돈 혈청서의 Total IgG의 발현 결과는 그림 70에서 보듯이 1차 목적동물실험 자돈의 혈청 결과 유사한 경향을 보였다.

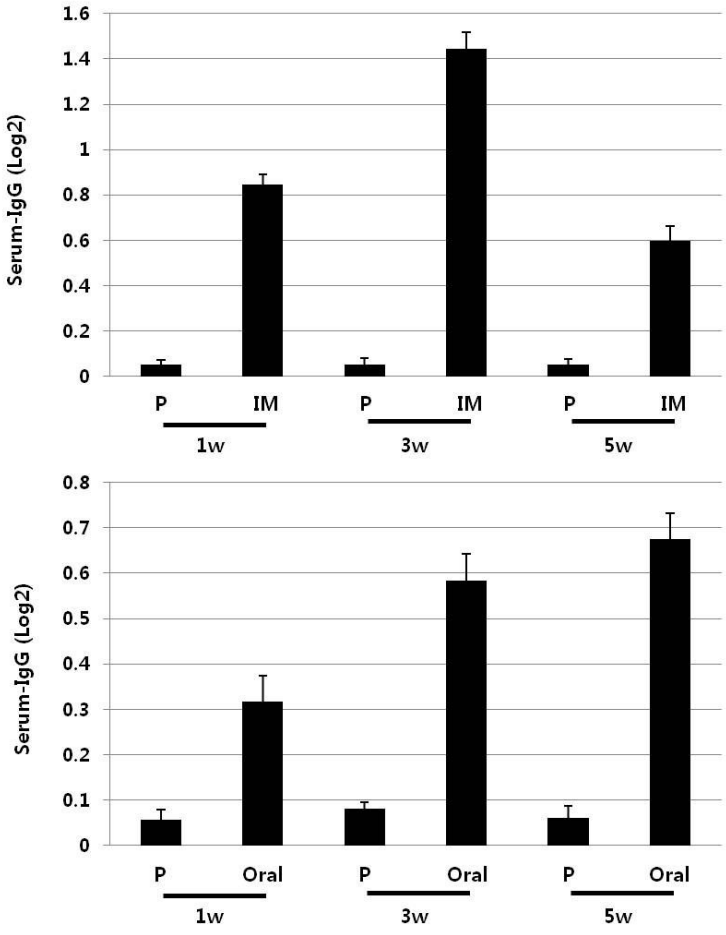


그림 69. 백신화된 1차 목적동물 모돈에서 태어난 자돈의 혈청으로부터 LPS에 항원에

대해 Total IgG 측정한 결과. 항원인 LPS를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG, 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. 위 그림은 근육으로 주사한 경우이고, 아래 그림은 경구로 고스트 백신을 투여한 경우이다. P, PBS만 투여한 마우스; IM, 근육으로 고스트 백신을 투여한 마우스 투여한 마우스; Oral, 근육으로 고스트 백신을 투여한 마우스 투여한 마우스. X축은 시간을 나타내고 Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

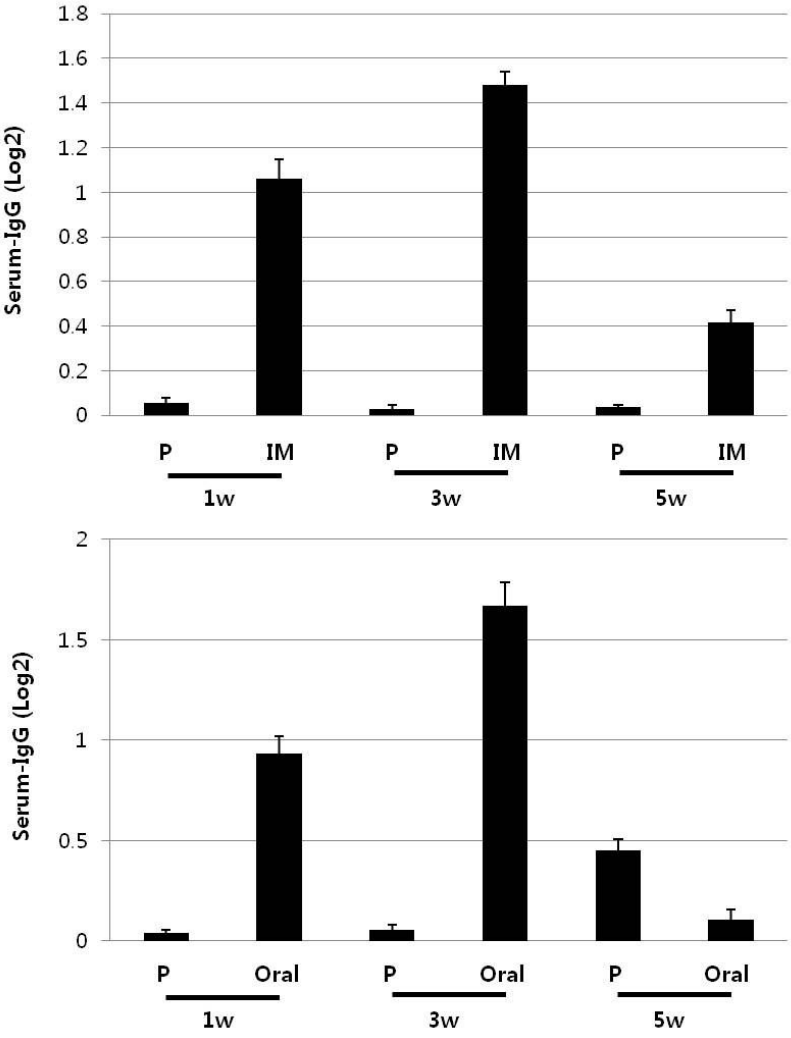


그림 70. 백신화된 2차 목적동물 모돈에서 태어난 자돈의 혈청으로부터 LPS에 항원에 대해 Total IgG 측정한 결과. 항원인 LPS를 2ug/ml의 농도로 처리하였고, 2′Ab인 Total IgG, 1:2000 비율로 상온에서 2시간 처리하였다. 반응 기질 ABTS를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405 nm에서 발현정도를 관찰하였다. 위 그림은 근육으로 주사한 경우이고, 아래 그림은 경구로 고스트 백신을 투여한 경우이다. P, PBS만 투여한 마우스; IM, 근육으로 고스트 백신을 투여한 마우스 투여한 마우스; Oral, 근육으로 고스트 백신을 투여한 마우스 투여한 마우스. X축은 시간을 나타내고

Y축은 면역유도반응의 정도를 log값 나타내었다.

16. 고스트화된 목적동물에서 살모넬라균에 대한 보호능력 확인

현재 실험 중으로 1차, 2차 목적동물의 실험의 경우 EMB agar와 BAP에서 selection된 대장균을 가지고 K88ab, FedA의 특이적인 올리고머로 PCR을 수행중이다. 1차에서 자돈 90마리와 2차에서 자돈 70마리에서 도전 실험을 하여 결과도출을 유도하고 있다. 3차 목적동물의 실험은 자돈에 대한 고스트 백신을 경구와 근육 투여 시험으로 자돈의 고스트 백신화를 시키는 중이다.

[3차년도]

[제1세부과제 : 전북대학교]

[11] 생균백신과 기존 상업용 백신과의 효능비교실험

11-1. 수행 방법

1. 실험 동물 :

1) 모돈 : 병원성 대장균 백신을 접종하지 않은 모돈 중에서 분변에서 병원성 대장균이 분리되지 않은 분만 8 ~ 9주전 모돈 18두를 선별하여 실험에 사용하였다. 이 실험에 사용된 모돈의 품종은 Danish Landrace, Duroc, Large Yorshire가 각각 6두씩 실험에 사용되었다.

2) 자돈 : 각 그룹의 모돈에서 출생한 107 두의 자돈을 실험에 사용하였다.

2. 백신 제조

경구용 생균백신을 준비하기 위해 각 항원별로 개발되어 보관중인 약독화 살모넬라균(표 29)을 10㎖ LB Broth에 접종하여 37℃에서 150 rpm의 속도로 16시간 배양하였다. 이 배양액을 1/100 (volume)의 비율로 100㎖ LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 3 ~ 5 시간 동안 재배양하였다. 이 배양액을 4℃에서 4,000 rpm으로 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 멸균 PBS로 재부유시키는 방법으로 세척하였다. 2번 더 세척한 후 마지막 침전물은 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose) 소량으로 부유시킨 후 OD_{600}값을 측정하여 균수를 확인하였다. 10㎖ PBS-sucrose에 각 adhesin 발현 약독화 살모넬라균 및 LTB 발현 약독화 살모넬

라균 이 각각 2.5×10^9 cfu가 되도록 혼합하여 경구용 생균백신으로 준비한 후 준비 당일 접종하였다.

표 29. 실험에 사용된 균주와 플라스미드

Strain or plasmid	Description	Source or reference
Strains		
E. coli		
JOL416	Wild type F4 (K88ab)$^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL417	Wild type F4 (K88ac)$^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL412	Wild type F5 (K99)$^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL415	Wild type F6 (Fas)$^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL413	Wild type F41$^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL489	Wild type F5$^+$,F41$^+$,LT$^+$,stx2$^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL564	Wild type F6$^+$,stx$^+$,stx2$^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL599	Wild type F4$^+$,LT$^+$,STa$^+$,STb$^+$,EAST1$^+$ETECisolatefrompig	This study
JM109	*end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*, *hsd*R17 (r_k^-,m_k^+), *rel*A1, *sup*E44, Δ(*lac-pro*AB), [F´ *tra*D36, *pro*AB, *laq*IqZΔM15]	Progma
BL21(DE3LysS	F$^-$,*omp*T, *hsd*S_B(r_B^-,m_B^-),*dcm*, *gal*, λ(DE3), pLysS, Cm^r	Progma
X7213	*λpir thi-1 thr-1 leuB6 supE44 towA21 lacY1 recA* RP4-2 Tc::Mu *ΔasdA4*	Kim et al., 2007
JOL470	JM109 with pQE31-K88ab	This study
JOL471	JM109 with pQE9-K88ac	This study
JOL794	BL21 with pET-K99	This study
JOL945	BL21 with pET-fasA	This study
JOL796	BL21 with pET-F41	This study
S. Tyhphmurium		
JOL401	Wild type isolate from chicken	This study
JOL912	*Δlon ΔcpxR Δasd,* a derivative of JOL401	Hur and Lee, 2011
JOL940	JOL912 containing pBP-K88ab	This study
JOL941	JOL912 containing pBP-K88ac	This study
JOL946	JOL912 containing pBP-K99	This study
JOL936	JOL912 containing pBP-fasA	This study
JOL947	JOL912 containing pBP-F41	This study
Plasmids		
pQE9	IPTG-inducible expression vector; Am^r	QIAEN
pQE31	IPTG-inducible expression vector; Am^r	QIAEN
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Km^r	Novagen
pQE31-K88ab	pQE31 derivative containing K88ab fimbrial gene	This study
pQE9-K88ac	pQE9 derivative containing K88ac fimbrial gene	This study
pET-K99	pET28a derivative containing K99 fimbrial gene	This study
pET-fasA	pET28a derivative containing *fasA*	This study
pET-F41	pET28a derivative containing F41 fimbrial gene	This study
pYA3493	Asd$^+$,pBR322*ori*, β-lactamase signal sequence-based periplasmic secretion plasmid	Kim et al., 2007
pBP244	pYA3493 derivative containing *lepB, secA*, and *secB* genes	Kim et al., 2007
pBP-K88ab	pBP244 derivative containing K88ab fimbrial gene	This study
pBP-K88ac	pBP244 derivative containing K88ac fimbrial gene	This study
pBP-K99	pBP244 derivative containing K99 fimbrial gene	This study
pBP-fasA	pBP244 derivative containing *fasA*	This study
pBP-F41	pBP244 derivative containing F41 fimbrial gene	This study

3. ELISA 항원 준비

각 병원성 대장균의 K88ab, K88ac, K99, FasA, F41 adhesin 항원 준비 : 사용화 되어

있는 단백질 발현 cloning kit를 이용하여 제작되어 보관 중인 각 adhesin 발현 대장균을 LB agar에 접종하여 확인된 한 colony를 LB broth 200㎖에 접종하여 37℃에서 150rpm의 속도로 흔들어 주면서 하룻밤 배양한 다음, 이 배양액에 최종농도가 1mM이 되도록 IPTG를 첨가하여 같은 조건으로 4시간 더 배양하였다. 이 배양액을 8,000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리한 후, 상층액은 버리고 침전물은 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)가 1mM이 되도록 첨가된 10㎖의 멸균 PBS로 재부유시킨 다음 -70℃에서 냉동하였다. 냉동된 부유액을 다시 37℃ water bath내에서 해동한 다음 -70℃에서 냉동하기를 3회 반복하였다. 마지막으로 해동한 후 부유액을 초음파 처리하여 세포막을 파고시킨 후 15,000rpm으로 4℃에서 20분간 원심분리하여 상층액을 멸균 관에 옮겼다. 발현 단백질이 가용성일 경우에는 Buffer B (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 8.0) 4㎖를 상층액과 혼합하였고 불용성일 경우에는 6㎖의 Buffer B로 침전물을 재부유시킨 후 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이 반응액을 15,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 시판되고 있는 resin이 들어 있는 관으로 옮겨 단백질이 resin과 결합하도록 30분간 교반하였다. 이 반응액을 준비된 column에 충전시키고 천천히 흘려보냈다. 흘려보낸 이 액으로 column을 재충전한 다음 다시 천천히 흘려보냈다. 반응액을 흘려보낸 다음 Buffer C (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 6.3) 6㎖로 column을 3회 세정하여 resin과 결합하지 않은 기타 불필요한 단백질을 제거하였다. Elution buffer (100mM Nah2PO4, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 4.5) 10㎖로 column을 충전시킨 후 20분간 반응시켜 발현 단백질을 resin으로부터 분리시킨 다음 elution buffer를 1㎖씩 첨가하여 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질을 SDS-PAGE에서 전기영동하여 발현 단백질을 확인하였으며 정량한 후 -70℃에 보관하며 ELISA 항원으로 사용하였다.

4. 예방접종

개발백신과 기존에 상용화되어 판매되고 있는 한 백신인 porcine *Escherichia coli* bacterin (돼지에 분포되고 있는 병원성 대장균 중 4종의 혈청형 균을 배양한 후 포르말린으로 불활화하여 최종 제품의 균수가 1㎖당 100억 개의 대장균이 함유되도록 조정된 사균백신)과의 백신 효능을 상호 비교하였다. 즉, 개발백신 (Group A, D)은 분만 8주와 11주에 생균을 각각 경구접종하며, 상업용 백신(Group B, E)은 백신 제조회사에서 추천하는 방법에 따라 분만 11주와 14주에 각각 근육으로 2ml씩 접종하였다. 그리고 대조군 (Group C, F)은 PBS-sucrose로 개발백신 접종 시기와 같은 시기에 각각 경구로 접종하였다 (표 30, 그림 71).

표 30. Immunization schedule in pregnant sows and clinical signs in the suckling piglets after challenge

Sow[a]	Immunization				Challenge	
	Weeks of pregnancy				Age of piglets (week)	
	Prime		Booster		One	Three
	8	11	11	14		
A	VC[b]		VC		0/18(0)[e]	
B		CV[c]		CV	0/17(0)	
C	PBS[d]		PBS		8/18 (44.4)	
D	VC		VC			0/19*(0)
E		CV		CV		7/19 (36.8)
F	PBS		PBS			8/16 (50)

[a] The sows of group A and D were orally primed and boosted with the mixture of the vaccine candidate,
group B and E were intramuscularly primed and boosted with the commercial ETEC vaccine, and group C and F were administered with PBS as a control.

[b] VC, The vaccine candidate

[c] CV, The commercial ETEC vaccine

[d]PBS, sterile phosphate buffered saline

[e] n/N (%), Number of diarrheal piglets per total piglets.

Asterisks indicate a significant difference in diarrhea and mortality between piglets of vaccinated group with our vaccine candidate and those of vaccinated group with the commercial vaccine (*P<0.05).

그림 71. 모돈에서의 예방 접종

5. 가검물 채취 및 항체역가 측정

(1) 모돈에서의 채혈

그룹 A와 Ddml 백신 일정에 기초하여 각 그룹별로 백신 접종 전 (0주), 1차 접종 후 3주 (3주), 2차 접종 후 2주 (5주) 그리고 분만 당일 (8주)에 각각 채혈하여 혈청을 분리하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다 (그림 72).

그림 72. 모돈에서의 채혈

(2) 초유 채취

각 Group별로 분만하고 있는 동안에 초유를 채취하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

(3) 자돈에서의 채혈

그룹 A-C의 모돈에서 출생한 자돈이 1주령이 되었을 때 그리고 그룹 D-F의 모돈에서 출생한 자돈 중 각 모돈 당 5마리씩 (각 그룹 당 총 15마리)의 자돈으로부터 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 냉동 보관하며 실험에 사용하였다 (그림 73).

그림 73. 자돈에서의 채혈

(4) 면역 측정

돼지 초유를 대상으로 접종 항원에 대한 mucosal IgG 및 sIgA를 측정하였고 모돈 및 자돈의 혈청에서 같은 항원에 대한 특이 serum IgG를 각각 측정하였다. 즉, 혈청 및 초유에서 각 항원에 특이한 항체역가를 측정하기 위해 ELPSA plate의 sample well에는 정제된 항원 단백질을 500ng/well의 농도로, standard well에는 goat anti-pig IgG 또는 goat anti-pig IgA를 각각 500ng/well, 100ng/well의 농도로 분주한 후 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켜 coating 하였다. ELISA plate는 PBS-Tween 20 (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (phosphate-buffered saline [pH7.4], 1% bovine serum albumin 사용)로 30분간 반응시켜 blocking 한다. Serum 및 초유 sample은 blocking buffer로 각각 1:200부터 1: 400으로 각각 희석하여 100㎕씩 분주한 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. Peroxidase-conjugated goat anti-pig IgG HRP 또는 peroxidase-conjugated goat anti-pig IgA HRP를 각각 1:100,000 및 1:50,000의 배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색시킨 후 3M H_2SO_4로 반응을 정지시켜 492nm에서 OD값을 측정하였다. 각 항원-특이 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정하였다.

6. 도전감염

그룹 A-C의 모돈에서 출생한 자돈이 1주령이 된 시점에 국내 돼지에서 발생빈도가 높은 4종의 병원성 대장균 혈청형 (F4, F5, F6, F41)을 섞어 경구 감염시킨 후 설사 유무로

방어능에 대한 효과를 측정하였다. 그리고 그룹 D-F의 모돈에서 출생한 자돈이 3주령이 되었을 때 4종의 병원성 대장균 혈청형 (F4, F5, F6, F41)을 동량씩 섞어 경구 접종한 후 설사 유무로 백신의 효능을 비교하였다 (표 30, 그림 74).

그림 74. 자돈에서의 도전감염

11-2. 결과

1. 모돈 및 자돈에서의 면역 반응 결과

(1) 모돈에서의 면역 반응

모돈에서 모든 각 부착인자에 대한 serum IgG 항체 역가는 그림 75에서 보는 바와 같이 그룹 A와 D 모돈에서의 IgG 역가는 접종 3주 (3 PPI) 후부터 접종 8주 (8 PPI) 후까지 모든 항원에서 대조군에 비해 대해 유의 있는 증가가 관찰되었다. 하지만 그룹 B와 E 모돈에서의 항체 역가는 단지 분만 당일 혈청에서만 대조군에 비해 높게 관찰되었을 뿐이다.

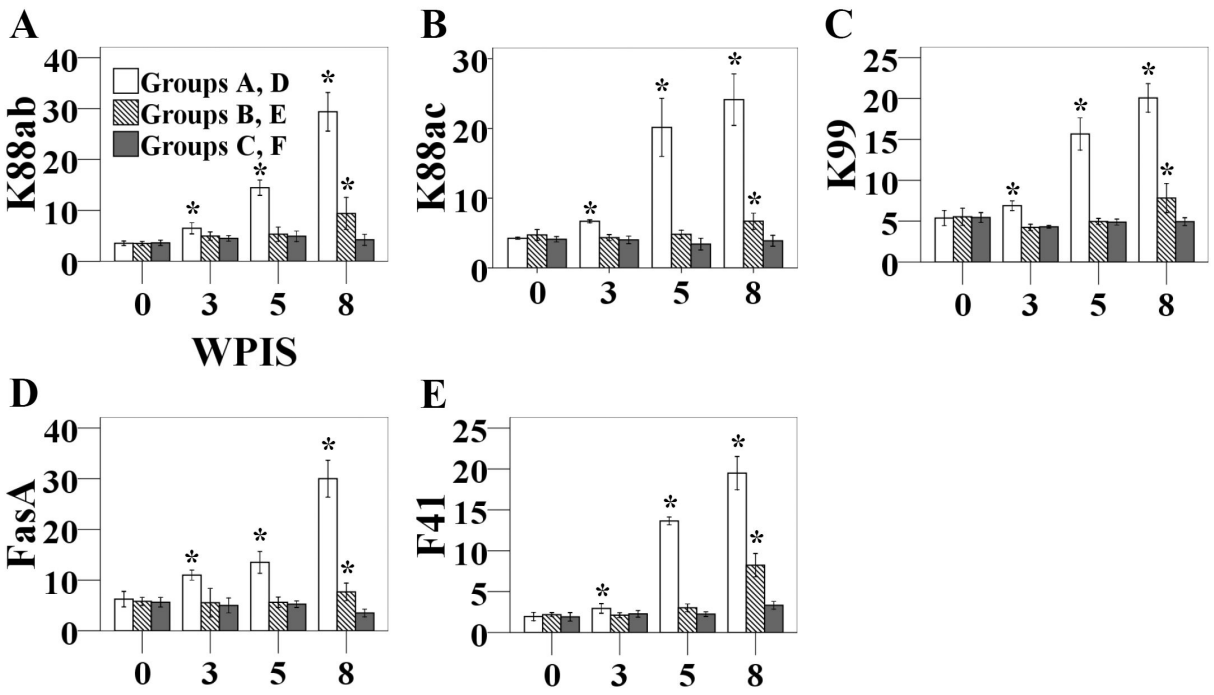


그림 75. Serum IgG (μg/ml) against each fimbrial antigen in the immunized sows: I - A, K88ab-specific IgG; I - B, K88ac-specific IgG; I - C, K99-specific IgG; I - D, FasA-specific IgG and I - E, F41-specific IgG. Groups A and D sows (□) were orally primed and boosted with a mixture of the vaccine candidate, and Groups B and E sows (▨) were intramuscularly primed and boosted with the commercial vaccine. Groups C and F sows (■) were orally administered PBS as a control. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD). Weeks post immunization of sows are referred to as WPIS. Asterisks indicate a significant difference between the values of the vaccinated group and those of the control group in the immunized sows ($^{*}P \leq 0.05$).

(2) 자돈에서의 면역 반응

자돈에서 모든 각 부착인자에 대한 serum IgG 항체 역가는 그림 76에서 보는 바와 같았다. 즉, 모든 항원에 대해 생후 1주령의 그룹 A와 B 자돈에서의 IgG 역가는 대조군 (그룹 C)에 비해 유의 있는 증가가 관찰되었다. 하지만 생후 2주령 자돈 serum IgG 항체역가는 그룹 D 자돈 항체 역가는 모든 항원에서 그룹 E와 대조군에 비해 유의 있게 높게 관찰되었고, 그룹 E의 항체역가 또한 대조군의 항체 역가보다 유의 있게 높았다.

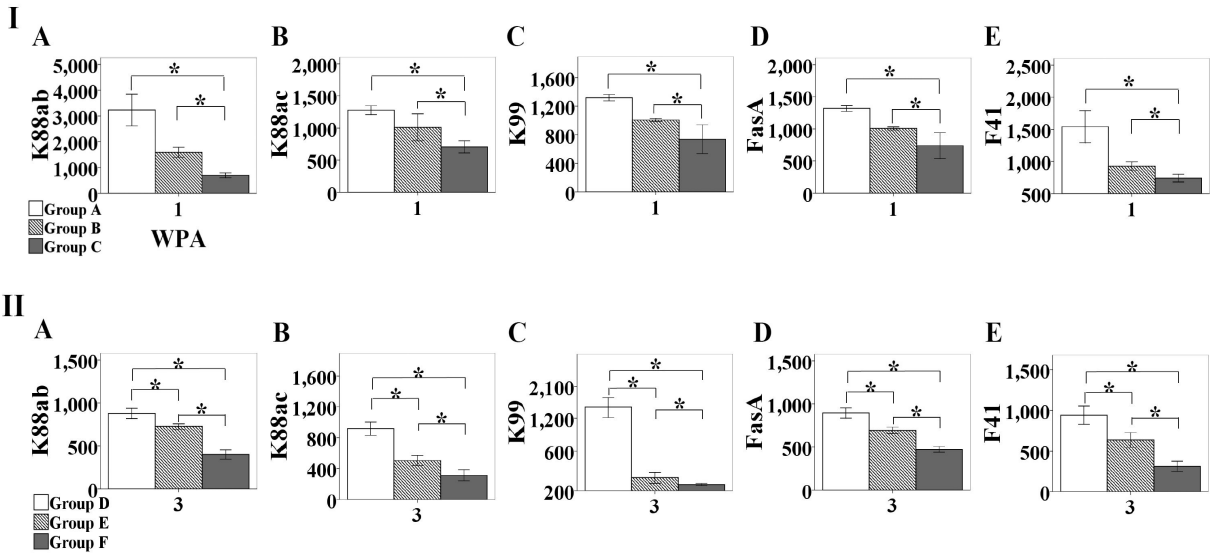


그림 76. Serum IgG (ng/ml) against each fimbrial antigen in the piglets: II means one week of age piglets from groups A, B and C sows, and III indicates three weeks of age piglets from groups D, E and F sows. A, K88ab-specific IgG; B, K88ac-specific IgG; C, K99-specific IgG; D, FasA-specific IgG and E, F41-specific IgG. The immunization conditions of groups A to F are referenced in Fig. 75. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD). Weeks of piglet age are referred to as WPA. Asterisks indicate a significant difference between the values of each group ($^{*}P \leq 0.05$).

(3) 모돈 초유에서의 면역 반응

모돈 초유를 대상으로 한 mucosal IgG 및 IgA의 항체 역가는 그림 77에서 보는 바와 같았다. 즉 모든 백신 그룹에서의 초유 IgG 및 IgA의 항체 역가는 대조군에 비해 유의 있는 항체 역가가 관찰되었다.

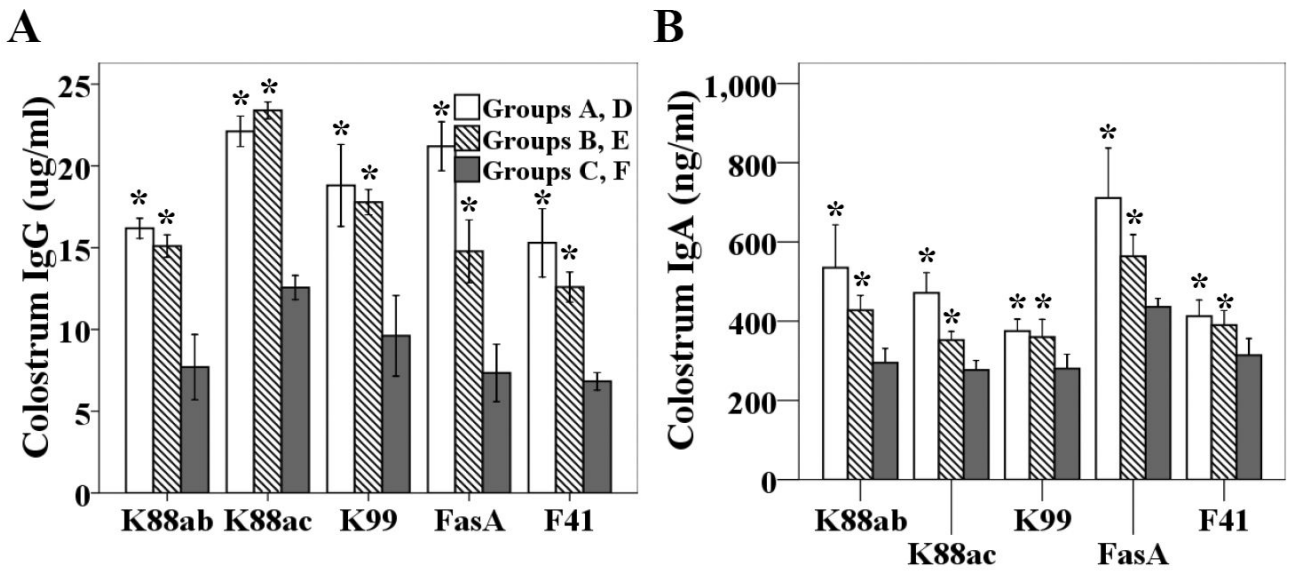


그림 77. Colostrum antibodies to each adhesin antigen in the immunized sows: A, colostrum IgG and B, colostrum sIgA. The immunization conditions of groups A to F are referenced in Fig. 75. Data represent the mean of all sows in each group; the error bars indicate standard deviation (SD). Asterisks indicate a significant difference between the vaccinated group ($^{*}P \leq 0.05$) and the control group.

2. 자돈에서의 도전 감염에 대한 방어 여부

생후 1주령의 경우 그룹 A와 B의 어떤 자돈에서도 설사가 관찰 되지 않은 반면, 대조군 (그룹 C)의 경우에는 18두의 자돈 중 8두에서 설사가 관찰되었다. 3주령의 자돈에서 도전감염 후 방어여부를 확인하여 본 결과, 그룹 D의 모든 자돈에서는 설사가 관찰되지 않은 반면, 그룹 E의 19두 중 7두에서 (각 모돈에서 출생한 자돈 당 적어도 2두에서), 대조군인 그룹 F의 16두 중 8두에서 각각 설사가 관찰되었다 (표 30).

11-3. 결론

이상의 결과를 종합하여 보면, 개발 백신 및 상업용 백신은 초유에서의 IgG 및 IgA의 항체 역가가 높았다. 따라서 모든 백신 모돈에서 출생한 자돈은 모돈의 높은 항체를 포함한 모유를 섭취하여 1주령에서의 혈청 IgG의 항체역가는 대조군에 비해 유의 있게 높았다. 그래서 대조군에서는 약 45%에서 설사가 관찰된 반면 모든 백신 그룹에서 출생한 자돈에서는 도전감염 균주를 방어 했다. 하지만 개발 백신을 투여한 모돈에서 출생한 자돈은 3주령의 혈청 IgG의 항체역가는 상업용 백신을 투여한 모돈에서 풀생한 자돈 및 대조군에 비해 유의 있게 높았

다. 비록 상업용 백신에서 출생한 자돈에서의 항체역가 또한 대조군에 비해 높았지만 1주령과는 다르게 개발 백신을 투여한 모돈에서 출생한 자돈에 비해 유의 있게 낮은 항체역가가 관찰되었다. 이 것은 도전감염 후 자돈에서의 방어와도 직접적인 관련이 있는 것으로 생각된다. 즉 3주령 자돈에서의 방어여부를 확인하기 위해 도전감염 후 설사 유무를관찰하여 본 걀과 개발 벡신을 투여한 모돈에서 출생한 자돈은 1주령에 이어 설사가 관찰되지 않은 반면, 상업용 백신을 투여한 모돈에서 출생한 자돈은 약 37%에서 설사가 관찰되었으며 대조군에서는 50%에서 설사가 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 상업용 백신보다는 각 fimbria를 발현하는 약독화 생균 백신을 혼합접종함으로써 출생 후부터 이유시까지 병원성 대장균을 효과적으로 방어할 수 있음을 알 수 있었다.

[12] 백신균주의 양돈장 filed 시험

12-1. 수행 방법

1. 실험 동물 :

(1) 모돈 : 한 양돈장을 선택하여 병원성 대장균 백신을 접종하지 않은 모돈 중에서 분변에서 병원성 대장균이 분리되지 않은 분만 8 ~ 9주전 모돈 9두를 선별하여 실험에 사용하였다. 이 실험에 사용된 모돈의 품종은 Danish Landrace, Duroc, Large Yorshire가 각각 3두씩 실험에 사용되었다.

(2) 자돈 : 각 그룹의 모돈에서 출생한 82 두의 자돈을 실험에 사용하였다.

2. 백신 제조

경구용 생균백신을 준비하기 위해 각 항원별로 개발되어 보관중인 약독화 살모넬라균(표 29)을 10㎖ LB Broth에 접종하여 37℃에서 150 rpm의 속도로 16시간 배양하였다. 이 배양액을 1/100 (volume)의 비율로 100㎖ LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 3 ~ 5 시간 동안 재배양하였다. 이 배양액을 4℃에서 4,000 rpm으로 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 멸균 PBS로 재부유시키는 방법으로 세척하였다. 2번 더 세척한 후 마지막 침전물은 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose) 소량으로 부유시킨 후 OD_{600}값을 측정하여 균수를 확인하였다. 10㎖ PBS-sucrose에 각 adhesin 발현 약독화 살모넬라균 및 LTB 발현 약독화 살모넬라균 이 각각 2.5×10^9 cfu가 되도록 혼합하여 경구용 생균백신으로 준비한 후 준비 당일 접종하였다.

3. 예방접종

한 양돈장을 선택하여 개발백신과 그 양돈장에서 현재 사용하고 있는 상용화 백신 (porcine *Escherichia coli* bacterin (돼지에 분포되고 있는 병원성 대장균 중 4종의 혈청형 균을 배양한 후 포르말린으로 불활화하여 최종 제품의 균수가 1㎖당 100억 개의 대장균이 함유되도록 조정된 사균백신) 그리고 백신하지 않은 Group으로 구별하여 백신접종한 후 출산된 자돈에서 이유할 때까지 설사 유무와 폐사율 위축돈 발생률 등을 조사하여 야외 양돈장에서의 백신 효능을 상호 비교한다. 즉, 개발백신 (Group G)은 분만 예정일 8주와 5주 전에 생균을 각각 경구접종하며, 상업용 백신(Group H)은 백신 제조회사에서 추천하는 방법에 따라 분만 예정일 4주와 2주 전에 각각 근육으로 2ml씩 접종한다. 그리고 대조군 (Group I)은 PBS-sucrose로 개발백신 접종 시기와 같은 시기에 각각 경구로 접종한다 (표 31).

표 31. Immunization schedule in pregnant sows and clinical signs in the suckling piglets

그룹	접종 두수	예방접종				상태 관찰
		모돈				자돈
		분만 예정일 8주전	분만 예정일 5주전	분만 예정일 4주전	분만 예정일 2주전	이유시까지
G	3	경구접종 생균백신	-	경구접종 생균백신	-	설사 유무, 폐사율, 자돈 행동 관찰
H	3	-	2ml 근육접종	-	2ml 근육접종	
I	3	20% sucrose	-	20% sucrose	-	

4. 자돈 상태 관찰

개발 백신 및 상용화 백신 그리고 PBS-sucrose로 각각 예방 접종된 모돈에서 출산한 자돈이 이유할 때까지 (평균 3주령) 각 Group별로 설사 유무 및 폐사율 등을 조사하여 야외 양돈장에서의 기존 백신과의 상호 비교와 더불어 야외 양돈장에서의 활용 가능성을 알아보았다 (표 31).

12-2. 결과

1. 모돈에서의 부작용 여부

모돈에 예방접종 후 발열과 식욕 감퇴 및 유사산과 같은 모돈에서의 부작용은 관찰되지 않았다.

2. 이유할 때까지 자돈에서의 상태

(1) 설사 유무

예방접종 후 출산한 자돈을 이유할 때까지 즉, 출생한 자돈이 3주령이 될 때까지 설사 유무를 관찰하여 본 결과, 개발백신을 접종한 모돈에서 출생한 자돈의 경우에는 17마리의 포유 자돈 중 출생 후 14일째에 1두에서 약한 설사가 관찰되었지만 모든 자돈의 행동은 매우 활발하였다. 하지만 사용화 백신으로 백신된 모돈에서 출생한 자돈 32두에서 출생 후 4일째부터 시작하여 20마리의 자돈에서 치료를 요할 정도의 심한설사가 관찰되었다. 그리고 대조군 모돈에서 출생한 자돈 16두 중12두에서 출생 그 다음날부터 치료를 요할 정도의 설사가 관찰되었다 (표 32).

(2) 폐사

예방접종 후 출산한 자돈 중 설사로 인해 폐사한 자돈을 조사하여 본 바, 개발백신을 접종한 모돈에서 출생한 자돈의 경우에는 비록 1두에서 약한 설사가 관찰되었지만 폐사하지는 않았다. 하지만 사용화 백신으로 백신된 모돈에서 출생한 설사하는 20마리의 자돈 중에서 7마리가 설사로 인해 폐사하였고 대조군 자돈 중 설사가 관찰된 12두 중에서 3두가 설사로 인해 폐사하였다 (표 32).

표 32. 야외 양돈장에서 포유 자돈을 대상으로 한 개발백신의 효능 실험

그룹	예방접종					도전감염					
	모돈					자돈					
	접종 두수	분만 8주전	분만 6주전	분만 5주전	분만 2주전	출생 두수	사산 두수	포유 두수	설사 두수	폐사 두수	치료 여부
G	3	경구접종 생균백신	-	경구접종 생균백신	-	21	4	17	1	0	-
H	3	-	2ml 근육접종	-	2ml 근육접종	38	6	32	27	7	항생제 치료
I	3	20% sucrose	-	20% sucrose	-	23	7	16	15	3	항생제 치료

12-3. 결론

야외 양돈장에서의 본 개발 백신의 실제 효능을 알아보기 위해 포유 자돈에서 설사로 인해 경영상에 애로사항을 겪고 있는 한 농장을 선택하여 모돈에 개발 백신과 그 농장에서 사용하고 있던 대장균 백신 그리고 대조군으로 나누어 백신을 접종하고 자돈이 출생하여 이유할 때까지 설사 여부 및 설사로 인한 폐사율을 비교하여 보았다. 그 결과 개발백신을 접종한 모돈에서 출생한 자돈에서는 설사와 폐사가 거의 발생하지 않은 반면 상용화 백신 접종군 및 대조군의 모돈에서 출생한 자돈의 경우에는 대체로 모든 자돈에서 심한 설사가 관찰되었으며 설사로 인한 폐사와 항생제 처치를 필요로 하였다. 이는

개발 백신이 야외 양돈농장에서도 기존 상업용 백신에 비해 포유자돈에서 설사를 효과적으로 예방할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[13] 개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역 유도 실험
- 마우스를 대상으로 근육접종에서의 최적화 실험 : adjuvant 혼합 여부 실험

13-1. 실험내용

1. 사용 균주

K88ab와 K88ac 항원을 발현하는 약독화 살모넬라 백신 균주를 실험에 사용하였다. 또한 면역 보강제로는 LTB를 발현하는 약독화 살모넬라 균주 (이하 adjuvant-1이라 칭함)와 MONTANIDE IMS 1113 VGNPR (Seppic 사 제품) (이하 adjuvant-2라 칭함)를 사용하였다.

2. 실험동물

5주령의 BALB/c 암컷 마우스 24두를 구입하여 전북대학교 실험동물사육장에서 사육하면서 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

3. 백신 준비

제조된 Ghost vaccine delivery system으로 K88ab와 K88ac를 각각 발현하는 *Salmonella* Typimurium ghost vaccine의 Stock 균주를 arabinose가 첨가된 LB agar에서 키워 선택한 콜로니 하나를 영양배지 200ml에서 28시간 배양하였다. 배양된 세포수를 파악하기 위하여 NaCl saline으로 희석하여 도말한 뒤 CFU를 확인하였다. 이후 42℃로 세팅되어 있는 Shaking incubator로 옮겨 48시간 배양하여 99% 이상 Lysis시켰다. 이후 contamination이나 mutant를 확인하기 위해 다시 spreading하여 자라지 않았다면 (혹은 10^{-3}cells/ml이하일 경우) 원시분리하여 PBS에 부유한 뒤 12시간 이상 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

4. 백신접종

실험군 및 접종 방법은 아래 표 33과 같았으며, 2차 접종은 1차 접종 4주 후에 접종하였다 (그림 78).

표33. 실험 계획 : 4주 간격으로 접종

그룹	두수	접종균주	접종량		접종경로
			1차 접종	2차 접종	
A	6	Control	PBS	PBS	근육
B	6	K88ab+K88ac	혼합 백신	혼합백신	근육
C	6	K88ab+K88ac+LTB	혼합백신 + adjuvant-1	혼합백신 + adjuvant-1	근육
D	6	K88ab+K88ac+1113	혼합백신 + adjuvant-2	혼합백신 + adjuvant-2	근육

그림 78. 마우스에서의 백신 근육 접종

5. 가검물 채취

접종 전 (0주) 그리고 접종 후 2 , 4 (2차 접종 전), 6, 8, 10, 12, 14 주째에 sIgA 항체 역가를 측정하기 위해 분변을 그리고 IgG 측정을 위하여 혈액을 채취하였다. 분변의 경우 분변은 무게를 잰 후 sodium azide가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/㎖가 되도록 부유시킨 후 13,200 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심 분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

6. ELISA

Salmonella Typhimurium 세포 표면에 발현된 fimbria K88ab 및 K88ac 항원에 대해

특이한 sIgA항체와 IgG항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. Sample well에는 정제된 항원 단백질을 500ng/well의 농도로, standard well에는 goat anti-mouse IgG 또는 goat anti-mouse sIgA를 각각 200ng/well의 농도로 분주 한 후 4℃ 에서 하룻밤동안 coating 하였다. Coating 된 plate는 Tween 20이 0.05% 함유된 PBS (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (3% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum은 PBST로 1:100 으로 Fecal은 1:3로 각각 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 1시간30분 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, HRP 그리고 Fecal Sample의 경우에는 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA HRP를 1:5,000의 배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응 시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색 후 3M H_2SO_4로 stop후 492nm에서 OD값을 측정하였다. 각 항원 specific한 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정하였다.

13-2. 결과

1. 면역 반응 결과

(1) 혈청 IgG 항체 역가

마우스에서 근육접종의 경우에 있어 최적화의 한 일환으로 면역 보강제의 첨부여부에 따른 K88ab 그리고 K88ac fimbria에 대한 serum IgG 항체 역가는 그림 79에서 보는 바와 같았다. 즉, 두 항원 모두에서 1차 접종 후 2주째부터 혈청 IgG의 항체 역가가 유도되기 시작하였으며 1차 접종 후 4주째에 면역 보강제가 첨부되지 않은 그룹 (그룹 B)은 면역보강제와 혼합하여 접종한 그룹들 (그룹 C와 D)보다 높은 면역 항체가 유도되었으며 실험이 끝나는 순간까지 대조군에 비해 월등히 높은 항체 역가를 유지하였다. 또한 LTB 면역 보강제와 혼합하여 접종한 경우에는 2차 접종 후 4주 째에 다른 백신 그룹들보다 높은 항체 역가가 관찰되었으며 그룹 B와 마찬가지로 실험이 끝날 때까지 높은 항체역가가 관찰되었다. 그룹 D의 경우에는 2차 접종 후 2주째부터 높은 항체 역가가 관찰되었으며 그룹 C와 마찬가지로 2차 접종 후 4주째에 최고의 항체 역가를 보였다.

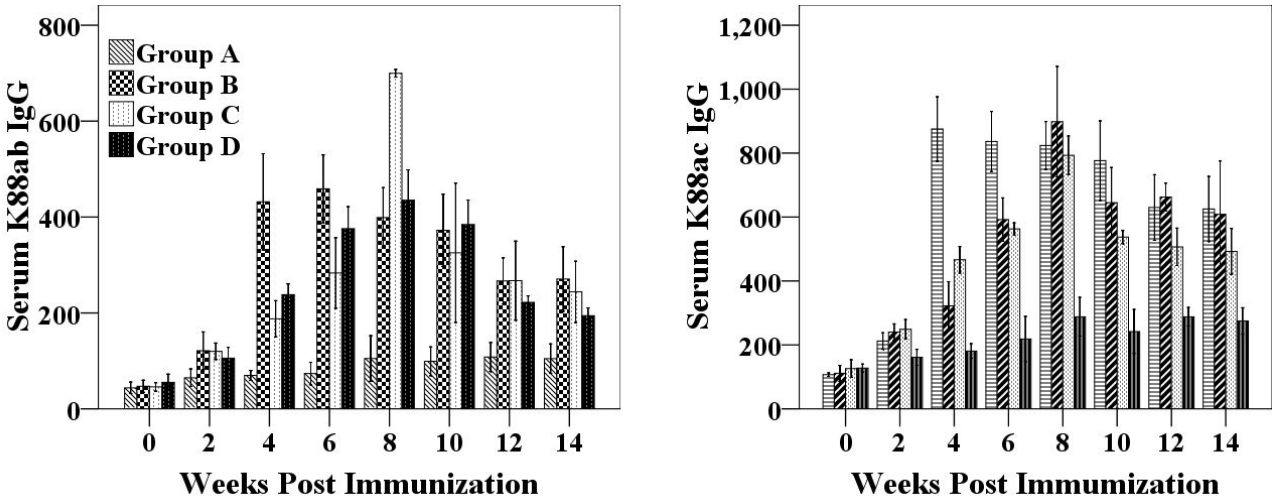


그림 79. Serum IgG (ng/ml) against K88ab and K88ac fimbrial antigens in the mice. The intramuscular immunization conditions of groups A to D are referenced in Table 33. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

(2) 분변 IgA 항체 역가

마우스에서 근육 접종의 경우에 있어 면역보강제의 첨부여부를 위한 실험에서 근육접종 후 K88ab 그리고 K88ac fimbria에 대한 fecal IgA 항체 역가는 그림 80에서 보는 바와 같았다. 분변에서의 IgA의 항체 역가는 혈청에서의 IgG 항체 역가와는 사뭇 다른 결과가 관찰되었다. 즉, K88ab의 경우에는 2차 접종 후 4주 째에 면역 보강제의 첨부 여부와 상관없이 최고의 항체 역가가 관찰되엇으며 더불어 면역 보강제와 혼합하지 않은 그룹 (그룹 B)이 면역 보강제를 혼하하여 접종한 그룹들보다 더 높은 항체 역가가 관찰되었다. 하지만 K88ac의 경우에는 2차 접종 후 2주째에 면역보강제의 종류와 상관없이 면역 보강제와 혼합하여 접종한 그룹 (그룹 C와 D)에서 최고의 항체 역가가 관찰되었으며 면역보강제가 첨부되지 않은 그룹은 K88ab에서와 같이 2차 접종 후 4주째에 최고의 항체 역가가 관찰되었다.

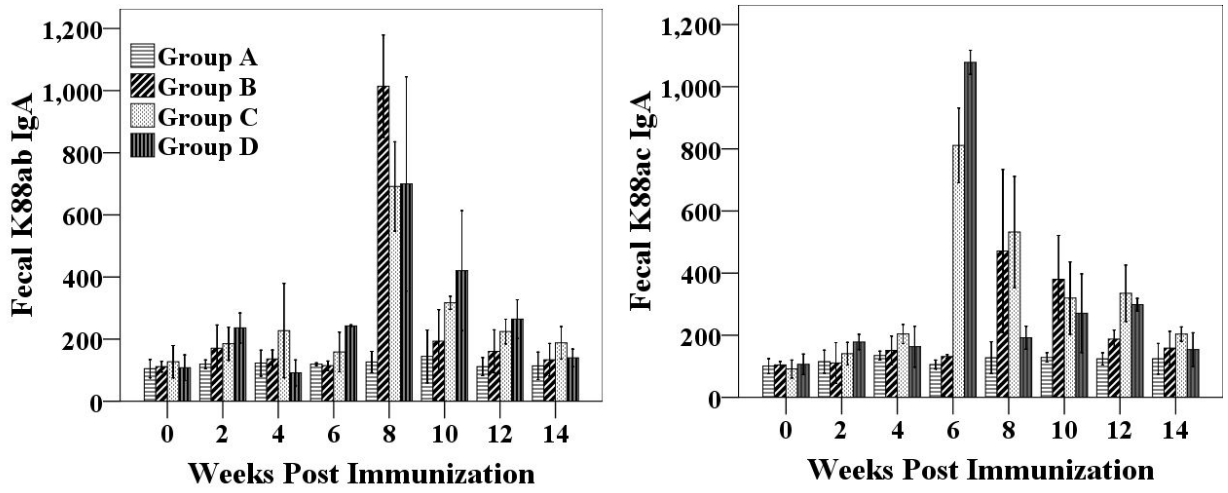


그림 80. Fecal IgA (ng/ml) against K88ab and K88ac fimbrial antigens in the mice. The intramuscular immunization conditions of groups A to D are referenced in Table 33. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

13-3. 결론

마우스를 대상으로 근육접종의 경우 면역 보강제와의 혼합 여부에 대한 실험 결과, 혈청 IgG 유도 실험에서 면역 보강제의 첨부 없이도 1차 접종 후 4주째부터 강력한 면역 반응을 유도하였으며, 점막 면역 반응 유도 시험에서는 2차 접종 후 2주나 4주 째에 면역 보강제의 첨부와 상관없이 강력한 면역 반응을 유도하였다. 이와 같은 결과를 종합해 보면 대장균 설사 예방을 위해서는 근육 접종의 경우에 면역 보강제와의 혼합 없이 백신 균주 단독으로 접종하여도 질병 예방에 필요한 충분한 면역 반응을 유도할 수 있음을 확인하였다.

[14] 개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 마우스에서의 면역 유도 실험
- 마우스를 대상으로 경구접종 경우에서의 최적화 실험 : adjuvant 혼합 여부 실험

14-1. 수행 내용

1. 사용 균주

마우스를 대상으로 경구 접종에서의 최적화의 한 일환으로 면역 보강제와의 혼합 필요성 여부를 알아 보기 위해 K88ab와 K88ac 항원을 발현하는 약독화 살모넬라 백신 균주 면역 보간제인 LTB와 시판되고 있는 ausdur 보강제와의 혼합하여 실험에 사용하였다. 사용한 면역

보강제로는 LTB를 발현하는 약독화 살모넬라 균주 (이하 adjuvant-1이라 칭함)와 MONTANIDE IMS 1113 VGNPR (Seppic 사 제품) (이하 adjuvant-2라 칭함)를 사용하였다.

2. 실험동물

5주령의 BALB/c 암컷 마우스 24두를 구입하여 전북대학교 실험동물사육장에서 사육하면서 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

3. 백신 준비

K88ab와 K88ac를 각각 세포외벽에 발현하는 *Salmonella* Typimurium ghost vaccine의 Stock 균주를 arabinose가 첨가된 LB agar에서 키워 선택한 콜로니 하나를 여양배지 200ml에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포수를 파악하기 위하여 NaCl saline으로 희석하여 도말한 뒤 CFU를 확인하였다. 이후 42℃ Shaking incubator로 옮겨 48시간 배양하여 99% 이상 Lysis시켰다. 이후 contamination이나 mutant를 확인하기 위해 다시 spreading하여 자라지 않았다면 (혹은 10^{-3}cells/ml이하일 경우) 원심분리하여 PBS에 부유한 뒤 12시간 이상 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

4. 백신접종

실험군 및 접종 방법은 아래 표 34와 같았다. 모든 그룹의 마우스는 경구접종을 하였으며 각 그룹은 적어도 백신 접종 전 4시간 동안은 절식을 시켰으며 백신접종 1시간 후에 사료를 공급하였다. 2차 접종은 1차 접종 4주 후에 접종 하였다 (그림 81).

표 34. 실험 계획 : 4주 간격으로 접종

그룹	두수	접종균주	접종량		접종경로
			1차 접종	2차 접종	
E	6	Control	PBS	PBS	경구
F	6	K88ab+K88ac	혼합 백신	혼합백신	경구
G	6	K88ab+K88ac+LTB	혼합백신 + adjuvant-1	혼합백신 + adjuvant-1	경구
H	6	K88ab+K88ac+1113	혼합백신 + adjuvant-2	혼합백신 + adjuvant-2	경구

그림 81. 마우스에서 백신 경구 접종

5. 가검물 채취

접종 전 (0주) 그리고 접종 후 2 , 4 (2차 접종 전), 6, 8, 10, 12, 14 주째에 sIgA 측정을 위해 분변을 그리고 IgG 측정을 위하여 혈액을 채취하였다. 분변의 경우 분변은 무게를 잰 후 sodium azide가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/㎖가 되도록 부유시킨 후 13,200 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 혈청은 안와후 정맥을 통해 채혈 한 후 4,000×g, 5min 동안 원심 분리하여 상층액인 serum을 분리 한 후 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

6. ELISA

Salmonella Typhimurium 세포 표면에 발현된 K88ab 및 K88ac 항원에 대한 특이한 sIgA항체와 IgG항체를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. Sample well에는 정제된 항원 단백질을 500ng/well의 농도로, standard well에는 goat anti-mouse IgG 또는 goat anti-mouse sIgA를 각각 200ng/well의 농도로 분주 한 후 4℃ 에서 하룻밤동안 coating 하였다. Coating 된 plate는 Tween 20이 0.05% 함유된 PBS (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (3% skim milk in PBS) 로 blocking 한 다음 serum은 PBST로 1:100 으로 Fecal은 1:3로 각각 희석한 다음 100 ㎕씩 well에 분주한 후, 37℃에서 1시간30분 동안 반응시켰다. Serum의 경우 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, HRP 그리고 Fecal Sample의 경우에는 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA HRP를 1:5,000의 배율로 희석하여 각 well에 100 μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응 시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색 후 3M H_2SO_4로 stop후 492nm에서 OD값을 측정하였다. 각 항원 specific한 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정하였다.

14-2. 결과

1. 면역 반응 결과

(1) 혈청 IgG 항체 역가

마우스에서 경구 접종할 경우의 면역 보강제의 첨부여부에 따른 K88ab 그리고 K88ac 항원에 대한 혈청 IgG 항체 역가는 그림 82에서 보는 바와 같았다. 경구접종에서의 경우에는 근육접종에서와는 달랐다. 즉, 면역 보강제의 첨부여부와 상관없이 1차 접종 후 2주째부터 면역 항체가 증가는 하였지만 근육접종에서처럼 대조군에 비해 월등히 높은 항체 역가의 증가가 없었다.

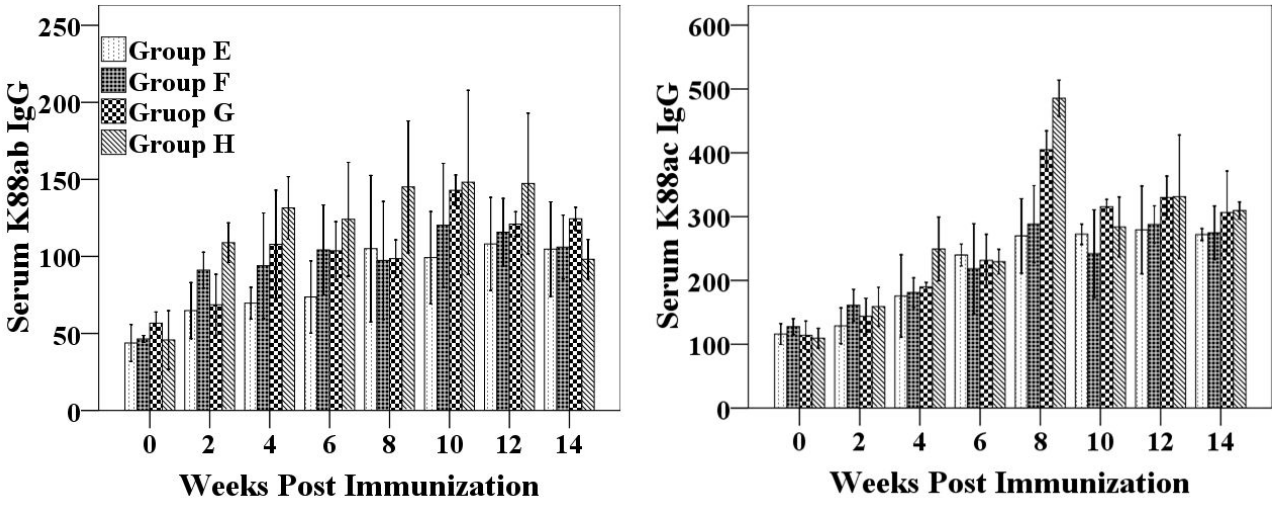


그림 82. Serum IgG (ng/ml) against K88ab and K88ac fimbrial antigens in the mice. The oral immunization conditions of groups E to H are referenced in Table 34. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

(2) 분변 IgA 항체 역가

마우스에서 경구 접종에 있어 면역보강제의 필요 여부를 알아보기 위한 실험에서 면역보강제와의 혼합 또는 백신 단독 경구접종 후 K88ab 그리고 K88ac 항원에 대한 fecal IgA 항체 역가를 측정한 결과는 그림 83에서 보는 바와 같았다. 분변에서의 IgA의 항체 역가는 혈청에서의 IgG 항체 역가와는 사뭇 다른 결과가 관찰되었다. 즉, K88ab의 경우에는 2차 접종 후 6주 째에 면역 보강제의 혼합 여부와 상관없이 최고의 항체 역가가 관찰되었다. 하지만 K88ac의 경우에는 2차 접종 후 2주와 4주 째에 adjuvant-2와 면역보강제와 혼합하지 않은 그룹에서

각각 최고의 항체 역가가 관찰되었다. LTB를 면역 보강제로 한 그룹(그룹 C)은 다른 그룹에 비해 그리 높지 않은 항체 역가가 관찰되어 근육 접종에서와는 다른 결과가 관찰되었다.

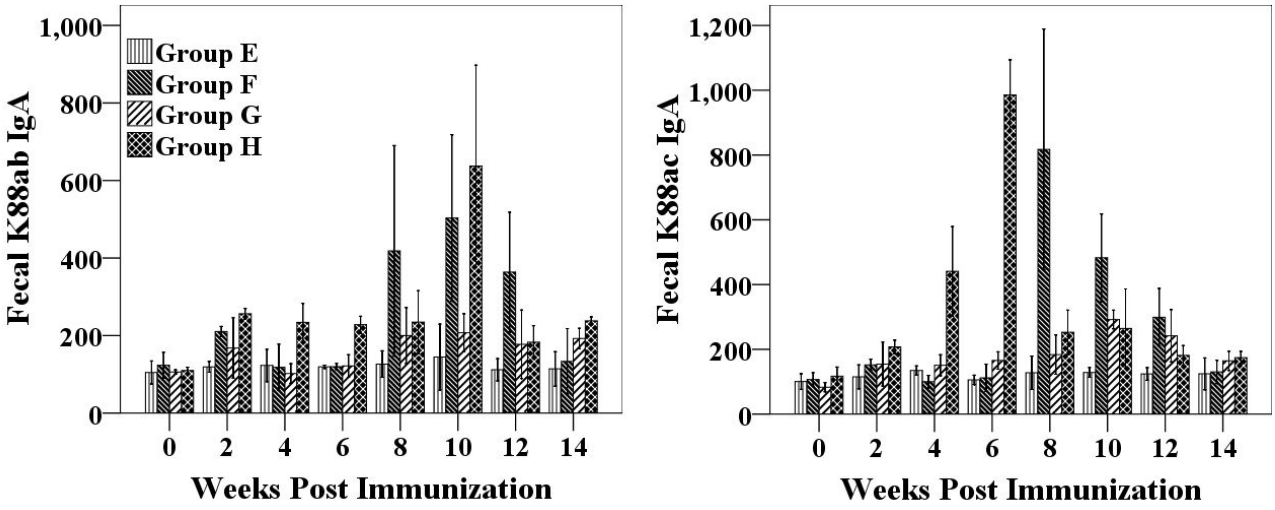


그림 83. Fecal IgA (ng/ml) against K88ab and K88ac fimbrial antigens in the mice. The oral immunization conditions of groups E to H are referenced in Table 34. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

14-3. 결론

마우스를 대상으로 경구 접종에 있어 면역 보강제와의 혼합 여부에 대한 실험 결과, 혈청 IgG 유도 및 fecal IgA 유도 모두에 있어서 근육 접종에서와는 면역 보강제와의 혼합에도 불구하고 대조군에 비해 월등한 면역 반응을 유도하지 못해 면역 보강제와의 혼합 유뮤와 상관없이 접종경로로는 적합하지 않음이 확인되었다.

[15] 목적동물을 대상으로 경구접종에서의 신생 자돈 설사 예방 ghost 다가 백신의 효능 및 접종량 결정시험

15-1. 수행 내용

1. 실험동물

분만 예정 5주 전인 모돈 중 살모넬라균 및 병원성 대장균에 감염된 병력이 없는 모돈을 선택하여 이중 병원성 대장균에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 모돈 12두와 그 모돈에서 출생한 자돈78두를 실험에 사용하였다.

2. 사용 균주

K88ab, K88ac, K99, FasA 그리고 F41 항원을 각각 발현하는 약독화 살모넬라 백신 균주를 실험에 사용하였다 (표 35).

표 35. Bacteria and plasmid used in this study

Strain/Plasmid	Description	Source
Strains		
E. coli		
JOL489	Wild type $F5^+$, $F41^+$, LT^+, $stx2^+$ ETEC isolate from pig	This study
JOL564	Wild type $F6^+$,stx^+,$stx2^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL599	Wild type $F4^+$, LT^+, STa^+, STb^+, $EAST1^+$ ETEC isolate from pig	This study
S. Tyhphmurium		
JOL1285	JOL401 containing pMMP81-K88ab, pMMP99	This study
JOL1286	JOL401 containing pMMP81-K88ac, pMMP99	This study
JOL1287	JOL401 containing pMMP81-K99, pMMP99	This study
JOL1288	JOL401 containing pMMP81-FasA, pMMP99	This study
JOL1289	JOL401 containing pMMP81-F41, pMMP99	This study
Plasmids		
T-vector	Cloning vector; pUC*ori* Amp^R	Promega
pMMP99	A derivative of T-easy carrying ghost cassette	This study

3. 백신준비

K88ab, K88ac, K99, FasA 그리고 F41을 각각 발현하는 *Salmonella* Typimurium ghost vaccine의 Stock 균주를 arabinose가 첨가된 LB agar에서 키워 선택한 콜로니 하나를 영양 배지에 접종하여 28℃에서 40시간 배양한 후 CFU를 확인하였다. 이후 42℃ Shaking incubator로 옮겨 48시간 완전히 Ghost 사균화 시킨 후 contamination이나 mutant 여부를 확인하였다 원심분리하여 침전물을 멸균 PBS로 부유한 뒤 12시간 이상 냉동보관하여 Ghost vaccine으로 실험에 사용하였다.

1) 접종량

a. 경구 접종 : 2×10^9 cells in 10㎖ PBS-sucrose (Group B)
2×10^{10} cells in 10㎖ PBS-sucrose (Group C)
2×10^{11} cells in 10㎖ PBS-sucrose (Group D)

2) 접종 : 실험 군 각 모돈은 한 마리당 위에서 준비된 백신 접종량을 경구 접종하였으며 대조군 (그룹 A)은 각각 멸균 PBS로 같은 방법으로 경구 접종 하였다. 2차 접종 군은 같은 균수와 같은 방법으로 접종 후 21일째에 한 번 더 추가 접종하였다 (표 36).

표 36. 임신 모돈에서의 백신 경구 접종과 자돈에서의 도전감염

그룹	두수	접종균주	접종량		접종 경로	도전 감염
			1차 접종 (분만 6주전)	2차 접종 (분만 3주전)		
A	3	Control	PBS	PBS	경구	5일령
B	3	K88ab+K88ac+K99+FasA+F41	혼합 백신 (2×10^9 cells)	혼합백신 (2×10^9 cells)	경구	5일령
C	3	K88ab+K88ac+K99+FasA+F41	혼합백신 (2×10^{10} cells)	혼합백신 (2×10^{10} cells)	경구	5일령
D	3	K88ab+K88ac+K99+FasA+F41	혼합백신 (2×10^{11} cells)	혼합백신 (2×10^{11} cells)	경구	5일령

2. 가검물 채취 :

(1) 채혈 :

a. 모돈 : 접종 전 (분만 6주 전), 1차 접종 후 3주 (2차 접종 전, 분만 3주 전), 6주 (분만 당일)째에 그룹별로 각각 채혈하여 혈청을 분리 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

b. 자돈 : 도전 감염 전에 각각 채혈하여 혈청을 분리하여 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

(2) 초유 : 분만 당일에 초유를 채취하여 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

3. 항체 역가 측정

돼지 초유를 대상으로 접종 항원에 대한 mucosal IgG 및 sIgA를 측정하였고 모돈 및 자돈의 혈청에서 같은 항원에 대한 특이 serum IgG를 각각 측정하였다. 즉, 혈청 및 초유에서 각 항원에 특이한 항체역가를 측정하기 위해 ELISA plate의 sample well에는 정제된 항원 단백질을 500ng/well의 농도로, standard well에는 goat anti-pig IgG 또는 goat anti-pig IgA를 각각 500ng/well, 100ng/well의 농도로 분주한 후 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켜 coating 하였다. ELISA plate는 PBS-Tween 20 (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (phosphate-buffered saline [pH7.4], 1% bovine serum albumin 사용)로 30분간 반응시켜 blocking 한다. Serum 및 초유 sample은 blocking buffer로 각각 1:200부터 1: 400으로 각각 희석하여 100㎕씩 분주한 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. Peroxidase-conjugated goat anti-pig IgG HRP 또는 peroxidase-conjugated goat anti-pig IgA HRP를 각각 1:100,000 및

1:50,000의 배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색시킨 후 3M H_2SO_4로 반응을 정지시켜 492nm에서 OD값을 측정하였다. 각 항원-특이 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정하였다.

4. 도전감염

국내 돼지에서 발생빈도가 높은 4종의 병원성 대장균 혈청형 (F4, F5, F6, F41)을 섞어 경구 감염시킨 후 설사 및 폐사 유무로 방어능에 대한 효과를 측정하였다.

15-2. 실험 결과

1. 모돈 혈청에서의 면역 반응

모돈에서 모든 각 부착인자에 대한 serum IgG 항체 역가는 그림 84에서 보는 바와 같았다. 즉, 그룹 B를 제외한 모든 그룹의 모돈에서의 IgG 역가는 접종 3주 (3 PPI) 후부터 접종 5주 (5 PPI) 후까지 모든 항원에서 대조군에 비해 대해 높은 항체 역가가 관찰되었다. 다시 말하면 경구 접종량이 2×10^{10} cells 이상일 경우에는 대조군에 비해 통계학적으로 유의 있는 면역 항체 유도가 관찰되었다.

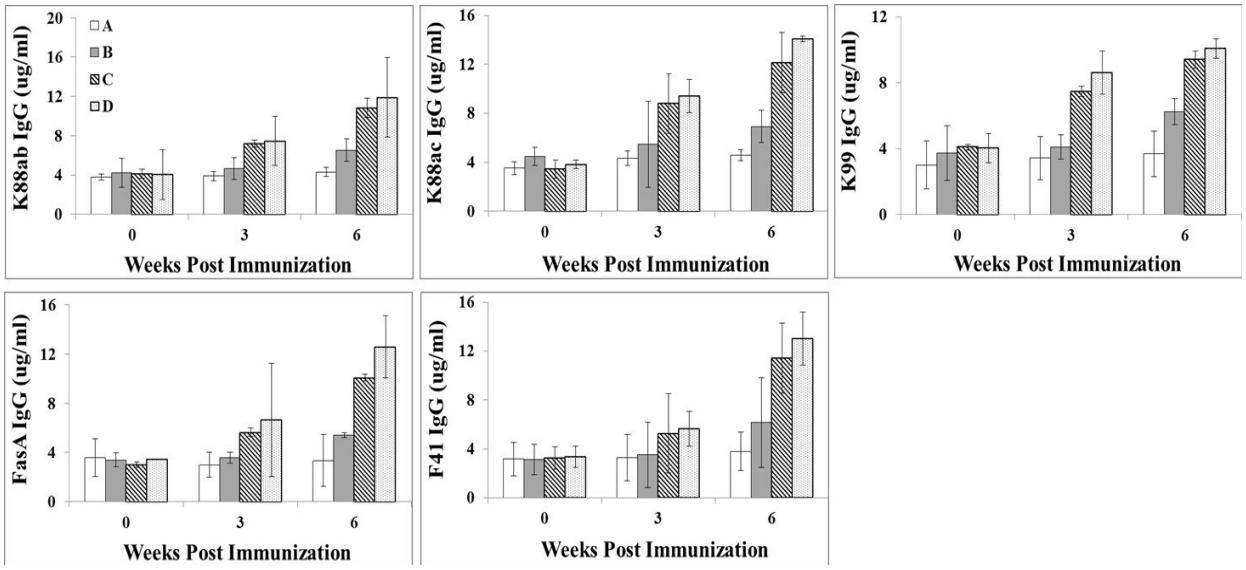


그림 84. Serum IgG (ug/ml) against each fimbrial antigen fimbrial antigen in the sows. The oral immunization conditions of groups A to D are referenced in Table 36. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

2. 모돈 초유에서의 면역 반응

모돈의 초유에서 IgA 및 IgG를 대상으로 한 모든 부착인자에 대한 항체 역가는 그림 85와 같았다. 즉, 그룹 B (접종량 2×10^9 cells)를 제외한 모든 그룹의 초유에서 IgA 및 IgG 역가는 모든 항원에서 대조군에 비해 대해 높은 항체 역가가 관찰되었다.

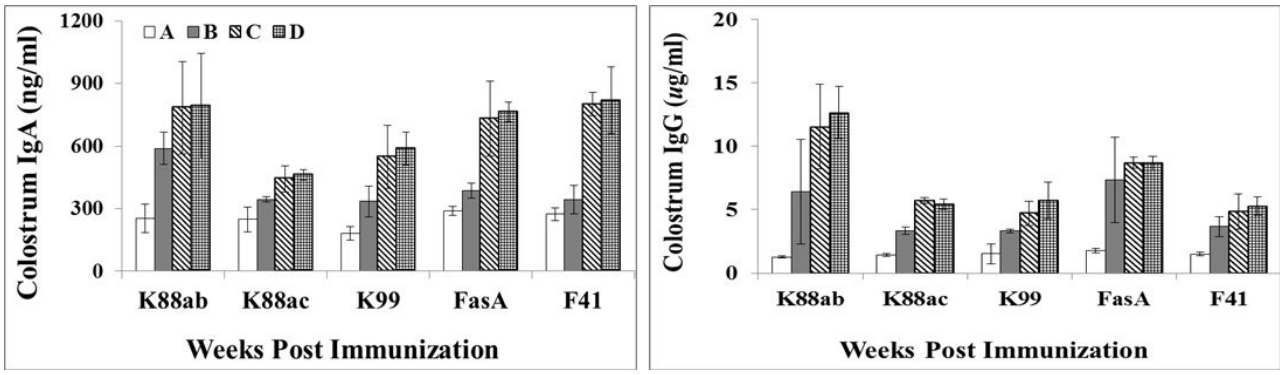


그림 85. Colostrum IgA (ug/ml) against each fimbrial antigen fimbrial antigen in the sows. The oral immunization conditions of groups A to D are referenced in Table 36. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

3. 자돈 혈청에서의 면역 반응

자돈에서의 혈청을 대상으로 모든 부착인자에 대한 IgG 및 IgA항체 역가는 그림 86에서 보는 바와 같이 초유에서의 결과와 비슷하였다. 즉, 그룹 C (접종량 2×10^{10} cells)와 D (접종량 2×10^{11} cells)에서는 모든 항원에 대해 대조군에 비해 월등한 항체 역가가 관찰된 반면, 그룹 B (접종량 2×10^9 cells)는 일부 항원에서 대조군보다 약간 높은 수준이었지만 편차가 심해 일부 항원에서는 대조군과 비슷한 역가를 보이는 자돈이 관찰되었다.

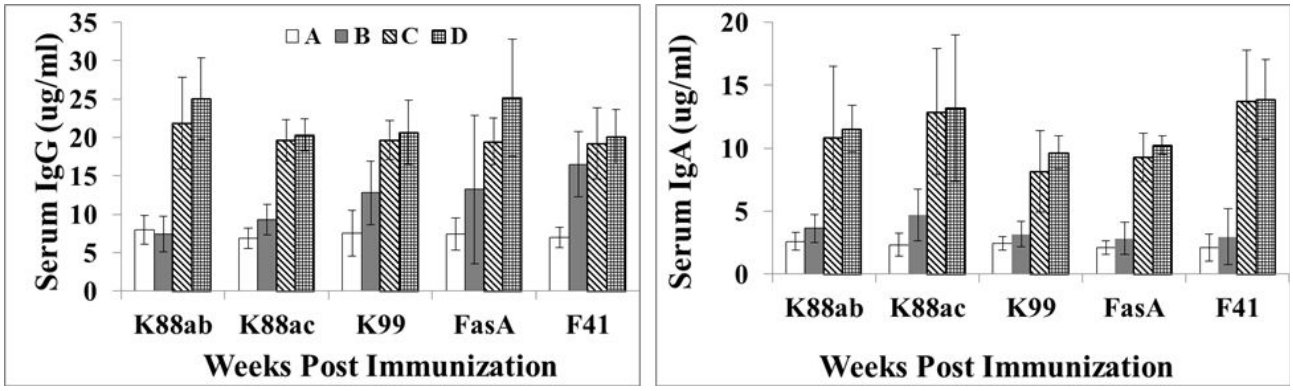


그림 86. Serum IgG and IgA (ug/ml) against each fimbrial antigen fimbrial antigen in the piglets. The oral immunization conditions of groups A to D are referenced in Table 36. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

4. 도전 감염 후 자돈에서의 방어 효과

생후 5일령에 도전감염 후 설사 및 탈수로 인한 폐사 여부를 관찰한 결과 그룹 C와 D의 어떤 자돈에서도 설사가 관찰 되지 않은 반면, 그룹 B는 각각 58.8%의 자돈에서 설사가 관찰되었고 대조군은 88.9%에서 설사가 관찰되어 이중 3두가 설사로 인한 탈수로 폐사하였다 (표 37).

표 37. 포유 자돈을 대상으로 접종량을 달리하여 경구 감염 후 도전감염에 대한 ghost vaccine의 효능 실험

그룹	도전감염		
	자돈		
	출생 두수	설사 두수	폐사 두수
A	18	16	3
B	17	10	0
C	20	0	0
D	23	0	0

15-3. 결론

이상의 결과를 종합하여 보면, 개발 백신을 접종량을 달리하여 경구 접종하였을 경우 접종량을 2×10^9 cells로 접종 할 경우에는 모돈 혈청 IgG 및 초유 IgG와 IgA 항체 역가는 대

조군에 비해 증가는 하였지만 월등할 정도의 증가는 관찰되지 않았으며 또한 초유를 섭취한 자돈에서의 혈청 IgG 및 IgA 항체 역가 역시 대조군에 비해 월등한 항체 역가가 관찰되지 않았다. 반면, 접종량을 2×10^{10} cells 이상으로 경구 접종할 경우에는 모든 혈청에서의 IgG 그리고 chdb 에서의 IgA 및 IgG 항체 역가 모두에서 대조군에 비해 탁월한 증가가 관찰되었으며 초유를 섭취한 자돈 혈청에서의 IgG 및 IgA 역시 대조군에 비해 상당히 높은 항체 역가가 관찰되었다. 또한 이들 면역 반응의 결과에서와 같이 접종량을 2×10^{10} cells 이상 경구 접종할 경우에는 도전 감염에 대해 모든 자돈에서 방어한 반면, 이 접종량 이하로 접종 할 경우에는 도전감염 균주에 대해 일부의 자돈에서만 설사가 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합해 보면 경구로 2×10^{10} cells이상 접종 할 경우에는 병원성 대장균에 대해 탁월한 방어 효과를 기대할 수 있음이 확인되어 경우 접종할 경우에는 접종량을 2×10^{10} cells로 결정하였다.

[16] 고스트 사균백신과 기존 상업용 백신과의 효능비교실험

16-1. 수행 내용

1. 실험동물

분만 예정 5주 전인 모돈 중에서 살모넬라균 및 병원성 대장균에 감염된 병력이 없는 모돈 중에서 병원성 대장균에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 모돈 12두와 그 모돈에서 출생한 자돈 78두를 실험에 사용하였다.

2. 사용 균주

K88ab, K88ac, K99, FasA 그리고 F41 항원을 각각 발현하는 약독화 살모넬라 백신 균주를 고스트 사균화 하여 실험에 사용하였다 (표 38).

표 38. Bacteria and plasmid used in this study

Strain/Plasmid	Description	Source
Strains		
E. coli		
JOL489	Wild type $F5^+$,$F41^+$,LT^+,$stx2^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL564	Wild type $F6^+$,stx^+,$stx2^+$ETECisolatefrompig	This study
JOL599	Wild type $F4^+$,LT^+,STa^+,STb^+,$EAST1^+$ETECisolatefrompig	This study
S. Tyhphmurium		
JOL1285	JOL401 containing pMMP81-K88ab, pMMP99	This study
JOL1286	JOL401 containing pMMP81-K88ac, pMMP99	This study
JOL1287	JOL401 containing pMMP81-K99, pMMP99	This study
JOL1288	JOL401 containing pMMP81-FasA, pMMP99	This study
JOL1289	JOL401 containing pMMP81-F41, pMMP99	This study

3. 백신준비 :

-80℃에서 보관중인 K88ab, K88ac, K99, FasA 그리고 F41을 각각 발현하는 *Salmonella* Typimurium ghost vaccine 균주를 arabinose가 첨가된 LB agar에서 키워 선택한 콜로니를 영양배지에 접종하여 28℃에서 24시간 배양한 후 CFU를 확인하였다. 이후 42℃ 에서 48시간 완전히 고스트 사균화 하여 오염여부와 고스트 사균화 여부를 확인하였다. 이 배양액을 원심분리하여 침전물을 멸균 PBS로 부유한 뒤 12시간 이상 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

(1) 접종량 (고스트 사균 백신의 경우)

a. 경구 접종 : 2×10^{10} cells in 10㎖ PBS-sucrose (Group H)

b. 근육접종 : 1×10^{10} cells in 1㎖ PBS (Group C)

(2) 접종

실험 군 각 모돈은 한 마리당 위에서 준비된 백신 접종량을 근육 또는 경구 접종하며 대조군은 각각 멸균 PBS로 근육 (2ml) 접종 하였다. 2차 접종 군은 같은 균수와 같은 방법으로 접종 후 21일째에 한 번 더 추가 접종하였다 (표 39). 그리고 상업용 백신의 경우에는 사용설명서에 명시된 방법에 따라 접종량을 상기와 같은 접종 시기에 근육으로 각각 접종하였다.

표 39. 모돈에서의 백신 접종과 자돈에서의 도전감염

그룹	두수	접종균주	접종량		접종 경로	도전 감염
			1차 접종 (분만 6주전)	2차 접종 (분만 3주전)		
E	3	Control	PBS	PBS	근육	5일령
F	3	상업용 백신	fimbria 정제 백신	fimbria 정제 백신	근육	5일령
G	3	K88ab+K88ac+K99+FasA+F41	혼합백신	혼합백신	근육	5일령
H	3	K88ab+K88ac+K99+FasA+F41	혼합백신 (2×10^{10} cells)	혼합백신 (2×10^{10} cells)	경구	5일령

2. 가검물 채취 :

(1) 채혈 :

a. 모돈 : 접종 전 (분만 6주 전), 1차 접종 후 3주 (2차 접종 전, 분만 3주 전), 6주 (분만 당일)째에 그룹별로 각각 채혈하여 혈청을 분리 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

b. 자돈 : 자돈이 5일령이 되어 도전 감염 전에 각각 채혈하여 혈청을 분리하여 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

(2) 초유 : 분만 당일에 초유를 채취하여 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

3. 항체 역가 측정

돼지 초유를 대상으로 각 부착인자에 대한 초유에서의 IgG 및 IgA 항체 역가를 측정하였고 또한 모돈 및 자돈의 혈청에서 각 부착인자에 대한 항원 특이 IgG 항체 역가를 각각 측정하였다. 즉, 혈청 및 초유에서 각 항원에 특이한 항체역가를 측정하기 위해 ELISA plate의 well에 정제된 항원 단백질을 500ng/well의 농도로, standard well에는 goat anti-pig IgG 또는 goat anti-pig IgA를 각각 500ng/well, 100ng/well의 농도로 분주한 후 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켜 coating 하였다. ELISA plate는 PBS-Tween 20 (PBST)로 3번 washing 한 후 blocking buffer (phosphate-buffered saline [pH7.4], 1% bovine serum albumin 사용)로 30분간 반응시켜 blocking 한다. 혈청 및 초유 sample은 blocking buffer로 각각 1:200부터 1: 400으로 각각 희석하여 100㎕씩 분주한 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. Peroxidase-conjugated goat anti-pig IgG HRP 또는 peroxidase-conjugated goat anti-pig IgA HRP를 각각 1:100,000 및 1:50,000의 배율로 희석하여 각 well에 100μ씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. OPD-substrate 반응액을 well 당 100μl씩 분주하여 발색시킨 후 3M H_2SO_4로 반응을 정지시

켜 492nm에서 OD값을 측정하였다. 각 항원-특이 항체의 농도는 standard protein 농도에 기초하여 측정하였다.

4. 도전감염

임신 모돈에서 출생한 자돈이 5일령이 되었을 때 국내 돼지에서 발생빈도가 높은 4종의 병원성 대장균 혈청형 (F4, F5, F6, F41)을 섞어 경구 감염시킨 후 설사 및 폐사 여부로 방어 능에 대한 효과를 측정하였다.

16-2. 실험 결과

1. 모돈 혈청에서의 면역 반응

모돈에서 모든 부착인자 항원에 대한 serum IgG 항체 역가는 그림 87에서 보는 바와 같았다. 즉, 모든 그룹의 모돈에서의 IgG 항체 역가는 접종 3주 (3 PPI) 후부터 모든 항원에서 대조군에 비해 증가하기 시작하여 분만 시점에는 각 부착항원에 대해 대조군에 비해 높은 항체 역가가 관찰되었다. 하지만 상업용 백신 접종 군 (그룹 F) 및 고스트 백신의 근육 접종 군 (그룹 G)에 비해 경구 접종군이 높은 항체 역가가 관찰되었다.

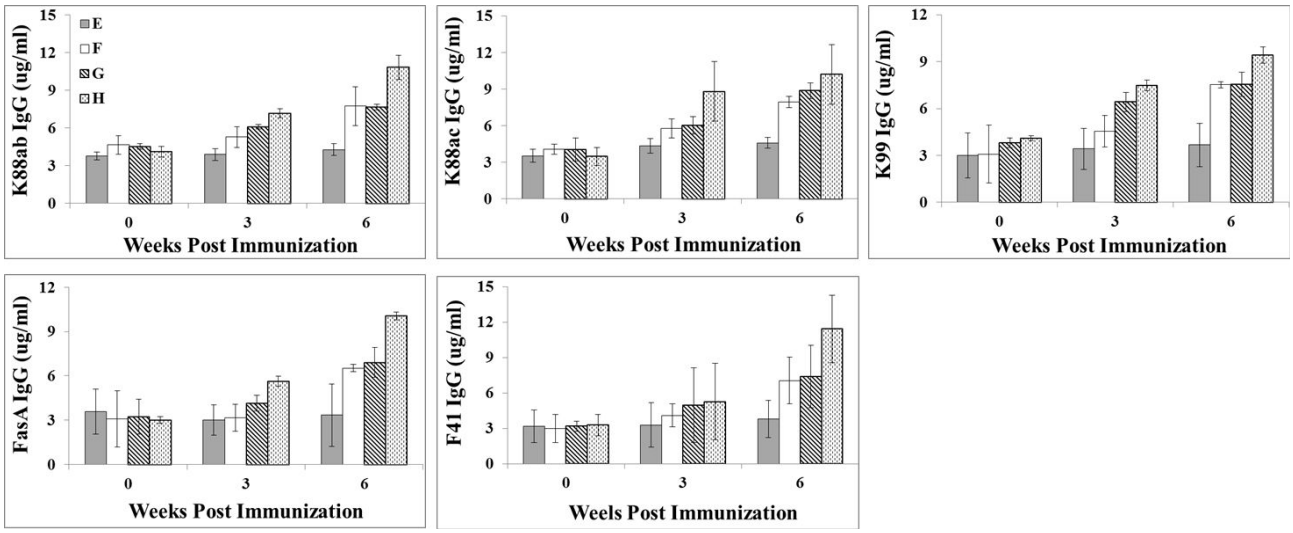


그림 87. Serum IgG (ug/ml) against each fimbrial antigen fimbrial antigen in the sows. The immunization conditions of groups E to H are referenced in Table 39. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

2. 모돈 초유에서의 면역 반응

모돈의 초유를 대상으로 한 IgA 및 IgG 항체 역가를 측정하여 본 결과 모든 부착인자에 대한 항체 역가는 그림 88과 같았다. 즉, 초유 IgA의 경우 그룹 H (경구 접종군)는 모든 부착인자에 대조군 (그룹 E) 및 사업용 백신 (그룹 F)과 고스트 백신의 근육 접종 군 (그룹 G)에 비해 높은 항체 역가가 관찰되었다. 하지만 초유에서의 IgG 항체 역가에서는 모든 부착인자에 대해 백신의 종류 및 접종 경로와 상관없이 대조군에 비해 월등한 항체 역가가 관찰되었다.

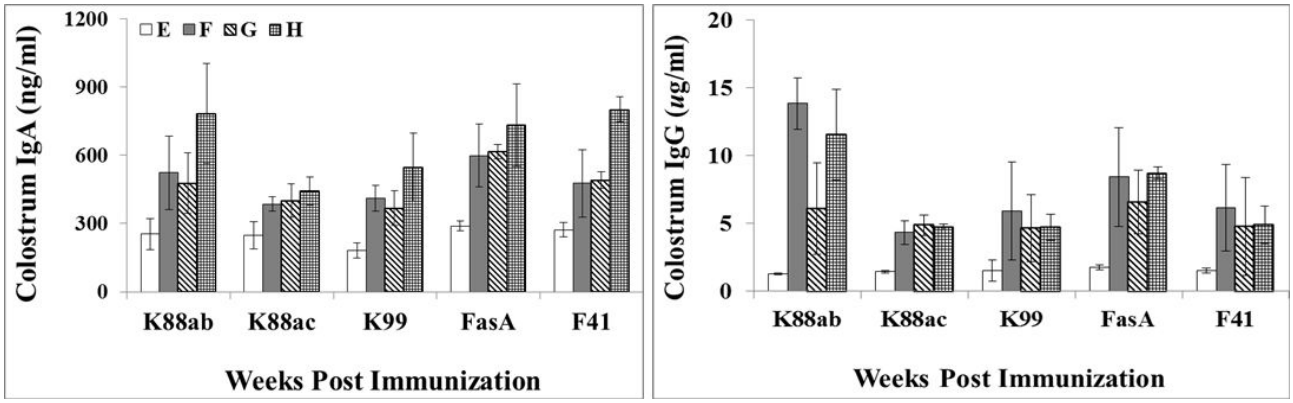


그림 88. Colostrum IgA (ug/ml) against each fimbrial antigen fimbrial antigen in the sows. The immunization conditions of groups E to H are referenced in Table 39. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

3. 자돈 혈청에서의 면역 반응

자돈에서의 혈청을 대상으로 모든 부착인자에 대한 IgG 및 IgA 항체 역가는 그림 89에서 보는 바와 같이 초유에서의 결과와 비슷하였다. 즉, 혈청 IgG의 경우 모든 그룹에서 대조군에 비해 월등히 높은 항체 역가가 관찰된 반면, IgA의 경우에는 고스트 백신을 경구 접종한 경우가 가장 높은 항체 역가를 그리고 고스트 백신을 근육 접종한 그룹, 그리고 상업용 백신을 근육 접종한 경우 순으로 항체 역가가 관찰되었다. 또한 IgA의 경우 상업용 백신을 근육 접종한 경우에는 K88ac를 제외한 다른 부착항원에서 표준 편차가 커 일부의 자돈에서는 대조군과 비슷한 항체 역가가 관찰되었다.

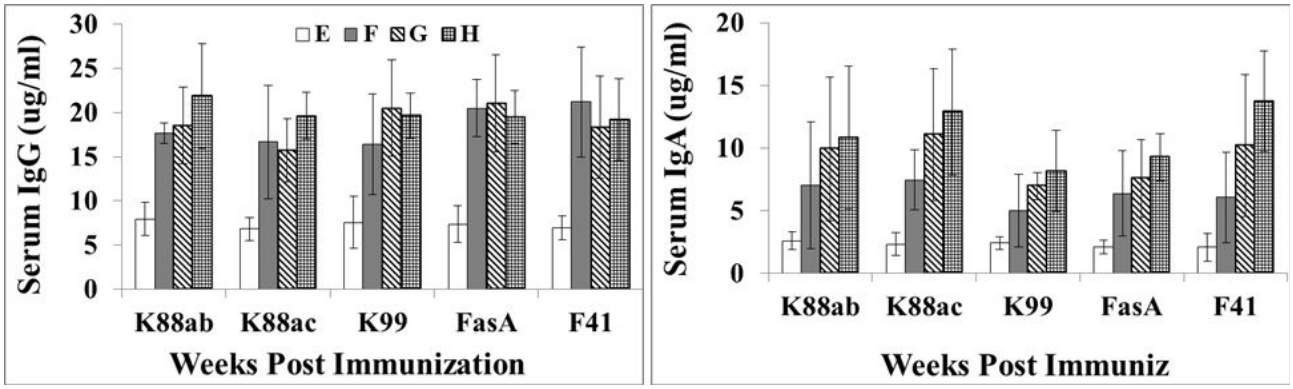


그림 89. Serum IgG and IgA (ug/ml) against each fimbrial antigen fimbrial antigen in the piglets. The immunization conditions of groups E to H are referenced in Table 39. Data represent the mean in each group; error bars represent standard deviation (SD).

4. 도전 감염 후 자돈에서의 방어 효과

자돈에서 출생한 자돈이 5일령이 되었을 때 야외 독성 균주로 도전감염 후 설사 및 폐사 여부로 도전감염에 대한 방어능을 조사하여 본 결과, 고스트 백신을 경구 감염한 경우에는 모든 자돈에서 설사 및 폐사가 관찰되지 않은 반면, 상업용 백신을 근육 접종한 경우에는 30.4%에서 설사가, 고스트 백신을 근육 접종한 경우에는 23.5%에서 설사가 관찰되었으며, 또한 고스트 백신을 근육 접종한 자돈 중 1두는 설사로 인한 탈수로 폐사하였다 (표 40).

표 40. 고스트 백신과 상업용 백신과의 효능 비교 실험

그룹	도전감염		
	자돈		
	출생 두수	설사 두수	폐사 두수
E	18	16	3
F	23	7	
G	17	4	1
H	20	0	

16-3. 결론

이상의 결과를 종합하여 보면, 자돈에서 도전 균주에 대한 방어능은 초유에서의 IgA 및 자돈 혈청에서의 IgA의 결과와 일치하는 결과가 관찰되었다. 즉, 초유에서의 IgG 및 자돈

에서의 IgG 항체 역가는 백신의 종류 및 접종 경로와 상관없이 모든 그룹에서 모든 항원에 대해 대조군에 비해 shb은 항체 역가가 관찰된 반면, 초유에서의 IgA 및 자돈 혈청에서의 IgA 항체 역가는 고스트 백신을 경구 접종한 그룹에서 가장 높은 항체 역가가 관찰되어 모든 자돈에서 도전 감염 후 설사가 관찰되지 않았다. 한편 고스프 백신을 근육 접종한 경우는 상업용 백신을 근육 접종한 경우보다 약간 높은 IgA 항체 역가가 관찰되었으며, 상업용 백신을 근육 접종한 경우는 대조군에 비해 약간 높은 항체 역가가 관찰되어 자돈에서 도전 감염 후 23.5%와 30.4%에서 각각 설사가 관찰되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 상업용 백신보다는 각 부착인자를 발현하는 ghost 백신을 혼합하여 근육 또는 경구로 접종하면 병원성 대장균에 대해 적어도 상업용 백신과 유사한 수준이상으로 방어할 수 있음을 알 수 있었으며, 경구로 2×10^{10} cells이상 접종 할 경우에는 병원성 대장균에 대해 탁월한 방어 효과를 기대할 수 있음을 확인하였다.

[제1협동과제 : 경남과학기술대학교]

[17] 고스트 재조합 다가 고스트 백신 개선 및 이를 활용한 마우스에서 고스트 사균백신 근육 접종 후 살모넬라에 대한 방어 효과

17-1. 수행방법

1) 사용된 균주 및 플라즈미드

사용된 균주 및 플라즈미드는 표 41에 정리되어 있다. *E. coli* 및 *Salmonella* strain은 현재 연구실에 보관중인 균주 또는 전북대학교 수의과 대학에서부터 분양받은 균주를 사용하였다.

2) 생균수 측정

고스트화 후 생균수를 측정하기 위해 100 ml 배지에 1/100로 전배양된 x8554 [pMMP184] 균주를 접종하여 25℃에서 24 h 배양한 후, 42℃에서 계속 배양하면서 일정한 시간 간격으로 샘플링을 실시하였다. 샘플링된 배양액은 10배씩 적절하게 희석한 후 LB 배지에 도말하여 생균수를 측정하였다. 배양액을 제거하고 신선한 배지를 제공하기 위해 배양된 액을 멸균된 원심분리관에 일정량을 첨가한 후 8,000 rpm으로 4℃에서 20분간 원심분리하여 배양상등액을 완전히 제거하였다. 침전된 세포에는 배양액과 동일한 양의 PBS bfr를 첨가한 후 위와 동일한 조건으로 2회에 걸쳐 원심분리하여 불순물을 완전히 제거하였다. 처리된 세포에는 신선한 M9 배지를 첨가하여 42℃에서 계속 배양하면서 관찰하였다.

4) 고스트 세포의 마우스 vaccination

동결 건조된 고스트 세포를 농도별로 희석하여 일주일간 순화된 BALB/c 마우스에 경구 또는 근육으로 접종하였다. 접종량은 경구가 $1X10^{9}$ CFU/ml로 투여하였고, 근육으로는 10^{8}

CFU/ml 로 접종하였다. 접종하기 전에 4시간이상 절수 및 절식을 시켰고 접종 후 1시간 후 음수 및 사료를 제공하였다. 접종을 실시한 후 10주 동안 마우스를 관찰하였고 혈액중의 면역글로불린 함량을 측정하기 위한 혈액의 채취는 2주, 4주, 6주, 8주, 10주에서 실시하였다. 또한 분비액 중에 sIgA를 측정하기 위해 질세척액과 분변을 2주, 4주, 6주, 8주, 10주에서 채취하였다.

5) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

LPS을 200ng/100ul 농도로 0.05M carbonate 용액 (pH 9.6) 에 넣어서 4℃에서 overnight 시켜서 plate의 표면에 항원을 코팅 시켰다. 코팅용액을 버리고 1xPBS (pH 7,4) 용액으로 한번 washing을 하였다. 1xPBS (pH 7,4) 용액을 완전히 제거한 후 1% skim milk 용액으로 상온에서 30분 blocking 시켰다. Blocking 용액인 1% skim milk 용액을 버리고 새로운 1% skim milk 용액을 넣은 후 샘플(혈액(1:50), 분변(1:2), 질분비액(1:2))을 넣고 2시간 37℃에서 반응 시켰다. 1xPBS (pH 7,4) 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1xPBS (pH 7,4) 용액을 완전히 제거한 후, 2차 항체인 IgG (1:2,000), lgG1 (1:2,000), IgG2a (1:2,000), IgA (1:2000)을 상온에서 2시간 반응 시켰다. 1xPBS (pH 7,4) 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1xPBS (pH 7,4) 용액을 완전히 제거한 후 반응 기질 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonic acid) (ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader로 파장 405nm에서 발현정도를 관찰하였다.

6) 고스트 세포의 살모넬라균에 대한 보호능력 확인

고스트 세포가 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰하기 위해서 도전실험을 다음과 같이 실시하였다. 경구와 근육으로 각각 $1x10^9$ CFU/ml 과 $1X10^8$ CFU/ml 고스트 세포를 접종하고 동량으로 2주 간격으로 0, 1, 2회 추가 접종하였다. 고스트 세포 접종 10주후에 *S. typhimurium* x3339를 $1-2x10^6$으로 경구로 투여하였다. 접종하기 전에 4시간이상 절수 및 절식을 시켰고 접종 후 1시간 후 음수 및 사료를 제공하였다. 접종을 실시한 후 4주 동안 마우스를 관찰하였다.

표 41. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description
E.coli	
Top10	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG
DH5α	*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*
χ7213	*hi-1 thr-1 leuB6 supE44 tonA21 lacY1 recA RP4-2-Tc::Mu λpir, △asd △zhf-2::Tn10*
χ6212	*Φ*80d lacZ △M15 *deoR △(lacZYA-argF)U169 supE44λ⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 △asdA4 △zhf-2::Tn10 hsdR17* (R^- M^+)
JOL500	$F18^+$,LT^+,STa^+,STb^+,$stx2^+$,$stx2e^+$ETECisolatefrompig
JOL599	F4, Sta, Stb, LT
Salmonella	
MMP13	*S. typhimurium* JOL401 *asd*A16
S.typhimurium x8554	
S.typhimurium x3339	Animal-passaged isolate of wild-type strain SL1344
plasmids	
pET28a	a overexpression vector containing pBR322 origin
pBSL14	a vector containing polylinker of the pUC18
pBP527	a temperature sensitive vector containing R101 origin
pYA3332	a vector containing p15A origin
pYA3342	a vector containing pBR origin
pMMP118	x6212 [pYA3560::LT-B]
pMMP172	x6212 [pMMP167::cI PR28 E lysis::ara]
PMMP184	x6212 [pMMP172::PR28 ompA TM]
pMMP132	x6212 [pMMP81::LT-B]

17-2. 결과

(1) 고스트 세포의 생존률 감소를 위한 처리 방법 개선 결과

1) 멸균수를 처리한 경우의 고스트 세포의 생존률

고스트카세트를 유지하는 살모넬라 균주는 고스트화를 유도하였을 때 10^3~10^4 세포가 대부분 잔존하는 결과가 나타났다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 선행연구자들은 nuclease를 추가적으로 고스트카세트에 포함시키거나 비교적 무해한 화학물질을 이용하여 완전히 생존세포를 사멸시키기 위해 노력해 왔다. 본 연구에서도 유사한 문제에 봉착되었기 때문에 그런 문제을 보다 근원적으로 해결하기 위한 수단으로 세포의 용균으로 기인되는 E 단백질의 표적단백질이 외부에서 공급될 수 있는 가능성에 유추하여 배양액 속에 있는 그와 같은 물질을 제거하기 위해 세척과정을 걸치는 방법을 도안했다.

그림 90에서 보이는 것과 같이 단순히 멸균수로 보완이 되었을 경우 대부분 정균상태로 머물려 있어 더 이상의 고스트화가 진행되지 못하는 것으로 나타나 도리어 처리되지 않은 균주에 비교하여 생균수가 월등하게 높은 것으로 관찰되었다. 그러므로 멸균수로 대체는 전혀 효과가 없는 것으로 판단되었다.

2) M9 배지를 처리한 후 고스트세포화시 사멸률 개선 결과

멸균수로 처리하여 결과가 전혀 없었기 때문에 M9 배지에서 배양한 후 멸균 완충액으로 세척하여 다시 신선한 M9 배지를 첨가하였다. 그 결과 그림 91에서 나타나는 바와 같이 멸균수로 처리된 경우에 비교할 때 급격히 생균수가 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 특히, 이 경우에 있어서 흥미로운 사실은 그림 90에 비처리한 실험구에서 고스트화를 위해 소요된 시간이 44시간이 필요한 반면에 본 실험에서는 28시간으로 단축되는 결과를 확보하였다.

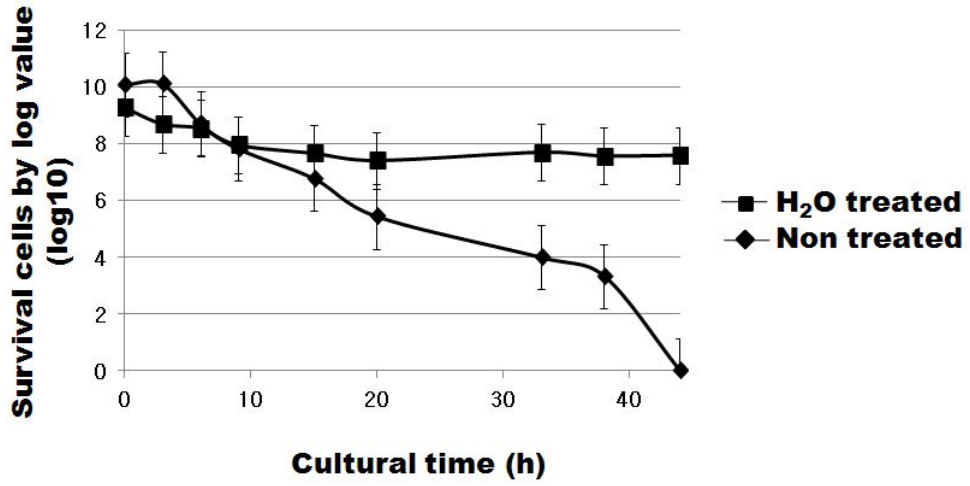


그림 90. Survival analysis of ghost after treatement of distilled water. Both ST x8554 [pMMP184] groups were grown for 24 h at 25℃ in 100 ml M9 minimal medium 42℃ with 0.2% Arabinose and then maintained for 44 h at 42℃. Water treated group was centrifuged before 42℃ incubation, treated supernatant was discarded, and then distilled water was added. Non treated group was continuously incubated after transferring 42℃ without any additional treatment.

배양 세포내에 존재하는 고스트화 과정에 유리되는 세포벽 성분은 지속적으로 생존세포가 성장할 수 있는 기반을 조성하는 것으로 추정되며, 그와 같은 물질을 제거하면 완전히 고스트화가 가능한 것으로 추정된다. 또한, 처리되지 않은 실험구보다 16 h 이상으로 시간이 많이 단축되는 효과가 있지만, 아직 더 많은 시간이 단축되어야 할 필요성이 있는 것으로 판단된다. 이것은 일반적 박테리아는 asd 유전자가 결손된 균주에 비교하여 성장이 1.5~2.0배 정도가 빠르기 때문에 고스트화를 위해 12~24시간이 소요되는 것에 대해 논리적으로 설명이 된다. 그러나 좀 더 효율적인 체계를 구축하기 위해서는 더 짧은 시간이 소요되는 방법의 모색이 요구된다.

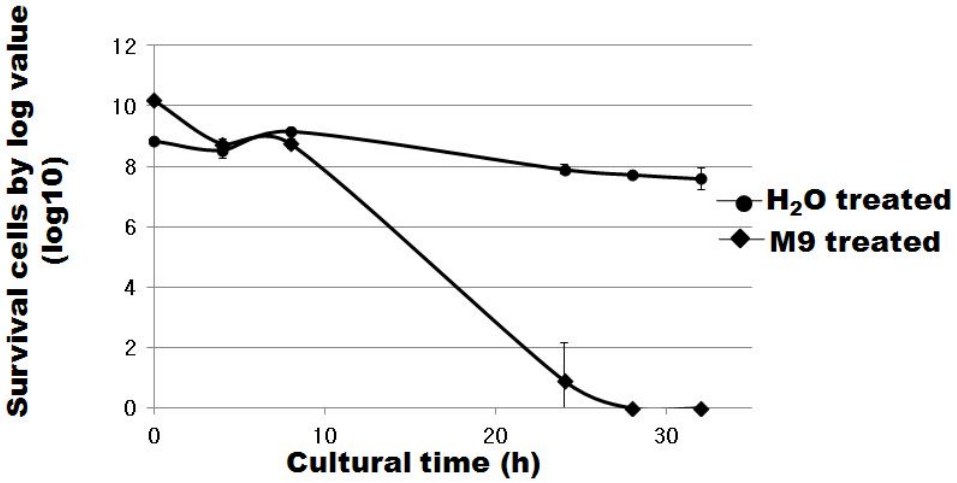


그림 91. Survival analysis of ghost after treatement of M9 medium. Both ST x8554 [pMMP184] groups were grown for 24 h at 25℃ in 100 ml M9 minimal medium 42℃ with 0.2% Arabinose. Water and M9-treations were centrifuged before 42℃ incubation, treated supernatant was discarded, and then distilled water and M9 medium were added and then incubated for indicated time.

(2) 면역성 분석 결과

1) 복합균주로부터 유도된 고스트백신에 의한 면역유도 효과

구강으로 고스트 백신을 투여할 경우에는 근육내 주사보다 전반적으로 면역지표가 낮게 나타나는 양상을 보였다. 이와 같은 현상은 구강투여의 경우는 소화기관내에서 고스트세포가 지속적으로 분해되어 면역성이 낮은 것이 그 원인으로 추정된다. 본 연구를 수행하는 과정에서 그림 92에서 보여지는 것과 같이 단독으로 각 항원을 투여한 경우에 비교하여 복합적으로 균주를 투여한 경우에 면역지표가 2주차에서부터 증가되는 경향성을 보였다.

본 결과를 바탕으로 하여 만약 복합 균주를 사용하거나 보다 독력이 강한 균주를 고스트세포 형성을 위한 균주로서 활용을 할 때 면역 유도능력이 상승될 가능성이 있는 것으로 추정되었다.

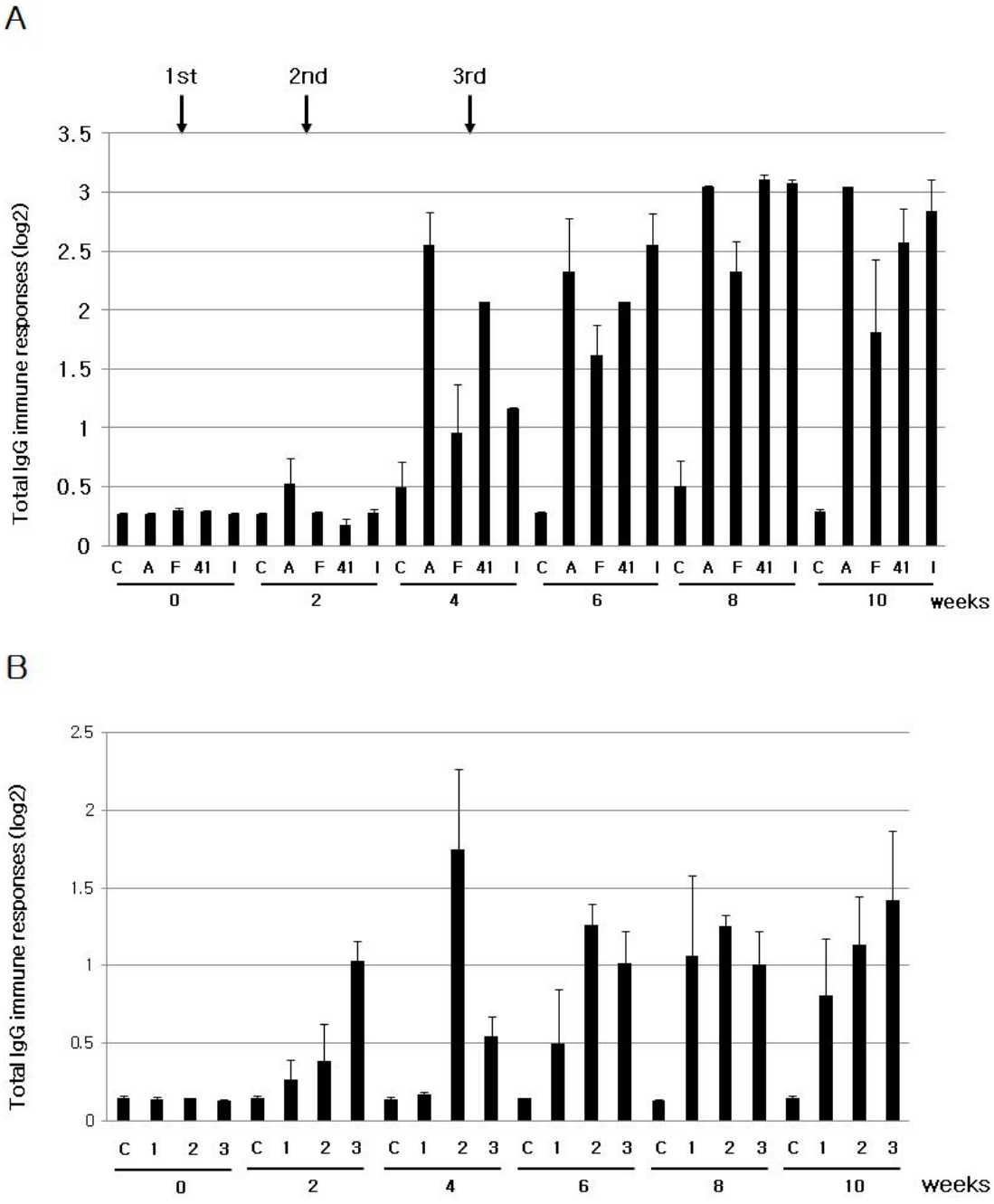


그림 92. **Analysis of total IgG to LPS (Lipopolysaccharides) from serum after administration of ghost vaccine into oral route. (A) Vaccination by single ghost vaccines and (B) Vaccination by mixing 4 ghost vaccines.** LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C, only PBS; A, fedA; F, fedF; 41, f41; I, intimin. 1, 2, and 3; 1, 2, and 3 times boosting.

2) 면역보강제 포함 및 독력에 따른 균주를 투여한 결과

① 면역유도 결과

MMP13 균주의 야생균주의 LD50가 $>10^9$ 이상으로 나타나기 때문에 독력이 매우 낮은 *Salmonella typhimurium* (ST)균주인 반면에 x8854의 야생균주는 LD50가 10^5 정도를 타내는 매우 강력한 독력을 가진 균주이다. 플라스미드 pMMP118은 LT-B를 운반하는 면역보강제로서 사용되어온 균주이다.

각 균주의 조합을 그림 93와 같이 구성하여 마우스에 백신화 실험을 수행하였다. 그 결과 단독 균주보다 x8554 [pMMP118]이 보강된 백신그룹에서 총 IgG 값이 높게 유도되는 것이 관찰되었다. 또한, 독력이 낮은 균주보다 독력이 높은 균주에서 초기 IgG 유도 값이 높게 형성되는 것이 관찰되었다. 본 연구에서는 독성이 강하거나 면역보강제인 LT-B가 추가되면 IgG 면역성을 증진시킬 수 있는 것으로 판단된다.

IgG1, IgG2a, fecal IgA 및 vaginal 세척액에 대한 IgA는 특이적인 양상을 관찰할 수 없었다(그림 94-97).

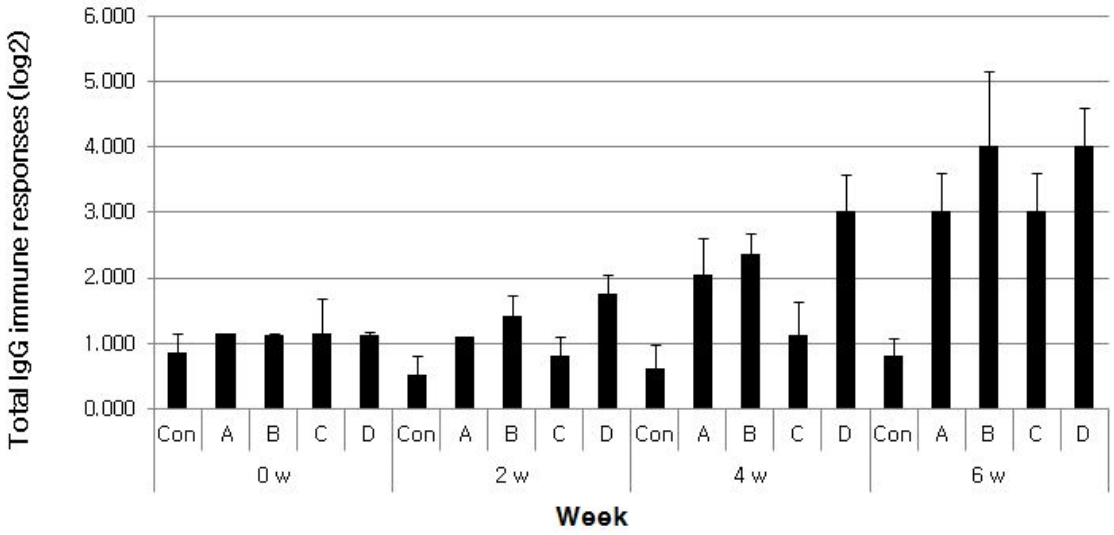


그림 93. Total IgG immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184], D; x8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118].

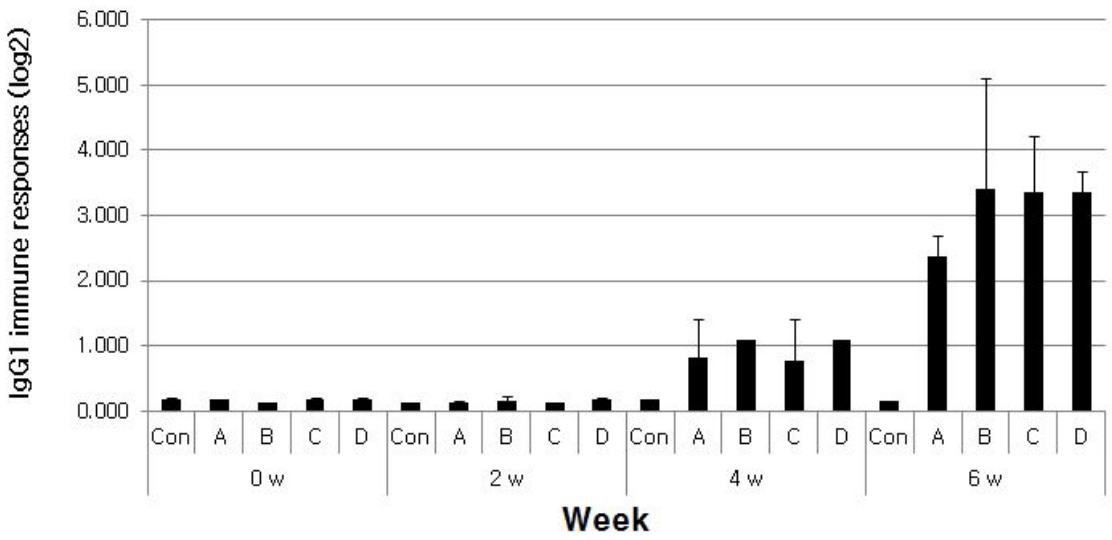


그림 94. IgG1 immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184], D; x8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118].

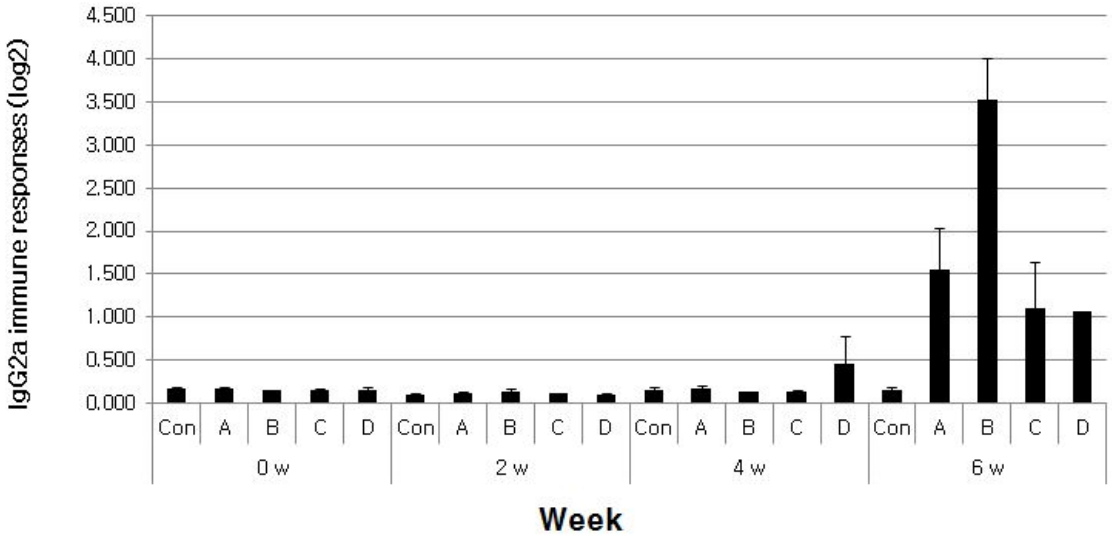


그림 95. IgG2a immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184], D; x8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118].

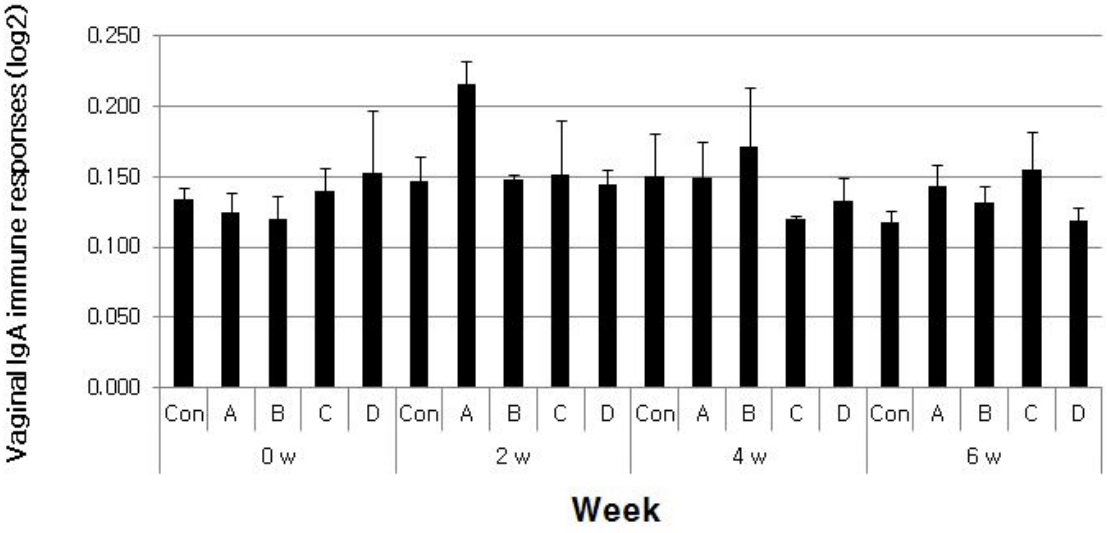


그림 96. Vaginal IgA immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184], D; x8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118].

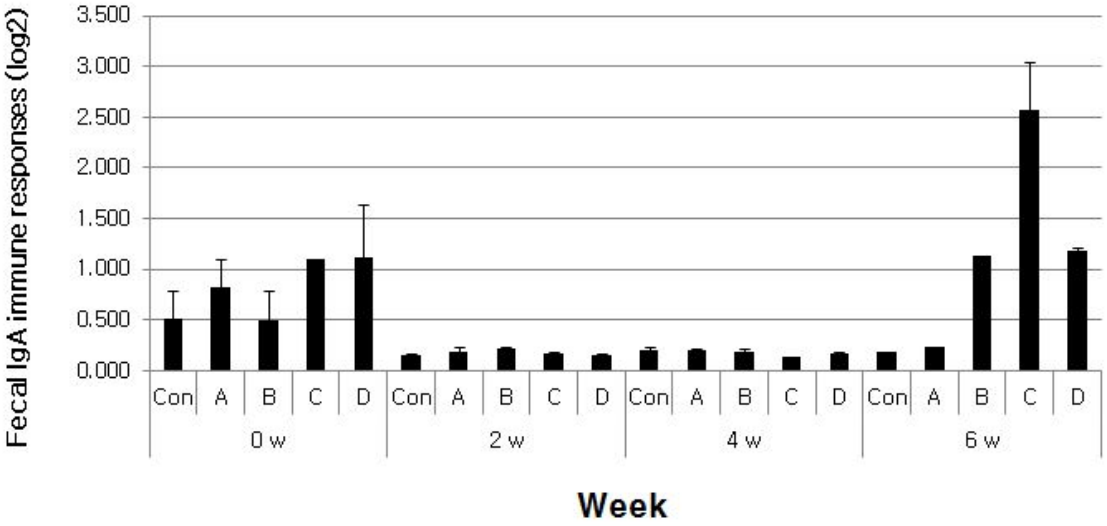


그림 97. Fecal IgA immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184], D; x8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118].

② 도전실험 결과

S. typhimurium x3339을 이용한 도전실험결과 대조구는 33.3%의 치사율을 보였지만, 단일균주 백신 그룹인 MMP13 [pMMP184]와 x8554 [pMMP184]는 약 50% 정도의 보호효과가 관찰되었다(그림 98). 그러나 두 균주를 이용한 MMP13 [pMMP184]/x8554 [pMMP118] 및 x8554 [pMMP184]/x8554 [pMMP118]은 모두 75% 이상의 보호 효과가 관찰되는 것으로 나타났다. 이 실험 결과는 보호효과는 균주의 독력의 강도에 의존하는 것이 아니라 사용된 균주의 개수에 의존하여 증가되는 것으로 나타났다.

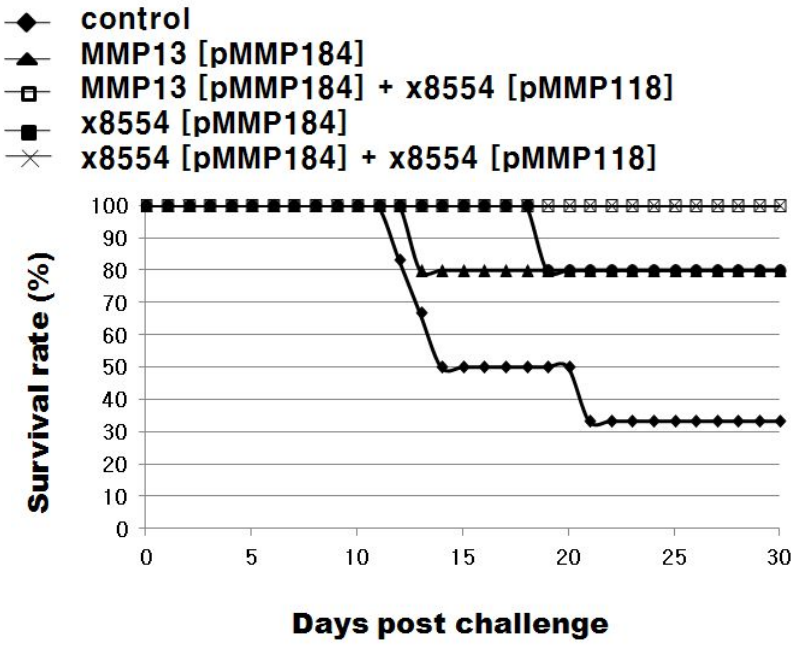


그림 98. Challenge test to BALB/c vaccinated via IM according to ghost strains. The virulent *S. typhimurium* x3339 was orally administrated by 8.4 x 10^6 CFU at 2 week post twice administration by ghost strains. The challenged mice were observed for 4 weeks.

3) 면역보강제와 독력이 높은 균주의 면역성 비교

① 백신화에 따른 면역 효과

면역보강제인 LT-B와 독력이 강한 균주인 *S. typhimurium* x3339 및 S. *S. typhimurium* JOL389를 면역보강제의 효력을 평가하기 위해 LT-B와 비교 실험을 수행해 보았다. 그 결과 그림 99에서 보여지는 바와 같이 LT-B을 유지하는 B 그룹에서 4주차에 약간 선행하여 상승되는 경향을 보였지만, 6주 이후에는 *S. typhimurium* x3339 및 S. *S. typhimurium* JOL389와 특별한 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러므로 total IgG 수준에서만 본다면 LT-B을 유지하는 x8554 [pMMP118]은 *S. typhimurium* x3339 및 S. *S. typhimurium* JOL389로 대체가 가능한 것으로 판단된다.

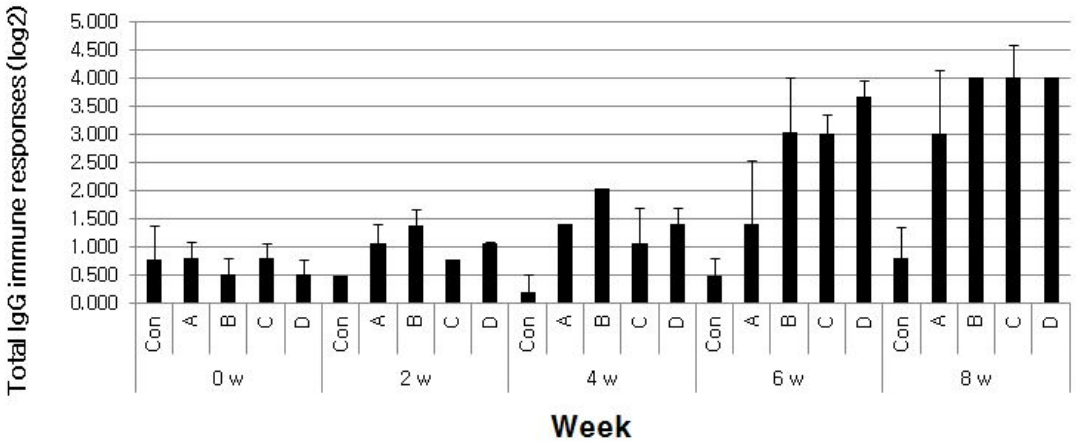


그림 99. Total IgG immune responses to ghost cells originated from different virulent strains via IM route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184] + χ3339, D; x8554 [pMMP184] + JOL389.

각 면역 글로블린 요소에 따른 결과를 분석해 본 결과 그림 100~103와 같은 결과를 얻었다. 그림 100에서 보여지는 바와 같이 IgG1의 경우는 x8554 [pMMP184]와 x8554 [pMMP118] 그룹에서 4주차부터 IgG1이 감지되어 x8554 [pMMP184]/x3339나 x8554 [pMMP184]/JOL389보다 전반적으로 높게 형성되는 것으로 나타났다. 그러나 IgG2a의 경우는 IgG1과 상반되는 결과가 관찰되었다(그림 101). 즉, 백신 투여 후 6주차부터 면역능력이 감지되었으며, x8554 [pMMP184]와 x8554 [pMMP118] 그룹보다 x8554 [pMMP184]/x3339나 x8554 [pMMP184]/JOL389에서 높게 감지되는 것이 관찰되었다. 질 IgA에서는 특이적인 양상이 관찰되지 않았지만, 분변 IgA는 x3339나 JOL389가 첨가된 실험구에서 보다 높은 IgA가 4~8주차에서 관찰되었다.

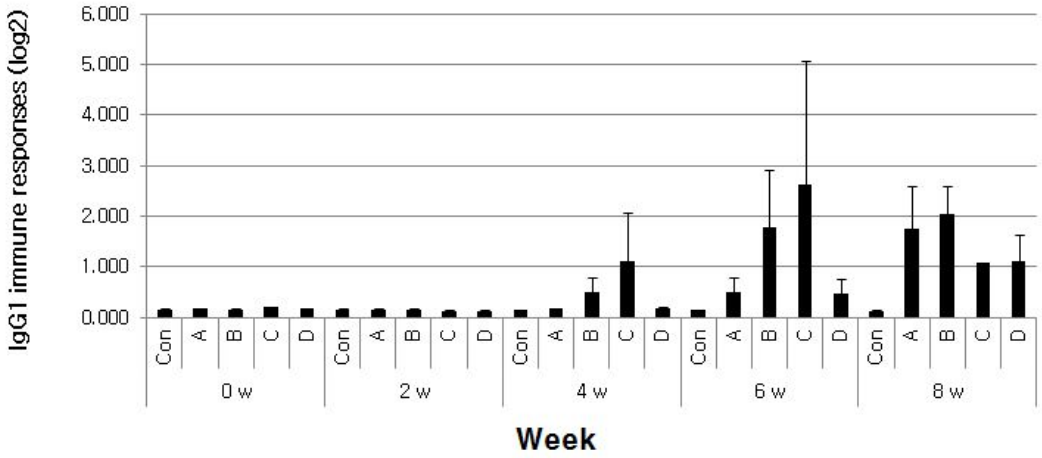


그림 100. IgG1 immune responses to ghost cells originated from different

virulent strains via IM route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184] + χ3339, D; x8554 [pMMP184] + JOL389.

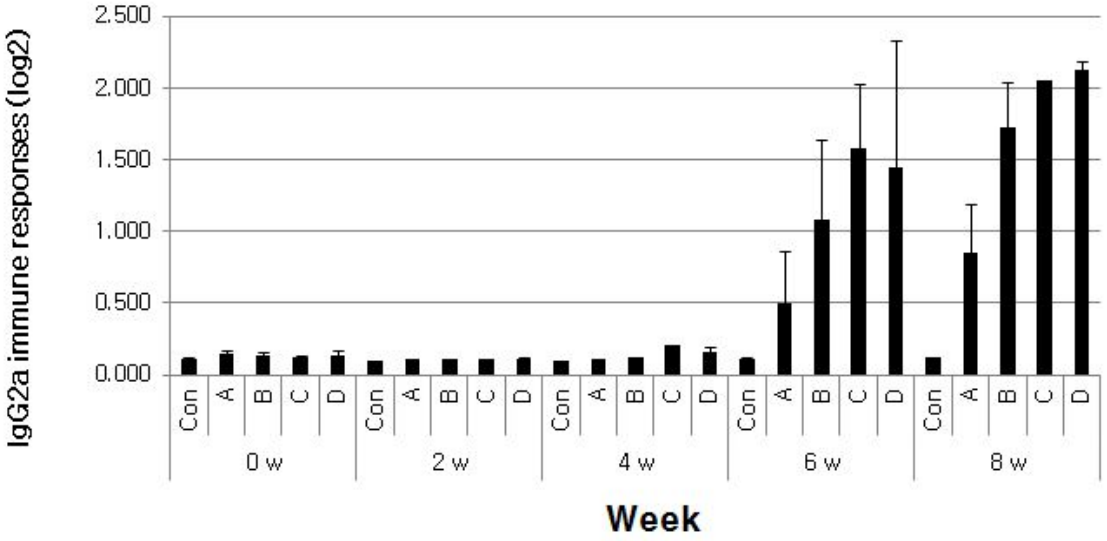


그림 101. **IgG2a immune responses to ghost cells originated from different virulent strains via IM route of BALB/c.** LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184] + χ3339, D; x8554 [pMMP184] + JOL389.

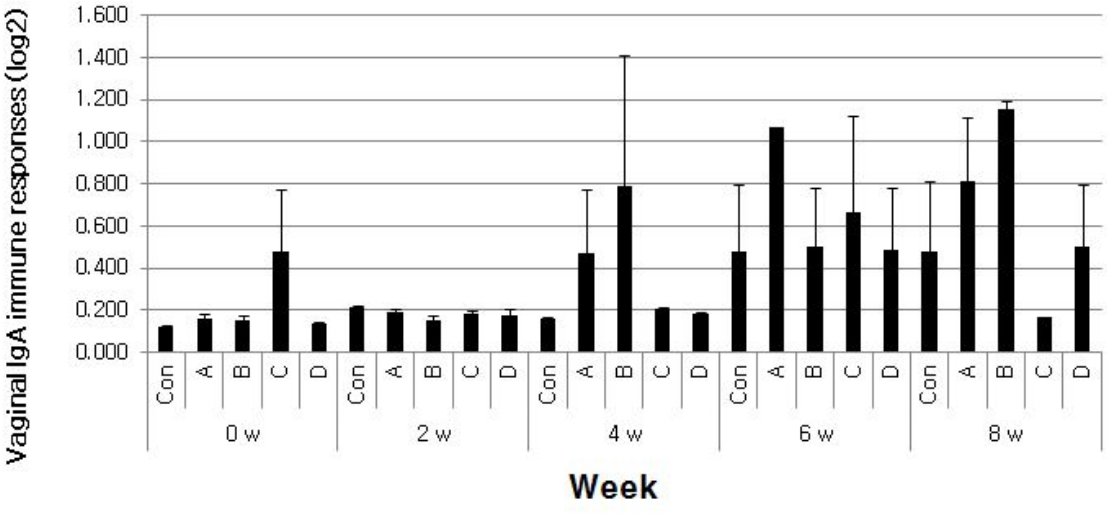


그림 102. **Vaginal IgA immune responses to ghost cells originated from**

different virulent strains via IM route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184] + χ3339, D; x8554 [pMMP184] + JOL389.

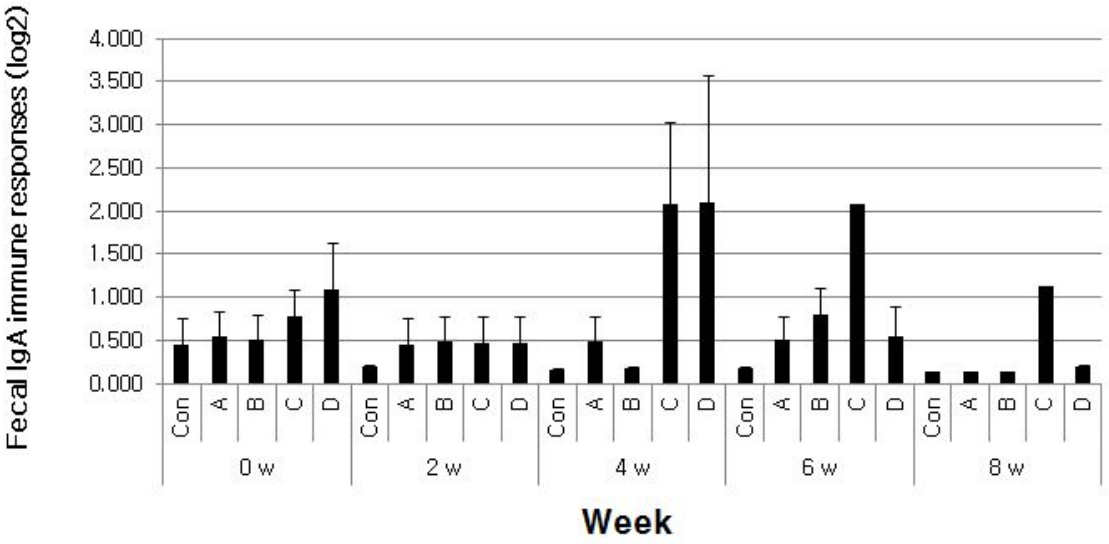
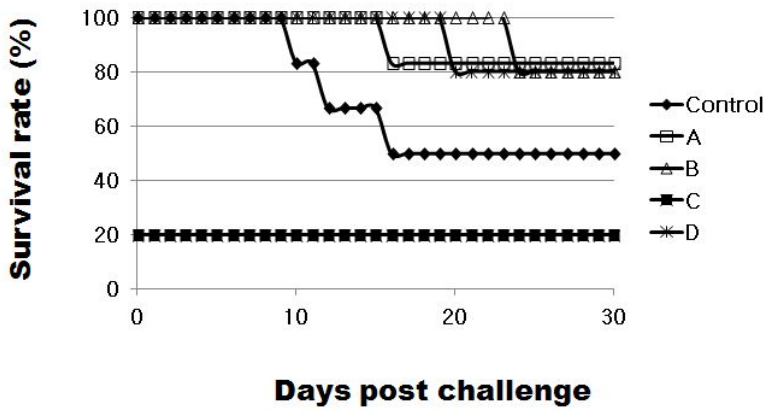


그림 103. **Fecal IgA immune responses to ghost cells originated from different virulent strains via IM route of BALB/c.** LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118], C; x8554 [pMMP184] + χ3339, D; x8554 [pMMP184] + JOL389.

② 도전실험 결과

S. typhimurium x3339을 이용한 도전실험결과 대조구는 50%의 치사율을 보였지만, 단일균주 백신 그룹인 x8554 [pMMP184], x8554 [pMMP184]/x8554 [pMMP118] 및 x8554 [pMMP184]/JOL389는 약 30% 정도의 보호효과가 관찰되었다(그림 104). 그러나 x8554 [pMMP184]/x3339는 백신화 초기에 대부분의 균주가 치사가 유도되는 관계로 정확한 결과를 돌출하지 못했지만, x8554 [pMMP184]/JOL389의 경향성으로 보아 x8554 [pMMP184]/x8554 [pMMP118] 그룹의 대체가 가능한 것으로 추정된다.



A; x8554 [pMMP184]
B; x8554 [pMMP184] + x8554 [pMMP118]
C; x8554 [pMMP184] + x3339
D; x8554 [pMMP184] + JOL389

그림 104. Challenge test to BALB/c vaccinated via IM according to ghost cells originated from different virulent strains. The virulent *S. typhimurium* x3339 was orally administrated by 1.12 x 10^7 CFU at 2 week post twice administration by ghost strains. The challenged mice were observed for 4 weeks.

3) 면역보강제로서 JOL389을 유지하는 백신 타입을 구강으로 투여한 후 면역 분석 결과

① 면역 능력 분석

근육내 투여를 통해 선별된 백신 그룹에 대해 구강내 투입시 면역능력의 양상을 분석하기 위해 *S. typhimurium* JOL389을 유지하는 백신그룹을 구강으로 투여하였다. 그 결과 그림 105에서 보여지는 바와 백신 투여 후 2주차부터 x8554 [pMMP184]/JOL389 그룹에서 면역 능력이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 그 이후 x8554 [pMMP184]를 사용한 경우에 비교하여 훨등하게 높게 감지되는 것으로 나타났다.

또한, IgG1에 대한 분석 결과 두 그룹간에 특이적인 차이점을 관찰하는 어려웠지만, 모두 4주차 이후에 발현이 상승되는 결과를 보였다(그림 106). IgG2a에 대한 분석 결과는 4, 6, 10주차에 발현에 차이가 있는 것을 그림 107에서 관찰할 수 있다. Vasinal sIgA의 분석결과는 4~8주차에 대조구에 비교하여 발현이 상승되는 것으로 나타났다(그림 108). x8554 [pMMP184]/JOL389 그룹이 x8554 [pMMP184] 그룹에 비교하여 대체적으로 높게 감지되는 것으로 나타났다. Fecal sIgA는 8주차에 약간 차이가 있는 것으로 나타났지만, 전반적인 경향성은 감지가 되지 않은 것으로 판단된다(그림 109).

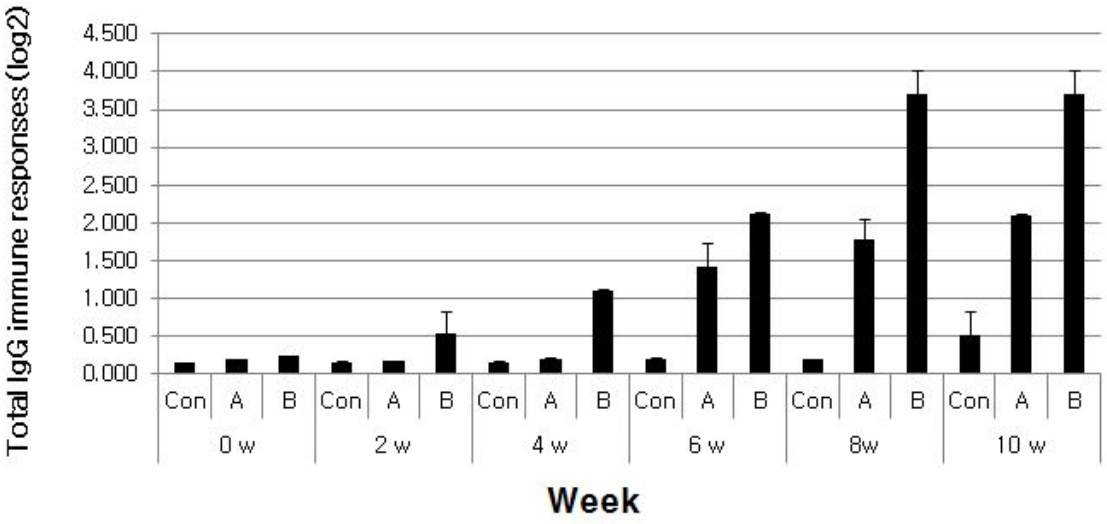


그림 105. Total IgG immune responses to ghost cells originated from different virulent strains via oral route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; oral administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + JOL389.

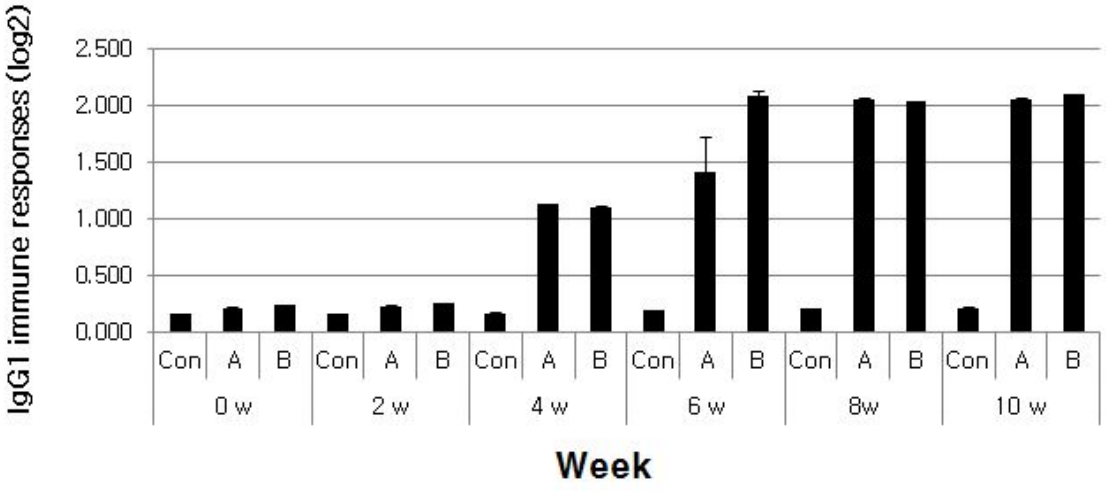


그림 106. IgG1 immune responses to ghost cells originated from different virulent strains via oral route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; oral administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + JOL389.

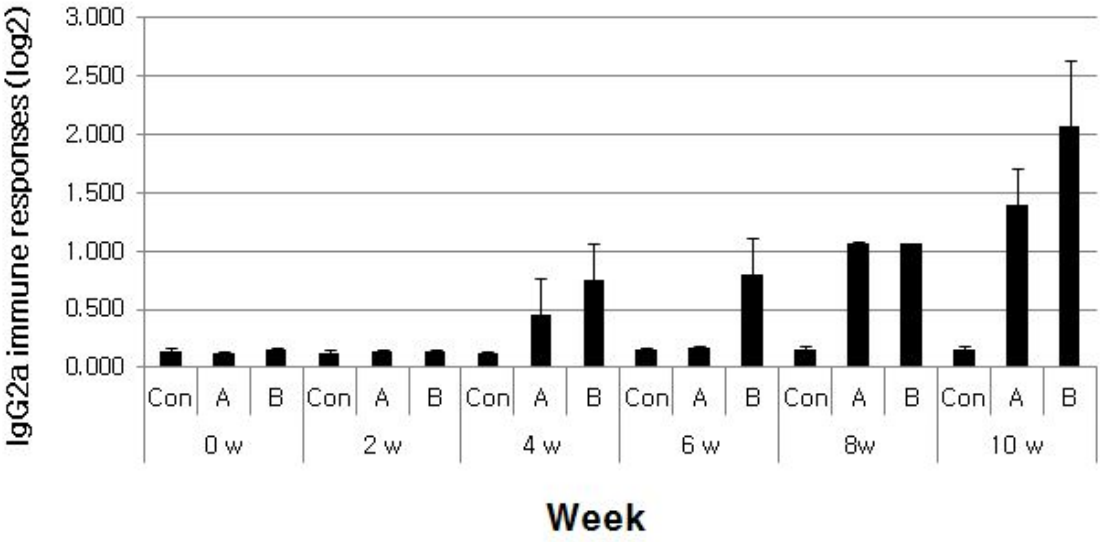


그림 107. **IgG2a immune responses to ghost cells originated from different virulent strains via oral route of BALB/c.** LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; oral administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + JOL389.

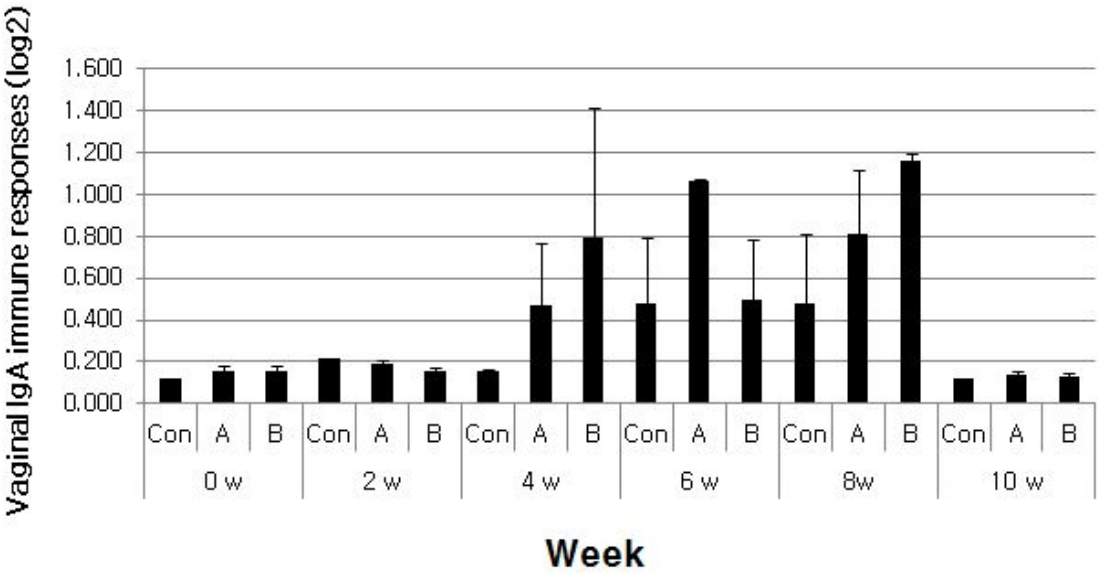


그림 108. **Vaginal IgA immune responses to ghost cells originated from different virulent strains via oral route of BALB/c.** LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; oral administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + JOL389.

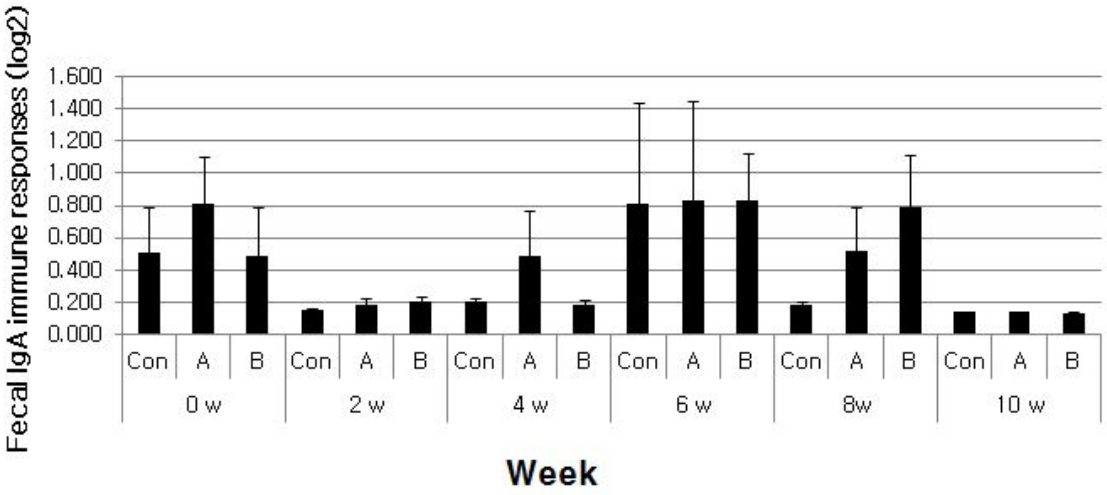
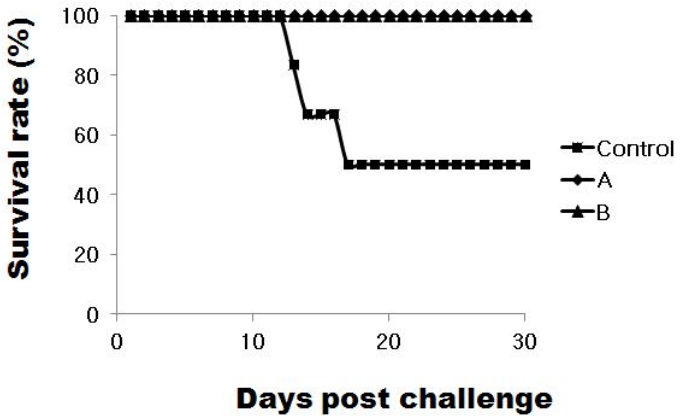


그림 109. Fecal IgA immune responses to ghost cells originated from different virulent strains via oral route of BALB/c. LPS and total of 2′Ab was treated for 2 h at room temperature by 2ug/ml concentration and by 1:2000 ratio, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; oral administration by only PBS, A; χ8554 [pMMP184], B; χ8554 [pMMP184] + JOL389.

② 도전실험 결과

S. typhimurium x3339을 이용한 도전실험결과 대조구는 50%의 치사율을 보였지만, 단일균주 백신 그룹인 x8554 [pMMP184] 및 x8554 [pMMP184]/JOL389는 약 50% 정도의 보호효과가 관찰되었다(그림 110).

이상의 결과를 종합해 보면 S. typhimurium JOL389는 면역보강제인 LT-B를 대체하여 사용할 수 있을 것으로 판단되며, 향후 왜 이와 같은 대체가 가능한지에 대한 전반적인 면역세포 발현 체계에 대한 정확한 비교 분석 결과에 대한 연구가 추진되어야 할 것으로 판단된다.



A; x8554 [pMMP184]
B; x8554 [pMMP184] + JOL389

그림 110. **Challenge test to BALB/c vaccinated via oral route according to ghost cells originated from different virulent strains.** The virulent *S. typhimurium* x3339 was orally administrated by 1.0 x 10^6 CFU at 2 week post twice administration by ghost strains. The challenged mice were observed for 4 weeks.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 연도	연구개발의 목표	연구개발의 달성도	관련분야의 기술발전에의 기여도
1차 연도 2010년도	백신 개발을 위한 면역원성이 우수한 항원 유전자 확보	100	신생자돈 및 이유자돈과 관련된 주요 부착인자에 대한 유전자 분석은 차 후 병원성 대장균 백신 개발에 기초 정보 제공가능
	Genetic modification에 의한 생균 bacteria delivery system을 이용한 재조합 다가 백신 개발	100	이종 항원을 전달할 수 있는 기술 개발은 여러 백신을 동시에 예방할 수 있는 다가 백신 개발에 박차를 가할 수 있는 기술력 제공
	실험동물에서의 면역 유도 실험 및 부작용 검사	100	안전한 약독화 살모넬라 delivery system 제조 기술은 유사 세균의 적용 가능성 제공하여 유상 세균에 대한 전달 시스템 개발에 정보 제공
	고스트 시스템 개발 및 고스트 백신 제작	100	저렴한 고스트 사균 백신의 개발은 국내 백신 기술력을 한 차원 높여 백신의 다양한 제조 방법에 대한 정보 제공
	실험동물에서의 고스트 백신 면역 유도 살험	100	경구 접종이 가능한 고스트 백신의 개발은 백신의 다양한 개발에 대한 정보 제공 가능
2차 연도 2011년도	목적 동물에서의 접종 경로별 생균 다가 백신 효능시험	100	접종 경로의 다양성은 다양한 접종 경로를 이용한 백신 개발에 도움을 줄 것임
	자돈에서의 백신 효능 시험	100	이유 후 설사 예방 백신 개발은 양돈가에 경제적으로 도움을 주었을 뿐만 아니라 백신 수출에도 도움을 줄 것임
	Ghost vector를 이용한 신생 자돈 설사 예방 백신 개발	100	경구 접종이 가능한 사균 백신의 개발 기술은 다른 주요 소화기 백신 개발에 응용 가능 할 것임
	개발된 신생 자돈 설사 예방ghost 백신 마우스에서의 면역 유도 시험	100	사균 백신 임에도 불구하고 생균 백신처럼 세균성 면역 반응 유도는 보다 안전하면서 효과가 우수한 사균 백신 개발에 도움을 줄 것임

3차 연도 2012년도	생균 백신 기존 상업용 백신과의 효능비교실험	100	방어 면역이 오래 지속될 수 있는 백신 개발에 정보 제공
	백신균주의 양돈장 field 시험	100	다가 생균 및 사균 백신의 개발로 인해 양돈가의 현실에 적합한 백신 종류 선택의 폭이 넓어짐
	개발된 신생 자돈 설사 예방 ghost 백신 목적동물에서의 효능 시험	100	생균 및 사균 백신의 경구 접종 가능성으로 인해 양돈가에 접종 방법의 다양성과 노동력 절감 등과 같은 경제적 효과를 기대할 수 백신 개발에 정보 제공
	안정되고 발현이 강화된 ghost vaccine 백신의 마우스에서의 최적화 실험	100	고스트 세포 표면으로의 이종 항원의 발현은 배양하기 힘든 세균의 예방 백신 개발에 도움을 줄 수 있을 것임
	고스트 세포의 살모넬라균에 대한 보호능력 확인	100	경구 접종이 가능한 고스트 사균 백신은 유사한 질병을 예방하기 위한 백신 개발에 기초 정보를 제공 할 수 있음

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

[제1세부과제 : 전북대학교]

1. 기술양도 및 산업화 계획-기술이전내용 기입

본 연구를 통해 제작된 K88ab, K88ac, K99, FasA, F41, FedA, FedF 그리고 intimin 발현 약독화 살모넬라 생균 및 고스트 사균 다가 백신은 안전성과 방어력이 우수하하였으며 근육 접종뿐만 아니라 경구로 접종이 가능하기 때문에 양돈가의 실정에 적합한 백신의 형태와 접종 방법을 선택할 수 있는 우수한 백신으로 야외농장에서의 임상시험 허가를 받게 되면 복수의 농장에서 시험한 후에 실용화를 목표로 하고 있다.

고스트 사균 다가 백신은 생균 다가 백신에 비해 방어력이 약간 떨어지지만 숙주에 접종 후 생존능력이 없는 균주들로 안전성을 더욱 강조하여야 할 경우에 안심하고 사용할 수 있다.

또한 이들 모든 생균 및 고스트 사균 다가 백신은 경구접종으로도 탁월한 방어면역을 유도함으로 더욱 편리하게 음수혼합 등의 방법으로 접종이 가능하여 실용화가 가능하다. 이를 위해 “고스트 살모넬라 변이주를 유효성분으로 함유하는 살모넬라균증 및 콜리바실로시스 동시 예방용 고스트 백신 조성물”에 관한 특허와 관련된 기술과 백신 조성물에 관한 기술을 이전하기 위해 특허권을 ㈜중앙백신연구소 (대표이사 윤인중)에 기술이전료를 받고 (57,000,000원, 2013년 7월부터 2014년 6월까지) 양도하면서 특허와 관련된 제반 서류, 균주 및 기술노하우를 전수하여 산업화를 위한 작업에 착수하였다.

2. 교육지도 홍보 등 기술 확산 계획 등

본 연구를 통하여 얻은 병원성 대장균에 의한 포유자돈에서의 설사 및 이유 자돈에서의 설사를 예방하기 위한 백신 접종과 도전감염 후에 나타나는 임상 증상, 면역 반응 등의 결과는 현재 시판되고 있는 포르말린 불활화 백신의 근육 접종에 따른 부작용을 사례를 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것이며 또한 돼지에서 살모넬라 근절과 병원성 대장균에 의한 포유 자돈에서의 설사와 이유 자돈에서의 설사를 조기 진압이 가능하게 하여 양돈가의 경제적 손실을 최소화 하는데 도움을 줄 수 있을 것이다. 향후 적극적인 교육 및 지도 그리고 홍보 활동을 통해 본 연구를 통해 획득한 정보와 기술 널리 알림으로서 가축방역에 이바지한다

(http://www.dhns.co.kr/board_view_info.php?idx=52628&s_where=all&s_word=이존화&page_num=1&seq=47).

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획 등

가. 특허출원

발명의 명칭	출원번호 (등록번호)	출원일자 (등록일자)	비고
돼지의 병원성 대장균의 부착인자가 형질전환된 약독화 살모넬라균 변이주 및 이를 포함하는 돼지의 병원성 대장균증 및 살모넬라균증의 예방 및 치료용 백신 조성물	제 2009-0080020 호 (등록 제 10-1178415호) (국내특허)	2009년 08월 27일 (2012년 08월 24일)	제1세부과제
	PCT/KR2010/005806 (국제특허)	2010년 1월 6일	
고스트 살모넬라 변이주를 유효성분으로 함유하는 살모넬라균증 및 콜리바실로시스 동시 예방용 고스트 백신 조성물	10-2013-0032469	2013년 03월 27일	
외래 단백질의 발현·분비용 재조합 벡터	10-1044332	2011년 06월 20일	제1협동과제
고스트 살모넬라 및 이를 함유하는 세균성 소화기 질환 예방용 백신	10-2012-0143910	2012년 12월 11일	
다목적 고스트 살모넬라 백신 및 이를 이용한 동물 면역반응 유도방법	10-2012-0143928	2012년 12월 11일	

나. 균주기탁

KCTC번호	Specification	기탁기관	JOL번호
KCTC11541BP	돼지에서 병원성 대장균에 의한 설사증을 예방하기 위해 약독화 살모넬라에	한국생명공학연구소	JOL940(K88ab), JOL941(K88ac), JOL946(K99), JOL937(FasA), JOL934(FedA), JOL947(F41), JOL948(Intimin),

	의해 병원성 대장균의 주요 핌브리아를 발현/분비하는 생균 백신		JOL906(LTB)
KCTC12377BP	포유자돈에서 살모넬라균증과 코실로바실로시스를 동시에 애방하기 위해 코실로바실로시스의 주요 부착인자를 약독화 살모넬라 세오 외벽에 발현하는 고스트 사균 백신	한국생명공학연구소	JOL1323(F4ab), JOL1324(F4ac), JOL1325(F5), JOL1326(F6), JOL1327(F41)

다. 학술논문-

본 연구개발 사업을 수행한 결과물로 현재까지 다음 편이 SCI급 국제학술논문에 개재되었다.

Title	Journal	Year	Vol	Authors (특기사항)
Enhancement of immune responses by an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain secreting an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein as an adjuvant for a live *Salmonella* vaccine candidate.	Clinical and Vaccine Immunology	2011	18	제1세부과제
Immune responses to new vaccine candidates constructed by a live attenuated *Salmonella* Typhimurium delivery system expressing *Escherichia coli* F4, F5, F6, F41 and intimin adhesin antigens in a murine model.	The Journal of veterinary medical science	2011	73	
Age-dependent competition of porcine enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) with different fimbria genes - short communication.	Acta veterinaria Hungarica	2011	59	
Development of a novel live vaccine delivering enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigens to prevent post-weaning diarrhea in piglets.	Veterinary Immunology and Immunopathology	2012	146	

Comparative evaluation of a vaccine candidate expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesins for colibacillosis with a commercial vaccine using a pig model.	Vaccine	2012	30	
A vaccine candidate for post-weaning diarrhea in swine constructed with a live attenuated *Salmonella* delivering *Escherichia coli* K88ab, K88ac, FedA, and FedF fimbrial antigens and its immune responses in a murine model.	Canadial Journal of Veterinary Research	2012	76	
Protection against neonatal *Escherichia coli* diarrhea by vaccination of sows with a novel multivalent vaccine candidate expressing *E. coli* adhesins associated with neonatal pig colibacillosis.	Research in veterinary science	2013	94	
An Efficient Secretion of the protein Fused to the AgfA Signal Sequence in *Salmonella*	African Journal of Biotechnology	2011	10	제1협동과제
RepC as a Negative Copy Number Regulator is Involved in the Maintenance of pJB01 Homeostasis	African Journal of Biotechnology	2011	5	
Construction of a conditional lethal *Salmonella* mutant via genetic recombination using the *ara* system and *asd* gene	J. Microbiological Methods	2011	87	
Characterization of a novel plasmid, pSW, isolated from *Salmonella enterica* servar Typhimurium JOL401	African Journal of Microbiology Research	2012	6	

4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획

본 연구 접근방법, 실험방법, 그리고 관찰된 결과를 기반으로 더욱 발전된 백신조성물을 개발연구 해 나갈 것이다. 특히 본 연구개발 사업을 진행함에 있어 야외논장 임상시험 허가를 받아 산업화가 가능하도록 수행해 나갈 것이다. 고스트 사균 백신의 제작 기술 및 고스트 사균 백신의 경구 접종을 통한 방어 효과는 그동안 포르말린 불활화 백신을 근육 접종 함으로써 일어나는 부작용과 더불어 점막면역 부재로 인한 소화기 질병 예방백신의 한계를 극복할 수 있는 발판을 마련하였다고 생각한다. 따라서 본 연구를 통해 얻은 고스트 사균 백신의 제조 기술을 다른 소화기 질병 또는 호흡기 질병 유발 원인균에 적용하여 점막 면역을 효과적으로 유도하여 이들 병원균을 효과적으로 예방할 수 있는 고스트 사균 백신을 개발하고자 한다. 또한 우리가 개발한 고스트 사균 다가 백신은 고스트 사균 백신의 세포 외벽에 이종 항원을 발현할 수 있는 시스템을 적용시켰기 때문에 배양하기 힘들어 백신 제조에 어려움이 있었던 원인균의 항원을 발현 시켜 저렴하면서도 안전하게 이들 질병을 동시에 방어할 수 있는 많은 종류의 다가 백신을 개발하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 없음

제 7 장 참고문헌

Barrow P.A., Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of *Salmonella gallinarum*, Infect. Immun. (1990) 58:2283-2288.

Barrow P.A., Huggins M.B., Lovell M.A., Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system, Infect. Immun. (1994) 62:4602-4610.

Basnet H.B., Kwon H.J., Cho S.H., Kim S.J., Yoo H.S., Park Y.H., et al, Reproduction of fowl typhoid by respiratory challenge with *Salmonella* Gallinarum, Avian Dis. (2008) 52:156-159.

Boddicker J.D., Ledeboer N.A., Jagnow J., Jones B.D., Clegg S., Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella* enterica serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the *fimH* gene of the *fim* gene cluster, Mol. Microbiol. (2002) 45:1255-1265.

Boddicker J.D., Jones B.D., Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells, Infect. Immun. (2004) 72:2002-2013.

Bouzoubaa K., Nagaraja K.V., Kabbaj F.Z., Newman J.A., Pomeroy B.S., Feasibility of using proteins from *Salmonella gallinarum* vs. 9R live vaccine for the prevention of fowl typhoid in chickens, Avian Dis. (1989) 33:385-391.

Christensen J.P., Barrow P.A., Olsen J.E., Poulsen J.S., Bisgaard M., Correlation between viable counts of *Salmonella* Gallinarum in spleen and liver and the development of anaemia in chickens as seen in experimental fowl typhoid, Avian Pathol. (1996) 25:769-783.

Crichton P.B., Yakubu D.E., Old D.C., Clegg S., Immunological and genetical relatedness of type-1 and type-2 fimbriae in salmonellas of serotypes Gallinarum, Pullorum and Typhimurium, J. Appl. Bacteriol. (1989) 67:283-291.

Crouch S.P., Kozlowski R., Slater K.J., Fletcher J., The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J. Immunol. Methods (1993) 160:81-88.

Danese P.N., Pratt L.A., Kolter R., Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture, J. Bacteriol. (2000) 182:3593-3596.

Dorel C., Lejeune P., Rodrigue A., The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? Res. Microbiol. (2006) 157:306-314.

Duguid J.P., Anderson E.S., CampbellI., Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. J. Pathol. Bacteriol. (1966) 92:107-138.

Gogal R.M. Jr, Ahmed S.A., Larsen C.T., Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new, simple, nonradioactive assay (lympho-pro), Avian Dis. (1997) 41:714-725.

Griffin H.G., Barrow P.A., Construction of an *aroA* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum: its effectiveness in immunization against experimental fowl typhoid, Vaccine (1993) 11:457-462.

Higgins S.E., Erf G.F., Higgins J.P., Henderson S.N., Wolfenden A.D., Gaona-Ramirez G., Hargis B.M., Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of *Salmonella enteritidis* by abdominal exudate cells, Poult. Sci. (2007) 86:2315-2321.

Jeong J.H., Song M., Park S.I., Cho K.O., Rhee J.H., Choy H.E., *Salmonella enterica* serovar gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells, J Bacteriol. (2008) 190:6340-6350.

Jones M.A., Wigley P., Page K.L., Hulme S.D., Barrow P.A., *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens, Infect. Immun. (2001) 69:5471-5476.

Kang H.Y., Dozois C.M., Tinge S.A., Lee T.H., Curtiss R. 3rd., Transduction-mediated transfer of unmarked deletion and point mutations through use of counterselectable suicide vectors, J. Bacteriol. (2002) 184:307-312.

Kang H.Y., Srinivasan J., Curtiss R. 3rd., Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine, Infect. Immun. (2002) 70:1739-1749.

Kim S.W., Moon K.H., Baik H.S., Kang H.Y., Kim S.K., Bahk J.D., et al., Changes of physiological and biochemical properties of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by deletion of *cpxR* and *lon* genes using allelic exchange method, J. Microbiol. Methods (2009) 79:314-320.

Ledeboer N.A., Jones B.D., Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium, J. Bacteriol. (2005) 187:3214-3226.

McEwen J., Silverman P., Genetic analysis of *Escherichia coli* K-12 chromosomal mutants defective in expression of F-plasmid functions: identification of genes *cpxA* and *cpxB*, J Bacteriol. (1980) 144:60-67.

Matsui H., Suzuki M., Isshiki Y., Kodama C., Eguchi M., Kikuchi Y., et al., Oral

immunization with ATP-dependent protease-deficient mutants protects mice against subsequent oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium, Infect. Immun. (2003) 71:30-39.

Nakayama S., Watanabe H., Identification of *cpxR* as a positive regulator essential for expression of the *Shigella sonnei virF* gene, J. Bacteriol. (1998) 180:3522-3528.

Nakayama S., Kushiro A., Asahara T., Tanaka R., Hu L., Kopecko D.J., Watanabe H., Activation of *hilA* expression at low pH requires the signal sensor *CpxA*, but not the cognate response regulator *CpxR*, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Microbiology (2003) 149:2809-2817.

Paulsen I.T., Beness A.M., Saier M.H. Jr, Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria, Microbiology (1997) 143:2685-2699.

Pomeroy B.S., Nagaraja K.V., Fowl Typhoid, in: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M., Yoder Jr H.W. (Eds.), Diseases of Poultry, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1991, pp. 87-99.

Qureshi M.A., Dietert R.R., Bacon L.D., Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1986) 181:560-568.

Rana N., Kulshreshtha R.C., Cell-mediated and humoral immune responses to a virulent plasmid-cured mutant strain of *Salmonella enterica* serotype gallinarum in broiler chickens, Vet. Microbiol. (2006) 115:156-162.

Rahn A., Drummelsmith J., Whitfield C., Conserved organization in the *cps* gene clusters for expression of *Escherichia coli* group 1 K antigens: relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the *cps* genes from *Klebsiella pneumoniae*, J. Bacteriol. (1999) 181:2307-2313.

Reed I.J., Muench H., A simple method of estimating fifty percent endpoints, Am. J. Hyg. (1938) 27:493-497.

Robitaille G., Moineau S., St-Gelais D., Vadeboncoeur C., Britten M., Detection and quantification of capsular exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* using lectin probes, J. Dairy Sci. (2006) 89:4156-4162.

Rosu V., Chadfield M.S., Santona A., Christensen J.P., Thomsen L.E., Rubino S., Olsen J.E., Effects of *crp* deletion in *Salmonella enterica* serotype Gallinarum, Acta Vet. Scand. (2007) 49:14.

Shah D.H., Lee M.J., Park J.H., Lee J.H., Eo S.K., Kwon J.T., Chae J.S., Identification of *Salmonella gallinarum* virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis, Microbiology (2005) 151:3957-3968.

Shah D.H., Shringi S., Desai A.R., Heo E.J., Park J.H., Chae J.S., Effect of *metC* mutation on *Salmonella* Gallinarum virulence and invasiveness in 1-day-old White Leghorn chickens, Vet. Microbiol. (2007) 119:352-357.

Smith H.W., The use of live vaccines in experimental *Salmonella gallinarum* infection in chickens with observation on their interference effect, J. Hygiene (1956) 54:419-432.

Takaya A., Suzuki M., Matsui H., Tomoyasu T., Sashinami H., Nakane A., Yamamoto T., Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice, Infect. Immun. (2003) 71:690-696.

Takaya A., Tomoyasu T., Tokumitsu A., Morioka M., Yamamoto T., The ATP-dependent lon protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1, J. Bacteriol. (2002) 184:224-232.

Torres-Cabassa A.S., Gottesman S., Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis, J. Bacteriol. (1987) 169:981-989.

Tsilibaris V., Maenhaut-Michel G., Van Melderen L., Biological roles of the Lon ATP-dependent protease, Res. Microbiol. (2006) 157:701-713.

Wigley P., Hulme S.D., Bumstead N., Barrow P.A., In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the *SAL1* locus, Microbes Infect. (2002) 4:1111-1120.

Wigley P., Hulme S., Powers C., Beal R., Smith A., Barrow P., Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken, BMC Vet. Res. (2005) 1:2.

Wilson R.L., Elthon J., Clegg S., Jones B.D., *Salmonella enterica* serovars gallinarum and pullorum expressing *Salmonella enterica* serovar typhimurium type 1 fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells, Infect. Immun. (2000) 68:4782-4785.

Wolfe A.J., Parikh N., Lima B.P., Zemaitaitis B., Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR, J. Bacteriol. (2008) 190:2314-2322.

Yamamoto K., Hirao K., Oshima T., Aiba H., Utsumi R., Ishihama A., Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*, J. Biol. Chem. (2005) 280:1448-1456.

Zhang-Barber L., Turner A.K., Dougan G., Barrow P.A., Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a *nuoG* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum, Vaccine (1998) 16:899-903.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품 연구개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.