

최 종 보 고 서

<p>(뒷면)</p> <p>주 의 (편집순서 8)</p>	<p>고 면역원성숙주특이항원을이용한브루셀라진단법개발</p> <p>농림축산식품부</p>	<p>(앞면)</p> <table border="1"><tr><td>발간등록번호</td></tr><tr><td>11-1543000-000990-01</td></tr></table> <p>고면역원성 숙주특이 항원을 이용한 브루셀라 진단법 개발 (Development of diagnostic methods using host specific and high immunogenic antigen for brucellosis)</p> <p>경상대학교</p> <p>농림축산식품부</p>	발간등록번호	11-1543000-000990-01
발간등록번호				
11-1543000-000990-01				

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고면역원성 숙주특이 항원을 이용한 브루셀라 진단법 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 9월 9일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 김 석

세부연구책임자 : 김 석

연 구 원 : 정광면

연 구 원 : 김대근

연 구 원 : 한나심보리오

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 유 한상

연 구 원 : 임영빈

연 구 원 : 성경룡

요 약 문

I. 제 목

고면역원성 숙주특이 항원을 이용한 브루셀라 진단법 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

구분	특허		신품종				(예시) 유전자 등록	논문		기타 (학술발 표)
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 산수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	달성	-	-	-	-	-	-	3	1	5
2차 년도	목표	2	-					1	1	
	달성	2						4	3	5
3차 년도	목표	-	2					2	2	
	달성	2	0					2	1	4
4차 년도	목표									
	달성									
5차 년도	목표									
	달성									
계	목표	2	2					3	4	
	달성	4	0					9	5	14

III. 연구개발의 목적 및 필요성

브루셀라 감염증을 정확히 진단하기 위한 고민감도 진단법의 부재로 인해 발생하는 문제점을 개선하고, 국내 감염우의 색출과 유통의 차단을 위해 브루셀라 균의 항원성을 분석, 고면역원성을 보이는 항원을 발굴 고민감도의 진단기법을 확립하여 본 감염증의 근절을 위한 토대를 구축하고자 본 과제를 수행하였다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발
 - 숙주특이 고면역원성 항원 발굴

- 발굴된 항원의 특성분석 및 재조합항원 생산
 - 항원조합을 통한 고민감도 혈청학적 진단기법 개발
 - 개발된 진단방법의 정확도, 특이도 등 조사
 - 고면역원성 항원의 대량생산체계 확립 및 산업화
2. 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치 평가
- 실험동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가
 - 목적동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가
 - 감염시기별 대상항원의 특성 분석 및 혈청학적 진단을 위한 최적 다중항원 조합 설정
 - 감염시기별 기존 방법의 정확도, 특이도 등 조사

V. 연구개발결과

1. 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발

1). 숙주특이 브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴 (28 종)

브루셀라 균체항원단백질에 대한 숙주의 감염시기별 최적 항원반응성을 나타내는 고면역원성 항원을 28종 발굴 (계획: 5종 이상) 하였으며 이들의 유전자적 특성 및 면역원성을 평가하였다.

2). 실험동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원 발굴

브루셀라 감염 마우스로부터의 혈청에 대한 항원 반응성을 보이는 브루셀라 균체항원단백질은 감염초기(10일)에는 13개, 중기(30일)에는 24개, 말기(60일)에는 54개로 분석되었으며, 이들 중 감염초기의 1개, 중기의 3개, 말기의 8개는 비특이적 반응 및 *Y. enterocolitica* O:9 과의 교차반응을 보여 배제시켜야 할 항원으로 평가되었다. 또한 실험동물 감염시기별 고면역원성 항원의 복합 조합 설정을 통해 감염초기와 중기의 공통반응 항원단백질은 1개, 감염초기와 말기는 5개, 감염중기와 말기는 8개로 나타났으며, 3가지 감염 시기 모두의 항원단백질은 인정되지 않았다. 따라서 비특이적 반응 및 교차반응을 배제시키고 감염시기별 높은 반응성을 가진 항원의 단위 및 복합 조합 설정을 통해 총 17개만이 실험동물 대상 감염 시기별 최적의 고면역원성 항원으로 평가되었다.

3). 목적동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원 발굴

브루셀라 감염 소로부터의 혈청에 대한 항원 반응성을 보이는 브루셀라 균체항원단백질은 감염초기(21일)에는 134개, 중기(49일)에는 110개, 말기(70일)에는 106개로 분석되었으며, 이들 중 13개의 비특이적 반응 및 13개의 *Y. enterocolitica* O:9 과의 교차반응이 나타나면서 배제시켜야 할 항원으로 평가되었다. 또한 목적동물 감염시기별 고면역원성 항원의 복합 조합 설정을 통해 감염초기와 중기의 공통반응 항원단백질은 19개, 감염초기와 말기는 10개, 감염중기와 말기는 4개로 나타났으며, 3가지 감염시기의 공통항원단백질은 74개로 평가되었다. 따라서 비특이적 반응 및 교차반응을 배제시키고 감염시기별 높은 반응성을 가진 항원의 단위 및 복합 조합 설정을 통해 총 55개만이 목적동물 대상 감염 시기별 최적의 고면역

원성 항원으로 평가되었다.

4). 실험동물과 목적동물의 고면역원성 항원의 최적 항원성 비교분석

브루셀라 균체항원단백질에 대한 숙주의 감염시기별 고면역원성 반응을 보인 최적 항원단백질은 실험동물(마우스)에서는 17개, 목적동물(소)에서는 55개로 평가되었다. 종합적으로 감염시기별 항원에 대해 실험동물(마우스)보다 목적동물(소)에서 더 높은 항원반응성(2.9배)을 나타내는 것으로 비교 평가되었으며, 이러한 결과는 *Brucella abortus*의 소에 대한 높은 숙주특이성으로 인해 기인된 것으로 판단된다. 실험동물(마우스) 감염시기별 최적 항원단백질들은 protein biosynthesis, proteolysis, metabolism, transcription 등에 관여하는 기능을 가진 단백질로 동정되었으며 일부는 아직 기능이 잘 밝혀지지 않은 putative uncharacterized protein으로 동정되어 앞으로 더 구체적인 기능규명연구가 요구된다고 판단된다. 비특이반응 및 교차반응을 모두 배제시킨 목적동물(소)과 실험동물(마우스)의 전체 반응성 공통항원단백질은 12개로 비교 평가되었으며 이 중 감염시기별 고면역원성 최적 항원 반응으로 선별된 3개의 단백질(aldehyde dehydrogenase, malate dehydrogenase, superoxide dismutase, Cu-Zn)이 가장 진단적 가치 및 백신으로의 활용가치가 높을 것이라 판단된다.

5). 고면역원성 재조합 항원 28종 작제 및 면역원성 확인

브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴: 제 1차년도에 수행된 고면역원성 항원 (9종)에 더하여 2차년도에 고면역원성 항원 19종 (Omp10, Omp19, Omp28, bfr, 0268 (Metal-dependent hydrolase), msrA, rocF, pgk, mdh (malate dehydrogenase), tsf, OsmC, ndk, asp, dps, YaeC, InPB, aspC, hypothetical protein, LivF, ndk 및 tbpA)을 발굴하여 총 28종에 대한 브루셀라 균의 고면역원성 재조합항원이 생산되었으며, 각 항원에 대한 면역 반응을 분석하여, 특이적인 면역반응이 나타나는 것을 확인하였다.

6). 숙주특이 고면역원성 재조합 항원의 세포독성 분석

브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴: 제 1차년도에 수행된 고면역원성 항원 (9종)에 더하여 2차년도에 고면역원성 항원 19종을 발굴하여 총 28종에 대한 브루셀라 균의 고면역원성 재조합항원에 대한 세포 독성 평가 결과, 대부분이 세포독성이 없는 것으로 평가 됐으나, rocF, mdh 및 tsf 재조합단백의 경우 비교적 낮은 농도에서 (15 mg/ml) 독성이 인정되었다.

7). 고면역원성 재조합 항원을 이용한 ELISA 법 확립

각각의 재조합 항원을 이용하여, ELISA법을 수행해 TAT 결과와 비교해 본 결과, bfr, omp10, omp19, omp28 및 osmC에서 약 90% 이상의 민감도와 특이도를 보였고, 그 이외의 단백질은 반응성이 낮거나 민감도 특이도가 70% 미만에 그쳐, 위 5가지의 항원을 이용한 ELISA 방법 구축이 필요할 것으로 판단되었다.

8). 고면역원성 재조합 항원의 최적 조합 설정

각각의 재조합 항원을 이용하여, ELISA법을 수행해 TAT 결과와 비교하여, 우수한 결과를 도출한, bfr, omp10, omp19, omp28 및 osmC 5종의 조합을 수행해 본 결과, omp10,

omp19, omp28항원의 경우 단일 항원의 사용에 비하여 조합을 하였을 때 민감도와 특이도가 95% 이상 증가되었으며, bfr 및 osmC는 단일 항원의 사용보다 낮은 민감도 (80% 미만)을 보여 단일 항원을 이용한 ELISA방법 개발에 적합 할 것으로 판단되었다.

9). 고면역원성 재조합 항원 대량생산 및 이를 이용한 간이 진단법 확립

재조합 항원 대량생산을 위해 pCold 및 pMal vector expression system을 이용한 대량생산기법이 확립되었음, 또한 이들 항원을 이용해 ELISA법을 수행해 TAT 결과와 비교해 우수한 결과를 도출한 bfr과 osmC재조합 항원을 이용하여 간이진단법 (Latex bead agglutination방법)을 수행 해 본 결과, bfr의 경우 특이도가 87.66%를 나타냈고, 민감도가 89.8%를 보였고 , osmC의 경우 특이도가 95.2%를 나타냈고, 민감도가 90.96%를 보여, 간이 진단기법의 개발이 가능할 것으로 판단 되었다. 또한, omp10, omp19, omp28항원을 이용한 Dip stick assay를 수행해본 결과 TAT와 비교하였을 때, TAT 음성혈청은 Dip stick assay 및 Sandwich Dip stick assay에서 음성을 보인 반면 TAT 양성 혈청은 rOmp 항원 조합을 이용한 ELISA에 비하여 특이도가 낮았지만, 현장 활용이 가능할 것으로 판단된다.

10). 개발된 진단방법의 경제성 평가

현재 브루셀라균 항원을 이용한 ELISA 방법은 유럽의 스바노바사 제품이 주요 진단키트로 상용화 되어있으며, 96 sample 적용 기준 약 900\$ 정도에 판매가 되고 있으나, 본 연구과제를 통해 개발된 ELISA 진단기법의 경우 참여업체인 (주) 메디안 디노스틱과 평가를 해 본 결과 96 sample 적용 기준 400\$ 내외로 시장 공급이 가능할 것으로 평가되고 있으나, 이에 대한 구체적인 경제성 평가는 국내는 물론 전 세계적인 브루셀라 발생 상황, 판매 수요량 등에 따라 변화가 있을 것으로 판단되어져, 현 시점에서 확정하기는 다소 어려울 것으로 판단되며 보다 면밀한 분석이 요구된다.

2. 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치 평가

1). 재조합 단백질의 생산 및 분석

제 1 세부과제에서 발굴된 9종의 숙주특이 브루셀라 pMal vector system을 이용한 고면역원성 재조합 단백질 (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC, AspC, OsmC, DPS)과 pCold TF vector system을 이용한 9종의 고면역원성 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19)에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치를 평가하기 위하여 고면역원성 재조합 단백질의 대량 정제를 실시하였으며, 분리 정제된 고면역원성 재조합 단백질들은 SDS-PAGE, Western blot, ELISA, in vitro, 그리고 in vivo 실험등에 각각 사용되었다.

2). 고면역원성 재조합 단백질을 이용한 혈청학적 분석

고면역원성 재조합 단백질을 분리 정제하여 야외가검혈청 및 인공감염우 혈청을 이용한 SDS-PAGE, Western blot, 그리고 ELISA 분석을 실시한 결과

(1) SDS-PAGE 및 Western blot

: pMal vector system을 이용한 재조합 단백질 중에서 OMP28이 Western blot 실험에서 야외가검혈청과 가장 높은 반응성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, pCold TF vector system을 이용한 재조합 단백질 중에서 OMP28은 야외가검혈청 및 인공감염우혈청을 이용한 Western blot에서 높은 민감도를 나타내었고 tsf는 인공감염우혈청을 이용한 Western blot에서 높은 민감도를 나타내었다. 반면에, 다른 단백질들은 양성혈청에 대한 민감도가 매우 낮게 나타났다.

(2) ELISA

: 고면역원성 재조합 단백질을 이용한 야외가검혈청 및 인공감염우혈청과의 반응성을 검사하기 위해서 ELISA 기법을 이용하여 항원 및 혈청의 농도를 결정하였다. 이를 통하여 고면역원성 재조합 단백질을 이용한 혈청 민감도 검사를 실시하였고 OMP28 재조합 단백질이 가장 민감도가 높은 단백질로 확인되었다. 또한, ELISA 실험 결과에서 고면역원성 재조합 단백질들이 각각의 혈청 마다 다른 민감도를 나타내었다.

3). In vitro cytokines 생성 분석

6종의 고면역원성 재조합 단백질 (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC)을 RAW 264.7 cell에 자극시킨 후 TNF- α 의 생성능을 확인한 결과 6종의 재조합 단백질 모두 자극 후 24시간부터 높은 생성능을 보이는 것을 확인하였다. 특히, Omp10 재조합 단백질의 TNF- α 생성능이 가장 높은 것으로 나타났다. 또한, 9종의 고면역원성 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19) 자극에 따른 면역매개물질 (NO 및 cytokines) 발현을 분석한 결과 RAW 264.7 cell에서 TNF- α 와 IL-6의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다. 하지만, IL-1 β , IL-12p70, IFN- γ 의 생성은 검출량 이하였다. 특히, IL-6의 발현은 Th2 면역반응을 유도하는 물질로 잘 알려져 있으며 0628, Bfr, TbpA, OMP19 재조합 단백질 자극에 있어서는 초기부터 발현을 유도하는 것을 확인하였으며, rocF는 48시간부터 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 이들 고면역원성 재조합 단백질이 Th2 면역반응을 유도하는 것으로 판단된다.

4). In vivo 면역반응 유도능 분석

(1) Mouse

첫 번째 실험에서 6종의 고면역원성 재조합 단백질 (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC)을 접종 후 혈청 내 항원 특이 항체 생성능 평가에서 IgM 생성능이 가장 높은 항원은 OmpA, Omp2b 이었으며, IgG 생성능이 가장 높은 항원은 Omp28, Omp2b 이었다. 세포성 면역을 확인한 고면역원성 항원을 마우스에 접종한 실험에서 접종된 마우스의 비장세포 중 항원 특이 항체 IgG 발현 세포 생성능이 높은 고면역원성 항원은 Omp28 이었으며 IL-4, INF- γ 발현 세포 생성능이 높은 항원은 Omp2b 이었다. 따라서 6종의 고면역원성 재조합 단백질을 통한 면역유도능 실험에서 면역반응이 가장 높게 관찰된 고면역원성 재조합 항원은 Omp28과 Omp2b 로 평가된다.

두 번째 실험에서 고면역원성 재조합 단백질 AspC, OsmC, DPS로 면역시킨 mouse 혈청을 이용한 ELISA test 결과 IgG1, IgG2a 그리고 cytokine 생성능이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

세 번째 실험에서 Normal BALB/C mouse의 spleen으로부터 splenocytes를 분리하여 재조합 단백질로 자극시킨 결과 면역 초기 Th1 면역과 연관된 cytokines (IFN- γ 와 IL-2)의 유도가 증가하는 것을 확인하였다. 반면에, Th2 면역과 관련된 cytokines (IL-4와 IL-5)의 발현은 확인할 수 없었다. 이는 재조합 단백질 자극이 naive한 splenocytes에 있어서 면역 초기 세포성 면역반응을 유도하는 것으로 판단된다.

네 번째 실험에서 pCold TF vector system을 이용한 고면역원성 재조합 단백질 9종 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19)을 면역 후 면역기관 (spleen)에서의 면역반응여부를 평가하였다. BALB/C mouse를 고면역원성 재조합 단백질로 면역을 시킨 후 3, 7, 14, 28일째 혈청을 회수하여 ELISA를 통해 IgG 및 IgM의 항체 생성능을 확인한 결과 OMP28, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19에 의한 항체 생성능은 매우 효율적으로 나타남을 확인하였다. 하지만, OMP10의 경우 IgM의 생성에 있어서 다른 재조합 단백질들과 달리 시간경과에 따라 발현량이 증가하는 것을 확인하였다.

Mouse 면역 후 28일째 splenocyte를 회수하여 항체 또는 cytokine 발현 세포 수를 ELISpot으로 측정한 결과 0628, TbpA, OMP19, mdh 재조합 단백질에서 IgG 생성 세포 수가 유의하게 증가했음을 확인하였고 OMP28, Bfr, OMP10은 유의성을 확인할 수 없었다. 그리고, Th1 면역에 관련된 IFN- γ 생성 세포 수에 있어서는 mdh와 tsf 재조합 단백질만이 유의하게 증가된 것을 확인하였고 Th2 면역에 관련된 IL-4 생성 세포 수에 있어서는 TbpA, mdh, tsf, rocF 재조합 단백질이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 또한, in vivo 면역 후 면역기관에서 28일째 IFN- γ 생성 세포 수 보다 IL-4 생성 세포 수에 있어서 그 발현량이 더 많은 것이 확인되었으며 이를 통하여 Th1 면역보다 Th2 면역반응의 증가를 유도하는 것으로 판단된다.

(2) Bovine

목적동물(소)의 PBMC에서 고면역원성 재조합 단백질 (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC) 자극 후 cytokines 유전자 발현능 평가에서 3 가지 cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 유전자에서 발현증가율을 나타낸 항원은 Omp19, 2 가지 cytokines (IL-1 β , TNF- α) 유전자 발현증가를 나타낸 항원은 Omp28 이었다. Apoptosis 유전자 발현능 평가에서 2 가지 apoptosis (Bax, TLR4) 유전자 발현증가를 나타낸 항원은 Omp19, Omp28, OmpA 이었다.

또다른, 고면역원성 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628)을 이용한 목적동물(소)의 PBMC에서 생성되는 cytokines의 발현을 비교분석한 결과 IL-6, IL12p40, IFN- γ , and TNF- α 4종류의 cytokine의 경우 시간의 변화에 따라 각각의 항원들에 의한 발현정도가 현저하게 차이가 나는 것을 확인하였으나 다른 3종류의 cytokine (iNOS, IL-1 β , 및 IL-4)의 발현량은 시간에 따른 비교에서 크게 차이를 나타내지 않음을 확인하였다. 또한, cytokine들의 발현양상은 자극하는 항원의 양에 따라 다르게 나타났다.

5). 결론

이상의 실험결과를 바탕으로 고면역원성 재조합 단백질의 대량 정제기법을 확립할 수 있었고 in vitro 및 in vivo 면역유도능 실험을 통하여 고면역원성 재조합 단백질들이 Th1 면역보다는 Th2 면역유도능이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 면역반응에 기초할 때에 본 실험에 사용한 고면역원성 재조합 항원 중 OMP28, OMP2b, TbpA, mdh는 향후 브루셀라 진단용 후보물질로 이용가능성이 매우 높으며, 특히 초기 감염우 검출을 위한 진단에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 특허

1). 브루셀라 진단과 관련하여 다음과 같이 특허출원(등록)을 하였음

[특허명칭] 박테리오페리틴을 이용한 브루셀라 감염증 진단방법

- 출원번호 : 10-2014-0066500

- 출원일자 : 2014년 5월 30일

[특허명칭] 브루셀라 균주 유래 NDK 재조합 항원을 이용한 브루셀라 감염증 예방방법

- 출원번호 : 10-2014-0066499

- 출원일자 : 2014년 05월 30일

[특허명칭] 브루셀라 아보투스 균주 유래의 Ohr 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물

- 출원번호 : 10-2015-0095013

- 출원일 : 2015년 7월 3일

[특허명칭] 브루셀라 아보투스 균주 유래의 다중 재조합 외막단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도

- 출원번호 : 10-2015-0095014

- 출원일 : 2015년 7월 3일

2) 특허출원(등록)된 기술을 참여기업(메디안디노스틱)에 기술을 이전할 계획임

3) 참여기업이 기술을 이전받은 후 산업화 및 보급할 계획임

2. 논문

1) SCI 급 발표논문

(1) JJ Lim, DH Kim, JJ Lee, DG Kim, WG Min, HJ Lee, MH Rhee, S Kim. Protective efficacy of Brucella abortus recombinant Omp28(rOmp28) subunit vaccine against Brucella abortus infection in mouse model, J. Vet. Sci, 13; 287-292, 2012

(2) JJ Lee, JH Kim, DG Kim, DH Kim, HL Simborio, WG Min, MH Rhee, HH Chang, S

- Kim. Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase (betB) as an essential virulence factor of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol.* 168; 131–140, 2014.
- (3) Lee JJ, Simborio HL, Reyes AW, Kim DG, Hop HT, Min W, Her M, Jung SC, Yoo HS, Kim S. Immunoproteomic identification of immunodominant antigens independent of the time of infection in *Brucella abortus* 2308–challenged cattle. *Vet. Res.* 46; 17–28, 2015
 - (4) Lee JJ, Simborio HL, Reyes AW, Kim DG, Hop HT, Min W, Her M, Jung SC, Yoo HS, Kim S. Proteomic analyses of the time course responses of mice infected with *Brucella abortus* 544 reveal immunogenic, *FEMS Microbiol Lett.* 357, 164–174. 2014
 - (5) Lee JJ, Lim JJ, Kim DG, Simborio HL, Kim DH, Reyes AW, Min W, Lee HJ, Kim DH, Chang HH, Kim S. Characterization of culture supernatant proteins from *Brucella abortus* and its protection effects against murine brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 37, 221–228, 2014
 - (6) Simborio HL, Lee JJ, Bernardo Reyes AW, Hop HT, Arayan LT, Min W, Lee HJ, Yoo HS, KimS. Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis. *Microb. Patho.* 16, 41–46, 2015
 - (7) Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Hannah Leah Tadeja Simborio, Huynh Tan Hop, Lauren Togonon Arayan, Suk Kim. Molecular cloning, purification and immunogenicity of recombinant *Brucella abortus* 544 malate dehydrogenase (MDH) protein. *J. Vet. Sci*, 2015 (In press)
 - (8) Seung Bin Cha, WS Lee, MK Shin, MH Jung, AN Yoo, JW Kim, Han Sang Yoo. Early transcriptional responses of internalization defective *Brucella abortus* mutants in professional phagocytes, RAW 264.7, *BMC Genomics*, 14, 426–435, 2013
 - (9) Kyung Yong Sung, MH Jung, MK Shin, HE Park, JJ Lee, S, Han Sang Yoo Kim Induction of Immune Responses by Two Recombinant Proteins of *Brucella abortus*, Outer Membrane Proteins 2b Porin and Cu/Zn Superoxide Dismutase, in Mouse Model, *J. Microbiol. Biotechnol*, 24(6), 854–861, 2014
 - (10) Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Hannah Leah Tadeja Simborio, Huynh Tan Hop, Lauren Togonon Arayan, Suk Kim. Dextran sulfate sodium upregulates MAPK signaling for the uptake and subsequent intracellular survival of *Brucella abortus* in murine macrophages, *Microbial pathogenesis*, 2015 (2nd revision)
 - (11) Huynh Tan Hop, Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Hannah Leah Tadeja Simborio, Lauren Togonon Arayan, Suk Kim. Immunization of mice with recombinant *Brucella abortus* organic hydroperoxide resistance (Ohr) protein protects against a virulent *Brucella abortus* 544 infection, *Journal of Microbiol. Biotech.* 2015 (2nd revision)
 - (12) Hannah Leah Tadeja Simborio, Huynh Tan Hop, Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Lauren Togonon Arayan, Suk Kim. Immune modulation and protective effects of recombinant *Brucella abortus* OmpA against *Brucella abortus* 544 infection in mice, *FEMS Microbiol. Lett.* 2015 (Submitted)
 - (13) Huynh Tan Hop, Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Hannah Leah Tadeja Simborio,

Lauren Togonon Arayan, Suk Kim. Evaluation of an ELISA using recombinant *Brucella abortus* bacterioferritin (Bfr) for bovine brucellosis, Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2015 (Submitted)

- (14) Young Bin Im, MH Jung, MK Shin, S Kim, Han Sang Yoo. Expression of cytokine and apoptosis-related genes in bovine peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Brucella abortus* recombinant proteins, Vet. Res. 2015 (Submitted)

2) 비 SCI 급 발표논문

- (1) Kim DG, Lee JJ, Simborio HL, Reyes AWB, Min W, Lee HJ, Chang HH. Kim S. Impaired bacterial proliferation, and compromised immune response in diabetic db/db mice infected with *Brucella abortus*. J. Agri. Life Sci. 47; 65-74, 2013
- (2) Kim DG, Simborio HL, Reyes AWB, Min W, Lee HJ, Lee JJ, Kim S. The key roles of toll-like receptor (TLR) for intracellular survival of *Brucella*. J. Preven. Vet. Med. 4; 185-193, 2013.
- (3) Kim DG, Lee JJ, Simborio HL, Reyes AWB, Min W, Lee HJ, Chang HH. Kim S. Antibacterial effects of *Coptis chinensis* Franch against *Brucella abortus*. J. Agri. Life Sci. 48(1), 107-114, 2014
- (4) Kyung Yong Sung, Han Sang Yoo, Host immune responses during *Brucella* infection :A brief review. J. Prev. Vet. Med. 38(1), 26-34, 2014
- (5) Lauren Togonon Arayan, Huynh Tan Hop, Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Hannah Leah Tadeja Simborio, WonGi Min, Hu Jang Lee, Suk Kim, Evaluation of recombinant AspC of *Brucella abortus* for serological diagnosis of bovine brucellosis in Korea. J. Preven. Vet. Med. 2; 33-37, 2015.

3) 학술발표

- (1) Characterization of Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BetB) as an Essential Virulence Factor of *Brucella abortus*. 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2013 04.
- (2) Impaired bacterial proliferation, and compromised immune response in diabetic db/db mice infected with *Brucella abortus*. 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2013 04.
- (3) Antibacterial effects of *Coptis Chinensis* Franch against *Brucella abortus*, 제5회 세계보건협회연맹 아시아태평양지역 국제컨퍼런스, 2014 04.
- (4) Evaluation of an ELISA using recombinant *Brucella abortus* bacterioferritin (Bfr) for bovine brucellosis. 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2015 04.
- (5) Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis. 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2015 04.
- (6) Cytokine production profiling of six sero-reactive proteins of *Brucella abortus* to RAW 264.7 cells, 2013 대한 수의학회 춘계 학술대회, 2013 04.
- (7) Immuno-stimulating activities of six sero-reactive proteins of *Brucella abortus* to RAW 264.7 cells, 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2013 04.
- (8) Cytokine Expression Profile in Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cell Stimulated with *B. abortus* Recombinant Proteins, 2013 대한 수의학회 추계 학술대회, 2013 10.
- (9) In vitro and in vivo analysis of immunogenicities of *Brucella abortus* recombinant proteins, Omp2b and SodC, 2013 대한 수의학회 추계 학술대회, 2013 10.

- (10) Cytokine Expression Analysis in Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cell with Stimulated *B. abortus* Recombinant Proteins by Real-Time PCR, 제5회 세계보건협회연맹 아시아태평양지역 국제컨퍼런스, 2014 04.
- (11) Analysis of Cytokine Gene expression in Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated with five *Brucella abortus* Recombinant Proteins, 2014 대한 수의학회 춘계 학술대회, 2014 05.
- (12) Analysis of Inflammatory Cytokines Secreted by Raw 264.7 cells with stimulated *Brucella abortus* Mutants, 2015 대한 수의학회 춘계 학술대회, 2015 04.
- (13) Profiles of Cytokine Production in Raw 264.7 cells stimulated with *Brucella abortus* Mutants, 2015 춘계인수공통진염병학회, 2015 05.
- (14) Cytokine expression profile in Raw 264.7 cells stimulated with *Brucella abortus* Mutants, FEMS 2015, 2015 06.

SUMMARY

In the last few decades, various diagnostic test methods have been developed for the successful surveillance and control of *Brucella* infection. The standard diagnostic techniques for brucellosis include the isolation of causative organisms through bacterial culture, molecular assays for bacterial genome detection, and serology through antibody detection. Bacterial culture, however, requires biosafety level 3 conditions and a skilled expert, while genomic detection is a rapid but limited technique for the recognition of active infection. Current serological assessments are more reliable and generally approved.

For the serological diagnosis of brucellosis in animals and humans, classical methods, such as the Rose Bengal test (RBT), agglutination test and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), have been widely established in various countries and are preferred in routine clinical practice. However, more enhanced sensitivity and specificity in the confirmatory diagnosis of brucellosis are still needed.

Consistent with these assessments, the diagnostic antigen used in classical serological tests is commonly derived from smooth lipopolysaccharide or O-polysaccharide as an immunodominant epitope for antibodies secreted in the humoral immune response. Despite the strong immunoreactivity of these common antigens, the specificity of LPS-based assays is assumed to be low, reflecting cross-reactions with other relevant bacteria, such as *Y. enterocolitica* O:9, which conserves the similar O-polysaccharide composition. Accordingly, diverse modifications in the diagnosis of brucellosis have been examined to overcome the limitations arising from the immune response against *Brucella* infection.

To determine reliable immunogenic proteins to detect *Brucella abortus* infection according to time course responses to aid in the appropriate management of this disease, proteomic identification through two-dimensional electrophoresis (2DE), followed by immunoblotting, revealed 13, 24, and 55 immunodominant *B. abortus* 544 proteins that were reactive to sera from experimentally infected mice at early (10 days), middle (30 days), and late (60 days) infection periods, respectively. After excluding several spots reactive to sera from *Yersinia enterocolitica* O:9-infected and non-infected mice, 17 of the 67 immunodominant proteins were identified through MALDI-TOF MS. Consequently, the identified proteins showed time course-dependent immunogenicity against *Brucella* infection.

In addition, this study examined novel immunogenic proteins that can be used to detect *Brucella abortus* infection or as an effective subcellular vaccine. In an immunoproteomic assay, 55 immunodominant proteins from *B. abortus* 544 were observed using two dimensional electrophoresis (2DE) and immunoblot profiles with antisera from *B. abortus*-infected cattle at the early (3 week), middle (7 week), and late (10 week) periods, after excluding protein spots reacting with antisera from *Yersinia enterocolitica* O:9-infected and non-infected cattle. Twenty-three selected immunodominant proteins whose spots were observed at all three infection periods were identified using

MALDI-MS/MS. Most of these proteins identified by immunoblot and mass spectrometry were determined by their subcellular localization and predicted function.

Moreover, to develop alternative means that can distinguish between these two conditions without utilizing lipopolysaccharide (LPS), this study was an attempt to determine the efficacy of combined recombinant *B. abortus* outer membrane proteins (rOmps) and individual rOmps in the serodiagnosis of brucellosis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), utilizing both that standard tube agglutination test (TAT)-positive and -negative serum samples from Korean native cattle. The results are very interesting and promising because the combined rOmp antigens used in the study were highly reactive with the TAT-positive serum samples. The combined rOmps sensitivity, specificity and accuracy were 215/232 (92.67%), 294/298 (98.66%) and 509/530 (96.04%), respectively. While these results are preliminary, the tests performed have very high potential in the serodiagnosis of brucellosis and likewise, the combined rOmps can be used for future vaccine production.

Moreover, we investigated the possible use of the *B. abortus* outer membrane protein A (OmpA), Omp10, Omp19, Omp28, Ndk, mdh, bfr, aspC, livF, tbp and several hypothetical proteins as a candidate recombinant proteins for serological diagnosis for bovine Brucellosis including latexbead agglutination assay, dip stick assay and wandsich dip stick assay application. After application, the results of these diagnostic tools was compared to those of TAT and Rose bengal, resulting that the sensitivity, specificity and accuracy was lower than those of ELISA using rOmps.

Eighteen recombinant proteins, nine proteins (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC, AspC, OsmC, DPS) with pMal vector system and other nine proteins (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19) with pCold vector system, were expressed and purified by mass production system using His-spintrap column. Those proteins were used for the serological and immunological analysis by SDS-PAGE, Western blot, ELISA, and ELISpot. When the recombinant proteins were reacted with bovine positive sera, OMP28 showed high reactivity both Western blot and ELISA.

In the cytokine production analysis, production of TNF- α was increased after 24 hours in RAW 264.7 cell stimulated by six recombinant proteins (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC). Of these proteins, Omp10 induced the highest production. Also, production of Nitric Oxide, TNF- α , and IL-6 were induced in RAW 264.7 cells stimulated with nine recombinant proteins (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19). However, IL-1 β , IL-12p70, and IFN- γ were not detectable in this system. Production level of IL-6 were started in the increase of the production at 8 hours in RAW 264.7 cells stimulated with 0628, Bfr, TbpA, and OMP19.

Immune responses were analysed with the eighteen recombinant proteins in mice and/or bovine. In mouse, the proteins were intraperitoneally injected by 30 μ g with complete adjuvant in BALB/C and booster injections were carried out with same amount of the proteins with incomplete adjuvant in 14 days. Sera were collected at 3, 7, 14, and 28 days after the injection. Then, production of IgG, IL-4, and IFN- γ were determined in the

mouse sera using ELISA systems. Omp28 and Omp2b expressed with pMal vector system were showed high production rates of IgG, IL-4, and, IFN- γ .

OMP28, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, and OMP19 expressed with pCold vector system induced the typical production of IgG and IgM in mice. However, OMP10 showed different pattern which was gradual increase of IgM production until 28 days.

In the analysis of immune induction of the proteins (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19) using cytokine production (IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-5) in the naive splenocytes, production of IFN- γ and IL-2 were increased in 12 hours after the stimulation.

However, the immune induction showed different phenomenon in the immunized mice. Splenocytes were collected from mice immunized with nine recombinant proteins (OMP28, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19, mdh, tsf, rocF) at 28 days after the first injection and the number of antigen secreting cell were analyzed using ELISpot after stimulation of the cells with the recombinant proteins. 0628, TbpA, OMP19, and mdh induced high number of IgG-secreting cells while mdh and tsf induced high number of IFN- γ -secreting cells. TbpA, mdh, tsf, and rocF induced high number of IL-4 secreting cells. Number of IL-4-secreting cells was higher than the number of IFN- γ -secreting cells ($p < 0.05$). These results suggest that those antigens might induced Th2 immune system rather than Th1 immune system.

In the analysis of the induction of cytokine expression in bovine peripheral blood mononuclear cells after stimulation with eleven recombinant proteins (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, and SodC in pMal vector system; OMP28, mdh, tsf, rocF, and 0628 in pCold vector system). Omp28 and Omp19 expressed in pMal vector system induced high production of IL-1 β and TNF- α . With the recombinant proteins expressed in pCold vector system, production of the cytokines (IL-6, IL12p40, IFN- γ , TNF- α , iNOS, IL-1 β , and IL-4) was induced in time and dose-dependent manners. Especially, OmpA expressed with pMal vector system induced high expression of Bax and TLR4 genes, which are related with apoptosis.

Through those experiments, mass production system of recombinant proteins were established. Immune induction in naive and immunized immune cells were analyzed. Generally, Th2 immune system was induced by most of our recombinant proteins than Th1 immune system. The results of our experiment suggested that OMP28, Omp2b, TbpA, and mdh induced the Th2 immune system and might be candidates for diagnostic analysis of early brucellosis detection.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	19
Section 1. Background and necessity of study	19
Section 2. Objectives of study	22
Section 3. Main research contents	22
Section 4. Achievement plans of study	23
Chapter 2. Status of Technology Development at Home and Abroad	25
Chapter 3. Contents and Results of Performed Study	27
Section 1. Materials and Methods	27
Section 2. Results	32
Chapter 4. Achievement of Objectives and Contribution to Related Fields	149
Section 1. Achievement of Objectives	149
Section 2. Contribution to Related Fields	153
Chapter 5. Results and Application Plans	154
Chapter 6. Foreign Science and Technology Information Collected in Research Process	175
Chapter 7. Status of research facility and equipment	176
Chapter 8. Status of safety laboratory management	177
Chapter 9. References	178

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	19
1절.	연구개발의 필요성	19
2절.	연구목적	22
3절.	주요 연구내용	22
4절.	성과목표	23
제 2 장	국내외 기술개발 현황	25
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	27
1절.	연구개발 수행 내용	27
2절.	연구개발 결과	32
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	149
1절.	연구개발목표 및 목표달성도	149
2절.	관련분야 기여도	153
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	154
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	175
제 7 장	연구시설·장비 현황	176
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적	177
제 9 장	참고문헌	178

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

1절. 연구개발의 필요성

1. 국내 브루셀라 감염증 현황

Brucella 감염증은 대표적인 인수공통 전염병의 하나이며 국내는 물론 전 세계적으로 공중 보건학적, 경제학적 심각한 문제를 야기한다(인체;4군법정전염병, 가축;2종법정전염병).국내에서 본 감염증이 인체와 가축에서도 2004년부터 2006까지 폭발적인 증가를 보이다가 감소추세를 보이고 있지만(Fig. 1), 국민적 관심사는 물론 이에 대한 대책이 절실한 실정이다. 현재 브루셀라 감염증 진단법의 민감도가 떨어져, 감염된 소의 시중 유통 가능성이 높다. 브루셀라에 감염된 소의 경우 신체 각 부위(특히 간, 비장, 임파절, 혈액 등)에서 균이 높은 농도로 존재하게 되며, 우리나라의 식문화 특성상 육회, 간, 비장, 위 등을 날것으로 섭취하는 경향이 높아 브루셀라 균에 대하여 심각하게 노출되어 있고, 이에 대한 국가적 대책 마련이 시급한 실정이다.

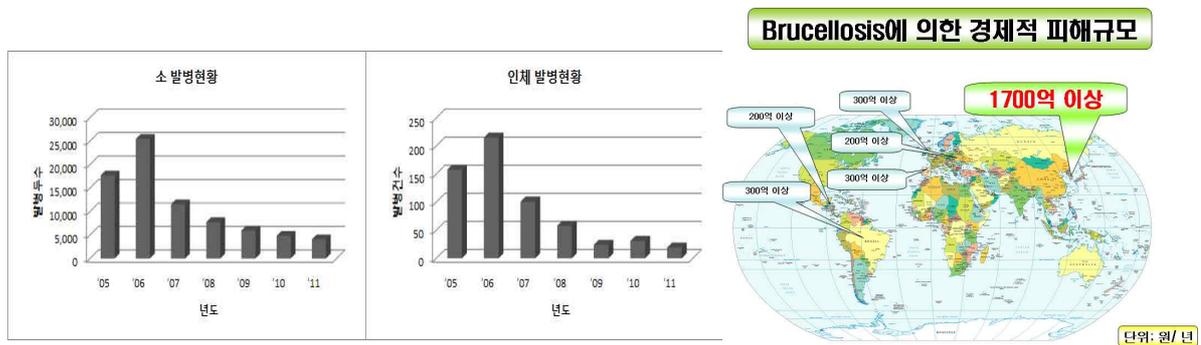


Fig. 1. 국내 *Brucella* 감염증 발병 추이 및 피해규모 (2012 국립수의과학 검역원, 질병관리본부 통계 자료).

2. 병인체 특성

B. abortus 균은 세포내에서 증식하며 발병을 일으키기 때문에 인체감염의 경우 짧게는 수 주에서 길게는 수년간의 항생제 치료가 필요하며, 다량의 항생제 복용으로 인한 후유증 등으로 인하여 치료방법에 대한 개선이 시급한 실정이며, 완치로 판단되었어도 수년 이내에 재발되는 경우가 많아 지속적 관찰이 요구되는 심각한 질병이다. *Brucella* 감염증의 원인체는 *B. abortus*(소), *B. melitensis*(양, 염소), *B. canis*(개), *B. ovis*(양), *B. suis*(돼지) 등이 보고되고 있고, 모두 인체에 감염하여 심각한 질병을 초래하며, 국내에서 문제가 되고 있는 원인체는 *B. abortus*에 의한 감염이 주를 이루고 있다. *Brucella* 감염증의 증상은 인체에 감염될 경우 10% 미만의 치사율을 보이고, 지속적 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 심내막염, 뇌척수염, 관절염등 중증 질병으로 진행하게 되며, 감염된 동물에서 보이는 증상은 특별한 외부 증상이 없이 암컷에서의 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 유산과 수컷에서 고환염, 기형정자 등으로 인한 불임을 유발한다.

특히, 감염축은 특별한 외부 증상 없이 균을 장기간 보균하며, 지속적으로 균 배출하여 인

체와 건강한 동물에 감염증을 유발함으로써 감염율의 폭발적 증가를 유발한다. 브루셀라균의 세포내 탐식기전 및 세포내 증식기전에 대한 해석이 미흡하여 본 질병의 근절이 어려운 실정이며, 현재까지 *Brucella* 감염증에 대한 안전한 vaccine과 유효한 치료 방법은 없는 실정이다. 또한, 브루셀라 감염증의 경우 백신부재 및 면역형성이 어려운 관계로 비면역상태에서 감염이 100%이루어지고 있기 때문에 이러한 비면역상태에서의 연구가 진행되어야 고민감도의 진단기법이 개발 될 수 있다.

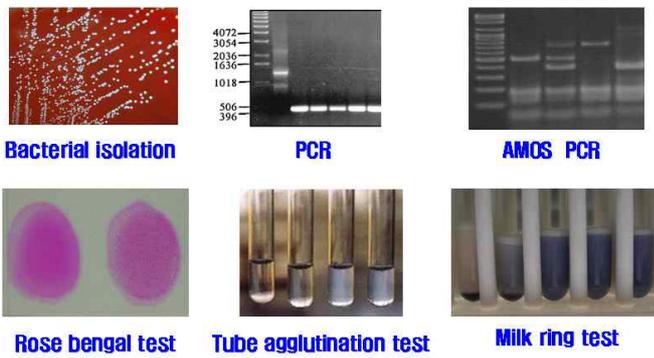
3. 브루셀라 감염증 진단 및 근절의 어려움

2011년 기준 국내에서 사육되고 있는 한우와 육우의 개체수가 2,517,648두이고, 사육농가수가 201,121농가, 축산업관련 종사자 수가 200만 이상이며(2011년 농림수산식품부 통계자료), 육회를 즐겨 먹는 국내의 식문화 등을 감안하면 *B. abortus*로 인한 경제적 손실과 감염 노출로 인한 국민건강의 위협은 실로 심각한 수준이다.

중요성에도 불구하고, 균주 취급상의 어려움과 위험성으로 인하여 *Brucella* 감염증에 대한 국내의 연구자들이 극소수에 불과하고, *Brucella* 감염증 다발 국가 이면서도 질병에 대한 이해 또한 상당히 미흡한 실정이다. 현재 국내의 브루셀라 감염증의 증가로 인해 인체 및 동물유래의 야외주가 다수 분리되고 있으나, 진단상의 어려움을 겪고 있으며, 야외주에 대한 병원성 및 항원성에 대한 연구 연구가 미흡하여, 병원성 요인의 분석, 감염경로 및 발병기전에 대한 기초적 자료가 거의 없는 실정이고, 이에 따라 브루셀라 감염증에 대한 대책 마련에 상당한 어려움을 겪고 있다.

본 감염증에 대한 피해를 최소화하기 위해서는 감염된 사람 또는 동물의 조기 진단, 치료 및 살처분과 같은 대책 마련이 중요한 방법으로 인식되고 있지만, 현재 사용되고 있는 진단 방법은 낮은 민감도와 다른 질병과의 교차 반응으로 인하여 브루셀라 감염증을 진단하고 근절하는데 상당히 어려운 상황이다. 현재 동물 브루셀라의 진단 방법으로는 혈액 배양을 통한 균의 분리 동정, PCR, STA, 보체결합반응, Milk ring test, Rose Bengal test, Coomb's test, Counterimmuno- electrophoresis, indirect hemolysis, AGID, Brucellin skin test 등 다양한 방법이 제시되고 있으며, 사람에게 있어서의 진단법은, 동물과 마찬가지로 혈액 배양을 통한 균의 분리 동정, PCR, STA, ELISA, Rose Bengal test 등 다양한 방법이 제시되고 있다(2005; Kim suk *et al.*).

Brucella 감염증 주요 진단방법



자료출처: 국립 수의과학검역원

우선 가장 확실한 진단법의 하나인 균의 분리 동정 및 PCR 법은 확진하는데 있어 유용한

방법이나, 균의 분리가 쉽지 않고, 시료 중 균체의 수가 적을 경우 PCR 음성으로 판정되어 오진 할 수 있는 문제점이 있음(2004; Kim suk *et al.*). 또한, 진단하는데 있어 장시간 및 고비용이 요구되고, 균체를 다루는 과정에서의 인체 감염 또한 큰 문제로 인식되어짐.. 이러한 문제점을 해결하기위해 제시된 방법이 혈청학적 진단 방법이다. 현재 국내를 포함하여 전 세계적으로 가장 많이 이용되고 인체감염 진단 방법은 standard agglutination test (SAT)이다. SAT 진단 방법은 앞서 기술한 방법보다 비교적 간단하고, 안전한 방법으로 인식되고 있으나, 감염초기 환자나 만성감염의 경우 항원과 반응 할 수 있는 항체의 양이 적을 경우 음성으로 오진 할 수 있는 단점이 있다. 뿐만 아니라 브루셀라 균은 여러 가지 균들과 혈청학적으로 교차반응을 일으켜 SAT법에서 오진을 유발시키는 단점을 보인다. 이러한 균들로는, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermanni*, *Francisella tularensis*, *Salmonella enterica* serotype Pullorum, Urbana, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella hemolytica*, *Rhizobium leguminosarum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ochrobactrum anthropi*, *Phyllobacterium* spp. 등이 보고되고 있으며, 이들 균주 중 특히 *Yersinia enterocolitica* O:9과 *Escherichia coli* O157:H7 균의 LPS는 *B. abortus*의 LPS와 성상이 유사하여 높은 교차반응을 보이고, 이로 인한 오진의 문제점이 보고되고 있다(2006; Sascha A.D. *et al.*, 2004; Kim suk *et al.*, 2004; Kim suk *et al.*, 2005; Kim suk *et al.*,2000; Sieira R. *et al.*, 1998;Pizarro-Cerda *et al.*).

국내 브루셀라 감염증의 피해를 최소화 하고 국민적 건강증진과 안전한 축산물의 공급을 구축하기 위해서는 국내에서 분리된 *Brucella abortus* 야외주의 특성 분석 및 항원성을 규명하고, 감염혈청과 반응하는 고민감도의 항원을 선발 활용하여 신속 정확한 진단체계를 확립 해야 한다.

4. 고민감도 진단법 개발의 필요성

현재까지의 혈청학적 진단방법은 감염증으로의 확진이 불가능하며, 비특이 반응의 출현으로 감염축 확인이 곤란한 실정이다. 현행 진단 방법은 민감도가 낮기 때문에 비감염축의 도살처분이 가능하며, 경제적 손실을 유발하는 문제점을 보인다. 대부분의 진단기법을 외국 수입에 의존해 외화 손실 유발되는 문제점을 보인다. 현재까지 실험실 진단에 의존하고 있어 신속 정확한 야외 진단용 키트 개발이 절실한 실정며, 다수의 의양성 개체의 출현으로 진단의 평가가 모호하기 때문에, 이러한 문제를 해결할 방법이 절실하다.



Fig. 3. 현재 브루셀라 진단의 부정확성으로 비감염축에 대한 살처분 가능성이 높은 실정임

2절. 연구목적

1. 연구개발의 최종 목표

브루셀라 감염증을 정확히 진단하기 위한 고민감도 진단법의 부재로 인해 발생하는 문제점을 개선하고, 국내 감염우의 색출과 유통의 차단을 위해 브루셀라 균의 항원성을 분석, 고면역원성을 보이는 항원을 발굴 고민감도의 진단기법을 확립하여 본 감염증의 근절을 위한 토대를 구축하고자 본 연구를 수행하였다.

3절. 주요 연구내용

1. 제 1 세부과제: 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발

가. 숙주특이 고면역원성 항원발굴

(1) 브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴(5종 이상)

나. 발굴된 항원의 특성분석 및 재조합항원 생산

(1) LC 및 MS/TOF 이용한 균체항원분리

(2) 유전자 분석을 통한 특성분석 및 재조합 항원 생산

(3) 후보물질의 세포독성 평가

다. 항원조합을 통한 고민감도 혈청학적 진단기법 개발

(1) 감염시기별 최적항원 조합 설정 및 고민감도 혈청학적 진단기법 적용

(2) 감염시기별 최적항원 조합 설정 및 간이 혈청학적 진단기법 적용

라. 현장에서 진단이 가능한 간이 진단키트 개발

(1) Dip stick, Latex bead agglutination kit 등

마. 개발된 진단방법의 정확도, 특이도 등 조사

(1) 개발된 진단법의 기존 방법과의 민감도, 특이도, 정확도 조사(Rose bengal, TAT, ELISA 등)

(2) 개발된 진단키트의 산업화 전략 수립

바. 고면역원성 항원의 대량생산체계 확립 및 산업화

2. 제 1 협동과제: 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치 평가

가. 실험동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가

(1) 실험실적 (in vitro) 숙주세포 및 실험동물 면역반응평가

- cytokine, 유전체 및 단백질 발현 조사
- (2) 세포주를 이용한 유효 물질의 in vitro 면역활성능력 평가
- (3) 실험동물의 세포 면역반응 조절 능력 평가
- (4) 실험동물의 면역활성능력 평가
- (5) 타 균과의 교차 반응 여부 검사 (Y. enterocolitica O:9 집중시험)
- 나. 목적동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가
 - (1) 목적동물 야외주 감염시기별 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석
 - 농림수산검역검사본부를 통해 확보한 감염시기별 항체를 이용하여 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석
 - 야외 브루셀라 양성우로부터 확보한 혈청을 이용한 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석
 - (2) 실험실적 (in vitro) 숙주세포 및 목적동물 면역반응평가
 - cytokine, 유전체 및 단백질 발현 조사
 - (3) 목적동물의 세포 면역반응 조절 능력 평가
 - (4) 목적동물의 면역활성능력 평가
- 다. 감염시기별 대상항원의 특성 분석 및 혈청학적 진단을 위한 최적 다중항원 조합 설정
 - (1) 감염시기별 최적 다중항원조합 설정
- 라. 감염시기별 기존 방법의 민감도, 정확도, 특이도 등 조사
 - (1) 기존 방법과의 비교를 통한 민감도, 정확도, 특이도 등 조사

4절. 성과목표

1. 제 1 세부과제: 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발
 - 가. 숙주특이 고면역원성 항원발굴 (5종 이상)
 - 나. 발굴된 항원의 특성분석 및 재조합항원 생산
 - 다. 항원조합을 통한 고민감도 혈청학적 진단기법 개발
 - 라. 현장에서 진단이 가능한 간이 진단키트 개발 (Dip stick, Latex bead agglutination kit 등)
 - 마. 개발된 진단방법의 정확도, 특이도 등 조사
 - 바. 고면역원성 항원의 대량생산체계 확립 및 산업화

2. 제 1 협동과제: 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치 평가
 - 가. 실험동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가
 - 나. 목적동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가

다. 감염시기별 대상항원의 특성 분석 및 혈청학적 진단을 위한 최적 다중항원 조합 설정
라. 감염시기별 기존 방법의 정확도, 특이도 등 조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내외 연구 및 산업화 동향

1. 국내외 연구동향

Teixeira-Gomes *et al.*와 Wanger *et al.*(1997)등은 *Brucella ovis* 및 *B. melitensis* 균에 대해 2-DE 분석과 immunoblotting을 이용하여 항원성 및 특성을 을 검정하였다. Sascha *et al.* (2006)등이 *B. abortus* 119-3 strain을 이용하여 항원성과 면역원성에 대한 분석은 proteomics를 통해 규명하였다. 그러나 현재까지 야외주에 대한 분석은 보고되어 있지 않으며, 특히 국내 야외주의 특성 분석은 이루어지고 있지 않아 이에 대한 연구가 시급한 실정이다.

현재 국내를 포함하여 전 세계적으로 가장 많이 이용되고 인체감염 진단 방법은 standard agglutination test (SAT)이다. SAT 진단 방법은 앞서 기술한 방법보다 비교적 간단하고, 안전한 방법으로 인식되고 있으나, 감염초기 환자나 만성감염의 경우 항원과 반응 할 수 있는 항체의 양이 적을 경우 음성으로 오진 할 수 있는 단점이 있다. SAT 단점을 극복하고자 제안된 방법이 ELISA 방법이다. 이 방법에 사용되는 항원은 whole cell antigen, LPS, cell wall extraction, OMPs 등이고, 높은 민감도를 나타내는 특징을 보여주고 있으나 *Y. enterocolitica* O:9 또는 *E. coli* O157:H7 등과의 교차 반응이 나타나 이를 해결하고자 다각도의 연구가 진행 중에 있다.

Erdenebaatar 등은 sarcosine 추출을 통한 *Brucella abortus*의 균체 항원이 *Y. enterocolitica* O:9과의 교차반응이 거의 없는 것을 보고하였고, Nielsen 등은 hot water and hot phenol extraction으로 분리된 항원을 이용 iELISA를 수행하여 *Y. enterocolitica* O:9 또는 *E. coli* O157:H7 등과의 교차반응이 낮고 민감도가 높은 것을 보고하였다 현재 *Brucella* 감염증을 진단하기위한 연구가 전 세계적으로 다양하게 진행되고 있으나, 교차반응으로 인한 오진의 문제점이 완벽하게 해결되어 있지 않으며, 특히 고민감도 진단기법 개발에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 특히, 감염초기, 중기 및 말기에 숙주와 반응하는 항원성 및 면역원성 분석이 미흡하며, 이들 항원의 조합을 이용한 진단법 개발은 전무한 실정이다.

국내외 연구 동향 및 한계성

연구수행 기관	연구개발의 내용	활용현황	문제점
전북대학교 수의과대학	라텍스비드 이용 부루셀라병 진단시약 및 진단키트 개발	특허등록 [10-1997- 0063214]	<i>B. abortus</i> 1119-3 균체항원 이용
수의과학검역원	부루셀라 케니스 변이균주 [M-] 이용 개 부루셀라병의 신속평판응집반응 진단키트	제품화	사용동물 제한 [개]
URBM, 벨기에	OMP 이용 ELISA 법 개발	진단법 개발 및 표준화	상용화 미흡
버지니아 대학, 미국	균 단백질 이용 ELISA 법 개발	진단법 표준화	상용화 미흡
오비히로 대학, 일본	균 단백질 이용 ELISA 법 개발	표준 진단법 개발	상용화 미흡
Food and Vet. Res., 캐나다	LPS 균단백 이용 ELISA 법 개발	혈청학적 검사기 법 토대	타균주와 교차반 응

2. 국내외 산업화동향

가. 국외 산업화 현황

- (1) 스웨덴과 미국에서 iELISA와 cELISA가 개발되어 부루셀라 아볼투스(소)의 진단에 사용되고 있다.

나. 국내 산업화 현황 및 문제점

- (1) 현재까지 부루셀라 케니스 (개)의 진단용 키트가 제작되어 국내에 시판중에 있다.
- (2) Rose bengal test kit는 농림수산물검역검사본부에서 제작하여 상용화 되어 있다.
- (3) 국내 사용 ELISA 키트는 전적으로 수입에 의존하고 있는 실정이다.
- (4) 현재까지 가장 고민감도로 평가 되고 있는 ELISA의 개발은 이루어지고 있지 않다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 연구개발 수행내용

1. 년차별 연구수행내용

가. 1차년도 (2012년도)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p><제1세부과제> 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발</p>	<p>○ 숙주특이 고면역원성 항원 발굴</p> <p>-순수 배양된 브루셀라의 균체 항원단백질 추출 및 2DE 및 silver stain을 통한 전체적인 균단백질 패턴 파악</p> <p>-브루셀라 균체항원단백질을 Western blot 분석을 통해 실험동물(마우스) 및 목적동물(소)의 감염시기별 면역원성 분석</p> <p>-고면역원성 항원의 단위 및 복합 조합 분석을 통한 감염시기별 최적 항원의 조합 설정</p>	<p>○ <i>Brucella abortus</i> 544 표준균주를 영양배지상에 순수배양한 후, TCA/acetone 침전을 통해 균체항원단백질을 추출. 2DE을 통해 2D gel 상에서 총단백질을 분리하여 silver stain을 통해 균체단백질을 염색한 후, 이미지프로그램을 이용해 gel 이미지를 분석</p> <p>○ 2DE를 통해 분리된 총 항원단백질을 PVDF membrane으로 transfer한 후 실험동물(마우스) 및 목적동물(소) 감염시기별(감염초기, 중기 및 말기) 혈청을 이용해 Western blot을 수행하여 항원 반응성 및 면역원성 확인(5종이상)</p> <p>○ 감염시기별 마우스 및 소 혈청과 반응하는 브루셀라 균체단백질 spots을 개별적 또는 복합적으로 비교 분석하고 비특이반응(비감염) 및 교차반응(<i>Y. enterocolitica</i> O:9 감염) spots과 일치되는 공통 spots은 모두 배제시켜 비교 분석해 감염시기별 최적 항원 spots을 선별</p>
	<p>○ 발굴된 항원의 특성분석 및 재조합항원 생산</p> <p>-LC 및 MS/TOF 이용한 균체 항원단백질 분리 및 동정</p> <p>-고면역원성 항원단백질의 유전자 분석 및 gene cloning기법을 통한 재조합항원생산</p> <p>-재조합 항원의 발현 및 Western blot 분석을 통한 면역원성 분석</p> <p>-발굴 항원의 cell line 감염을 통한 세포안전성 및 세포독성 평가</p>	<p>○ 선별된 최적 항원 spots을 picking한 후 특정 enzyme(trypsin)을 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 한 번 더 MS/MS분석을 하여 amino acid 단위까지 쪼개진 mass값을 측정하여 database search를 하고 동정</p> <p>○ 발굴된 최적 항원단백질의 유전자 염기서열에 기초한 primer를 제작하고 PCR 증폭산물과 pMAL vector를 이용한 recombinant DNA를 작성한 후 <i>E. coli</i> DH5a을 이용한 transformation 및 발현을 통해 recombinant protein을 생산</p> <p>○ IPTG를 이용해 recombinant protein의 발현을 유도한 후 pMAL purification을 통해 정제된 재조합항원단백질은 SDS-PAGE 및 브루셀라 양성 혈청을 이용한 Western blot을 수행하여 항원반응성 및 면역원성 확인</p> <p>○ 마우스 대식세포유래 cell line인 RAW264.7 cell에 정제된 항원단백질들을 농도별(0, 5, 10, 50, 100 µg/ml)로 처리한 후 MTT assay를 이용한 세포독성을 분석</p>

<p><제 1 협동과제> 속주특이 브루셀라 고면역원성 재조합 항원에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 세포주를 이용한 유효 물질의 <i>in vitro</i> 면역활성능력 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 유효물질 감각 후 세포주에서 분비되는 면역관련 cytokine을 단백질 수준에서 ELISA를 측정 • 면역관련세포주에 목표항원 혹은 병원체를 감염시킨 후 microarray를 실시하여 면역관련 유전자 중 발현 증가/감소 현황을 검색하여 면역반응 파악 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마우스 마크로파지 세포주 (RAW 264.7)를 이용하여 실험실적 (<i>in vitro</i>) 면역활성능력 평가 - 고면역원성 항원 감각 이후 시간대별 배양 상층액 내 cytokine 생성량을 ELISA로 측정 - RAW 264.7 세포에 <i>B. abortus</i> 1119-3을 감염시킨 후 microarray를 실시하여 면역관련 유전자 발현 현황을 검사하였으며 향후 유효물질의 감각 실험 시 비교자료 및 목표 유전자로 활용
	<ul style="list-style-type: none"> • 실험동물에서 (<i>in vivo</i>) 면역활성능력 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 항원을 투여한 실험동물의 혈청에서의 항원 특이 항체 생성량 분석 - 면역 관련 장기를 분리하여 cytokine 및 chemokine 등의 발현, 생성 여부 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마우스 (BALB/C)에 고면역원성 항원을 접종하여 생체적 (<i>In vivo</i>) 면역활성능력 평가 실시 - 혈청 채취 및 혈청 내 항원단백질 특이 항체 (IgG, IgM)생성량을 ELISA로 측정 - 비장세포 (splenocyte)를 채취하여 항원단백질 감각 시 생성 cytokine을 ELISA 측정 - 비장세포의 항원단백질에 대한 activated B cell 생성 여부 확인을 위한 ELISpot 측정
	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물 야외주 감염시기별 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 발굴된 고면역원성 항원에 대한 각 감염시기별 야외 감염우 혈청의 반응을 평가할 수 있는 Western blot 기법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 브루셀라 야외 감염우 혈청을 단계 희석한 후 고면역원성 항원에 대한 반응을 비교 분석하여 ELISA 측정 기준을 확립하고 감염우 혈청의 반응을 평가할 수 있는 Western blot 기준 비교 분석 (단백질 농도 및 혈청 희석농도) - 농림축산검역본부 보유 감염시기별 감염우 혈청 확보하여 실험을 실시
	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물의 실험실적 (<i>in vitro</i>) 속주세포 면역반응평가 <ul style="list-style-type: none"> - 목적동물인 소 유래의 macrophage cell line 확보 	<ul style="list-style-type: none"> - 일본 Kifu 대학으로부터 자체 개발한 소 마크로파지 세포주 (BO·120) 확보완료 및 차후 항원단백질을 이용한 면역반응평가
	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물의 면역활성능력 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 소의 면역반응 관련 유전자에 대한 primer 제작 및 이를 정량하기 위한 quantitative real-time PCR 기법 확립 · 항원 투여 시기별 및 투여량에 따른 면역반응 정도 분석 · 소 세포주에서 분비되는 항체, cytokine 등의 생성여부 조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 건강한 소 말초혈액단핵세포 (PBMC)를 혈액으로부터 분리 배양하여 고면역원성 항원으로 자극시킨 후 시간대 별, 투여량별 PBMC 발현 mRNA를 추출하여 quantitative real-time PCR로 측정

나. 2차년도 (2013년도)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p><제 1 세부과제> 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발</p>	<p>• 발굴된 항원의 특성분석 및 재조합항원 생산 -LC 및 MS/TOF 이용한 균체 항원단백질 분리 및 동정</p> <p>-고면역원성 항원단백질의 유전자 분석 및 gene cloning기법을 통한 재조합항원생산</p> <p>-재조합 항원의 발현 및 Western blot 분석을 통한 면역원성 분석</p> <p>-발굴 항원의 cell line 감염을 통한 세포안전성 및 세포독성 평가</p>	<p>○ 선별된 최적 항원 spots을 picking한 후 특정 enzyme(trypsin)을 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 한 번 더 MS/MS분석을 하여 amino acid 단위까지 쪼개진 mass값을 측정하여 database search를 하고 동정</p> <p>○ 발굴된 최적 항원단백질의 유전자 염기서열에 기초한 primer를 제작하고 PCR 증폭산물과 pCold vector를 이용한 recombinant DNA를 작제한 후 <i>E. coli</i> DH5a을 이용한 transformation 및 발현을 통해 recombinant protein을 생산</p> <p>○ IPTG를 이용해 recombinant protein의 발현을 유도한 후 pCold purification을 통해 정제된 재조합항원단백질은 SDS-PAGE 및 브루셀라 양성 혈청을 이용한 Western blot을 수행하여 항원반응성 및 면역원성 확인</p> <p>○ 마우스 대식세포유래 cell line인 RAW264.7 cell에 정제된 항원단백질들을 농도별(0, 5, 10, 50, 100 μg/ml)로 처리한 후 MTT assay를 이용한 세포독성을 분석</p>
	<p>• 항원조합을 통한 고민감도 혈청학적 진단기법 개발</p> <p>- 고민감도 진단기법 개발을 위한 최적 항원 조합설정 및 고민감도 혈청학적 진단기법 적용</p>	<p>○ 감염우에 반응하는 최적항원 조합 설정 및 고민감도 혈청학적 진단기법 적용</p> <p>-발현항원에 대한 감염우 혈청의 면역반응 평가 (Western, ELISA 등)</p> <p>-최적 조합 항원을 이용한 진단기법 적용 (ELISA 등)</p>
	<p>- 최적항원 조합 설정 및 간이 혈청학적 진단기법 적용</p>	<p>○ 간이 혈청학적 진단기법 적용 (latex bead agglutination방법 응용)</p> <p>-감염우 혈청을 이용한 최적 조합 설정</p> <p>-최적 조합 항원을 이용한 진단기법 적용 및 평가</p>
	<p>• 고면역원성 항원의 분리 및 정제</p> <p>- 고면역원성 항원의 배양 및 분리 정제 조건 확립</p>	<p>- 제 1 세부과제 연구팀으로부터 제공 되어진 고면역원성 재조합 단백질 후보군들을 이용하여 배양 조건 확립</p>
<p><제1협동과제> 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치 평가</p>	<p>• 목적동물의 면역활성능력 평가</p> <p>- 소의 면역반응 관련 유전자에 대한 primer 제작 및 이를 정량하기 위한</p>	<p>- 배양된 단백질을 column (anti-histidine) 기법을 이용하여 분리 정제</p> <p>- 정제되어진 단백질을 SDS-PAGE 및 Western Blot 기법을 이용하여 검증</p> <p>- 브루셀라 야외 감염우 혈청을 이용한 각각의 후보 단백질들의 면역반응을 Western Blot 기법을 이용하여 확인</p>
	<p>- 소의 면역반응 관련 유전자에 대한 primer 제작 및 이를 정량하기 위한</p>	<p>- 건강한 소 말초혈액단핵세포 (PBMC)를 혈액으로부터 분리 배양하여 고면역원성 항원으로 자극시킨 후 시간대 별, 투여량별 PBMC 발현 mRNA를 추출하여 quantitative real-time PCR로 측정</p>

	<p>quantitative real-time PCR 기법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 항원 투여 시기별 및 투여량에 따른 면역반응 정도 분석 - 소 말초혈액단핵세포(PBMC)에서 분비되는 항체, cytokine 등의 생성여부 조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 고면역원성 항원에 자극된 말초혈액단핵세포로부터 분비되어지는 cytokine (iNOS, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-12p40, IFN-γ, TNF-α) 및 apoptosis (Bax Bcl-2, TLR-4) 에 관련된 유전자들을 Real-time PCR기법을 이용하여 비교 분석
	<p>● 목적동물 야외주 감염시기별 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 발굴된 고면역원성 항원에 대한 각 감염시기별 야외 감염우 혈청의 반응을 평가할 수 있는 기법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 브루셀라 야외 감염우 혈청을 단계 희석한 후 고면역원성 항원에 대한 반응을 비교 분석하여 ELISA 측정 기준을 확립 (단백질 농도 및 혈청 희석농도) - 농림축산검역본부 보유 감염시기별 감염우 혈청 및 야외 감염우 혈청 확보 완료 및 실험실시 예정
	<p>● 목적동물의 교차반응 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Y. enterocolitica</i> O:9, <i>E. coli</i> 에 감염된 소 혈청 확보 - 고면역원성 항원을 이용한 타균과의 교차반응 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 브루셀라 야외 감염우 혈청과 <i>Y. enterocolitica</i> O:9, <i>E. coli</i> 에 감염된 소 혈청을 확보하여 ELISA 기법을 이용하여 교차반응을 비교 분석할 예정 - ELISA를 통한 교차반응 결과를 토대로 감염시기별 최적 다중항원 조합을 설정할 예정

다. 3차년도 (2014년도)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p><제 1 세부과제> 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발</p>	<p>개발된 진단방법의 정확도, 특이도 등 조사</p> <p>고면역원성 항원의 대량생산 체계 확립 및 산업화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 개발된 진단법의 기존 방법과의 민감도, 특이도, 정확도 조사(Rose bengal, TAT, ELISA 등);제 1협동 공동수행 ● 개발된 간이진단법의 기존 방법과의 민감도, 특이도, 정확도 조사(Rose bengal, TAT, ELISA 등): 제 1협동 공동수행 ● 개발된 진단키트의 산업화 전략 수립 ● 고면역원성 항원의 대량생산체계 확립 및 산업화
<p><제1협동과제> 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 감염시기별 기존 방법의 민감도, 정확도, 특이도 등 조사 	<p>o 타 축종에 대한 진단 적용 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 진단법의 국내 브루셀라 감염 보고된 타 축종 혈청을 이용한 진단평가 (개 등) o 기존 방법과의 비교를 통한 민감도, 정확도, 특이도 등 조사 (제 1세부 공동) o 실험동물을 이용한 실험을 통하여 민감도가 높은

		<p>고면역원성 재조합 항원을 목적동물 (소) 에 적용 면역반응 분석 및 비교 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 감염시기별 혈청을 확보 이에 대한 ELISA 평가 및 타균과의 교차반응에 대한 비교 분석 ○ 진단에 사용가능한 재조합 단백질의 최적조합 분석
--	--	--

2절. 연구개발 결과

1. 제1세부과제 결과

가. 숙주특이 고면역원성 항원 발굴

1) 브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴 (5 종이상)

- (1) 브루셀라 균체항원 추출 및 2DE(dimensional gel electrophoresis) 분석을 통한 균체항원 분석: *Brucella abortus* 544 표준균주로부터 추출된 균체항원단백질을 이용해 2DE 방법 및 silver stain을 수행한 후 Image master 5.0 (Amersham Biosciences) 프로그램을 이용하여 gel 이미지를 분석해 본 결과, 브루셀라 균체단백질로부터 총 1181개의 단백질 spots를 확인할 수 있었으며 5반복 실험을 통하여 전체 단백질 spots이 99%이상 일치하는 패턴을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

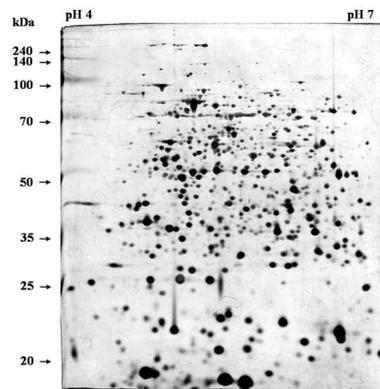


Fig. 1. 브루셀라 균체항원단백질의 2DE 및 silver stain을 통한 총 단백질의 수 및 패턴분석. *Brucella abortus* 544 표준균주로부터 추출된 균체단백질로부터 총 1181개의 단백질 spots를 확인할 수 있음.

- (2) 실험동물 감염시기별 고면역원성 항원을 발굴하기 위해 브루셀라 감염 마우스로부터의 감염초기(10일), 중기(30일) 및 말기(60일) 혈청을 이용해 2DE를 통해 분리된 총 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 감염초기(10일)에는 13개의 immunoblotting spots (Fig. 2A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (Fig. 2B), 중기(30일)에는 24개의 immunoblotting spots (Fig. 3A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (Fig. 3B), 말기(60일)에는 54개의 immunoblotting spots (Fig. 4A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (Fig. 4B)을 확인할 수 있었다.

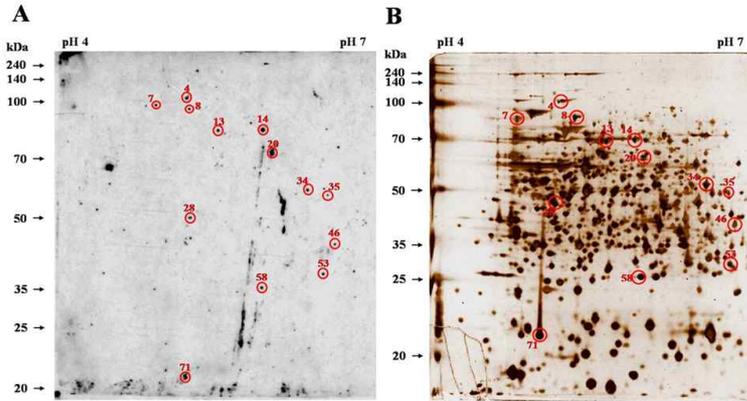


Fig. 2. 실험동물 감염초기 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 분석. *B. abortus* 감염 마우스로부터의 감염초기(10일) 혈청과 반응하는 13개의 immunoblotting spots(A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots(B)을 확인할 수 있음.

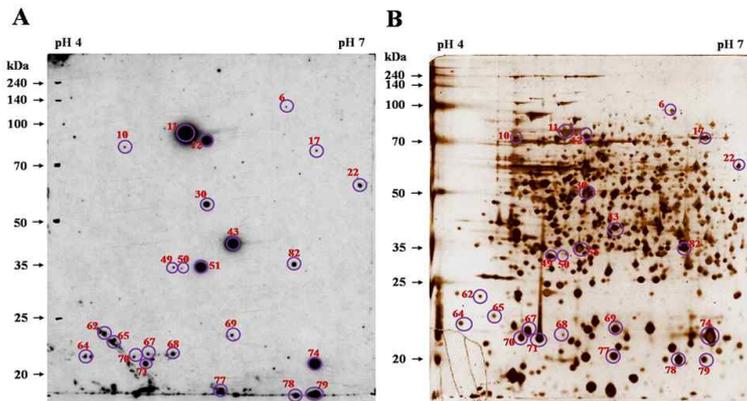


Fig. 3. 실험동물 감염초기 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 분석. *B. abortus* 감염 마우스로부터의 감염중기(30일) 혈청과 반응하는 24개의 immunoblotting spots(A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots(B)을 확인할 수 있음.

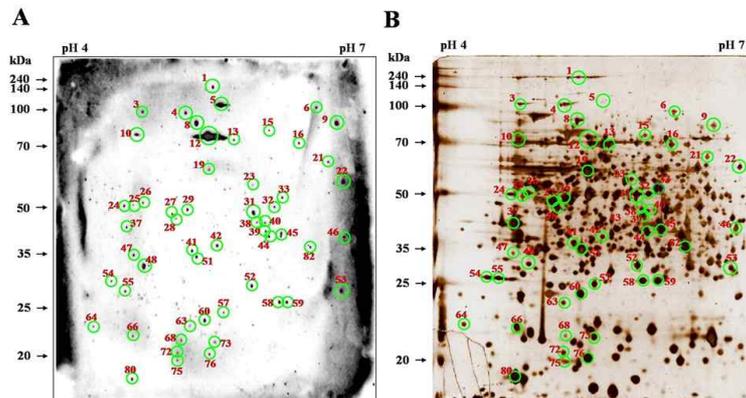


Fig.4. 실험동물 감염초기 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 분석. *B. abortus* 감염 마우스로부터의 감염말기(60일) 혈청과 반응하는 54개의 immunoblotting spots(A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots(B)을 확인할 수 있음.

(3) 실험동물 감염시기별 고면역원성 항원의 비특이적 반응 및 다른 균과의 교차반응을 배제시키기 위해 비감염 마우스와 *B. abortus*의 LPS와 성상이 유사하여 높은 교차반응을 보이는 *Yersinia enterocolitica* O:9 감염 마우스의 혈청을 이용해 2DE를 통해 분리된 브루셀라 균체단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 비감염 마우스 혈청과의 비특이적 반응으로 나타나는 7개의 immunoblotting spots (Fig. 5A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (Fig. 5B)을 확인하였으며, *Y. enterocolitica* O:9 감염 마우스 혈청과의 교차 반응으로 나타나는 14개의 immunoblotting spots (Fig. 6A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (Fig. 6B)을 확인할 수 있었다.

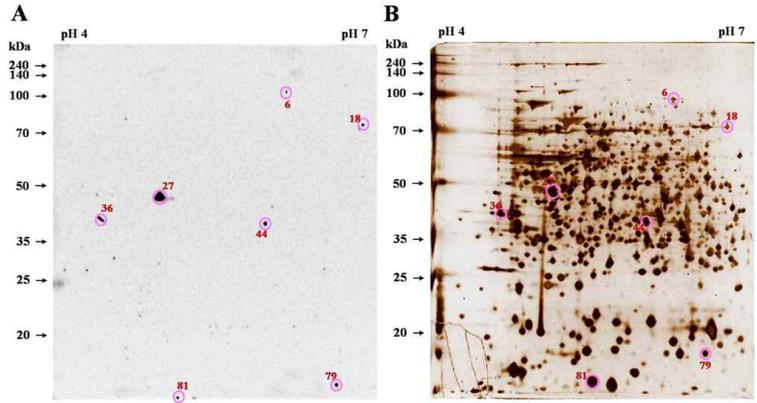


Fig. 5. 브루셀라 균체항원단백질의 비특이적 면역원성 분석. *B. abortus* 비감염 마우스로부터의 혈청과 반응하는 7개의 immunoblotting spots (A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (B)을 확인할 수 있음.

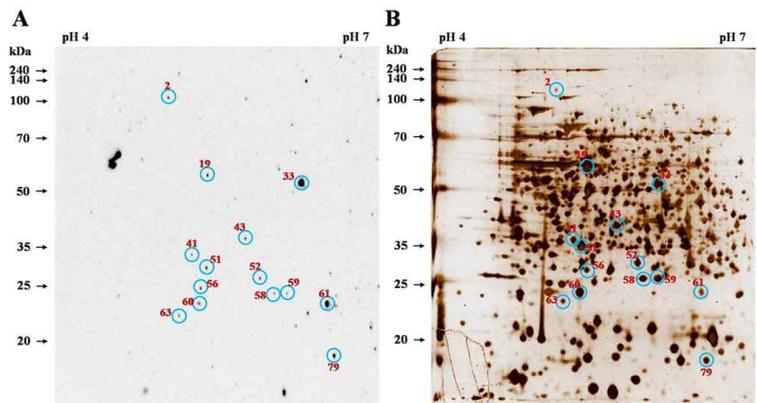


Fig. 6. 브루셀라 균체항원단백질의 교차반응 면역원성 분석. *Y. enterocolitica* O:9 감염 마우스로부터의 혈청과 반응하는 14개의 immunoblotting spots(A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots(B)을 확인할 수 있음.

(4) 다른 균과의 교차반응을 배제시킨 실험동물 감염시기별 고면역원성 항원만을 선별 분석하기 위해 브루셀라 균체단백질 spots을 비교 분석해 본 결과, *Y. enterocolitica* O:9 감염 마우스 혈청과의 교차 반응 spots과 일치되는 공통 spots은 감염초기(10일)에는 1개 (Fig. 7A), 중기(30일)에는 3개 (Fig. 7B), 말기(60일)에는 8개 (Fig. 7C)로 나타남을 확인할 수 있었다.

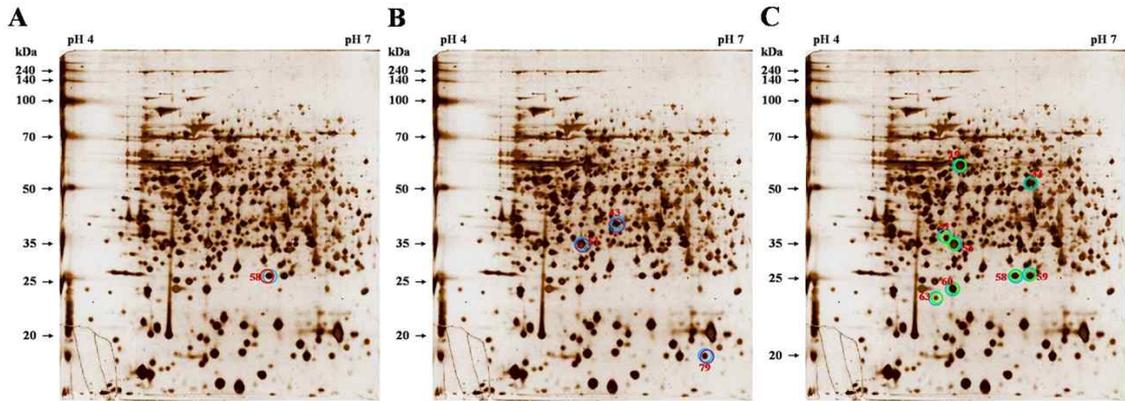


Fig. 7. 실험동물 감염시기별 면역원성과 교차반응 면역원성 비교분석. *B. abortus* 감염 마우스로부터의 혈청 반응 spots과 *Y. enterocolitica* O:9 감염 마우스 혈청의 교차 반응 spots과의 공통 spots은 감염초기(10일)에 1개(A), 중기(30일)에 3개(B), 말기(60일)에 8개(C)로 나타남.

(5) 목적동물 감염시기별 고면역원성 항원을 발굴하기 위해 브루셀라 감염 소로부터의 감염초기(21일), 중기(49일) 및 말기(70일) 혈청을 이용해 2DE를 통해 분리된 총 단백질 Western blot으로 분석해 본 결과, 감염초기(21일)에는 134개의 immunoblotting spots (Fig. 8A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (Fig. 8B), 중기(30일)에는 110개의 immunoblotting spots (Fig. 9A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (Fig. 9B), 말기(60일)에는 106개의 immunoblotting spots (Fig. 10A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (Fig. 10B)을 확인할 수 있었다.

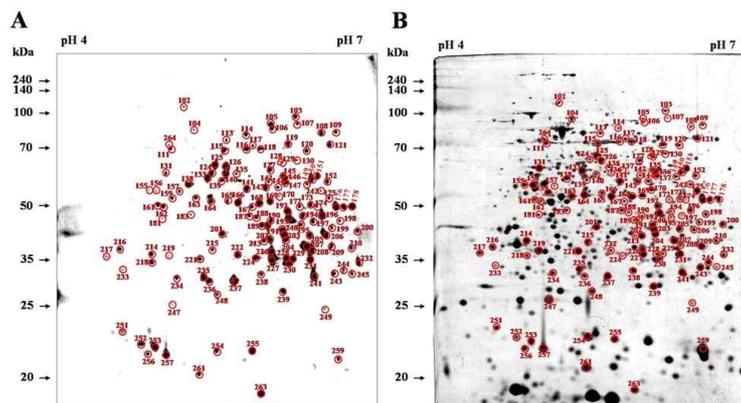


Fig. 8. 목적동물 감염초기 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 분석. *B. abortus* 감염 소로부터의 감염초기(21일) 혈청과 반응하는 134개의 immunoblotting spots(A) 과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots(B)을 확인할 수 있음.

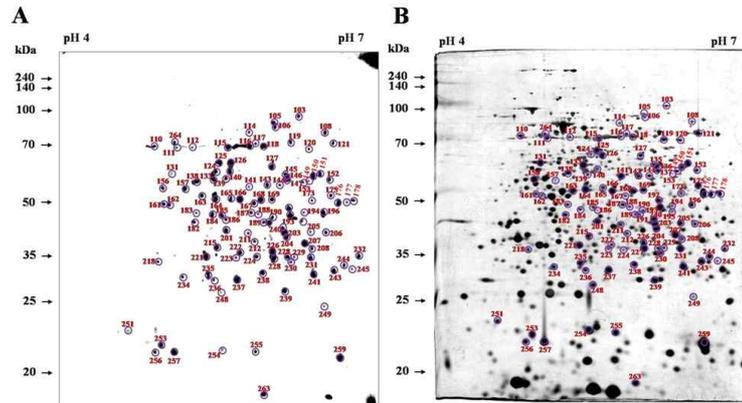


Fig. 9. 목적동물 감염초기 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 분석. *B. abortus* 감염 소로부터의 감염중기(49일) 혈청과 반응하는 110개의 immunoblotting spots(A) 과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots(B)을 확인할 수 있음.

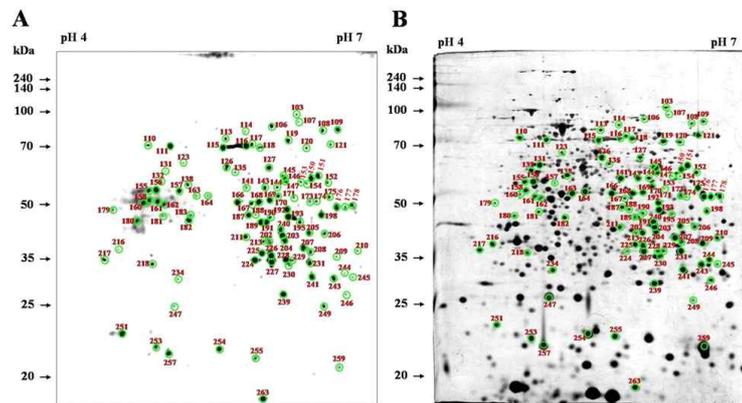


Fig. 10. 목적동물 감염초기 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 분석. *B. abortus* 감염 소로부터의 감염말기(70일) 혈청과 반응하는 106개의 immunoblotting spots(A) 과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots(B)을 확인할 수 있음.

(6) 목적동물 감염시기별 고면역원성 항원의 비특이적 반응 및 다른 균과의 교차반응을 배제시키기 위해 비감염 소와 *Y. enterocolitica* O:9 감염 소의 혈청을 이용해 2DE 를 통해 분리된 브루셀라 균체단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 비감염 소 혈청과의 비특이적 반응으로 나타나는 25개의 immunoblotting spots (Fig. 11A) 과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (Fig. 11B)을 확인하였으며, *Y. enterocolitica* O:9 감염 소 혈청과의 교차반응으로 나타나는 25개의 immunoblotting spots (Fig. 12A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질spots (Fig. 12B)을 확인할 수 있었다.

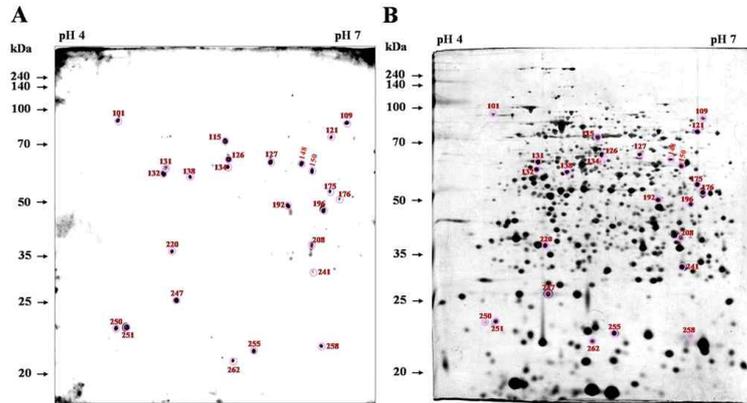


Fig. 11. 브루셀라 균체항원단백질의 비특이적 면역원성 분석. *B. abortus* 비감염 소로부터의 혈청과 반응하는 25개의 immunoblotting spots(A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots (B)을 확인할 수 있음.

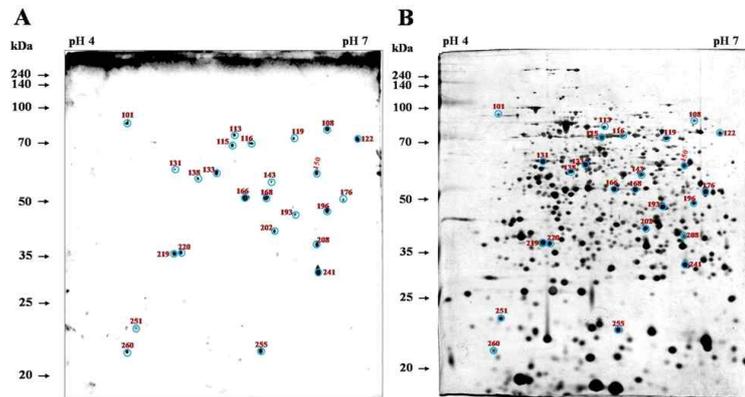


Fig. 12. 브루셀라 균체항원단백질의 교차반응 면역원성 분석. *Y. enterocolitica* O:9 감염 소로부터의 혈청과 반응하는 25개의 immunoblotting spots(A)과 이와 상응하는 2DE상의 단백질 spots(B)을 확인할 수 있음.

(7) 비특이반응과 다른 균과의 교차반응을 배제시킨 목적동물 감염시기별 고면역원성 항원만을 선별 분석하기 위해 브루셀라 균체단백질 spots을 비교 분석해 본 결과, 비감염 소와의 비특이 반응 spots과 일치되는 공통 spots은 13개 (Fig. 13A), *Y. enterocolitica* O:9 감염 소 혈청과의 교차 반응 spots과 일치되는 공통 spots은 13개 (Fig. 13B)로 나타남을 확인할 수 있었다.

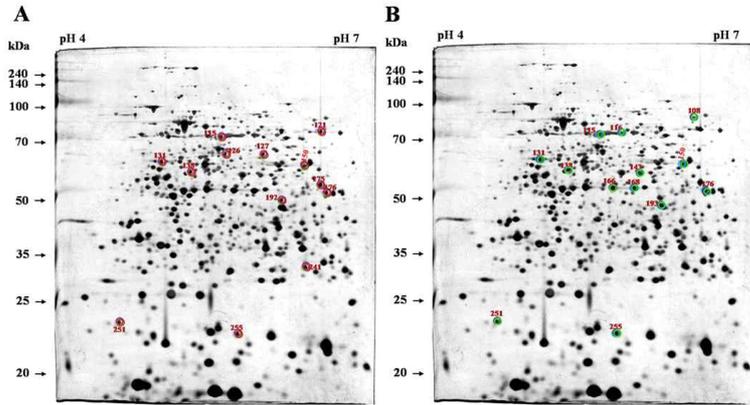


Fig.13. 목적동물 감염시기별 면역원성과 비특이적 반응 및 교차반응 면역원성 비교 분석. *B. abortus* 감염 소의 반응 spots과의 공통 spots은 비감염 소의 비특이 반응 spots은 13개(A), *Y. enterocolitica* O:9 감염 소의 교차 반응 spots은 13개(B)로 나타남.

2) 브루셀라 고면역원성 항원의 단위평가 및 복합효과 평가

(1) 실험동물 감염시기별 고면역원성 항원의 단위 및 복합 조합 설정을 위해 감염시기별 마우스 혈청과 반응하는 브루셀라 균체단백질 spots을 개별적 또는 복합적으로 비교 분석해 본 결과, 감염초기(10일) 감염 마우스 혈청과 중기(30일)와 일치되는 공통 spots은 1개 (Fig.14A), 감염초기(10일)와 말기(60일)와 일치되는 공통 spots은 5개 (Fig.14B), 감염중기(30일)와 말기(60일)와 일치되는 공통 spots은 8개 (Fig.14C)로 나타났으며, 3가지 감염시기의 마우스 혈청에 대한 공통 spots은 인정되지 않았다 (Table 1).

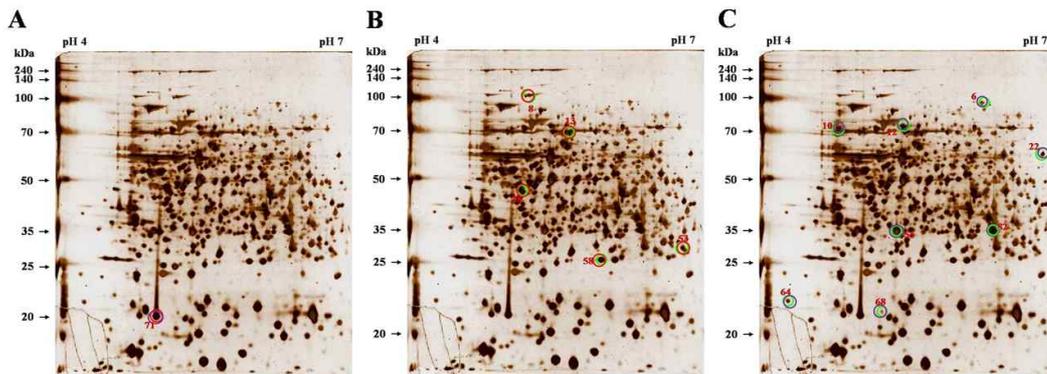


Fig.14. 실험동물 감염시기별 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 비교분석. *B. abortus* 감염 마우스 감염초기(10일)와 중기(30일) 혈청과 반응하는 공통 spots은 1개(A), 감염초기(10일)와 말기(60일)의 공통 spots은 5개(B), 감염중기(30일)와 말기(60일)의 공통 spots은 8개 (C)로 나타남.

Table 1. 실험동물 감염시기별 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 비교분석.

Antisera immunoreactions compared	No. of matched protein spots		Mean no. of protein spots		% Similarity*	
	Spot no.		No.	Mean no.		
All 3 sera		0	10 day	13	30	0
			30 day	24		
			60 day	54		
10 day vs 30 day	71	1	10 day	13	18	5.56
			30 day	24		
10 day vs 60 day	8, 13, 28, 53, 58	5	10 day	13	33	15.15
			60 day	54		
30 day vs 60 day	6, 10, 12, 22, 51, 64, 68, 82	8	30 day	24	39	20.51
			60 day	54		

* Percent similarity was calculated as the number of proteins common to the antisera immunoreactions compared divided by the mean number of proteins in these antisera immunoreactions × 100.

(2) 목적동물 감염시기별 고면역원성 항원의 단위 및 복합 조합 설정을 위해 감염시기별 소 혈청과 반응하는 브루셀라 균체단백질 spots을 개별적 또는 복합적으로 비교 분석해 본 결과, 감염초기(21일) 감염 소 혈청과 중기(49일)와 일치되는 공통 spots은 19개 (Fig. 15A), 감염초기(21일)와 말기(70일)와 일치되는 공통 spots은 10개 (Fig. 15B), 감염중기(49일)와 말기(70일)와 일치되는 공통 spots은 4개 (Fig. 15C)로 나타났으며, 3가지 감염시기의 소 혈청에 대한 공통 spots은 74개 (Fig. 15D)로 나타남을 확인할 수 있었다 (Table 2).

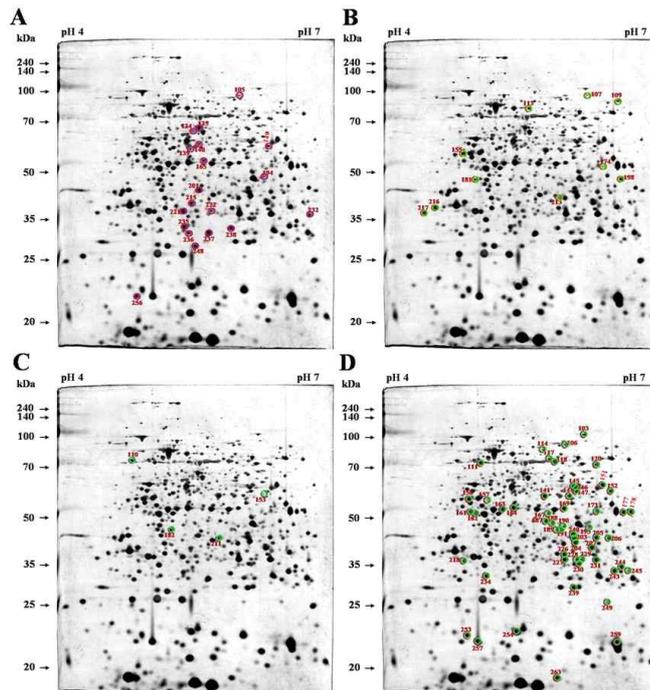


Fig.15. 목적동물 감염시기별 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 비교분석. *B. abortus* 감염 소의 감염초기(21일)와 중기(49일) 혈청과 반응하는 공통 spots은 19개 (A), 감염초기(10일)와 말기(60일)의 공통 spots은 10개(B), 감염중기(30일)와 말기

(60일)의 공통 spots은 4개(C), 3가지 감염시기의 소 혈청의 공통 spots은 74개(D)로 나타남.

Table 2. 목적동물 감염시기별 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 비교분석.

Antisera immunoreactions compared	No. of matched protein spots	Mean no. of protein spots		% Similarity ^a	
		No.	Mean no.		
All 3 sera	74	21 day	134	117	47.01
		49 day	110		
		70 day	106		
21 day vs 49 day	19	21 day	134	122	15.57
		49 day	110		
21 day vs 70 day	10	21 day	134	120	8.33
		70 day	106		
49 day vs 70 day	4	49 day	110	108	3.70
		70 day	106		

^a Percent similarity was calculated as the number of proteins common to the antisera immunoreactions compared divided by the mean number of proteins in these antisera immunoreactions × 100.

(3) 실험 및 목적동물 감염시기별 고면역원성 항원의 단위 및 복합 조합 설정을 통한 감염시기별 최적 항원의 조합 설정을 위해 비특이 반응 및 교차반응 spots과 일치되는 공통 spots은 모두 배제시켜 비교 분석해 본 결과, 실험동물의 감염시기별 최적 항원 spots는 17개, 목적동물의 감염시기별 최적 항원 spots는 55개로 확인되었고, 이를 통해 목적동물(소) 고면역원성 최적 항원 spots는 전체적으로 실험동물(마우스)에서 보다 2.9배 더 많음을 확인할 수 있었다 (Table 3).

Table 3. 실험 및 목적동물 감염시기별 브루셀라 균체항원단백질의 면역원성 비교분석.

Antisera immunoreactions	No. of non-matched protein spots with negative sera and positive sera of <i>Y. enterocolitica</i>		Antisera immunoreactions compared with mice antisera			
	bovine sera	mice sera	No. of matched protein spots	Antisera immunoreactions	No. of matched protein spots	% Similarity ^a
Matched protein spots of all 3 bovine sera (21, 49 and 70 days)	55	17	12	10 day	5	3.73
				30 day	11	10.00
				60 day	11	10.38

^a Percent similarity was calculated as the number of proteins common to the antisera immunoreactions compared divided by the mean number of proteins in these antisera immunoreactions × 100.

나. 발굴된 항원의 특성분석 및 재조합항원 생산

1) 발굴항원의 LC 및 MS/TOF를 이용한 브루셀라 균체항원단백질 동정 및 분석

(1) 실험동물 감염시기별 고면역원성 항원의 조합 설정을 통해 비특이 반응 및 교차반응을 모두 배제시킨 최적 항원 spots을 17개로 선별하여 LC 및 MS/TOF 분석을 이용해 브루셀라 균체항원단백질 동정 및 분석을 해본 결과, 감염초기(10일)와 중기(30일)에는 hypothetical protein BruAb2_0845, 감염초기(10일)와 말기(60일)에는 S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, elongation factor G (EF-G), elongation factor Ts, lipoprotein Omp10, 감염중기(30일)와 말기(60일)에는 serine protease Do, lipoprotein Omp19, betaine aldehyde dehydrogenase, DNA-directed RNA polymerase subunit omega, immunoreactive 28 kDa outer membrane protein, 50S ribosomal protein L25 가 동정되었다 (Table 4).

Table 4. 실험동물 감염시기별 브루셀라 고면역원성 항원의 LC 및 MS/TOF 분석을 통한 단백질 동정.

No. of spot	Antiserum immunizations			Gene name	Gene ID	GI	Protein identification	Protein ID	Accession no.	Sequence length	Locus tag	Score	Mw	pI	Sequence coverage (%)		
	10 day	30 day	60 day														
	<i>B. abortus</i>			<i>Yersinia</i>									Experimental	Theoretical			
	Positive		Negative	Positive													
8		ND*		ND	fusA	3340968	62290147	elongation factor G (EF-G)	YP_221940.1	Q57CQ3	694	BruAb1_1241	306	76301	76235	5.05	18
10	ND			ND	BruAb1_1389	3340946	62290268	serine protease Do	YP_222081.1	Q57CB4	524	BruAb1_1389	182	55228	55205	4.86	10
12	ND			ND	omp19	3340928	62290784	lipoprotein Omp19	YP_222577.1	P0C109	534	BruAb1_1506	337	19198	19210	5.81	20
13		ND		ND	betB	3339662	62289522	betaine aldehyde dehydrogenase	YP_221315.1	Q57E10	487	BruAb1_0574	312	51044	53514	5.30	26
22	ND			ND	dadA	3341955	62317265	D-amino acid dehydrogenase small subunit	YP_223103.1	Q579E2	416	BruAb2_0309	152	45367	45110	6.47	20
28		ND		ND	tsf	3340671	62290601	elongation factor Ts	YP_221867.1	Q57CX8	305	BruAb1_1167	370	31528	31491	5.02	41
53		ND		ND	omp10	3342161	62317036	lipoprotein Omp10	YP_222889.1	P0A3P0	381	BruAb2_0077	197	13908	13260	6.63	32
64	ND			ND	spoZ	3339864	62317250	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	YP_221404.1	Q57B91	133	BruAb1_0668	102	14562	14514	4.22	33
68	ND			ND	omp28	3339599	62288991	immunoreactive 28 kDa outer membrane protein	YP_222159.1	ESWJ88	753	BruAb1_1470	191	28482	28514	5.13	31
71			ND	ND	BruAb2_0845	3341366	62290359	hypothetical protein BruAb2_0845	YP_223598.1	Q577B7	177	BruAb2_0845	400	18506	18571	5.02	43
74	ND		ND	ND	sodC	3341416	62317454	superoxide dismutase, Cu-Zn	YP_223307.1	P15453	173	BruAb2_0527	283	18233	18131	6.24	43
82	ND			ND	BruAb1_1470	3340810	62289118	50S ribosomal protein L25	YP_222213.1	Q57BY2	207	BruAb1_1470	171	22369	22383	5.91	47

ND*, not detected

(2) 목적동물(소) 감염시기별 고면역원성 최적 항원 spots 중 실험동물(마우스)에서 비특이반응 및 교차반응을 모두 배제시킨 전체 반응성 항원 spots과는 12개가 일치하였으며 이 중 실험동물의 최적 항원 반응으로 선별된 spots은 3개 (aldehyde dehydrogenase, malate dehydrogenase, superoxide dismutase, Cu-Zn) 임을 확인할 수 있었다. 그 중 항원반응성이 높은 5개의 spots을 1차적으로 선별하여 LC 및

MS/TOF 분석을 이용해 브루셀라 균체항원단백질 동정 및 분석을 해본 결과, outer membrane protein, 31 kDa, Omp2a, porin, Omp2b, porin, Leu/Ile/Val-binding family protein, OmpA family protein가 동정되었다 (Table 5).

Table 5. 목적 및 실험동물 감염시기별 브루셀라 고면역원성 공통항원의 LC 및 MS/TOF 분석을 통한 단백질 동정.

	Antisera immunoreactions		Gene name	Gene ID	GI	Protein identification	Protein ID	Accession no.	Sequence length	Locus tag	Score	Mw		pI	Sequence coverage (%)		
	<i>B. abortus</i>											Experimental	Theoretical				
	Positive	Negative															
No. of spot	32	164	ND*	ND	omp31-1	3340872	62290498	outer membrane protein, 31 kDa	YP_222291.1	ESWJ81	786	BruAb1_1608	332	27701	27774	5.21	20
	38	188	ND	ND	omp2a	3339453	62289598	Omp2a, porin	YP_221391.1	Q44620	966	BruAb1_0655	274	34228	34535	4.36	22
	39	189	ND	ND	omp2b	3339998	62289600	Omp2b, porin	YP_221393.1	Q44619	1128	BruAb1_0657	310	38482	38723	5.41	32
	45	204	ND	ND	LivF	3787892	82700119	Leu/Ile/Val-binding family protein	YP_414693.1	Q2YQM0	1092	BAB1_1313	358	38444	38613	5.90	28
	67	253	ND	ND	ompA	3340717	62290115	OmpA family protein	YP_221908.1	Q57C17	663	BruAb1_1209	260	23367	23008	6.04	20

ND*, not detected

2) 발굴항원의 유전자 분석을 통한 특성분석 및 재조합 항원 생산

(1) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 **Omp10**의 유전자 분석을 통한 pMAL vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pMAL purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(10kDa)이 pMAL vector(42.5kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(52.5kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig.16A), 브루셀라 양성 마우스혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pMAL vector)의 maltose-binding protein; MBP)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig.16B).

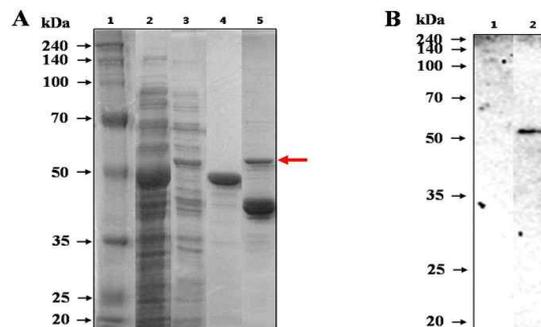


Fig.16. 브루셀라 균체항원단백질 Omp10의 발현 및 면역원성 분석. Omp10(10kDa)이 pMAL vector(42.5kDa; Lane2,4)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(52.5kDa; Lane3,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane1)과 비교해 재조합단백질(Lane2)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인됨(B).

(2) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 **Omp19**의 유전자 분석 및 특성 분석을 수행해 본 결과, 목적 단백질(19kDa)이 pMAL vector(42.5kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(61.5kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig.17A), 브루셀라 양성 마우스혈청을 이용해 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(MBP)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig.17B).

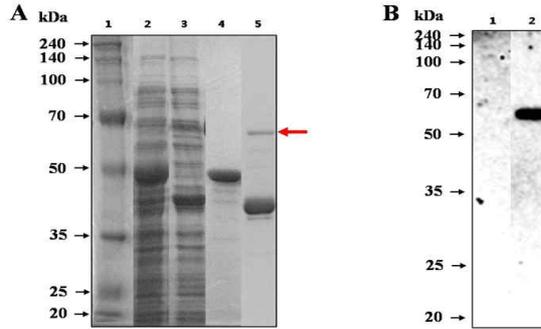


Fig.17. 브루셀라 균체항원단백질 Omp19의 발현 및 면역원성 분석. Omp19(19kDa)이 pMAL vector(42.5kDa; Lane2,4)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(61.5kDa; Lane3,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane1)과 비교해 재조합단백질(Lane2)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인됨(B).

(3) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 **Omp28**의 유전자 분석 및 특성 분석을 수행해 본 결과, 목적 단백질(28kDa)이 pMAL vector(42.5kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(70.5kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig.18A), 브루셀라 양성 마우스혈청을 이용해 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(MBP)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig.18B).

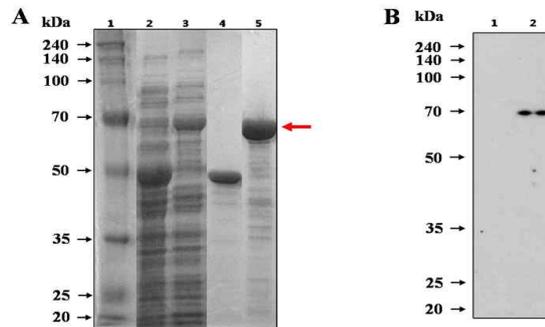


Fig.18. 브루셀라 균체항원단백질 Omp28의 발현 및 면역원성 분석. Omp28(28kDa)이 pMAL vector(42.5kDa; Lane2,4)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(70.5kDa; Lane3,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane1)과 비교해 재조합단백질(Lane2)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인됨(B).

(4) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 **Omp31-1**의 유전자 분석 및 특성 분석을 수행해 본 결과, 목적 단백질(31kDa)이 pMAL vector(42.5kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(73.5kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig.19A), 브루셀라 양성 마우스혈청을 이용해 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(MBP)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig.19B).

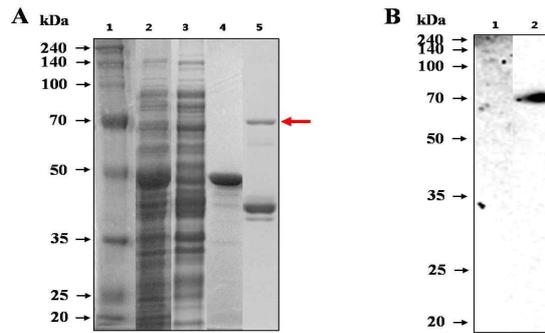


Fig.19. 브루셀라 균체항원단백질 Omp31-1의 발현 및 면역원성 분석. Omp31-1(31kDa)이 pMAL vector(42.5kDa; Lane2,4)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(73.5kDa; Lane3,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane1)과 비교해 재조합단백질(Lane2)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인됨(B).

(5) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 **Omp2a**의 유전자 분석 및 특성 분석을 수행해 본 결과, 목적 단백질(33kDa)이 pMAL vector(42.5kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(75.5kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며 (Fig. 20A), 브루셀라 양성 마우스혈청을 이용해 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(MBP)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 20B).

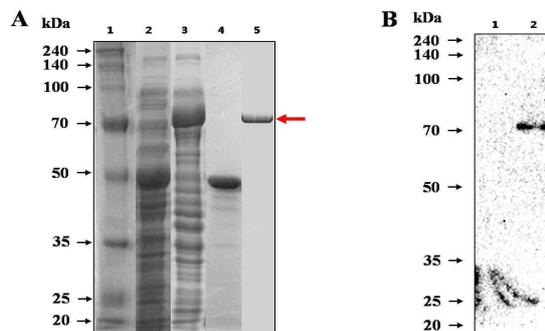


Fig. 20. 브루셀라 균체항원단백질 Omp2a의 발현 및 면역원성 분석. Omp2a(33kDa)이 pMAL vector(42.5kDa; Lane2,4)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기 (75.5kDa; Lane3,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane1)과 비교해 재조합단백질(Lane2)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인됨(B).

(6) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 **Omp2b**의 유전자 분석 및 특성 분석을 수행해 본 결과, 목적 단백질(36kDa)이 pMAL vector(42.5kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(78.5kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 21A), 브루셀라 양성 마우스혈청을 이용해 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(MBP)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 21B).

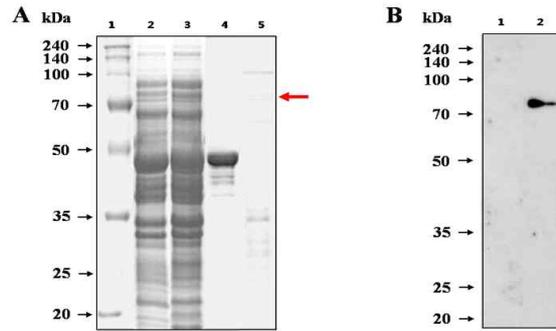


Fig.21. 브루셀라 균체항원단백질 Omp2b의 발현 및 면역원성 분석. Omp2b(36kDa)이 pMAL vector(42.5kDa; Lane2,4)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(78.5kDa; Lane3,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane1)과 비교해 재조합단백질(Lane2)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인됨(B).

(7) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 **SodC**의 유전자 분석 및 특성 분석을 수행해 본 결과, 목적 단백질(17.5kDa)이 pMAL vector(42.5kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(60kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig.22A), 브루셀라 양성 마우스혈청을 이용해 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(MBP)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 22B).

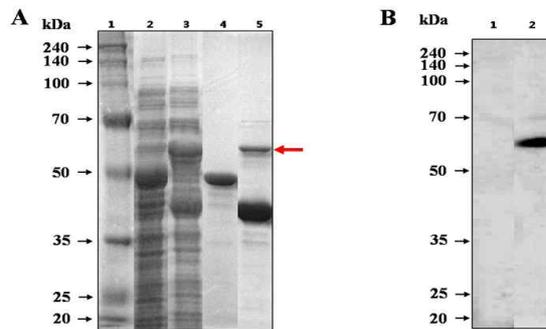


Fig. 22. 브루셀라 균체항원단백질 SodC의 발현 및 면역원성 분석. SodC(17.5kDa)이 pMAL vector(42.5kDa; Lane2,4)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(60kDa; Lane3,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane1)과 비교해 재조합단백질(Lane2)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인됨(B).

(8) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 **OmpA**의 유전자 분석 및 특성 분석을 수행해 본 결과, 목적 단백질(23 kDa)이 pMAL vector(42.5 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(65.5 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig.23A), 브루셀라 양성 마우스혈청을 이용해 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(MBP)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 23B).

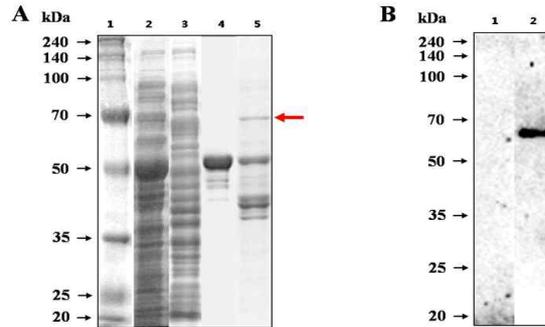


Fig.23. 브루셀라 균체항원단백질 SodC의 발현 및 면역원성 분석. SodC(17.5kDa)이 pMAL vector(42.5kDa; Lane2,4)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(60kDa; Lane3,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane1)과 비교해 재조합단백질(Lane2)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인됨(B).

(9) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 **LivF**의 유전자 분석 및 특성 분석을 수행해 본 결과, 목적 단백질(38 kDa)이 pMAL vector(42.5 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(80.5 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 24A), 브루셀라 양성 마우스혈청을 이용해 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(MBP)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 24B).

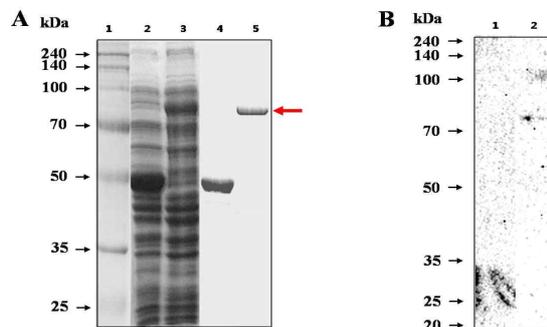


Fig. 24. 브루셀라 균체항원단백질 LivF의 발현 및 면역원성 분석. LivF(38 kDa)이 pMAL vector(42.5 kDa; Lane2,4)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(80.5 kDa; Lane 3, 5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane 1)과 비교해 재조합단백질(Lane 2)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인됨(B).

(10) 발굴된 고면역원성 항원단백질들(Omp10, Omp19, Omp28, Omp31-1, Omp2a, Omp2b, SodC, LivF, OmpA)의 재조합단백질에 대한 목적동물(소)의 항원반응성을 검증하기 위해 브루셀라 양성 소혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(MBP;Lane1)과 비교해 재조합단백질들의 목적동물(소)에 대한 면역원성을 확인할 수 있었다(Fig.25).

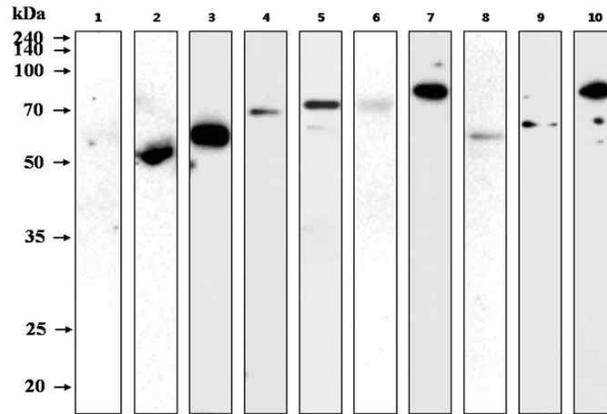


Fig.25. 목적동물(소)에서 브루셀라 균체항원 재조합단백질들의 면역원성 분석. 브루셀라 양성 소혈청을 이용한 Western blot을 통해 대조군(MBP; Lane1)과 비교해 재조합단백질들(Omp10;Lane2, Omp19;Lane3, Omp28;Lane4, Omp31-1;Lane5, Omp2a;Lane6, Omp2b;Lane7, SodC;Lane8, LivF;Lane9, OmpA;Lane10)의 목적동물(소)에 대한 항원반응성이 확인됨.

3) 고면역원성 후보물질의 세포독성 평가

발굴 항원의 세포안전성 및 세포독성을 평가하기 위해 마우스 대식세포유래 cell line인 RAW264.7 cell에 정제된 항원단백질들을 농도별(0, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리해 본 결과, 대조군(MBP)은 모든 농도에서 세포독성을 보이지 않았으며 목적 항원단백질들은 모두 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 세포독성을 85% 미만의 생존율로 세포독성을 보였으나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하농도에서는 95% 이상의 생존율로 세포독성이 인정되지 않았다 (Fig. 26).

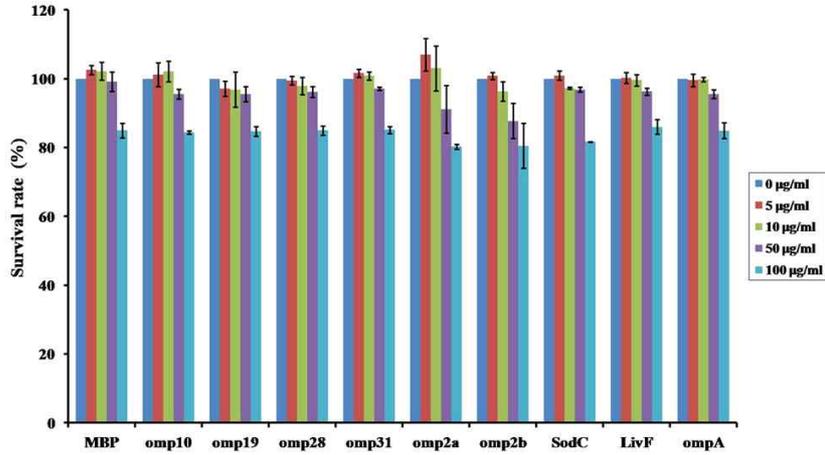


Fig. 26. 브루셀라 균체항원단백질 세포독성 평가. RAW264.7 cell에 정제된 항원단백질들Omp10, Omp19, Omp28, Omp31, Omp2a, Omp2b, SodC, LivF, OmpA을 농도별 (0, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리시, 모든 목적 항원단백질들은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 85% 미만의 생존율과 50 $\mu\text{g/ml}$ 이하농도에서 95% 이상의 생존율을 보임.

다. 숙주특이 고면역원성 재조합 항원 제작 및 면역원성 규명

1) 브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴: 제 1차년도에 수행된 고면역원성 항원 (9종)에 더하여 2차년도에 고면역원성 항원 19종을 발굴하여 총 28종에 대한 브루셀라 균의 고면역원성 재조합항원이 생산되었으며, 각 항원에 대한 면역 반응을 분석 함

(1) 1차년도에서 pMal vector에 발현된 Omp10, Omp 19 및 Omp 28를 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질 Omp10(10 kDa), Omp 19(19 kDa) 및 Omp 28(28kDa)이 pCold vector(60kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기 Omp10(70 kDa), Omp 19(79 kDa) 및 Omp 28 (88 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 27), 브루셀라 양성 감염우 혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pCold 단백)과 비교해 재조합단백질 Omp10, Omp 19 및 Omp 28모두가 브루셀라 혈청에 대해 반응한 반면, 음성혈청에는 반응이 없었다(Fig. 27).

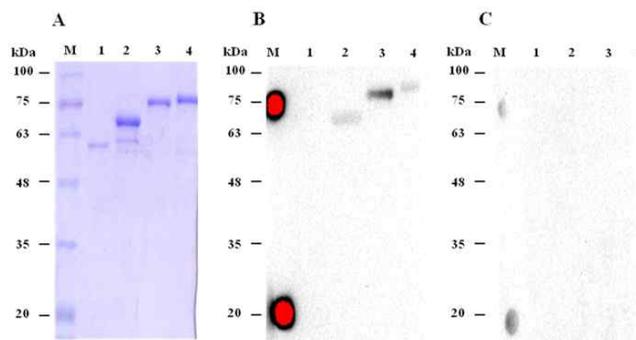


Fig. 27. 브루셀라 균체항원단백질 Omp10, Omp 19 및 Omp 28의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. Omp10(10 kDa), Omp 19(19 kDa) 및 Omp 28(28kDa)이 pCold vector(60 kDa; Lane2)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기가 Omp10(70 kDa; Lane 3), Omp 19(79 kDa; Lane 4) 및 Omp 28 (88 kDa; Lane 5)에서에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(A), 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 통해 재조합단백질 Omp10, Omp 19 및 Omp 28 (Lane 2, 3, 4)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인되었으며(B), 음성혈청과는 재조합단백질 Omp10, Omp 19 및 Omp 28(Lane5)에서 반응이 나타나지 않음 (C). pCold 단백질은 브루셀라 양성 (B; Lane 1) 및 음성 (C; Lane 1)에서 모두 반응이 없었음.

- (2) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 bfr의 유전자 분석을 통한 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(19 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(79 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig.28), 브루셀라 양성 감염우혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pCold 단백)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig.28).

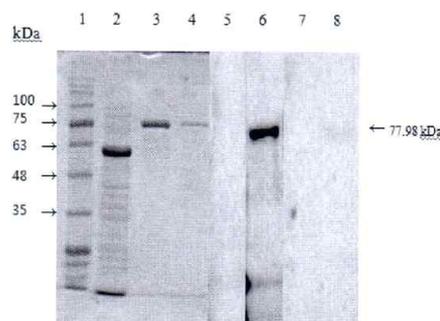


Fig. 28. 브루셀라 균체항원단백질 bfr의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. bfr(19kDa)이 pCold vector(60 kDa; Lane2)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(79kDa; Lane3, 4)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 통해 대조군(pCold; Lane5)과 비교해 bfr 재조합단백질 (Lane6)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인되었으며, 음성혈청과는 대조군(pCold; Lane7) 및 bfr 재조합단백질(Lane8)에서 반응이 나타나지 않음.

- (3) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 0628 (Metal-dependent hydrolase)의 유전자 분석을 통한 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(25 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(85 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 29A), 브루셀라 양성 감염우혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pCold 단백)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원 반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 29B).

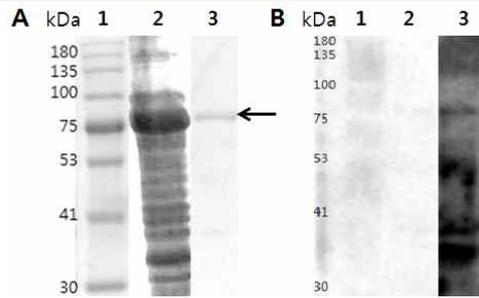


Fig. 29. 브루셀라 균체항원단백질 0628(Metal-dependent hydrolase)의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. mdh(25 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(85 kDa; Lane2)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 정제 후 적정크기가 확인 되었고 (85 kDa; Lane3)(A), 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 통해 대조군(pCold; Lane1)과 비교해 Metal-dependent hydrolase 재조합단백질(Lane3)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인되었으며, 음성혈청과는 대조군(pCold; Lane1) 및 mdh 재조합단백질(Lane 2)에서 반응이 나타나지 않음(B). 화살표: 약 85 kDa.

(4) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 msrA의 유전자 분석을 통한 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(24 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(84 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 30A), 브루셀라 양성 감염우혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pCold 단백)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 30B).

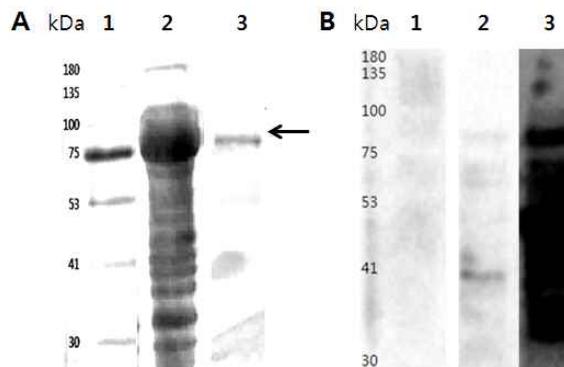


Fig. 30. 브루셀라 균체항원단백질 msrA의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. msrA (24 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(84 kDa; Lane2)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 정제 후 적정크기가 확인 되었고 (84 kDa; Lane3)(A), 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 통해 대조군(pCold; Lane1)과 비교해 msrA 재조합단백질(Lane3)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인되었으며, 음성혈청과는 대조군(pCold; Lane1) 및 msrA 재조합단백질

(Lane 2)에서 반응이 나타나지 않음(B). 화살표: 약 84 kDa.

- (5) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 rocF의 유전자 분석을 통한 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(39 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(99 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig.31A), 브루셀라 양성 감염우혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pCold 단백질)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 31B).

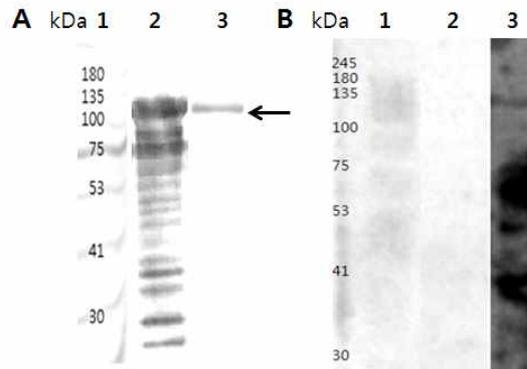


Fig. 31. 브루셀라 균체항원단백질 rocF의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. rocF (39 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(99 kDa; Lane2)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 정제 후 적정크기가 확인 되었고 (99 kDa; Lane3)(A), 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 통해 대조군(pCold; Lane1)과 비교해 rocF 재조합단백질(Lane3)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인되었으며, 음성혈청과는 대조군(pCold; Lane1) 및 rocF 재조합단백질 (Lane 2)에서 반응이 나타나지 않음(B). 화살표: 약 99 kDa.

- (6) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 pgk의 유전자 분석을 통한 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(42 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(102 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 32A), 브루셀라 양성 감염우혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pCold 단백질)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 32B).

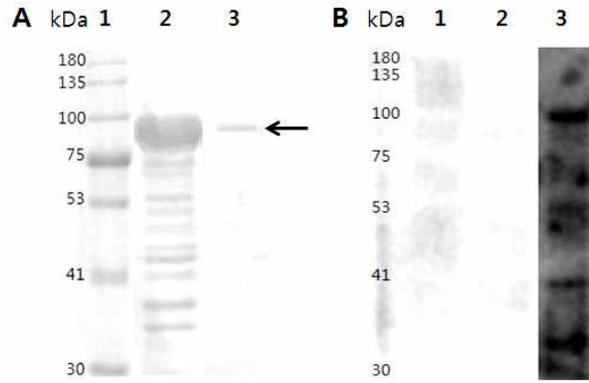


Fig. 32. 브루셀라 균체항원단백질 rocF의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. pgk (42 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(102 kDa; Lane2)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 정제 후 적정크기가 확인 되었고 (102 kDa; Lane3)(A), 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 통해 대조군(pCold; Lane 1)과 비교해 pgk 재조합단백질(Lane 3)의 브루셀라에 대한 항원 반응성이 확인되었으며, 음성혈청과는 대조군(pCold; Lane1) 및 pgk 재조합단백질 (Lane 2)에서 반응이 나타나지 않음(B). 화살표: 약 102 kDa.

- (7) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 mdh (malate dehydrogenase)의 유전자 분석을 통한 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(33 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(93 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 33A), 브루셀라 양성 감염우혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pCold 단백)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원 반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 33B).

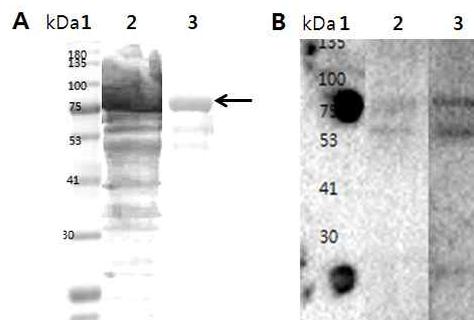


Fig. 33. 브루셀라 균체항원단백질 mdh의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. mdh (33 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(93 kDa; Lane2)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 정제 후 적정크기가 확인 되었고 (93 kDa; Lane3)(A), 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 통해 대조군(pCold; Lane1)과 비교해 mdh 재조합단백질(Lane3)의 브루셀라에 대한 항원 반응성이 확인되었으며, 음성혈청과는 대조군(pCold; Lane1) 및 pgk 재조합단백질

(Lane 2)에서 반응이 나타나지 않음(B). 화살표: 약 93 kDa.

- (8) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 tsf의 유전자 분석을 통한 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(31 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(91 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 34A), 브루셀라 양성 감염우혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pCold 단백)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 34B).

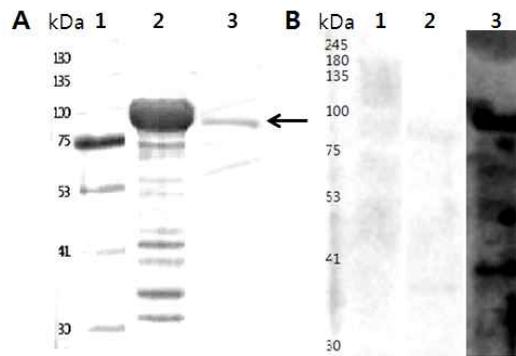


Fig. 34. 브루셀라 균체항원단백질 mdh의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. tsf (31 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(91 kDa; Lane2)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 정제 후 적정크기가 확인 되었고 (91 kDa; Lane3)(A), 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 통해 대조군(pCold; Lane1)과 비교해 tsf 재조합단백질(Lane3)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인되었으며, 음성혈청과는 대조군(pCold; Lane1) 및 pgk 재조합단백질 (Lane 2)에서 반응이 나타나지 않음(B). 화살표: 약 91 kDa.

- (9) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 OsmC의 유전자 분석을 통한 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(15 kDa)이 pCold vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(75 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 35), 브루셀라 양성 감염우혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pCold 단백)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 35).

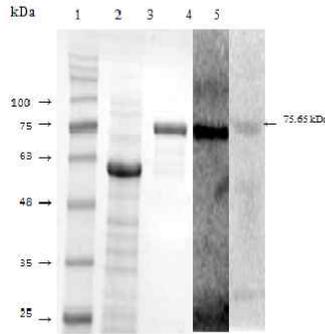


Fig. 35. 브루셀라 균체항원단백질 OsmC의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. OsmC(15kDa)이 pCold vector(60 kDa; Lane2)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(75kDa; Lane3)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 통해 OsmC 재조합단백질(Lane4)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인되었으며, 음성혈청과는 OsmC 재조합단백질(Lane5)에서 반응이 나타나지 않음.

- (10) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 ndk의 유전자 분석을 통한 pMal vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pMal purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(17 kDa)이 pMal vector(42.5 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(79 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 36), 브루셀라 양성 감염 마우스 혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pMal 단백)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 36).

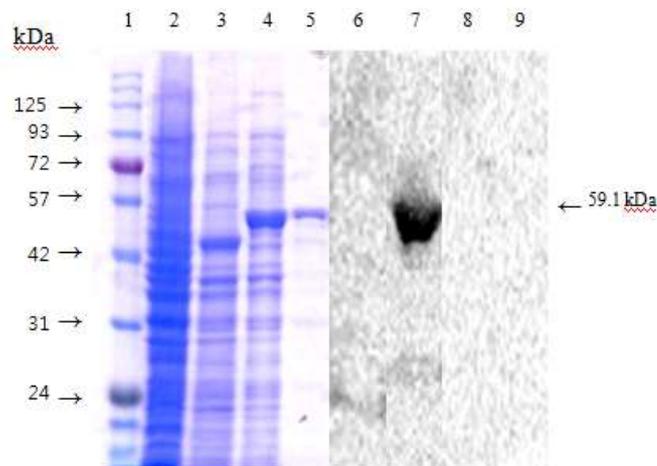


Fig. 36. 브루셀라 균체항원단백질 ndk의 발현 및 감염 마우스 혈청을 이용한 면역원성 분석. ndk(17 kDa)이 pMal vector(42.5kDa; Lane2)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(79 kDa; Lane4,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 감염 마우스 혈청을 이용한 Western blot을 통해 대조군(pMal; Lane6)과 비교해 ndk 재조합단백질(Lane8)의 브루셀라에 대한 항원반응성이 확인되었으며, 음성혈청과는 대

조균(pMal; Lane7) 및 bfr 재조합단백질(Lane9)에서 반응이 나타나지 않음. Lane 1; Marker, Lane 2; *E. coli* whole cell lysate, Lane 3; pMal expression Lane 4; ndk expression, Lane 5; purification

- (11) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 asp의 유전자 분석을 통한 pMal vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pMal purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(45 kDa)이 pMal vector(42.5 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(88 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 37), 브루셀라 양성 감염 마우스 혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pMal 단백질)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 37).

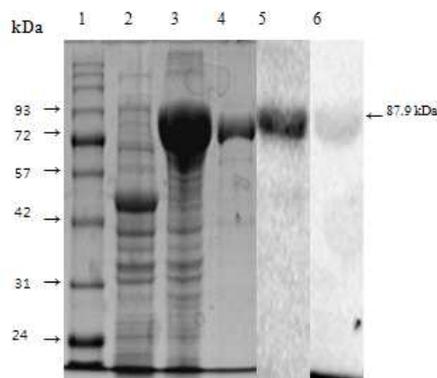


Fig. 37. 브루셀라 균체항원단백질 asp의 발현 및 감염 마우스 혈청을 이용한 면역원성 분석. asp(45 kDa)이 pMal vector(42.5 kDa; Lane2)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(87kDa; Lane4,5)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 감염 마우스 혈청을 이용한 Western blot을 수행해 본 결과 양성혈청과는 강한 반응을 보인 반면(lane 5) 음성혈청과는 (lane 6) 미약한 반응을 보였다. Lane 1; Marker, Lane 2; pMal expression Lane 3; asp expression, Lane 4; asp purification, Lane 4; asp westernblot (positive serum), Lane 5; asp westernblot (negative serum)

- (12) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 dps의 유전자 분석을 통한 pMal vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pMal purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(20 kDa)이 pMal vector(42.5 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(62 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 38), 브루셀라 양성 감염 마우스 혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pMal 단백질)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 38).

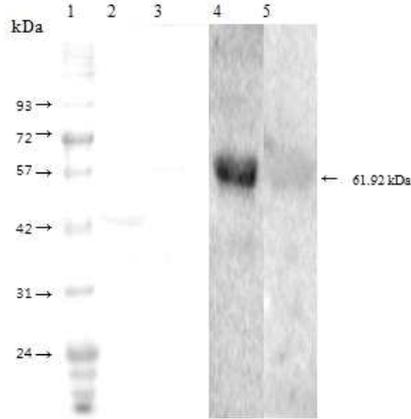


Fig. 38. 브루셀라 균체항원단백질 dps의 발현 및 감염 마우스 혈청을 이용한 면역원성 분석. dsp (20 kDa)이 pMal vector(42.5 kDa; Lane2)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(62 kDa; Lane3)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 감염마우스 혈청을 이용한 Western blot을 수행해 본 결과 양성혈청과는 강한 반응을 보인 반면(lane 4) 음성혈청과는 (lane 5) 반응이 나타나지 않았다. Lane 1; Marker, Lane 2; pMal expression Lane 3; dps expression, Lane 4; dps westernblot (positive serum), Lane 5; dps westernblot (negative serum)

- (13) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 YaeC의 유전자 분석을 통한 pMal vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pMal purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(33 kDa)이 pMal vector(42.5kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(75kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 39), 브루셀라 양성 감염 마우스 혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pMal 단백질)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다 (Fig. 39).

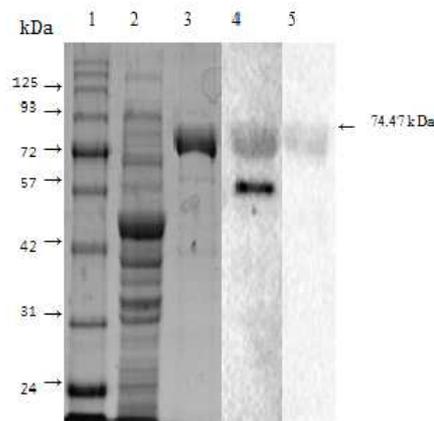


Fig. 39. 브루셀라 균체항원단백질 YaeC의 발현 및 감염 마우스 혈청을 이용한 면역원성 분석. YaeC (33 kDa)이 pMal vector(42.5 kDa; Lane2)에 재조합된

recombinant protein의 적정 크기(75 kDa; Lane3)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 감염마우스 혈청을 이용한 Western blot을 수행해 본 결과 양성혈청과는 강한 반응을 보인반면(lane 4) 음성혈청과는 (lane 5) 반응이 나타나지 않았다. Lane 1; Marker, Lane 2; pMal expression Lane 3; YaeC expression, Lane 4; YaeC westernblot (positive serum), Lane 5; YaeC westernblot (negative serum)

- (14) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 InPB의 유전자 분석을 통한 pMal vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pMal purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질(20 kDa)이 pMal vector(42.5 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(62 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며(Fig. 40), 브루셀라 양성 감염 마우스 혈청을 이용해 정제된 재조합 단백질을 Western blot으로 분석해 본 결과, 대조군(empty pMal 단백)과 비교해 재조합단백질의 브루셀라에 대한 항원반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 40).

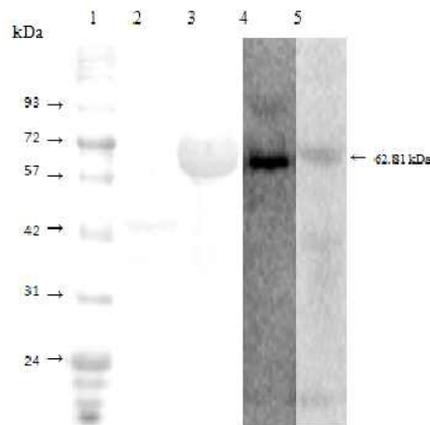


Fig. 40. 브루셀라 균체항원단백질 InPB의 발현 및 감염 마우스 혈청을 이용한 면역원성 분석. InPB (20 kDa)이 pMal vector(42.5 kDa; Lane2)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(62 kDa; Lane3)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 감염마우스 혈청을 이용한 Western blot을 수행해 본 결과 양성혈청과는 강한 반응을 보인 반면(lane 4) 음성혈청과는 (lane 5) 반응이 나타나지 않았다. Lane 1; Marker, Lane 2; pMal expression Lane 3; YaeC expression, Lane 4; InPB westernblot (positive serum), Lane 5; InPB westernblot (negative serum)

- (15) 발굴된 고면역원성 항원단백질 중 항원반응성이 높은 신규 aspC, hypothetical protein, LivF, ndk 및 tbpA의 유전자 분석을 통한 pCold vector를 이용한 recombinant DNA 작제 후 IPTG를 이용한 recombinant protein 발현 유도 및 pCold purification을 수행해 본 결과, 목적 단백질이 발현되었으며, 각 단백질에 대한 면역반응도 관찰 되었음 (Fig. 41)

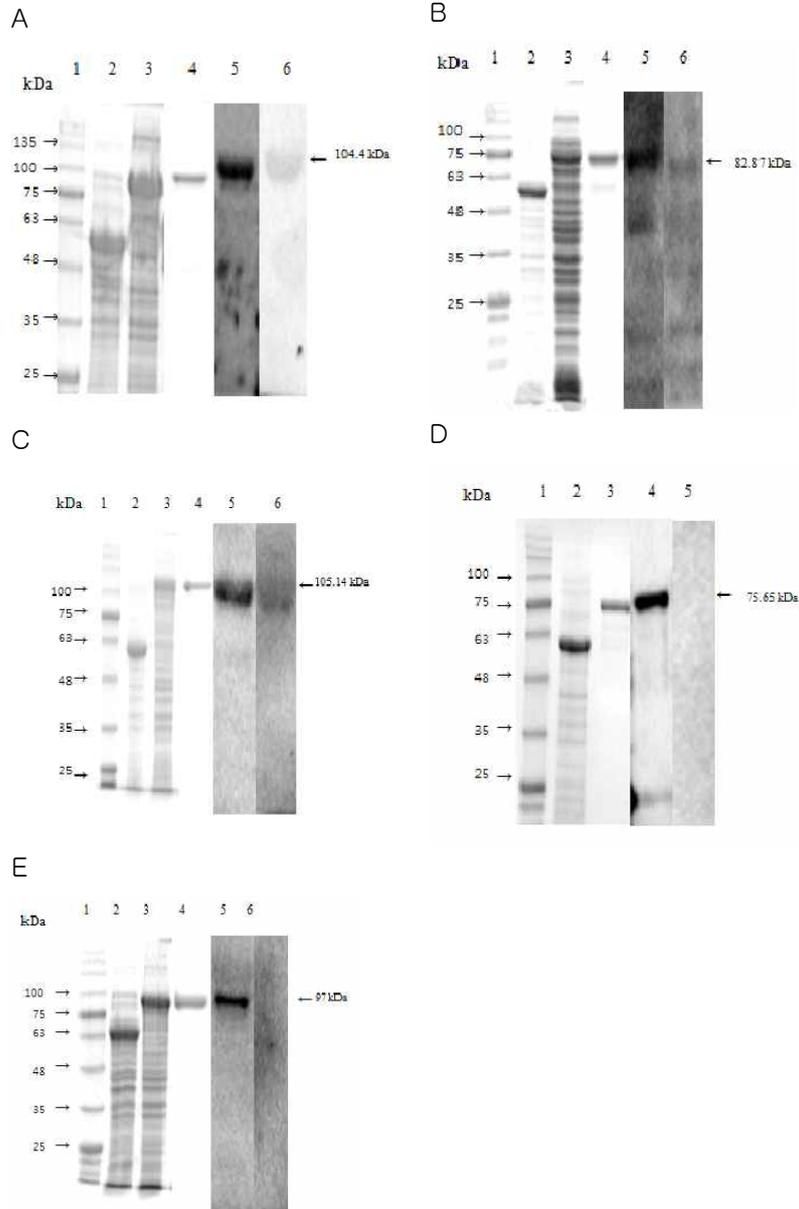


Fig. 41. 브루셀라 균체항원단백질 aspC, hypothetical protein, LivF, ndk 및 tbpA의 발현 및 감염우 혈청을 이용한 면역원성 분석. aspC(44 kDa)(A), hypothetical protein(22 kDa)(B), LivF(45 kDa)(C), ndk(15 kDa)(D) 및 tbpA (37 kDa)(E)이 pMal vector(60 kDa)에 재조합된 recombinant protein의 적정 크기(각각 104, 82, 105, 75 및 97 kDa)에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있으며, 감염우 혈청을 이용한 Western blot을 수행해 본 결과 양성혈청과는 강한 반응을 보인 반면 음성혈청과는 반응이 나타나지 않았음.

라. 숙주특이 고면역원성 재조합 항원의 세포독성 분석

1) 브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴: 제 1차년도에 수행된 고면역원성 항원 (9종)에 더하

여 2차년도에 고면역원성 항원 19종을 발굴하여 총 28종에 대한 브루셀라 균의 고면역원성 재조합항원이 생산되었으며, 각 항원에 대한 대식세포의 세포독성을 평가함.

(1) 재조합 고면역원성 항원 6종(0628, msrA, rocF, pgk, mdh, tsf)에 대한 마우스 유래 대식세포 Raw 264.7의 세포독성 평가를 수행한 결과 처리 후 48시간 지난 시점에서 0628, msrA 및 pgk 재조합 단백질의 경우 5, 15, 50 및 100 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 세포독성이 인정되지 않았으나, 그 외 rocF, mdh 및 tsf 재조합 단백질은 농도에 비례하여 세포독성을 보임 (Fig. 42).

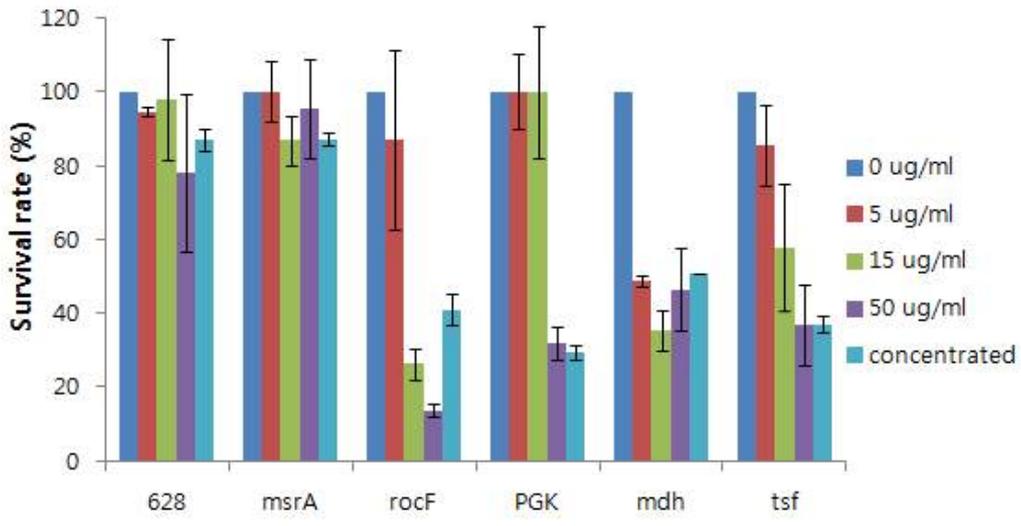


Fig. 42. 브루셀라 균체항원단백질 세포독성 평가 (1). RAW264.7 cell에 정제된 항원 단백질들(0628, msrA, rocF, pgk, mdh, tsf)을 농도별(0, 5, 10, 50, 100 μ g/ml)로 48시간 처리시, 모든 목적 항원단백질들은 0628, msrA 및 pgk 재조합 단백질의 경우 모든 농도에서 세포독성이 인정되지 않았으나, 그 외 rocF, mdh 및 tsf 재조합 단백질은 농도에 비례하여 세포독성을 보임

(2) 재조합 고면역원성 항원 2종(Omp 19, Omp 10)에 대한 마우스 유래 대식세포 Raw 264.7의 세포독성 평가를 수행한 결과 처리 후 48 시간 지난 시점에서 Omp 19, Omp 10 재조합 단백질의 경우 0.1에서 10 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 세포독성이 인정되지 않았으나, 그 이상의 높은 농도 (100 mg/ml) 에서 세포독성을 보임 (Fig. 43).

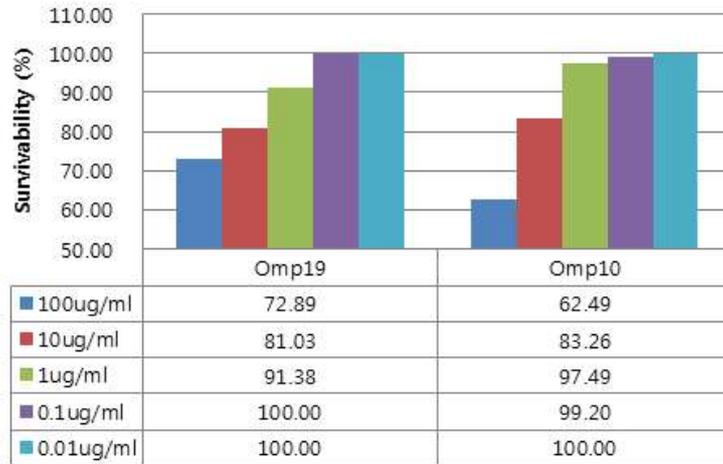


Fig. 43. 브루셀라 균체항원단백질 세포독성 평가 (2). RAW264.7 cell에 정제된 항원 단백질들 Omp 19, Omp 10을 농도별(0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 48시간 처리시, 0.1에서 10 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 세포독성이 인정되지 않았으나, 그 이상의 높은 농도 (100 mg/ml) 에서 세포독성을 보임

- (3) 재조합 고면역원성 항원 2종(Omp19, Omp10)에 대한 마우스 유래 대식세포 Raw 264.7의 세포독성 평가를 수행한 결과 처리 후 48 시간 지난 시점에서 Omp19, Omp10 재조합 단백질의 경우 0.1에서 10 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 세포독성이 인정되지 않았으나, 그 이상의 높은 농도 (100 mg/ml) 에서 세포독성을 보임 (Fig. 44).

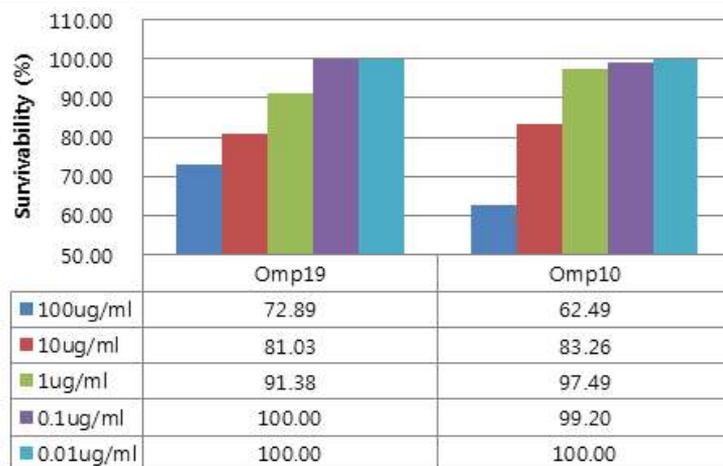


Fig. 44. 브루셀라 균체항원단백질 세포독성 평가 (2). RAW264.7 cell에 정제된 항원 단백질들 Omp 19, Omp 10을 농도별(0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 48시간 처리시, 0.1에서 10 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 세포독성이 인정되지 않았으나, 그 이상의 높은 농도 (100 mg/ml) 에서 세포독성을 보임

마. 재조합 항원을 이용한 브루셀라 혈청학적 진단기법 적용

1) 발굴된 고면역원성 항원에 대해 작제된 재조합 항원을 이용하여, 혈청학적 진단법에 응용을 수행함.

(1) 재조합 고면역원성 항원 3종(Omp10, Omp19, Omp 0)을 이용하여 브루셀라 음성 및 양성혈청 (TAT 100; 42, 200; 44, 400;69)혈청을 이용하여 50 μ l의 antigen (3 μ g/ml)을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, Omp10, Omp19와 Omp28 모두에서 TAT 200이상에서 유의적인 결과를 보임 (Fig. 45A, B, C)

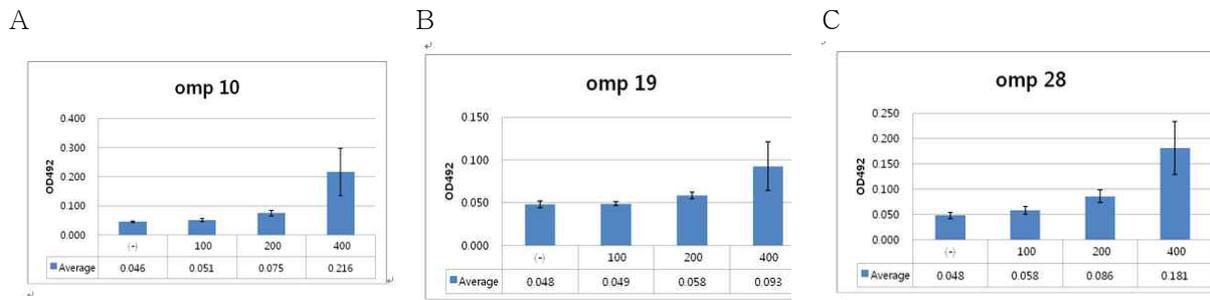


Fig. 45. 브루셀라 균체항원단백질을 이용한 ELISA법 적용. 재조합 고면역원성 항원 3종(Omp10, Omp19, Omp 0)을 이용하여 브루셀라 음성 및 양성혈청 (TAT 100; 42, 200; 44, 400;69)혈청을 이용하여 50 μ l의 antigen (3 μ g/ml)을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, Omp10(A), Omp19(B)와 Omp28 (C) 모두에서 TAT 200이상에서 유의적인 결과를 보임

(2) 재조합 고면역원성 항원 bfr을 이용하여 브루셀라 음성(120개) 및 양성혈청 (TAT 100; 40, 200; 40, 400;56, 총136개)혈청을 이용하여 50 μ l의 재조합 bfr antigen (6 μ g/ml)을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, bfr 모두에서 TAT 100이상에서 유의적인 결과를 보임 (Fig. 46). 이를 토대로 cutoff value는 음성 혈청값의 2배인 0.156으로 하여 평가하였으며(표 6), 각 혈청에 대한 민감도 특이도 및 정확도를 분석해본 결과 136개의 TAT 양성값을 보인 혈청은 ELISA 에서 122개가 양성으로 나와 민감도가 89.71%(122/136)를 보였고, 음성혈청의 경우 120개에서 115개의 음성값을 보여 특이도가 95.83%(115/120)을 나타냈으며, 정확도는 92.58%(237/256)를 나타냄 (표 7).

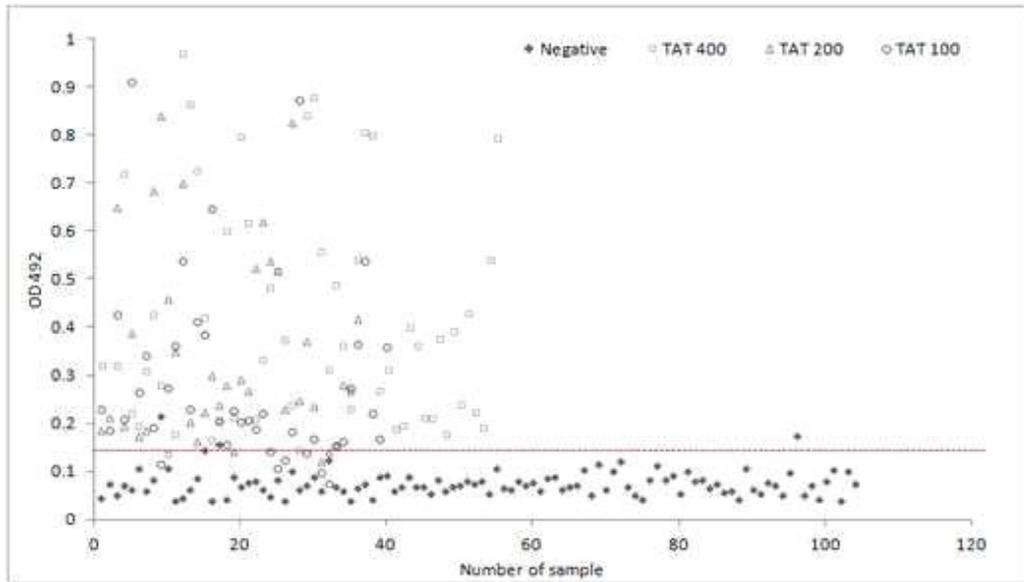


Fig. 46. 브루셀라 균체항원단백질을 이용한 ELISA법 적용. bfr 재조합 고면역원성 항원 을 이용하여 브루셀라 음성 (n=120) 및 양성혈청(n=136)dmf 이용하여 50 μ l의 antigen (6 μ g/ml)을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, 음성혈청 에서는 낮은 반응을 보인 반면 (0.078 \pm 0.051), 양성에서는 TAT 100 (0.284 \pm 0.105), 200(0.331 \pm 0.086), 400(0.434 \pm 0.12)을 보였다. cutoff value는 음성 혈청값의 2배인 0.156으로 하여 평가 함.

Table 6. Absorbance values of bovine sera using rBFR antigen based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

	Negative (n=120)	TAT 400 (n=56)	TAT 200 (n=40)	TAT 100 (n=40)
Average OD ₄₉₂	0.078 \pm 0.051	0.434 \pm 0.12	0.331 \pm 0.086	0.284 \pm 0.105

Cutoff value was calculated as double of average mean of negative sera = 0.0783*2 = 0.156

Table 7. Evaluation of diagnostic values of rBFR antigen based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

		TAT positive (n=136)	TAT negative (n=120)
ELISA	Positive	122	5
	Negative	14	115

Sensitivity=(122/136)*100=89.71 %; Specificity=(115/120)*100=95.83%; Accuracy=(237/256)=92.58%

(3) 재조합 고면역원성 항원 osmC를 이용하여 브루셀라 음성(86개) 및 양성혈청 (TAT 100; 40, 200; 39, 400;40, 총118개)혈청을 이용하여 50 μ l의 재조합 osmC antigen (6 μ g/ml)을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, osmC 모두에서 TAT 100이상에서 유의적인 결과를 보임 (Fig. 47). 이를 토대로 cutoff value는 음성 혈청값의 2배인 0.156으로 하여 평가하였으며(표 8), 각 혈청에 대한 민감도 특이도 및 정확도를 분석해본 결과 118개의 TAT 양성값을 보인 혈청은 ELISA 에서 109개가 양성으로 나와 민감도가 92.37%(109/118)를 보였고, 음성혈청의 경우 86개에서 84개의 음성값을 보여 특이도가 97.6%(84/86)을 나타냈으며, 정확도는 92.58%(237/256)를 나타냄 (표 9).

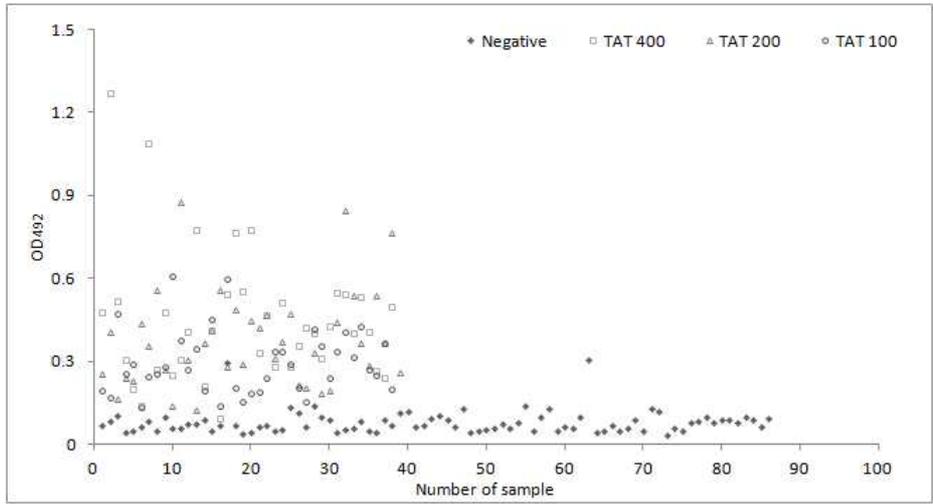


Fig. 47. 브루셀라 균체항원단백질을 이용한 ELISA법 적용. osmC 재조합 고면역원성 항원 을 이용하여 브루셀라 음성 (n=120) 및 양성혈청(n=118)를 이용하여 50 μ l의 antigen (6 μ g/ml)을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, 음성혈청 에서는 낮은 반응을 보인 반면 (0.084 \pm 0.041), 양성에서는 TAT 100 (0.295 \pm 0.095), 200(0.382 \pm 0.081), 400(0.426 \pm 0.45)을 보였다. cutoff value는 음성 혈청값의 2배인 0.168으로 하여 평가 함.

Table 8. Absorbance values of bovine sera using rOsmC antigen based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

	Negative (n=86)	TAT 400 (n=40)	TAT 200 (n=39)	TAT 100 (n=39)
Average OD ₄₉₂	0.084 \pm 0.041	0.426 \pm 0.238	0.382 \pm 0.177	0.295 \pm 0.116

Cutoff value was calculated as double of average mean of negative sera = 0.084*2 = 0.168

Table 9. Evaluation of diagnostic values of rOsmC antigen based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

		TAT positive (n=118)	TAT negative (n=86)
ELISA	Positive	109	2
	Negative	9	84

Sensitivity=(109/118)*100=92.37 %; Specificity=(84/86)*100=97.67%; Accuracy=(193/204)=94.61%

(4) 재조합 고면역원성 항원 aspC, ndk, livF, tbp 및 hypothetical protein을 이용하여 브루셀라 음성 및 양성혈청을 이용하여 50 µl의 각각의 재조합 단백 (6 µg/ml)을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, 앞서 수행한 bfr과 osmC 에 비하여 낮은 민감도 및 특이도를 보였음 (표 10-15).

Table 10. Absorbance values of bovine sera using different antigens based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Antigen	OD ₄₉₂ value			
	Negative (n=36)	TAT 400 (n=24)	TAT 200 (n=20)	TAT 100 (n=20)
rAspC	0.112 ± 0.068	0.286 ± 0.163	0.204 ± 0.105	0.178 ± 0.084
rNdk	0.133 ± 0.072	0.368 ± 0.152	0.286 ± 0.094	0.253 ± 0.131
rLivF	0.118 ± 0.054	0.290 ± 0.082	0.252 ± 0.166	0.196 ± 0.106
rTbpA	0.124 ± 0.089	0.311 ± 0.147	0.285 ± 0.119	0.206 ± 0.075
Hypothetical protein	0.128 ± 0.044	0.343 ± 0.186	0.314 ± 0.092	0.243 ± 0.103

Table 11. Evaluation of diagnostic values of rAspC antigen based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

		TAT positive (n=64)	TAT negative (n=36)
ELISA	Positive	39	5
	Negative	25	31

Sensitivity=(39/64)*100=60.9 %; Specificity=(31/36)*100=86.11%; Accuracy=(70/100)*100=70%

Table 12. Evaluation of diagnostic values of rNdk antigen based enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

		TAT positive (n=64)	TAT negative (n=36)
ELISA	Positive	48	10
	Negative	16	26

Sensitivity=(48/64)*100=75 %; Specificity=(26/36)*100=72.22%; Accuracy=(74/100)*100=74%

Table 13. Evaluation of diagnostic values of rLivF antigen based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

		TAT positive (n=64)	TAT negative (n=36)
ELISA	Positive	34	18
	Negative	30	18

Sensitivity=(34/64)*100=53.13 %; Specificity=(18/36)*100=50%; Accuracy=(52/100)*100=52%

Table 14. Evaluation of diagnostic values of rTbpA antigen based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

		TAT positive (n=64)	TAT negative (n=36)
ELISA	Positive	44	13
	Negative	20	23

Sensitivity=(44/64)*100=68.75 %; Specificity=(23/36)*100=63.88%; Accuracy=(67/100)*100=67%

Table 15. Evaluation of diagnostic values of recombinant hypothetical protein based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

		TAT positive (n=64)	TAT negative (n=36)
ELISA	Positive	49	17
	Negative	15	19

Sensitivity=(49/64)*100=76.56 %; Specificity=(19/36)*100=52.78%; Accuracy=(68/100)*100=68%

바. 브루셀라 혈청학적 진단기법 적용을 위한 최적의 재조합 항원 조합설정

1) 작제된 재조합 항원의 조합을 이용하여, 혈청학적 진단법에 응용을 수행함.

(1) 재조합 고면역원성 항원 3종(Omp10, Omp19, Omp 28)을 조합 하여 브루셀라 음성 (n=298) 및 양성(n=268)혈청 혈청을 이용하여 비율 1;1;1 (3 µg/ml), 2;2;2 (6 µg/ml) 및 3;3;3 (9 µg/ml)의 항원농도 50 µl을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, 각 비율 모두에서 TAT 100이상에서 유의적인 결과를 보임 (Fig. 48). 이를 토대로 가장 우수한 결과를 얻은 3;3;3 (9 µg/ml)의 항원농도 50 µl을 이용하여 ELISA를 수행한 결과 음성 혈청에 비하여 상당히 유의적인 양성값을 보였으며, TAT 음성 298개에서 294가 음성을 보여, 특이도가 98.66%를 나타냈고, TAT 양성 268개중 177개가 양성 반응을 보여 민감도가 66.04%를 보였음 (Fig. 49, 표 16)

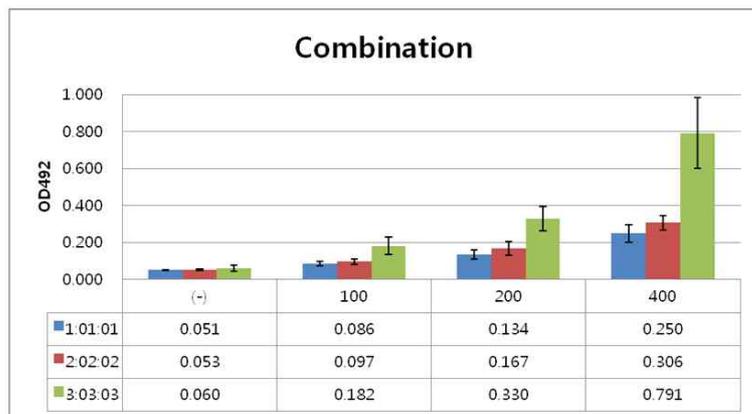


Fig. 48. 브루셀라 재조합 체항원단백질 조합을 이용한 ELISA법 적용. 재조합 고면역원성 항원 3종(Omp10, Omp19, Omp 28)을 조합 하여 브루셀라 음성(n=298) 및 양성(n=268) 혈청을 이용하여 농도 비율(µg/ml) 1;1;1, 2;2;2 및 3;3;3 의 항원농도 50 µl을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, 각 비율 모두에서 TAT 100이상에서 유의적인 결과를 보임.

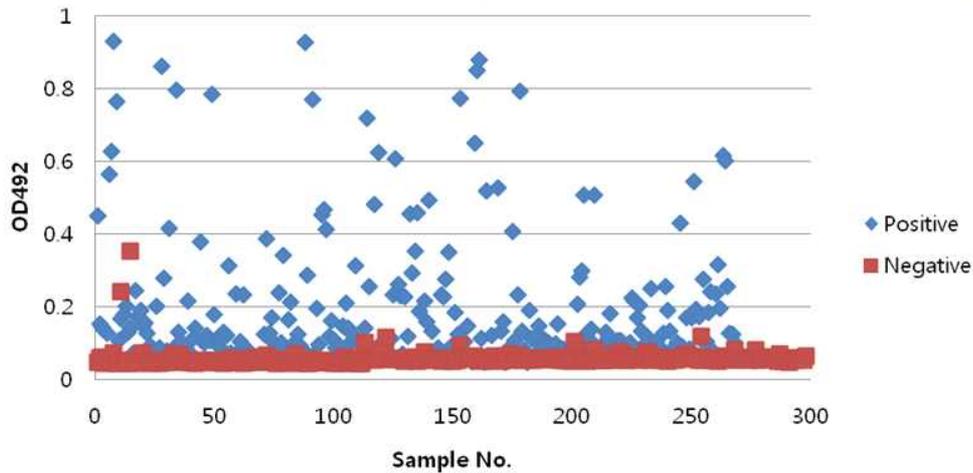


Fig. 49. 브루셀라 재조합 체항원단백질 조합을 이용한 ELISA법 적용. 재조합 고면역원성 항원 3종(Omp10, Omp19, Omp 28)을 조합 하여 브루셀라 음성 및 양성 혈청을 이용하여 농도 비율 ($\mu\text{g/ml}$) 3:3:3 의 항원농도 50 μl 을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, 각 비율 모두에서 TAT 100이상에서 유의적인 결과를 보임. Cutoff value 는 음성값 0.058의 두배인 0.116으로 설정함.

Table 16. Evaluation of diagnostic values of recombinant Omp10, Omp19 and Omp28 proteins based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

	TAT	ELISA	%	
(-)	298	294	98.66	specificity
(+)	268	177	66.04	sensitivity

사. 고면역원성 재조합 단백 대량생산기법 확립 및 이를 이용한 간이 진단기법 확립 (Latex bead agglutination)

1) pCold 및 pMal vector expression system을 이용한 브루셀라 재조합 단백질의 대량생산기법이 확립되었으며, 작제된 재조합 항원 중 우수한 ELISA를 보였던 2종의 항원 bfr 및 osmC 재조합 항원을 이용하여 간이 진단법의 응용을 수행하였다.

(1) bfr 및 osmC 재조합 항원을 조합 하여 브루셀라 음성(n=146) 및 양성(n=177) 혈청을 이용하여 비율 각각 (80 $\mu\text{g/ml}$) 의 항원농도로 1% Latex bead (Sigma)에 coating 시킨 후 50배 희석한 50 μl 의 혈청과 동량의 항원이 코팅된 latex bead를 실온에서 5분간 을 이용하여 응집반응을 수행한 결과, 각 비율 모두에서 TAT 100이상에서 응집이 발생하였으며, 결과적으로 음성 혈청보다 높은 응집 반응이 나타났음 (Fig. 50,

51). 결과적으로 bfr의 경우 TAT 음성 146개에서 128가 음성을 보여, 특이도가 87.66%를 나타냈고, TAT 양성 177개중 159개가 양성 반응을 보여 민감도가 89.8%를 보였고 (표 17), osmC의 경우 TAT 음성 146개에서 139가 음성을 보여, 특이도가 95.2%를 나타냈고, TAT 양성 177개중 161개가 양성 반응을 보여 민감도가 90.96%를 보였다 (표 17, 18).

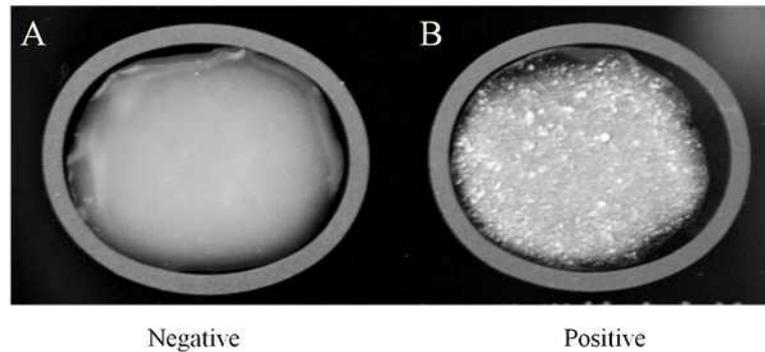


Fig. 50. 브루셀라 재조합 항원단백질 bfr을 이용한 간이진단법 적용. 대조합 bfr 항원을 이용하여 TAT 음성혈청(A)과 양성혈청(B)을 반응한 결과 양성혈청이 높은 응집을 보이는 것으로 판명됨

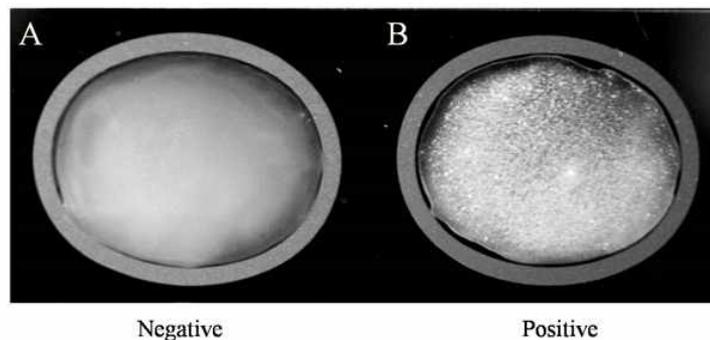


Fig. 51. 브루셀라 재조합 항원단백질 osmC을 이용한 간이진단법 적용. 재조합 osmC 항원을 이용하여 TAT 음성혈청(A)과 양성혈청(B)을 반응한 결과 양성혈청이 높은 응집을 보이는 것으로 판명됨

Table 17. Evaluation of diagnostic values of recombinant bfr proteins based latex agglutination test compared to a standard tube agglutination test (TAT)

	TAT	Latex bead agglutination	%	
(-)	146	128	87.66	specificity
(+)	177	159	89.8	sensitivity

Table 18. Evaluation of diagnostic values of recombinant osmC proteins based latex agglutination test compared to a standard tube agglutination test (TAT)

	TAT	Latex bead agglutination	%	
(-)	146	139	95.2	specificity
(+)	177	161	90.96	sensitivity

아. 고면역원성 재조합 단백을 이용한 간이 진단기법 확립 (Dip stick assay)

1) 작제된 재조합 항원 중 우수한 ELISA를 보였던 2종의 Omp 10과 Omp 28 재조합 항원을 이용하여 간이 진단법중 하나인 Dip stick assay의 응용을 수행함. 총 85개의 TAT 음성혈청과 40개의 음성 혈청을 이용하여 측정하였다. 측정결과 음성혈청은 특이적 밴드가 확인되지 않았으며(Fig. 52), 97% 이상의 특이 밴드가 확인되지 않았다 (Fig. 53, 표 19).



Fig. 52. 브루셀라 재조합 항원단백질 Omp10과 Omp28항원 을 이용한 간이진단법 Dip stick assay적용. 재조합 Omp10과 Omp28항원을 이용하여 TAT 음성혈청(A)을 이용한 결과 음성 혈청에서는 특이적 밴드가 확인되지 않았음

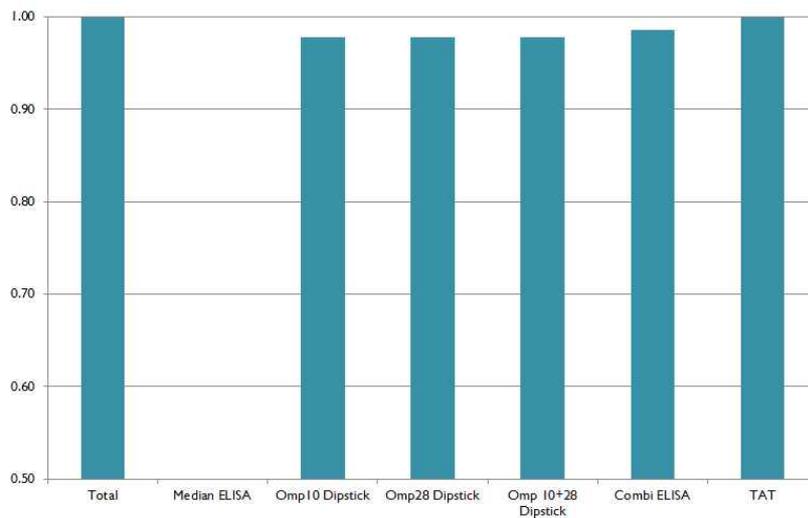


Fig. 53. 브루셀라 재조합 항원단백질 Omp10과 Omp28항원 을 이용한 간이진단법 Dip stick assay 적용. 재조합 Omp10과 Omp28항원을 이용하여 TAT 음성혈청 및 Omp 10과 28항원을 복합조성한 ELISA(Combi ELISA)을 측정된 결과 음성혈청에 대해서는 97% 이상의 혈청에서 음성 반응을 나타냄

Table 19. Evaluation of diagnostic values of recombinant Omp10 and Omp28 proteins based Dip stick assay compared to a standard tube agglutination test (TAT) and ELISA with Brucella negative serum

Total	Dipstick		ELISA		TAT negative
	rOmp10	rOmp28	Combi(rOmp 10 +28)	Combi(rOmp 10 +28)	
	83/85	83/85	83/85	294/298	85/85
	0.98	0.98	0.98	0.99	1.00

2) 작제된 재조합 항원 중 우수한 ELISA를 보였던 2종의 Omp 10과 Omp 28 재조합 항원을 이용하여 간이 진단법중 하나인 Dip stick assay의 응용을 수행함. 총 40개의 TAT 양성혈청을 이용하여 측정하였다. 측정결과 음성혈청은 특이적 밴드가 확인되었으며(Fig. 54), 70% 이상의 특이 밴드가 확인되었다 (Fig. 55, 표 20).

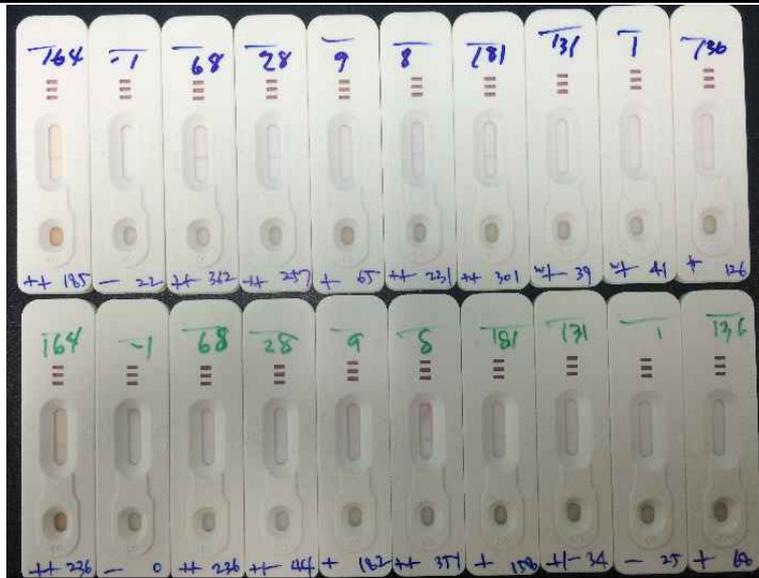


Fig. 54. 브루셀라 재조합 항원단백질 Omp10과 Omp28항원 을 이용한 간이진단법 Dip stick assay 적용. 재조합 Omp10과 Omp28항원을 이용하여 TAT 양성혈청(A)을 이용한 결과 음성 혈청에서는 특이적 밴드가 확인되었음

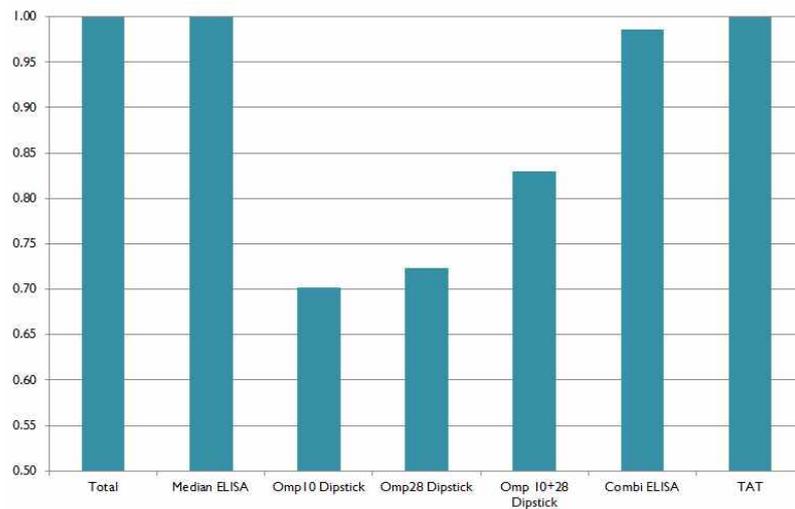


Fig. 55. 브루셀라 재조합 항원단백질 Omp10과 Omp28항원 을 이용한 간이진단법 Dip stick assay 적용. 재조합 Omp10과 Omp28항원을 이용하여 TAT 양성혈청 및 Omp 10과 28항원을 복합조성한 ELISA(Combi ELISA)을 측정된 결과 양성혈청에 대해서는 70% 이상의 혈청에서 양성 반응을 나타냄

Table 20. Evaluation of diagnostic values of recombinant Omp10 and Omp28 proteins based Dip stick assay compared to a standard tube agglutination test (TAT) and ELISA with Brucella positive serum

Total	Dipstick		ELISA		TAT positive
	rOmp10	rOmp28	Combi(rOmp 10 +28)	Combi(rOmp 10 +28)	

28/40	29/40	34/40	215/232	40/40
0.70	0.73	0.85	0.93	1.00

3) 작제된 재조합 항원 중 우수한 ELISA를 보였던 2종의 Omp 10과 Omp 28 재조합 항원을 이용하여 간이 진단법중 하나인 Sandwich Dip stick assay의 응용을 수행하였다. 총 85개의 TAT 음성혈청과 76개의 TAT 양성 혈청을 이용하여 측정해 본 결과 음성 혈청 모두에서 Sandwich Dip stick assay가 음성 반응을 보였으며, 양성혈청은 Gold reader cut off 50일 경우 약 72%이상을 보였고, Gold reader cut off 35일 때, 87%를 보였다 (Fig. 56, 표 21).

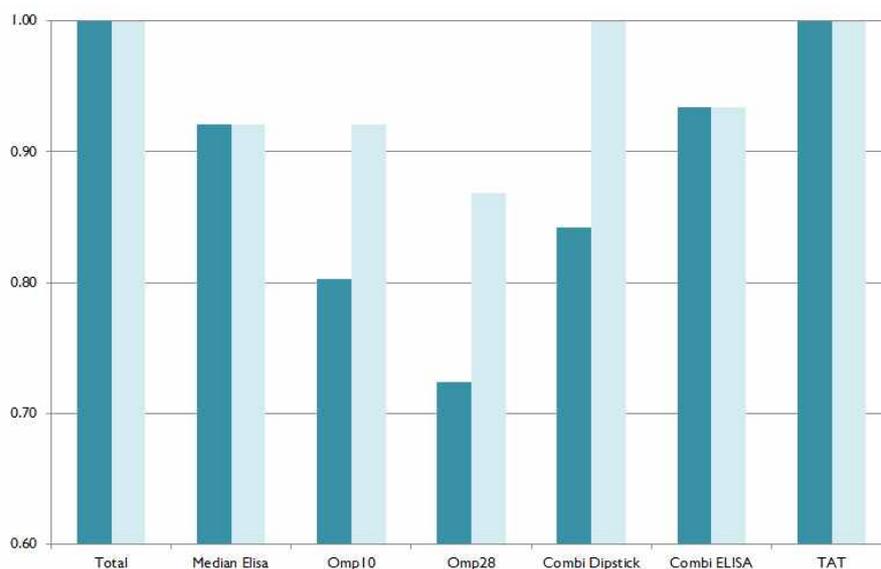


Fig. 56. 브루셀라 재조합 항원단백질 Omp10과 Omp28항원 을 이용한 간이진단법 Sandwich Dip stick assay 적용. 재조합 Omp10과 Omp28항원을 이용하여 76개의 TAT 양성혈청을 이용하여 Sandwich Dip stick assay를 수행한 결과, Dip stick assay방법보다 약간 우수한 양성반응이 35 cut off value에서 측정되었음 (진한색; 50, 연한색; 35, Gold reader cut off 값)

Table 21. Evaluation of diagnostic values of recombinant Omp10 and Omp28 proteins based Sandwich Dip stick assay compared to a standard tube agglutination test (TAT) and ELISA with Brucella positive serum

Gold Reader Cut Off	Total	Dipstick			ELISA	TAT
		Omp10	Omp28	Combi	Combi	
50		61/76	55/76	64/76	294/298	76/76
		0.80	0.72	0.84	0.99	1.00
35		70/76	66/76	76/76	294/298	76/76
		0.92	0.87	1.00	0.99	1.00

자. 브루셀라 감염우 양성혈청(골덴 스탠다드혈청) 및 감염시기별 감염우 혈청 확보: 몽골 국립 수의연구소 Erdenebaatar Janchivdorj 박사의 도움으로, 당 연구소 감염시설을 이용하여, 브루셀라 감염 실험을 수행하고, 감염시기별 혈청을 확보하여, 현재 수입검역중에 있음. 또한, 브루셀라 양성 혈청 (Fig. 57, 혈청검사 양성판정우로부터 균분리 혈청; 골덴스탠다드 혈청) 120샘플을 기여 받아, 검역중에 있으며, 본 연구결과로 얻어진 진단방법의 정확성을 높일 계획임. 특히 골덴스탠다드 혈청은 본 연구개발로 얻어진 진단 기법의 민감도 및 특이도 검사에 핵심적으로 사용할 중요한 샘플이기 때문에 본 연구개발의 산업화 및 국제특허 제출에 중요한 기여를 할 것임.

1) 브루셀라 감염 실험 우 및 감염시기별 혈청 항체가 분석



Fig. 57. 브루셀라 감염 실험 수행 및 감염시기별 항체가 측정 분석 (몽골)

자. 1세부과제 결과 종합

1). 숙주특이 브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴 (28 종)

브루셀라 균체항원단백질에 대한 숙주의 감염시기별 최적 항원반응성을 나타내는 고면역원성 항원을 28종 발굴 (계획: 5종 이상) 하였으며 이들의 유전자적 특성 및 면역원성을 평가하였다.

2). 실험동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원 발굴

브루셀라 감염 마우스로부터의 혈청에 대한 항원 반응성을 보이는 브루셀라 균체항원단백질은 감염초기(10일)에는 13개, 중기(30일)에는 24개, 말기(60일)에는 54개로 분석되었으며, 이들 중 감염초기의 1개, 중기의 3개, 말기의 8개는 비특이적 반응 및 *Y. enterocolitica* O:9 과의 교차반응을 보여 배제시켜야 할 항원으로 평가되었다. 또한 실험동물 감염시기별 고면역원성 항원의 복합 조합 설정을 통해 감염초기와 중기의 공통반응항원단백질은 1개, 감염초기와 말기는 5개, 감염중기와 말기는 8개로 나타났으며, 3가지

감염 시기 모두의 항원단백질은 인정되지 않았다. 따라서 비특이적 반응 및 교차반응을 배제시키고 감염시기별 높은 반응성을 가진 항원의 단위 및 복합 조합 설정을 통해 총 17개만이 실험동물 대상 감염 시기별 최적의 고면역원성 항원으로 평가되었다.

3). 목적동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원 발굴

브루셀라 감염 소로부터의 혈청에 대한 항원 반응성을 보이는 브루셀라 균체항원단백질은 감염초기(21일)에는 134개, 중기(49일)에는 110개, 말기(70일)에는 106개로 분석되었으며, 이들 중 13개의 비특이적 반응 및 13개의 *Y. enterocolitica* O:9 과의 교차반응이 나타나면서 배제시켜야 할 항원으로 평가되었다. 또한 목적동물 감염시기별 고면역원성 항원의 복합 조합 설정을 통해 감염초기와 중기의 공통반응 항원단백질은 19개, 감염초기와 말기는 10개, 감염중기와 말기는 4개로 나타났으며, 3가지 감염시기의 공통항원단백질은 74개로 평가되었다. 따라서 비특이적 반응 및 교차반응을 배제시키고 감염시기별 높은 반응성을 가진 항원의 단위 및 복합 조합 설정을 통해 총 55개만이 목적동물 대상 감염 시기별 최적의 고면역원성 항원으로 평가되었다.

4). 실험동물과 목적동물의 고면역원성 항원의 최적 항원성 비교분석

브루셀라 균체항원단백질에 대한 숙주의 감염시기별 고면역원성 반응을 보인 최적 항원단백질은 실험동물(마우스)에서는 17개, 목적동물(소)에서는 55개로 평가되었다. 종합적으로 감염시기별 항원에 대해 실험동물(마우스)보다 목적동물(소)에서 더 높은 항원반응성(2.9배)을 나타내는 것으로 비교 평가되었으며, 이러한 결과는 *Brucella abortus*의 소에 대한 높은 숙주특이성으로 인해 기인된 것으로 판단된다. 실험동물(마우스) 감염시기별 최적 항원단백질들은 protein biosynthesis, proteolysis, metabolism, transcription 등에 관여하는 기능을 가진 단백질로 동정되었으며 일부는 아직 기능이 잘 밝혀지지 않은 putative uncharacterized protein으로 동정되어 앞으로 더 구체적인 기능규명연구가 요구된다고 판단된다. 비특이반응 및 교차반응을 모두 배제시킨 목적동물(소)과 실험동물(마우스)의 전체 반응성 공통항원단백질은 12개로 비교 평가되었으며 이 중 감염시기별 고면역원성 최적 항원 반응으로 선별된 3개의 단백질(aldehyde dehydrogenase, malate dehydrogenase, superoxide dismutase, Cu-Zn)이 가장 진단적 가치 및 백신으로의 활용가치가 높을 것이라 판단된다.

5). 고면역원성 재조합 항원 28종 작제 및 면역원성 확인

브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴: 제 1차년도에 수행된 고면역원성 항원 (9종)에 더하여 2차년도에 고면역원성 항원 19종 (Omp10, Omp19, Omp28, bfr, 0628 (Metal-dependent hydrolase), msrA, rocF, pgk, mdh (malate dehydrogenase), tsf, OsmC, ndk, asp, dps, YaeC, InPB, aspC, hypothetical protein, LivF, ndk 및 tpbA)을 발굴하여 총 28종에 대한 브루셀라 균의 고면역원성 재조합항원이 생산되었으며, 각 항원에 대한 면역 반응을 분석하여, 특이적인 면역반응이 나타나는 것을 확인되었다.

6). 숙주특이 고면역원성 재조합 항원의 세포독성 분석

브루셀라 고면역원성 균체항원 발굴: 제 1차년도에 수행된 고면역원성 항원 (9종)에 더하여 2차년도에 고면역원성 항원 19종을 발굴하여 총 28종에 대한 브루셀라 균의 고면역원성 재조합항원에 대한 세포 독성 평가 결과, 대부분이 세포독성이 없는 것으로 평가 됐다

나, rocF, mdh 및 tsf 재조합단백의 경우 비교적 낮은 농도에서 (15 mg/ml) 독성이 인정되었음.

7). 고면역원성 재조합 항원을 이용한 ELISA 법 확립

각각의 재조합 항원을 이용하여, ELISA법을 수행해 TAT 결과와 비교해 본 결과, bfr, omp10, omp19, omp28 및 osmC에서 약 90% 이상의 민감도와 특이도를 보였고, 그 이외의 단백질은 반응성이 낮거나 민감도 특이도가 70% 미만에 그쳐, 위 5가지의 항원을 이용한 ELISA 방법 구축이 필요할 것으로 판단된다.

8). 고면역원성 재조합 항원의 최적 조합 설정

각각의 재조합 항원을 이용하여, ELISA법을 수행해 TAT 결과와 비교하여, 우수한 결과를 도출한, bfr, omp10, omp19, omp28 및 osmC 5종의 조합을 수행해 본 결과, omp10, omp19, omp28항원의 경우 단일 항원의 사용에 비하여 조합을 하였을 때 민감도와 특이도가 95% 이상 증가되었으며, bfr 및 osmC는 단일 항원의 사용보다 낮은 민감도 (80% 미만)을 보여 단일 항원을 이용한 ELISA방법 개발에 적합 할 것으로 판단된다.

9). 고면역원성 재조합 항원 대량생산 및 이를 이용한 간이 진단법 확립

재조합 항원 대량생산을 위해 pCold 및 pMal vector expression system을 이용한 대량생산기법이 확립되었음, 또한 이들 항원을 이용해 ELISA법을 수행해 TAT 결과와 비교해 우수한 결과를 도출한 bfr과 osmC재조합 항원을 이용하여 간이진단법 (Latex bead agglutination방법)을 수행 해 본 결과, bfr의 경우 특이도가 87.66%를 나타냈고, 민감도가 89.8%를 보였고, osmC의 경우 특이도가 95.2%를 나타냈고, 민감도가 90.96%를 보여, 간이 진단기법의 개발이 가능할 것으로 판단 되었다. 또한, omp10, omp19, omp28항원을 이용한 Dip stick assay를 수행해본 결과 TAT와 비교하였을 때, TAT 음성혈청은 Dip stick assay 및 Sandwich Dip stick assay에서 음성을 보인 반면 TAT 양성 혈청은 rOmp 항원 조합을 이용한 ELISA에 비하여 특이도가 낮았지만, 현장 활용이 가능할 것으로 판단된다.

10). 개발된 진단방법의 경제성 평가 및 사업화 전략수립

현재 브루셀라균 항원을 이용한 ELISA 방법은 유럽의 스바노바사 제품이 주요 진단키트로 상용화 되어있으며, 96 sample 적용 기준 약 900\$ 정도에 판매가 되고 있으나, 본 연구과제를 통해 개발된 ELISA 진단기법의 경우 참여업체인 (주) 메디안 디노스틱과 평가를 해본 결과 96 sample 적용 기준 400\$ 내외로 시장 공급이 가능할 것으로 평가되고 있으나, 이에 대한 구체적인 경제성 평가는 국내는 물론 전 세계적인 브루셀라 발생 상황, 판매 수요량 등에 따라 변화가 있을 것으로 판단되어져, 현 시점에서 확정하기는 다소 어려울 것으로 판단되며 보다 면밀한 분석이 요구된다. 또한, 사업화를 위하여 본 과제를 통해 얻어진 결과를 추후 농림축산검역검사본부 및 시도 가축위생시험소와의 연구결과 협의를 통해 현행진단방법 (로즈벵갈 및 TAT)과 본 과제에서 개발된 진단키트 (ELISA, dip stick) 방법을 병행하여 민감도 및 특이도에 대한 데이터를 확보하고 사업화를 위한 토대를 구축한다..

2. 제1협동과제 결과

가. 실험동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가

- 고면역원성 항원 6 종 (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, 및 SodC)은 제 1 세부과제 연구팀으로부터 제공받아 실험을 진행하였다.
- 추가적으로 고면역원성 항원 3 종 (Omp31, Omp2a, LivF)은 제 1 세부 과제 연구팀으로부터 제공 받아 실험을 진행하였다.

(1) 고면역원성 항원에 대한 mouse 유래 macrophage cell line의 cytokine 생성 여부

1) 고면역원성 항원의 농도 확인

- 고면역원성 항원들의 농도를 BCA protein assay kit (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 측정 한 뒤에 각각의 실험에 사용하였으며, 정제된 고면역원성 항원의 농도는 아래와 같다 (Table 22).

Table 22. BCA protein assay로 측정 한 고면역원성 단백질 농도

	Omp10	Omp19	Omp28	OmpA	Omp2b	SodC	MBP
농도 (mg/mL)	0.23553	0.312693	1.608749	0.419897	1.228436	2.053448	0.569634

2) 고면역원성 항원을 이용한 감염우 혈청반응 기준 확립

- 6종의 고면역원성 항원과 야외가검혈청과의 반응을 측정하기 위한 기준을 확립하고자 ELISA 기법을 이용하였다.
- 야외가검 양성 혈청 및 음성 혈청은 1/100의 희석 배율로 희석하여 고면역원성 항원과의 반응을 유도하였으며 그 결과 야외가검 양성 혈청과의 반응에 있어서 Omp28과 OmpA의 반응성이 확연하게 증가되었으며 다른 4종의 고면역원성 항원들의 반응성은 낮은 것을 확인하였다 (Fig. 58).

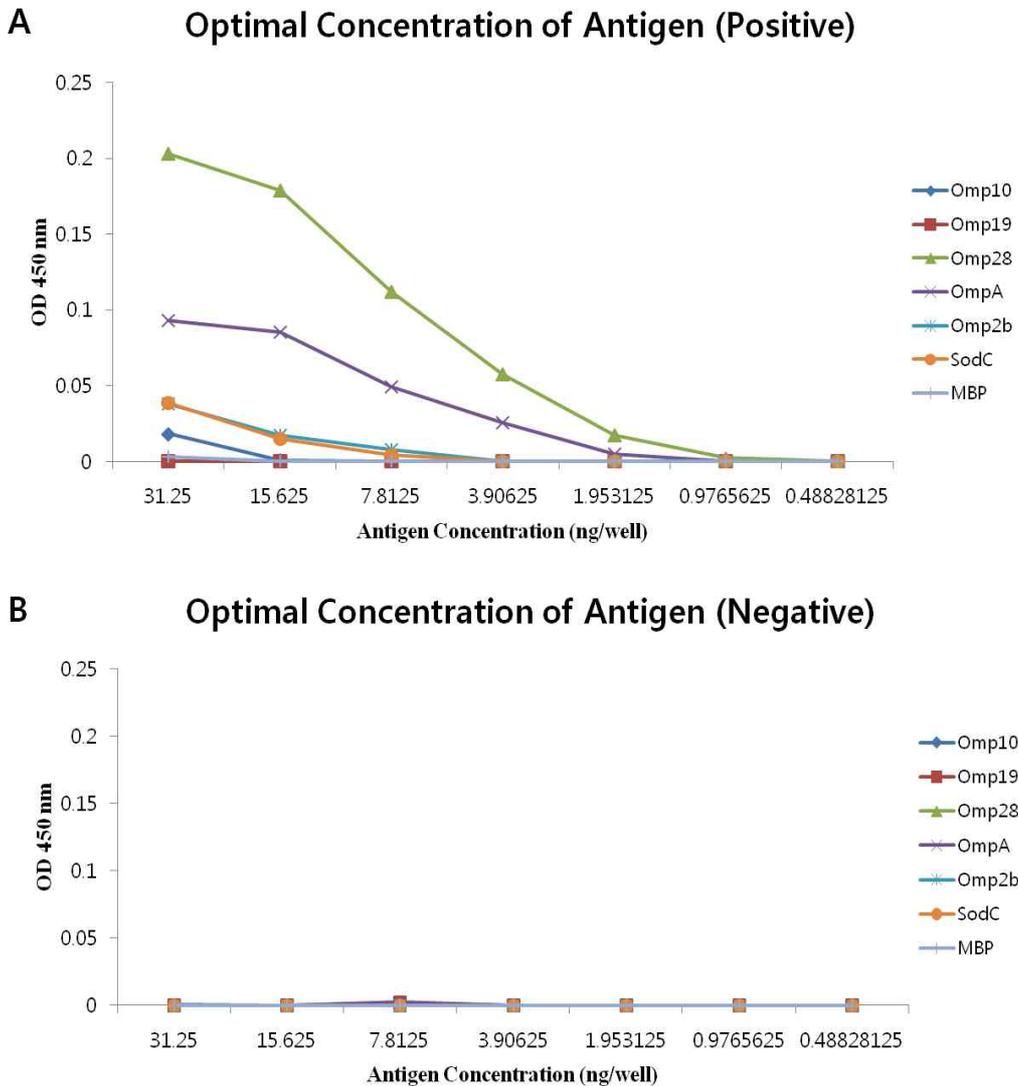


Fig. 58. 항원 농도에 따른 야외 감염우 (A) 양성 혈청 및 (B) 음성 혈청 반응

3) 세포주를 이용한 고면역원성 항원의 면역활성능력 평가

- 고면역원성 항원이 세포주에 유발하는 면역활성능력을 평가하기 위한 기본 연구로서, 세포주가 고면역원성 항원에 노출되었을 시 유발되는 유전자 및 cytokines의 변화지표를 선정하기 위하여 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell에 국내 야외 분리주인 *B. abortus* 1119-3을 감염 시킨 후 세포주의 면역 및 방어 관련 유전자의 초기발현여부를 microarray 기법을 이용하여 분석하였다.
- RAW 264.7 cell의 정상 유전자 발현량과 비교하여 *B. abortus* 1119-3 감염 시 발현이 증가한 유전자는 147 종, 감소한 유전자는 36종이었다. (Fig. 59)

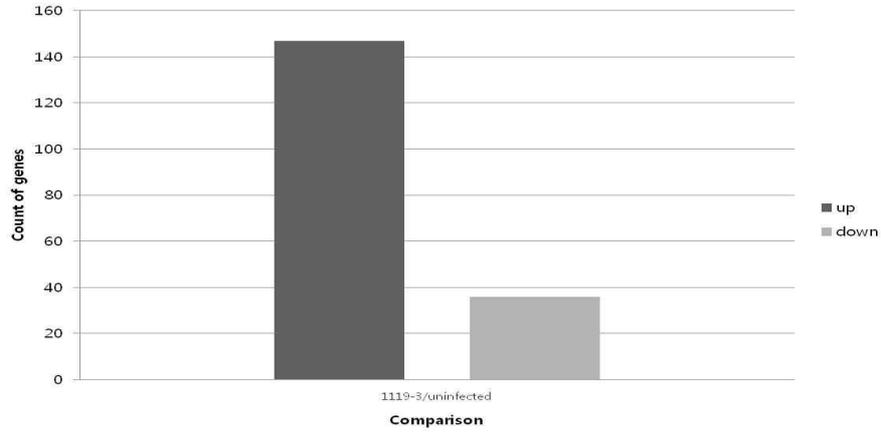


Fig. 59. RAW 264.7 cell에서 *B. abortus* 1119-3 감염 후 발현 증가 및 감소 유전자 현황

- RAW 264.7에 *B. abortus* 1119-3 감염 시 증가한 유전자를 기능적으로 분류한 결과 중 Immunity and defense와 관련 유전자는 40종, Apoptosis 관련 유전자는 18종으로 확인되었다 (Fig. 60).

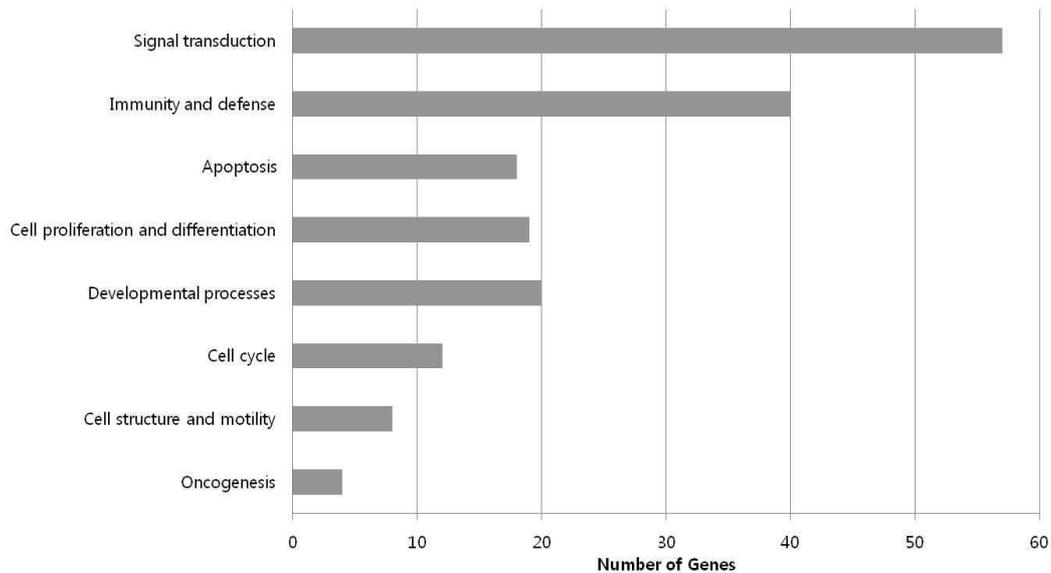


Fig. 60. RAW 264.7 cell에서 *B. abortus* 1119-3 감염 후 발현이 증가된 유전자 현황

- RAW 264.7에 *B. abortus* 1119-3 감염 시 감소한 유전자를 기능적으로 분류한 결과 중 Immunity and defense와 관련 유전자 2종, Apoptosis와 관련 유전자는 2종으로 확인되었다 (Fig. 61).

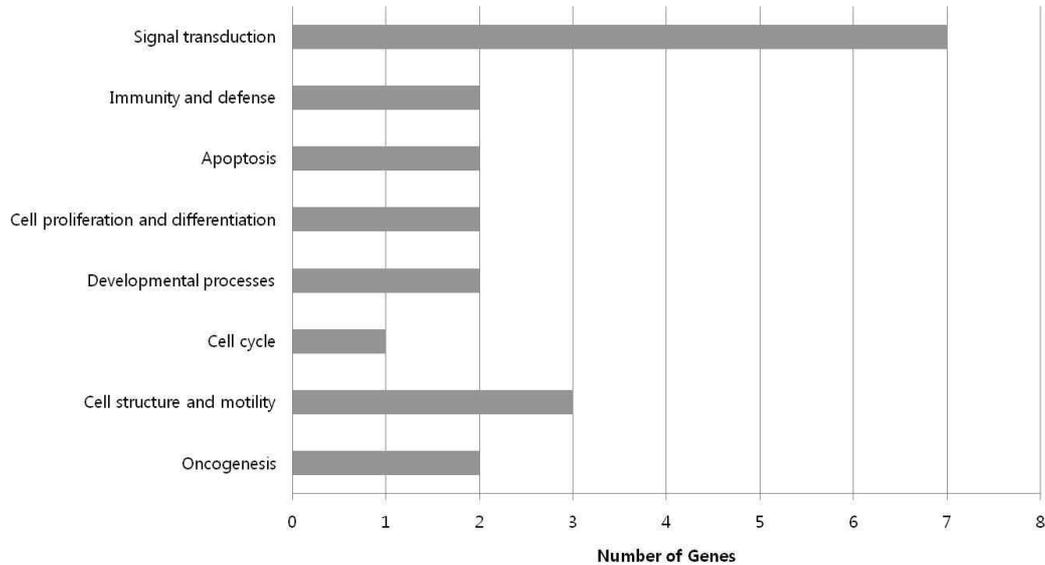


Fig. 61. RAW 264.7 cell에서 *B. abortus* 1119-3 감염 후 발현이 감소된 유전자 현황

- Microarray 분석 결과를 바탕으로, immunity and defense 관련 유전자는 40종, apoptosis 관련 유전자는 18종의 발현이 증가 되었다. 반면에, immunity and defense 관련 유전자는 2종, apoptosis 관련 유전자는 2 종의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 이 결과 및 기존연구결과를 바탕으로 IL-1 β , IL-4, IL-6, INF- γ , TNF- α , Bax, Bcl2, 그리고 TLR4 등의 유전자 발현 정도를 소 PMBC를 이용하여 분석하였다.
- RAW 264.7 cell에 *B. abortus* 1119-3 감염 후 induction of apoptosis 관련 유전자 10종 그리고 inhibition of apoptosis 관련 유전자 8종으로 총 18종의 apoptosis 관련 유전자들이 증가됨을 확인하였다 (Table 23).

Table 23. RAW 264.7 cell에서 *B. abortus* 1119-3 감염 후 apoptosis 관련 유전자 발현 증가 현황

Probe set	Asccsion no.	Fold increase	Gene symbol	Description
Induction of apoptosis				
ILMN_2899863	NM_013693.1	13.00	Tnf	Tumor necrosis factor (Tnf)
ILMN_1230586	NM_009421.3	9.40	Traf1	Tnf receptor-associated factor 1 (Traf1)
ILMN_3137287	NM_001039537.1	3.81	Lif	Leukemia inhibitory factor (Lif), transcript variant 2
ILMN_2902979	NM_007987.1	3.03	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6) (Fas)
ILMN_3137291	NM_001039537.1	2.76	Lif	Leukemia inhibitory factor (Lif),

				transcript variant 2
ILMN_2619408	NM_007498.2	2.36	Atf3	Activating transcription factor 3 (Atf3)
ILMN_1237471	NM_145827.3	1.81	Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3 (Nlrp3)
ILMN_2629297	NM_145827.1	1.81	Cias1	
ILMN_2634970	NM_138952.3	1.62	Ripk2	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2 (Ripk2)
ILMN_2702208	NM_145857.2	1.56	Nod2	Nucleotide-binding domain oligomerization domain containing 2 (Nod2)
Inhibition of apoptosis				
ILMN_3137287	NM_001039537.1	3.81	Lif	Leukemia inhibitory factor (Lif), transcript variant 2
ILMN_2718330	NM_009895.3	3.55	Cish	Cytokine inducible SH2-containing protein (Cish)
ILMN_2618176	NM_007707.2	2.45	Socs3	Suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3)
ILMN_1246841	NM_009046.2	2.23	Relb	Avian reticuloendotheliosis viral(v-rel) oncogene related B (Relb)
ILMN_2936165	NM_007535.2	2.04	Bcl2a1c	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1c (Bcl2a1c)
ILMN_3006505	NM_007536.2	2.02	Bcl2a1d	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d (Bcl2a1d)
ILMN_2592476	NM_008689.2	1.63	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105 (Nfkb1)
ILMN_2659408	NM_009044.2	1.51	Rel	Reticuloendotheliosis oncogene (Rel)

- 반면에, apoptosis 관련 유전자들 중 inhibition of apoptosis에 관여하는 유전자 2 종은 *B. abortus* 1119-3 감염 후 발현량이 감소됨을 확인하였다 (Table 24).

Table 24. RAW 264.7 cell에서 *B. abortus* 1119-3 감염 후 apoptosis 관련 유전자 발현 감소 현황

Probe set	Asccsion no.	Fold increase	Gene symbol	Description
Inhibition of apoptosis				
ILMN_2826881	NM_008652.2	-1.55	Mybl2	myeloblastosis oncogene-like 2 (Mybl2)
ILMN_2659160	NM_001077696.1	-1.61	Hdac5	histone deacetylase 5 (Hdac5), transcript variant 1

- RAW 264.7에 *B. abortus* 1119-3 감염 후 immunity and defense와 관련된 유전

자 40종이 증가됨을 확인하였다 (Table 25).

Table 25. RAW 264.7 cell에서 *B. abortus* 1119-3 감염 후 immunity and defense 관련 유전자 발현 증가 현황

Probe set	Asccsion no.	Fold increase	Gene symbol	Description
B-cell and antibody-mediated immunity				
ILMN_3115796	NM_170702.2	3.96	Cd40	CD40 antigen (Cd40), transcript variant 5
ILMN_2682566	NM_001039701.2	3.02	Il1rn	Interleukin 1 receptor antagonist (Il1rn), transcript variant 2
ILMN_2896601	NM_010493.2	2.67	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1 (Icam1)
ILMN_1258283	NM_008518.1	2.50	Ltb	Lymphotoxin B (Ltb)
ILMN_1246841	NM_009046.2	2.23	Relb	Avian reticuloendotheliosis viral(v-rel) oncogene related B (Relb)
Cytokine/chemokine mediated immunity				
ILMN_2771176	NM_013654	4.51	Ccl7	
ILMN_1245710	NM_011333.3	4.01	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2)
ILMN_2718330	NM_009895.3	3.55	Cish	Cytokine inducible SH2-containing protein (Cish), .
ILMN_2777498	NM_008361	3.47	Il1b	
ILMN_1224472	NM_013652.2	3.44	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4 (Ccl4)
ILMN_1258283	NM_008518.1	2.50	Ltb	Lymphotoxin B (Ltb)
ILMN_2485839	NM_011610.3	2.48	Tnfrsf1b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b (Tnfrsf1b)
ILMN_2841290	NM_009396.1	2.32	Tnfaip2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 (Tnfaip2)
ILMN_3142803	NM_021274.1	2.23	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10)
Granulocyte-mediated immunity				
ILMN_2811154	NM_009140.2	57.86	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2)
ILMN_2778289	NM_009140	7.07	Cxcl2	
ILMN_2752624	NM_017466.4	3.62	Ccr12	Chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (Ccr12), .
Interferon-mediated immunity				
ILMN_3142803	NM_021274.1	2.23	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10)
Macrophage-mediated immunity				
ILMN_2811154	NM_009140.2	57.86	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2)
ILMN_2718330	NM_009895.3	3.55	Cish	Cytokine inducible SH2-containing protein (Cish), .
ILMN_2777498	NM_008361	3.47	Il1b	
ILMN_1215209	NM_019948.1	2.71	Clecsf9	
ILMN_1258283	NM_008518.1	2.50	Ltb	Lymphotoxin B (Ltb)

ILMN_2841290	NM_009396.1	2.32	Tnfaip2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 (Tnfaip2)
ILMN_1216972	NM_019948.2	2.31	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e (Clec4e),
ILMN_3142803	NM_021274.1	2.23	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10)
Natural killer cell mediated immunity				
ILMN_1258283	NM_008518.1	2.50	Ltb	Lymphotoxin B (Ltb),
Other immune and defense				
ILMN_1215209	NM_019948.1	2.71	Clecsf9	
ILMN_2841290	NM_009396.1	2.32	Tnfaip2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 (Tnfaip2)
ILMN_1216972	NM_019948.2	2.31	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e (Clec4e),
ILMN_3142803	NM_021274.1	2.23	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10)
Stress response				
ILMN_1216764	NM_133662.2	6.79	Ier3	Immediate early response 3 (Ier3)
ILMN_3137287	NM_001039537.1	3.81	Lif	Leukemia inhibitory factor (Lif), transcript variant 2
ILMN_3001914	NM_010907.1	3.61	Nfkbia	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (Nfkbia)
ILMN_2742152	NM_007836.1	2.64	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha (Gadd45a)
ILMN_2900653	NM_008655.1	2.22	Gadd45b	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta (Gadd45b)
T-cell mediated immunity				
ILMN_2811154	NM_009140.2	57.86	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2)
ILMN_3115796	NM_170702.2	3.96	Cd40	CD40 antigen (Cd40), transcript variant 5
ILMN_1258283	NM_008518.1	2.50	Ltb	Lymphotoxin B (Ltb)
ILMN_1246841	NM_009046.2	2.23	Relb	Avian reticuloendotheliosis viral(v-rel) oncogene related B (Relb)

- 반면에, *B. abortus* 1119-3 감염 후 2종의 immunity and defense 관련 유전자들이 감소됨을 확인하였다 (Table 26).

Table 26. RAW 264.7 cell에서 *B. abortus* 1119-3 감염 후 immunity and defense 관련 유전자 발현 감소 현황

Probe set	Asccsion no.	Fold increase	Gene symbol	Description
Cytokine/chemokine mediated immunity				
ILMN_2630459	NM_009911.2	-2.21	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (Cxcr4),
T-cell mediated immunity				
ILMN_2648455	NM_198429.1	-1.62	Nfatc1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (Nfatc1), transcript variant 2,

4) 고면역원성 항원에 대한 RAW 264.7 cell의 cytokine 발현 분석

- 고면역원성 항원에 대한 macrophage의 면역 반응을 확인하기 위해 mouse macrophage cell line (RAW 264.7 cell)을 1×10^5 cell/mL 로 배양하여 고면역원성 항원 6개와 대조군으로 MBP를 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 감작한 후 1, 2, 6, 12, 24, 그리고 48시간 후 상층액을 채취하여 TNF- α 의 발현정도를 quantitative ELISA kit (eBioscience, USA) 사용하여 측정하였다.
- Mouse RAW 264.7 cell을 이용하여 TNF- α 자극 실험을 실시한 결과, 각각의 고면역원성 항원의 모든 농도에서 자극 후 24시간 이후부터 TNF- α 의 생성이 증가함을 확인하였다 (Fig. 62).

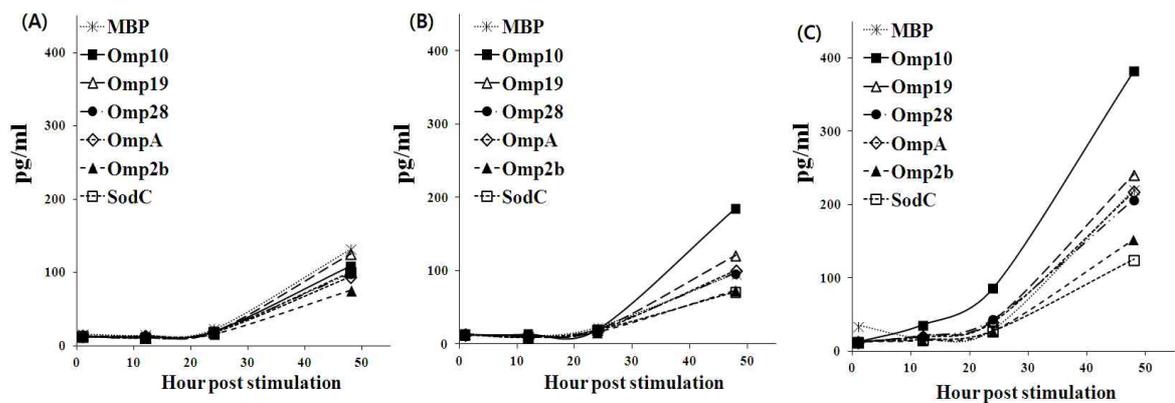


Fig. 62. *B. abortus* 고면역원성 항원으로 Mouse RAW 264.7 cell에 농도별 자극 후 생성된 TNF- α 농도 (A) 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (B) 1 $\mu\text{g/mL}$ (C) 10 $\mu\text{g/mL}$

- 특히, 고면역원성 항원 자극 후 48시간 때 항원자극량 1 $\mu\text{g/mL}$ 와 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 Omp10이 MBP보다 TNF- α 생성량이 유의적으로 높음을 확인하였다 (Fig. 63).

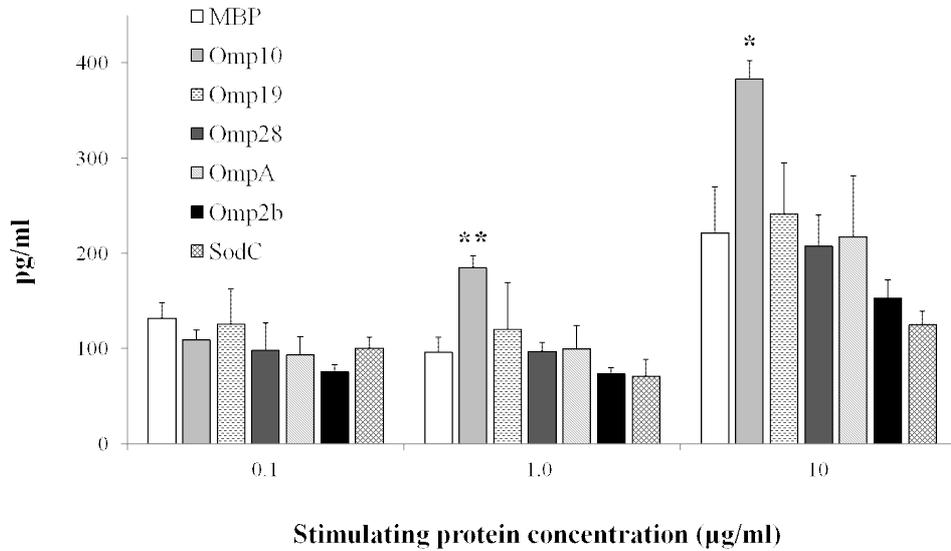


Fig. 63. RAW 264.7 cell에 *B. abortus* 고면역원성 항원으로 농도별 자극 후 48시간에서 TNF- α 생성 농도 비교 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- 48시간째에 MBP의 항원에 비해 높은 수준의 TNF- α 생성 수준을 보인 1.0 μ g/mL 및 10 μ g/mL의 항원 농도를 바탕으로 고면역원성 항원의 감작에 따른 IL-1 β , IL-4, IL-6, 그리고 INF- γ 등과 같은 cytokines에 대한 발현량을 분석하였다.

(2) 고면역원성 항원에 대한 실험동물 (mouse)의 면역반응 평가

1) 고면역원성 항원을 투여한 마우스의 항체 생성 정도 측정

- 실험동물에서 고면원성 항원에 대한 항체 생성능을 확인하기 위하여 mouse (BALB/C)를 각각 non treatment군 (n=5), PBS 투여군 (n=20), 고면역원성 항원 복강 접종군 (각각 20마리 * 6 그룹 총 120마리)으로 분류하여 각각의 항원을 50 μ g/mouse의 농도로 14 일 간격으로 두 차례 복강 접종한 후 3, 7, 14, 및 28 일째 각각의 실험군 (5마리)에서 혈청을 분리하였다 (서울대학교 실험동물위원회 승인번호: SNU-121129-4-1).
- 각각의 실험군으로부터 얻어진 혈청을 이용하여 ELISA 방법을 이용, 항체 (IgG와 IgM) 형성능을 측정하였으며 ELISA 조건은 아래와 같다.

- 고면역원성 항원: 5 ng/well in 100 μ l coating buffer
- 1st Ab (mouse serum sample): 1/200

- 2nd Ab (Goat anti-mouse IgG HRP conjugated, Jackson lab): 1/2000

가) Omp10

- Omp10에 대한 IgM 생성 반응은 접종 직후 증가하여 7 일 차에 최고값을 나타내고 점차 감소하여 14 일 이후 평형을 이루며 IgG의 생성 반응은 접종 후 3 일 이후부터 점차적으로 증가하였다 (Fig. 64).

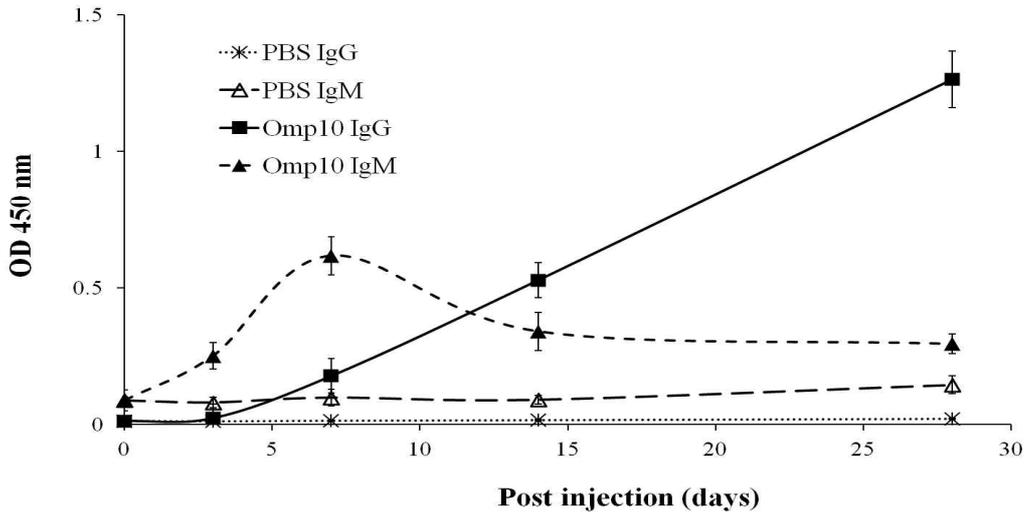


Fig. 64. Omp10의 마우스 접종 후 마우스 혈청 내 항원 특이 IgM과 IgG의 변화

나) Omp19

- Omp19에 대한 IgM 생성 반응은 접종 직후 증가하여 7 일 차에 최고값을 나타내었으나 다른 항원 단백질의 반응에 비해 가장 낮은 OD 값 (0.5 이하)을 보였으며, 이후 감소하여 평형을 이룬 OD값과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. IgG의 생성 반응은 접종 후 7 일 이후부터 일정하게 증가하였다 (Fig. 65).

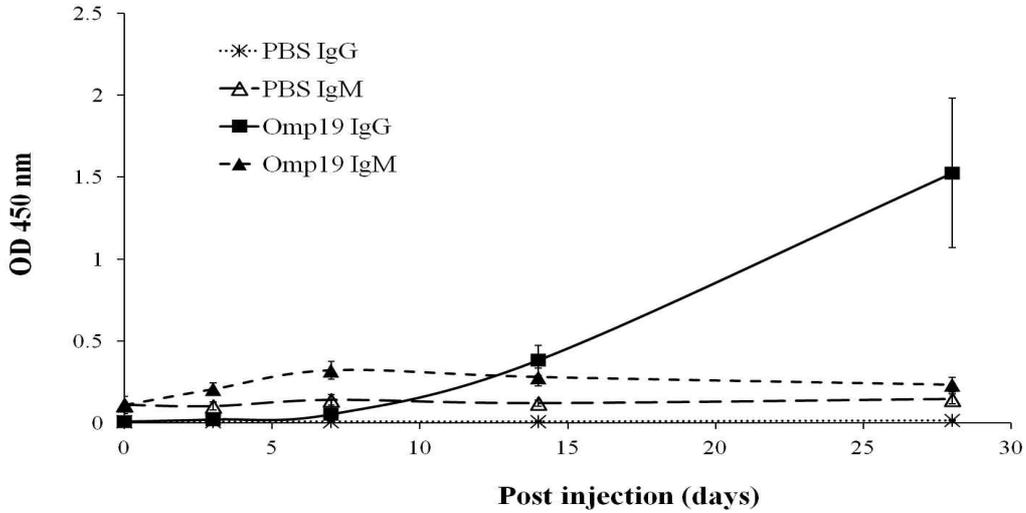


Fig. 65. Omp19의 마우스 접종 후 마우스 혈청 내 항원 특이 IgM과 IgG의 변화

다) Omp28

- Omp28에 대한 IgM 생성 반응은 접종 3 일째 증가하여 7 일 차에 최고값을 나타내고 점차 감소하여 14 일 이후 OD값이 평형을 이루었으며 IgG의 생성 반응은 접종 후 3 일 이후부터 점차 증가하였고, 다른 고면역원성 항원에 비해 가장 높은 OD값 (2 이상)을 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 66).

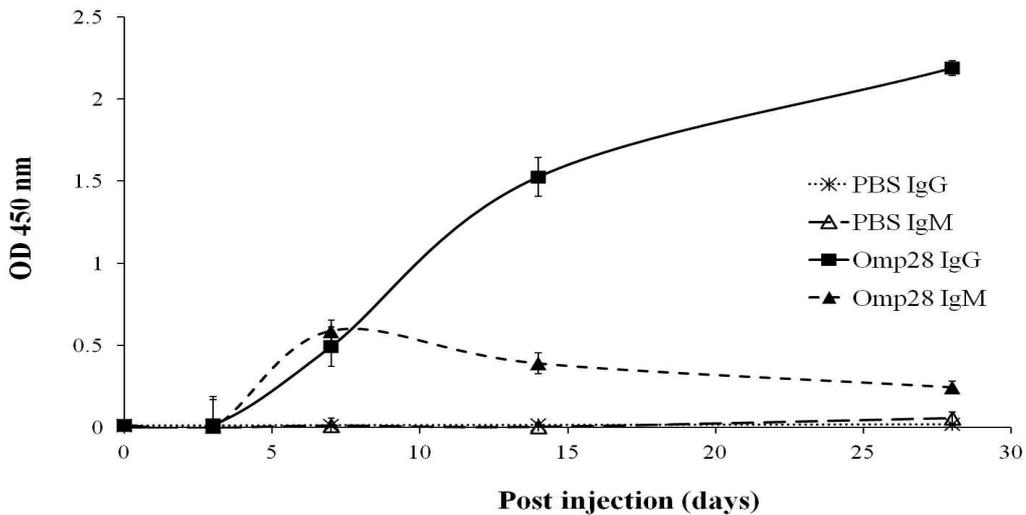


Fig. 66. Omp28의 마우스 접종 후 마우스 혈청 내 항원 특이 IgM과 IgG의 변화

라) OmpA

- OmpA에 대한 IgM 생성 반응은 접종 3일 차에 최고값을 나타내고 점차 감소하여 14일 이후 OD값이 평형을 이루었으며 IgG의 생성 반응은 접종 후 3 일부터 일정

하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 67).

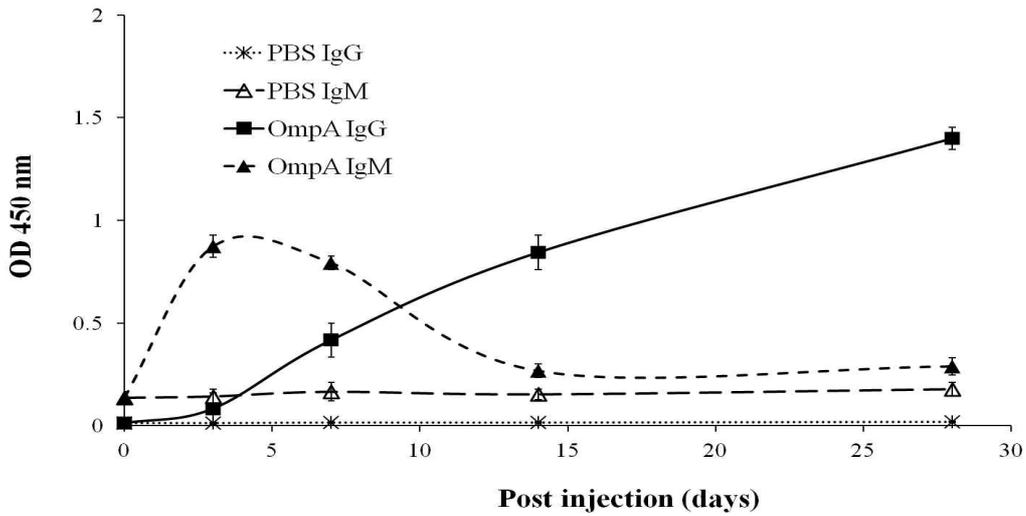


Fig. 67. OmpA의 마우스 접종 후 마우스 혈청 내 항원 특이 IgM과 IgG의 변화

마) Omp2b

- Omp2b에 대한 IgM 생성 반응은 접종 3일 차부터 다른 고면역원성 항원에 비해 높은 수치의 생성이 관찰되었고 7 일 차에 최고값을 나타내었으며 다른 항원 단백질의 반응에 비해 가장 높은 OD값 (1.3)을 보인 후 점차 감소하여 14 일 이후 OD 값이 평형을 이루었다. IgG의 생성 반응은 접종 후 3 일부터 관찰되기 시작하여, 14 일 2 차 접종 전까지 급격히 증가함이 관찰되었다. 이후 IgG의 상승률이 감소함을 확인하였다 (Fig. 68).

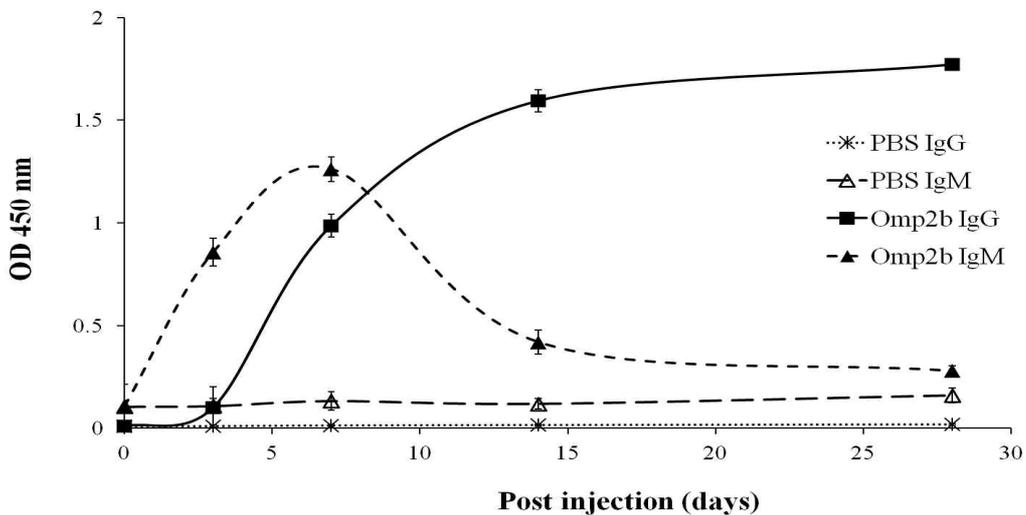


Fig. 68. Omp2b의 마우스 접종 후 마우스 혈청 내 항원 특이 IgM과 IgG의 변화

바) SodC

- SodC에 대한 IgM 생성 반응은 접종 직후부터 증가하여 7 일 차에 최고값을 나타내고 점차 감소하여 14 일 이후 OD값이 평형을 이루었으며 IgG의 생성 반응은 접종 후 3 일부터 점진적으로 증가하여 14 일 2차 접종 이후 28일까지 상승곡선 기울기가 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 69).

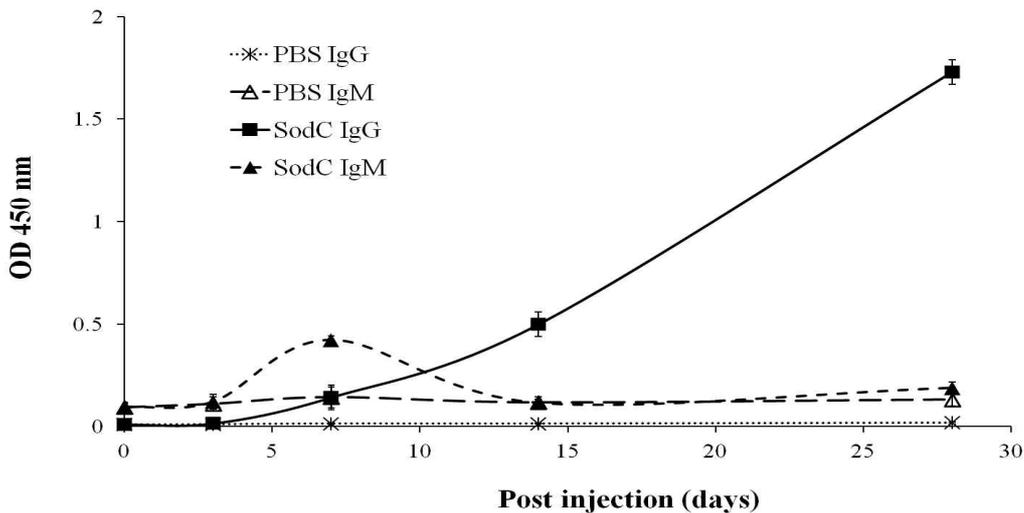


Fig. 69. SodC의 마우스 접종 후 마우스 혈청 내 항원 특이 IgM과 IgG의 변화

- 각각의 고면역원성 항원 투여 전의 혈청에서는 대조군과 실험군 모두 해당 고면역원 항원에 대한 IgG와 IgM이 매우 낮았으나 1 차 접종 후 7 일 까지 IgM의 상승이 관찰되었으며 이후 감소하기 시작하여 14 일 후에는 모든 고면역원성 항원 접종 그룹에서 IgM의 발현양이 낮게 유지됨을 확인하였다 (Fig. 70).
- IgG는 5 일 이후 지속적으로 상승하여 2 차 boosting 접종 이후, 각각의 고면역원성 항원 대한 IgG가 지속적으로 상승하는 것이 관찰되었으며 이를 통하여 *B. abortus* 고면역원성 항원 6종 모두 실험동물에 접종 시 충분한 항원성을 나타낼 수 있음을 확인하였다 (Fig. 70).

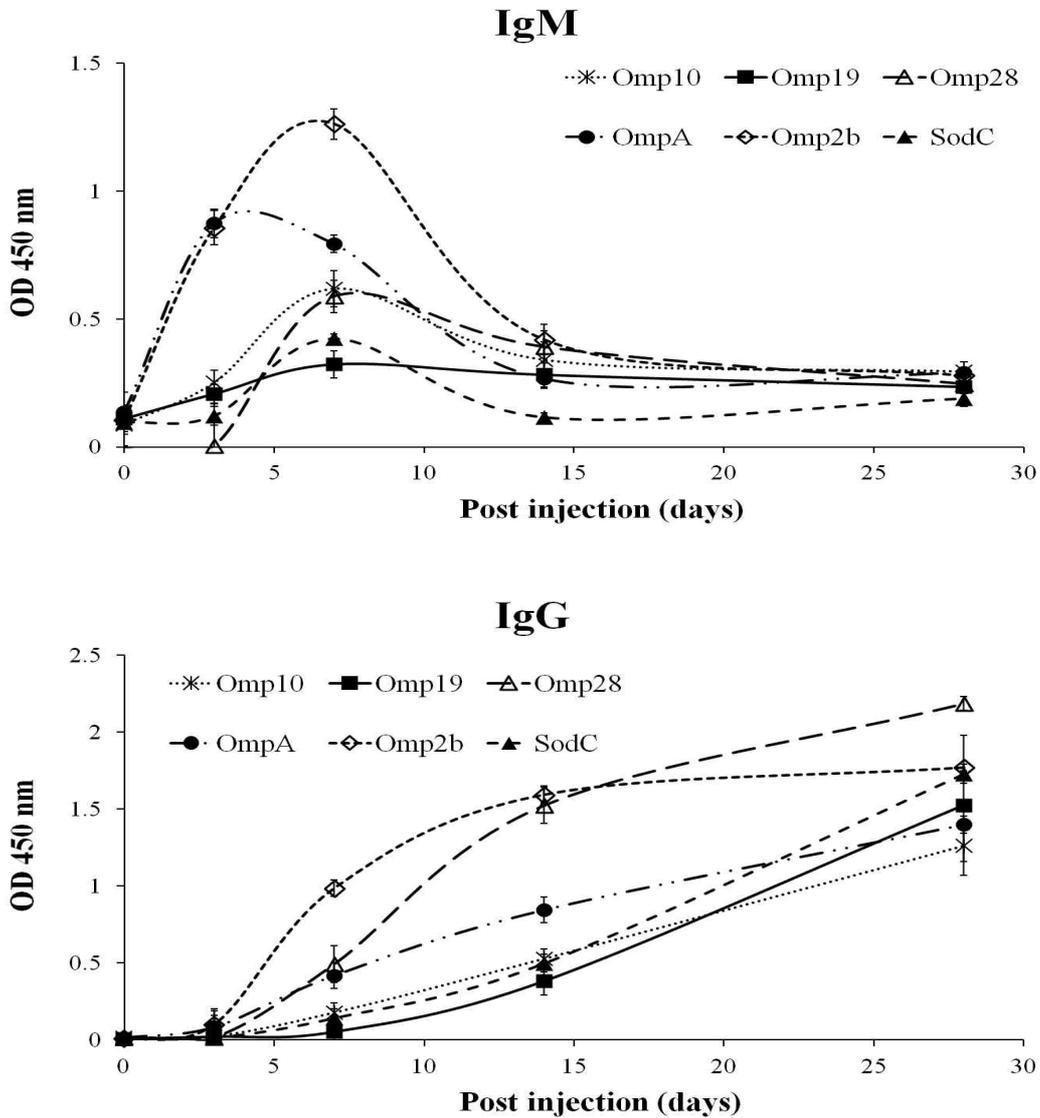


Fig. 70. 6 종의 고면역원성 항원의 마우스 접종 후 마우스 혈청 내 항원 특이 IgM과 IgG의 변화

- 이상의 6 가지 항원에 대한 IgM과 IgG의 면역반응을 분석한 결과 IgM 생성능이 가장 높은 항원은 OmpA, Omp2b 이었으며, IgG 생성능이 가장 높은 항원은 Omp28, Omp2b 이었다. 특히 이들 중 Omp2b의 경우 접종 후 3 일째부터 높은 수준의 IgM이 관찰되었고, 접종 후 7 일째에 높은 IgG를 보여 가장 빠른 항체 생성을 유도하였다. 항체 생성을 빠르게 유도한다고 판단되는 Omp2b의 항원은 차후 추가적인 실험을 통해서 초기 brucella 혈청학적 진단에 이용될 수 있는 가능성이 가장 높다고 판단된다.

2) 고면역원성 항원에 대한 마우스 splenocyte에서 항체 및 cytokine 생성 분석

- 혈청 내 고면원성 항원 특이 항체 생성을 분석하기 위해 각각의 항원이 투여된 마스에서 접종 후 14 일 및 28 일째에 안락사를 실시하여 비장 (spleen)을 분리하였다.
- 분리한 마우스 비장을 잘게 분쇄한 후 RBC lysis buffer (NH_4Cl 0.145 M+Tris 0.017 M, pH 7.2)를 이용하여 잔여 RBC를 제거한 뒤, 분리된 비장세포를 1×10^6 cells/mL 으로 맞추어 RPMI 1640 배양액에서 배양하였다.
- 각각의 고면원성 항원에 대한 비장세포에서의 antigen specific IgG와 IgM 발현 세포 수와 $\text{INF-}\gamma$ 및 IL-4 발현 세포수는 ELISpot kit (Mabtech, Sweden)을 이용하여 Omp28, OmpA, Omp2b, SodC 접종군의 비장세포 (in vivo activated)와 PBS 접종군 (negative control) 비장세포를 이용하여 비교 분석하였다.
- 비장세포에서 각각 target에 대한 발현 세포수는 ELISpot reader (EPSON, USA)를 이용하여 spot 수를 측정하여 비교 분석하였다.
- 고면원성 항원 Omp28, OmpA, Omp2b, SodC를 접종 후 28일 쯤 마우스와 PBS 접종 음성대조군 마우스의 splenocyte 중 항원 특이 IgM, IgG 생성 세포수를 비교하였다. 그 결과 음성대조군과 비교하여 항원 특이 IgM 생성 세포수의 유의적인 차이는 관찰되지 않았으며, 이는 접종 후 28일이 지나 항원 특이 IgM 항체 생성 면역세포의 수가 감소했기 때문인 것으로 판단되며, 이와 같은 결과는 Fig. 70에서 확인된 것과 같이 IgM의 경우 초기 항체 반응에서 관찰되고 이후 14일이 지난 뒤에는 낮은 수준으로 관찰되었던 결과와 일치하는 것을 확인하였다 (Fig. 71).

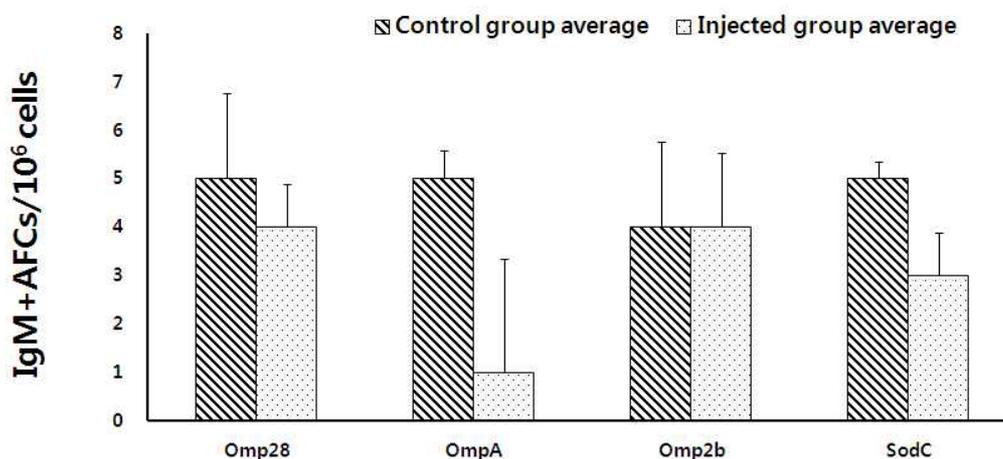


Fig. 71. 접종 후 28일 마우스 splenocyte 중 항원 특이 IgM 생성 세포 수

- 고면역원성 항원에 대한 특이 IgG 생성 세포수는 Omp28, OmpA, Omp2b 및 SodC 접종군에서 음성대조군과 비교하여 높은 세포수를 보였고 이 중 Omp28, OmpA, SodC의 경우 음성대조군과 비교하여 유의적인 증가를 보였다. 이와 같은 결과는 Fig. 70에서 접종 후 28일째에 항원 특이 IgG의 수준이 음성대조군보다 높은 것과 일치하는 결과로 이를 통해 각각의 고면역원성 항원이 복강으로 접종 시 마우스에서 충분한 항원성을 보일 수 있음을 확인하였다 (Fig. 72).

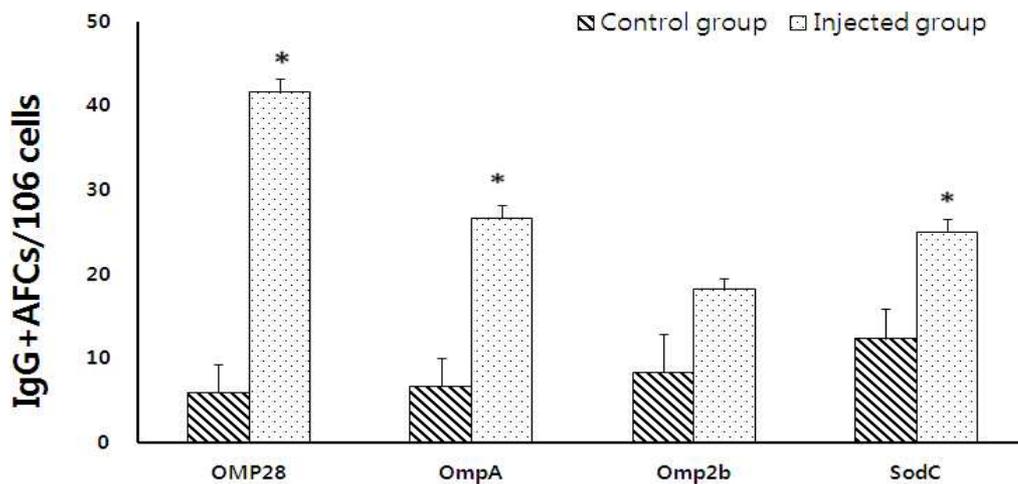


Fig. 72. 접종 후 28일 마우스 splenocyte 중 항원 특이 IgG 생성 세포 수 (* $p < 0.05$)

- 고면역원성 항원 Omp28, OmpA, Omp2b과 SodC를 접종 후 28 일째의 마우스와 PBS 접종 음성대조군 마우스에서 splenocyte를 분리 배양한 뒤 각각의 항원으로 재감작 하였을 때 면역 반응 조절에 중요한 역할을 하는 INF- γ , IL-4를 생성하는 세포 수를 ELISpot으로 측정하였다. Omp28, Omp2b 및 SodC 접종군에서 음성대조군과 비교하여 높은 수준의 IL-4 생성 세포수를 확인하였으며, 특히 Omp2b의 경우 재감작할 시 음성대조군과 비교하여 유의적인 IL-4의 생성 세포 수 증가를 확인하였다. 반면에 OmpA의 경우 대조군과 비교하여 증가된 IL-4 생성 세포 수를 확인할 수 없었다. 이와 같은 결과는 INF- γ 에서도 확인이 되었다. 유의적인 차이를 보인 Omp2b과 더불어 Omp28과 SodC 접종군에서는 음성대조군과 비교하여 높은 수준의 INF- γ 생성 세포 수를 보였으며, 반면 OmpA의 경우 음성대조군에 비교하여 증가된 세포 수를 확인하기 어려웠다 (Fig. 73-74).

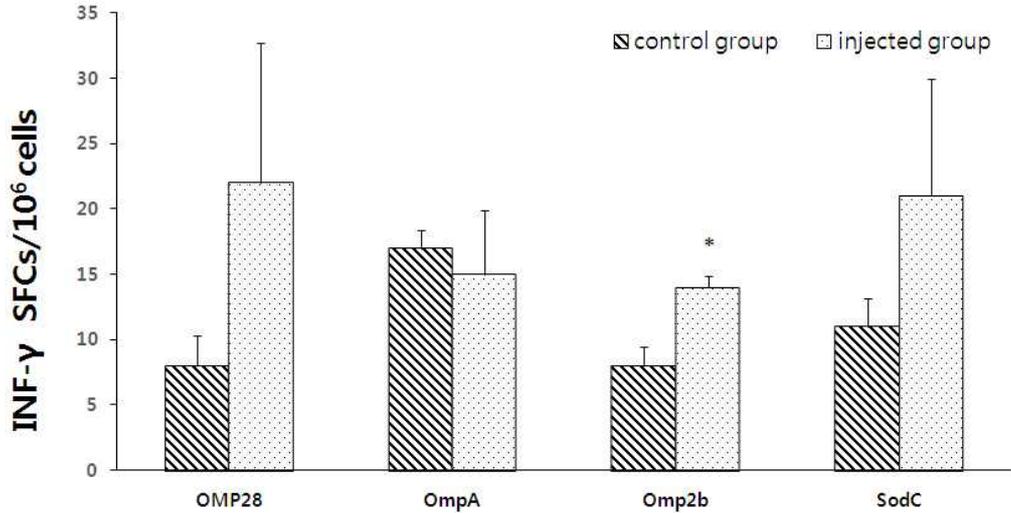


Fig. 73. 접종 후 28일 마우스 splenocyte 에 항원 단백질 자극 시 INF- γ 생성 세포 수 (* $p < 0.05$)

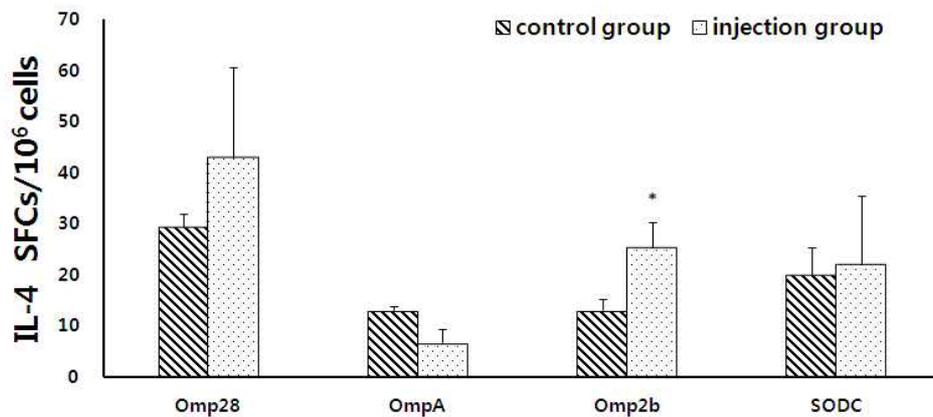


Fig. 74. 접종 후 28일 마우스 splenocyte 에 항원 단백질 자극 시 IL-4 생성 세포 수 (* $p < 0.05$)

- 고면역원성 항원 Omp10, Omp19 접종 마우스 비장세포의 직접적인 cytokine 생성능을 확인하기 위하여 비장세포 상층액 중 INF- γ 를 quantitative ELISA kit(eBioscience, USA)를 이용하여 측정하였다.
- 1×10^6 cells/mL 으로 맞추어 RPMI 1640 배양액 된 PBS 접종군 (negative control) 비장세포와 항원 접종군의 비장세포는 각각 고면역원성 항원 (1 μ g/mL) 으로 자극하여 12, 24, 48 시간에 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액을 샘플로 하여 INF- γ 의 생성량을 측정 분석하였다.

- Quantitative ELISA kit에서 제공된 INF- γ standard 항원에 대한 450 nm OD 값을 기준으로 각 샘플의 OD 값을 비교하여 INF- γ 를 정량하였다.
- 고면역원성 항원 Omp10 접종 28 일 후 마우스의 splenocyte에서 항원 자극 후 12, 24, 48 시간 때 INF- γ 량이 음성대조군에 비해 유의하게 높게 관찰되었고, Omp19는 동일조건에서 INF- γ 생성량이 측정 하한선 이하의 값을 확인하였다 (Fig. 75).

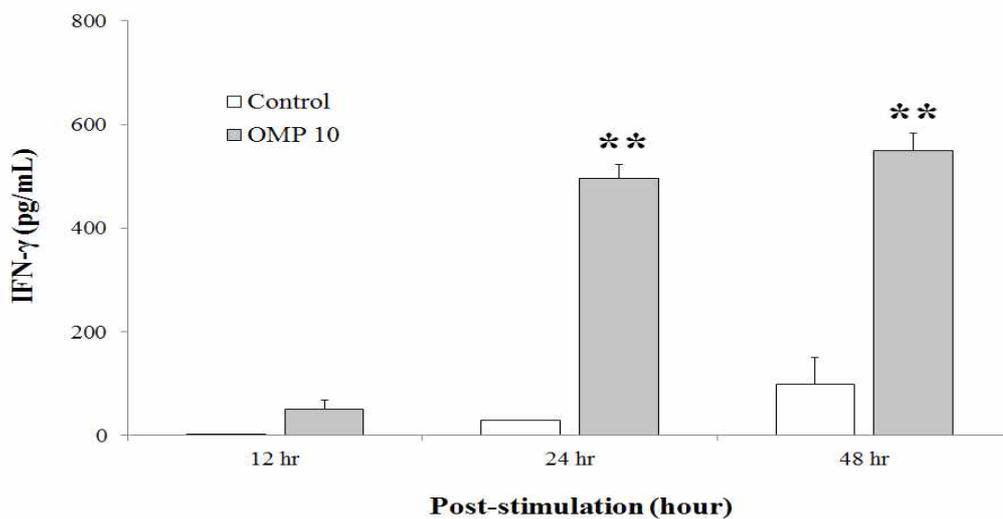


Fig. 75. 고면역원성 항원 Omp10 접종 후 28일 마우스 비장세포에서의 항원 자극 후 시간 변화에 따른 INF- γ 의 생성량 (** $p < 0.01$)

2. 목적동물 대상 감염 시기별 고면역원성 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가

(1) 고면역원성 항원에 대한 야외주 감염 목적동물의 면역반응 분석

1) 감염시기별 감염우 혈청 확보

- 감염시기별 *B. abortus* 균에 대한 혈청학적 반응을 분석하기 위하여 농림축산검역본부로부터 감염시기별 혈청을 확보하였고, 혈청의 특성은 Table 27 - 29와 같다.

→ *B. abortus* 양성 혈청 내역: 23 - 27 개월령 소 7 마리에 *B. abortus* 2308을 4×10^7 CFU/head 단위로 결막낭(conjunctive sac) 접종하여 주차별 혈청을 채취하여 *B. abortus* 양성 혈청으로 확립 (시험관 응집반응과 로즈벵갈법으로 감염우 혈청별 특징 확인).

→ 교차 반응 확인을 위한 *Yersinia enterocolitica* O:9 양성 혈청 내역: 14 개월
 령 5 마리 소에 *Y. enterocolitica* O:9 5×10^6 CFU/head 단위로 1 일 3 회 간격
 피하, 구내 접종하여 주차별 혈청 채취하여 *Y. enterocolitica* O:9 양성 혈청 확
 립.

Table 27. 감염우 혈청 보유 현황 (총 20개)

대상 감염균	인식번호	보유 현황
<i>B. abortus</i> 2308 (양성시료)	3766	3주(1), 5주(1), 7주(1)
	61	3주(1), 5주(1), 7주(1), 9주(1), 10주(1)
	56	3주(1), 5주(1), 7주(1), 9주(1), 10주(1)
	3528	3주(1), 5주(1), 7주(1), 9주(1), 10주(1)
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 (교차반응 검사용)	9810	1주(2)

Table 28. 감염우 혈청의 시험관응집반응 결과

	실험개체 식별번호	1주차	3주차	5주차	6주차	7주차	8주차	9주차	10주차
브루셀라균 감염우	3766	음성	50	100	100	100	200	·	·
	61		200의심	100	100	100	100	50	50
	561		100	400	400	400	400	400	400
	3528		400	100	200의심	·	100	100	100
<i>Y. enterocolitica</i> O:9감염우	9810	균집중 1주일 시험관응집반응에서 1:400 역가							

Table 29. 감염우 혈청의 로즈벵갈 응집반응 결과

	실험개체 식별번호	1주차	3주차	5주차	6주차	7주차	8주차	9주차	10주차
브루셀라균 감염우	3766	음성	*	**	**	***	***	·	·
	61	음성	**	*	**	**	**	**	***
	561	음성	**	*	**	***	***	***	***
	3528	음성	*	*	*	***	**	**	**
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 감염우		로즈벵갈 음성							

② 야의 brucella 양성혈청 확보

- 야외 brucella 양성혈청은 현재 각 시·도 가축위생시험소에서 수행하고 있는 brucella 정기 검사과정에서 양성으로 진단된 양성우의 혈청을 각 시험소의 협조 하에 수집하였다.

- 감염 시기별 양성 혈청 20 개, 야외 감염우 양성 혈청 30 개를 확보하였다.

(2) 실험실적 (in vitro) 숙주세포 및 목적동물 면역반응평가

- 숙주동물인 소에서의 고면역원성 항원의 면역반응을 측정하기 위해서 Bovine macrophage cell line을 일본 기후(Gifu)대로부터 분양받아 현재 검역관련 사항에 대한 허가를 취득하기 위한 조치를 실시하였다.

- 관련 논문 : ‘Sassa Y., Inoshima Y., Ishiguro N., 2010, Bovine macrophage degradation of scrapie and BSE PrP^{Sc}, Vet Immunol Immunopathol. 15; 133(1):33-9

- 선별된 고면역원성 항원의 목적동물 (소) 면역세포에서 면역활성 및 면역유도능 측정에 활용하였다.

(3) 고면역원성 항원에 대한 목적동물의 세포 면역반응 분석

1) 소 PBMC를 이용한 고면역원성 항원의 면역활성능력 평가

가) 소 PBMC의 분리

- 국내 사육 한우에서 혈액을 채취하여 헤파린을 이용하여 항응고 처리를 한 후 Histopaque 1077 (Sigma, USA)를 이용하여 PBMC를 분리하였다.

- 분리된 PBMC는 5×10^6 cell/mL의 세포 수로 RPMI 1640 (10% FBS)에 배양 하여 실험에 이용하였다.

나) 분리된 소 PBMC에 항원 자극, 채취

- 6 종의 고면역원성 항원과 MBP를 polymixin B 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 처리하여 LPS 오염을 방지한 후 최종농도 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 PBMC를 자극하였다. Positive control인 LPS와 concanavalin A (ConA)는 최종 농도 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 PBMC를 자극하였다.

- 분리 배양 후 자극된 PBMC는 각각 6, 12, 24, 그리고 48 시간 간격으로 수거하

여 RNeasy kit (Qiagen, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다.

다) Cytokine 및 apoptosis 등 면역 반응 관련 유전자 발현 측정

- RNeasy kit(Qiagen, USA)를 사용하여 RNA 추출하고 추출된 RNA를 100 ng/μl 으로 희석한 뒤 잔여 DNA를 제거한 후 QuantiTect Reverse transcription kit (Qiagen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 고면역원성 항원으로 감각된 소 PBMC에서 발현된 cytokines 발현 유전자 및 apoptosis 유전자의 양을 측정하기 위해 상기에서 합성된 cDNA를 template로 하여 Rota-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen, USA)와 Rota-Gene-Q real-time PCR 기계 (Qiagen, USA)를 이용하여 quantitative real time PCR를 실시하여 면역반응 관련 cytokine 및 apoptosis 인자의 발현을 정량 측정하였다 (Table 30).
- Quantitative real-time PCR을 통해 확인된 cytokines와 apoptosis 유전자의 발현량은 house keeping gene인 β-actin의 상대적 발현량으로 비교 분석하였다.

Table 30. 분석한 소 PBMC의 cytokines 및 apoptosis의 인자의 primer와 product size

Primer	Sequence	Product size
IL-1β Forward	5'-ACCTTCATTGCCAGGTTTCT-3'	120 bp
IL-1β Reverse	5'-TGTTTGGGGTCATCAGCCTCAA-3'	
IL-4 Forward	5'-CAAAGAACAACAATAAGAAG-3'	181 bp
IL-4 Reverse	5'-AGGTCTTTCAGCGTACTTGT-3'	
IL-6 Forward	5'-TCCAGAATGAGTATGAGG-3'	236 bp
IL-6 Reverse	5'-CATCCGAATAGCTCTCAG-3'	
IFN-γ Forward	5'-ATAACCAGGTCATTCAAAGG-3'	218 bp
IFN-γ Reverse	5'-ATTCTGACTTCTCTTCCGCT-3'	
TNF-α Forward	5'-TAACAAGCCAGTAGCCCACG-3'	277 bp
TNF-α Reverse	5'-GCAAGGGCTCTTGATGGCAGA-3'	
β-actin Forward	5'-CGCACCCTGGCATTGTCAT-3'	227 bp
β-actin Reverse	5'-TCCAAGGCGACGTAGCAGAG-3'	
Bax Forward	5'-TCTCCCCGAGAGGTCTTTTT-3'	151 bp
Bax Reverse	5'-TGATGGTCCTGATCAACTCG-3'	
Bcl2 Forward	5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3'	146 bp
Bcl2 Reverse	5'-CTAGGGCCATACAGCTCCAC-3'	
TLR4 Forward	5'-TGACATCTTCACAGAACTGACTA-3'	164 bp
TLR4 Reverse	5'-GGAGTGGTTCATAAAGAAATGTA-3'	

2) 소 PBMC를 이용한 고면역원성 항원의 면역활성능력 평가 결과

가) Inflammatory cytokine 유전자의 발현 분석

- IL-1 β 는 세포성 면역인 Th1 반응 유도에 관여하는 cytokine이며 소 PBMC 에서 고면역원성 항원으로 자극하였을 때 자극 후 6 시간부터 24 시간 까지 2 에서 6 까지 높은 발현량을 나타내었으나 48시간 때는 발현량이 1 이하로 급격하게 감소 하였으며 IL-1 β 유전자 발현량은 non-treat negative control 보다는 모두 높았으며 고면역원성 항원에 결합된 MBP의 작용과 비교하기 위한 MBP (reference control) 자극 샘플과 비교하여 유의하게 증가한 것은 자극 후 6시간에서 Omp28, 12시간에서 Omp19, Omp28, 24 시간에서 Omp19, Omp28 이었다. 따라서, Omp19 와 특히 Omp28이 소 PBMC에서 자극 후 6시간부터 24시간까지 IL-1 β 유전자 발현량을 유의하게 증가시킨다는 것을 확인하였다 (Fig. 76).

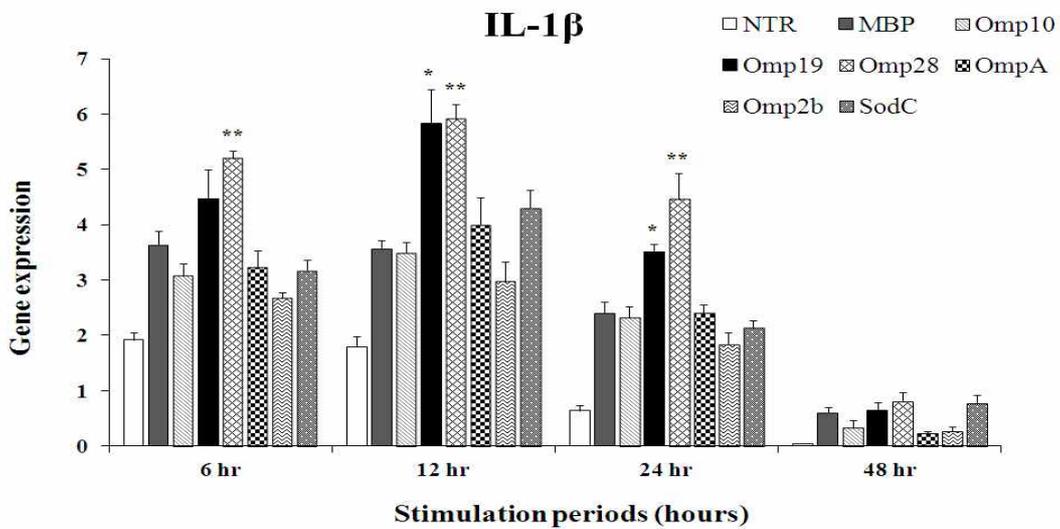


Fig. 76. 고면역원성 항원에 대한 시간대별 IL-1 β 발현 정도 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- IL-4는 체액성 면역인 Th2 반응 유도에 관여하는 cytokine이며 소 PBMC 에서 고면역원성 항원으로 자극하였을 때, 자극 후 6 시간부터 48 시간 까지 발현량 1 이하로 낮게 나타났으며 IL-4 유전자 발현량은 non-treat negative control과 MBP (reference control) 자극 샘플과 비교하여 6종 고면원성 항원을 자극한 PBMC에서 증가한 경향을 관찰하기 어려웠다. 상기의 결과를 통해 6 종의 고면역원성 항원은 소 PBMC에서 자극 시 IL-4 유전자 발현량에 유의적인 영향을 주지 않는다는 것으로 판단된다 (Fig. 77).

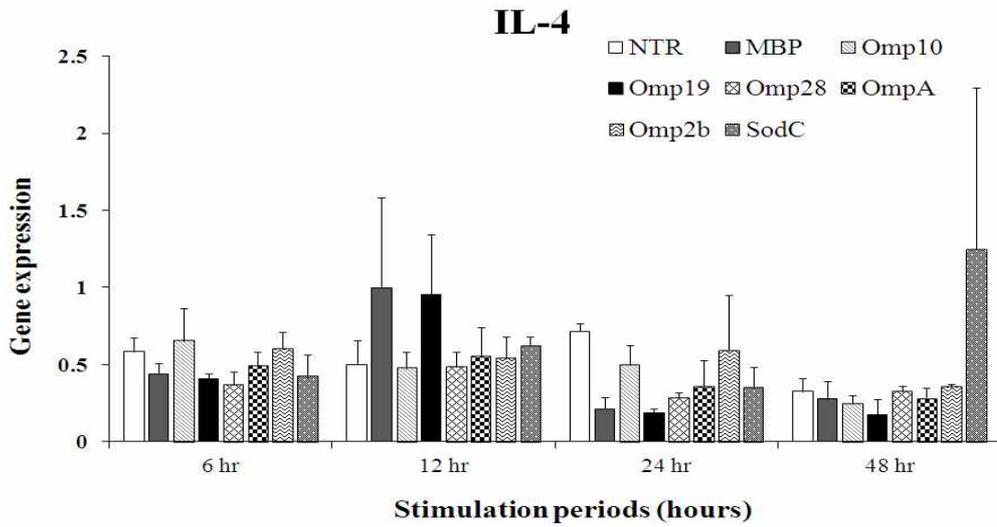


Fig. 77. 고면역원성 항원에 대한 시간대별 IL-4 발현 정도

- IL-6는 체액성 면역인 Th2 반응 유도에 관여하는 cytokine이며 소 PBMC 에서 고면역원성 항원으로 자극하였을 때 자극 후 6 시간부터 12 시간 까지는 발현량이 3 에서 7 사이로 높게 유지했으나 24 시간부터 48 시간까지는 1이하로 낮게 발현 되었다. IL-6 유전자 발현량은 non-treat negative control 보다는 모두 높았으며 Omp19와 Omp28 자극 소 PBMC의 경우 MBP (reference control) 자극 샘플과 비교하여 높은 수준의 유전자 발현량을 보였다 (Fig. 78).

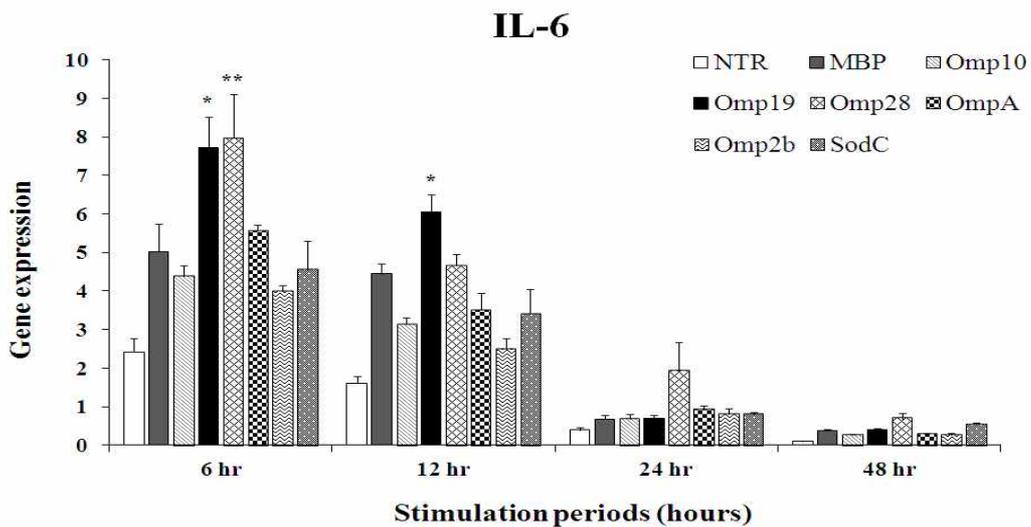


Fig. 78. 고면역원성 항원에 대한 시간대별 IL-6 발현 정도 (* $p < 0.05$)

- INF- γ 는 세포성 면역인 Th1 반응 유도에 관여하는 cytokine이며 소 PBMC 에서 고면역원성 항원으로 자극하였을 때 자극 후 6 시간부터 12 시간 까지는 발현량이

0.2 이하로 낮게 유지되었으나 24 시간 이후부터 발현량이 증가하기 시작하였다. MBP (reference control) 자극 샘플과 비교하여 발현량이 증가한 고면역원성 항원은 Omp19 와 Omp28로 관찰되었다 (Fig. 79).

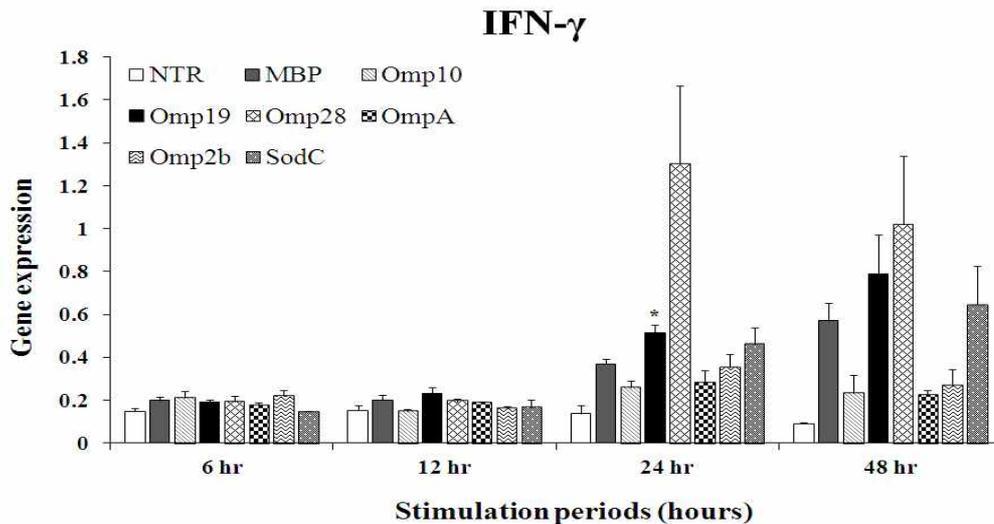


Fig. 79. 고면역원성 항원에 대한 시간대별 IFN- γ 발현 정도 (* $p < 0.05$)

- TNF- α 는 세포성 면역인 Th1 반응 유도에 관여하는 cytokine이며 소 PBMC 에서 고면역원성 항원으로 자극하였을 때 자극 후 6 시간부터 48 시간까지는 0.4 이상 1.0 이하의 발현량을 유지하였으며 TNF- α 유전자 발현량은 non-treat negative control 보다는 모두 높았고 MBP (reference control) 자극 샘플과 비교하여 유의하게 증가한 것은 자극 후 6 시간에서 Omp19, Omp28, 12 시간에는 Omp19, Omp28, SodC, 24 시간과 48 시간에는 Omp28 으로 관찰되었다. 즉, Omp28의 경우 소 PBMC에서 자극 후 6 시간부터 48 시간까지, Omp19의 경우 6 시간부터 12 시간까지, SodC는 24 시간에서 TNF- α 유전자 발현량을 유의하게 증가시킨다는 것을 확인하였다 (Fig. 80).

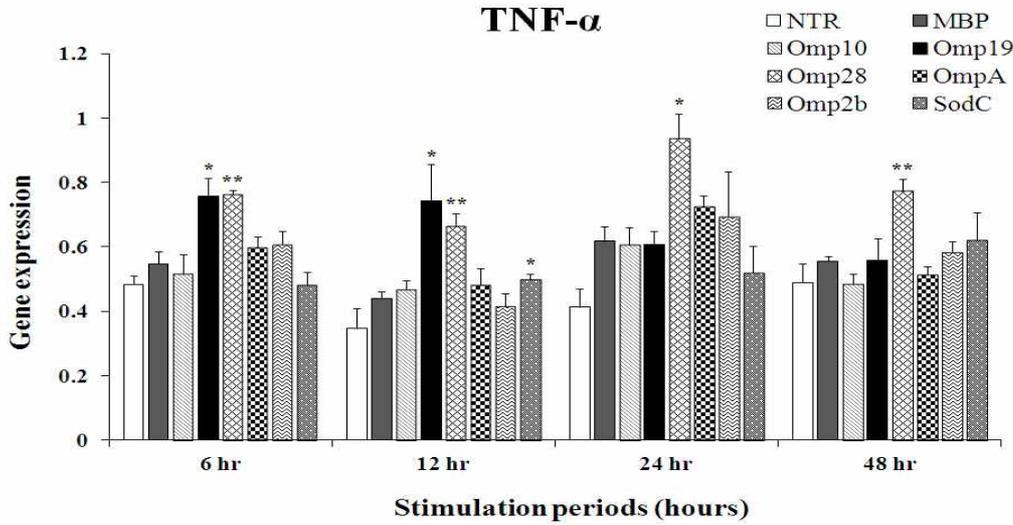


Fig. 80. 고면역원성 항원에 대한 시간대별 TNF- α 발현 정도 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- 소 PBMC를 고면역원성 항원으로 자극한 후 48 시간까지의 cytokine 유전자 발현량을 조사한 결과 negative control보다 높고 MBP 자극 발현량과 비교하였을 때 유의한 수준으로 증가한 경우는 Omp19 자극 시 IL-1 β , IL-6, INF- γ , 및 TNF- α 와 Omp28 자극 시 IL-1 β 및 TNF- α 유전자이며, 고면역원성 항원 자극 PBMC 중 IL-4 유전자 발현의 증가는 관찰되지 않았다.

나) Apoptosis 유전자의 발현 분석

- Bcl2는 apoptosis 유발에 관여하는 조절 단백질이며 소 PBMC 에서 고면역원성 항원으로 자극하였을 때 자극 후 6 시간부터 48 시간까지 유전자 발현량이 증가하였다. Bcl2 유전자 발현량은 MBP (reference control) 자극 샘플과 비교하여 고면역원성 항원 자극에도 크게 증가한 경우를 확인하기 어려웠다 (Fig. 81).

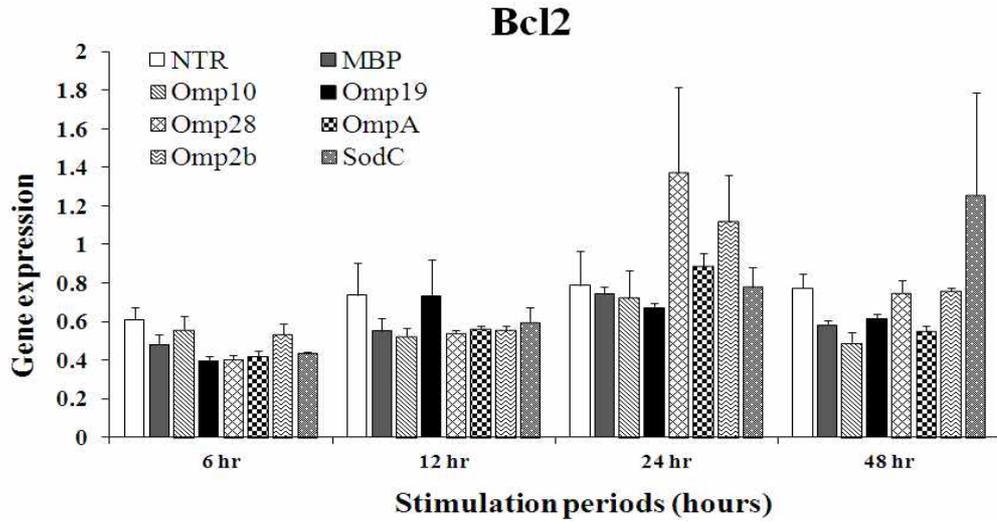


Fig. 81. 고면역원성 항원에 대한 시간대별 Bcl2 발현 정도(* $p < 0.05$)

- Bax는 apoptosis 유발에 관여하는 조절 단백질이며 소 PBMC 에서 고면역원성 항원으로 자극하였을 때 자극 후 6 시간부터 48 시간까지 유전자 발현량이 증가하였다. 각각의 고면역원성 항원을 자극 한 뒤 6 시간째까지는 Bax의 발현이 대조군과 비슷하였으나, 이후 12 시간부터 고면역원성 항원 자극 PBMC에서 발현량이 증가하여, 24 시간째 까지 MBP 자극 PBMC 보다 높은 수준의 발현을 보였으나, 48 시간째에는 MBP 자극 PBMC 보다 낮은 발현량을 관찰할 수 있었다 (Fig. 82).

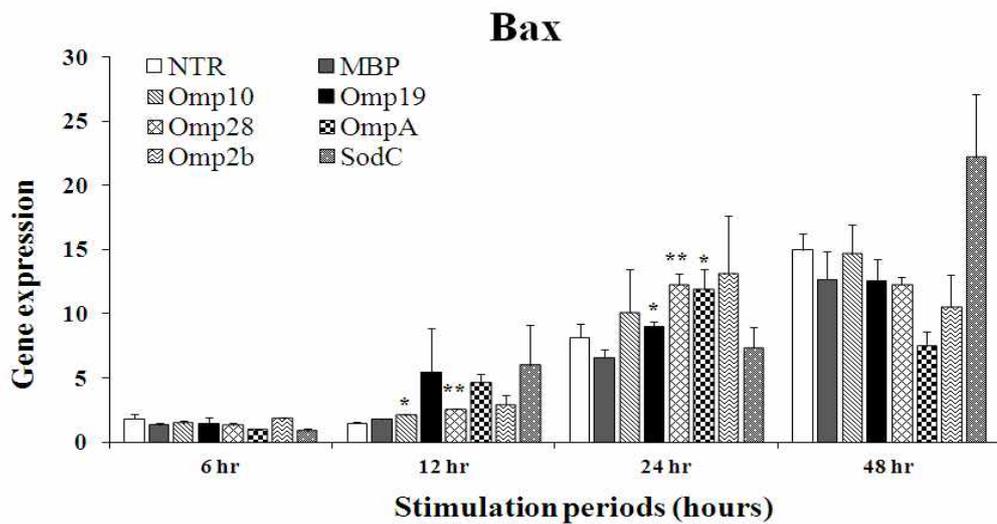


Fig. 82. 고면역원성 항원에 대한 시간대별 Bax 발현 정도(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- TLR4는 apoptosis 유발에 관여하는 세포막 수용체이며 소 PBMC 에서 고면역원성 항원으로 자극하였을 때 자극 후 6 시간부터 24 시간까지 일정하게 유전자 발

현량이 유지되었고 48 시간에 감소하였으며 TLR4유전자 발현량이 non-treat negative control 보다 높고 MBP (reference control) 자극 샘플과 비교하여 증가한 시간은 자극 후 12 시간에서 Omp19와 Omp2b이며 24 시간에서 Omp28과 OmpA, 48시간에서 SodC임을 확인하였다. 따라서, Omp19와 Omp2b는 소 PBMC에서 자극 후 12시간에서, Omp28과 OmpA는 24시간에서, SodC이 48시간에서 TLR4 유전자 발현량이 증가함을 확인하였다 (Fig. 83).

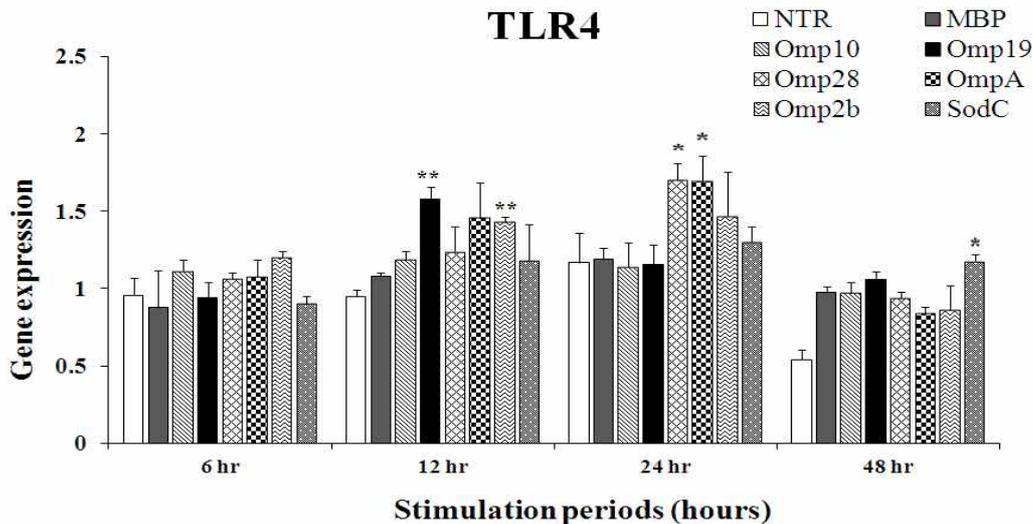


Fig. 83. 고면역원성 항원에 대한 시간대별 TLR4 발현 정도 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- 소 PBMC를 고면역원성 항원으로 자극한 후 48시간까지의 apoptosis 조절 단백질 유전자 발현량을 조사한 결과 negative control 보다 높고 MBP 자극 발현량에 비해 유의한 수준으로 증가한 경우는 Omp19, Omp28, OmpA이 Bax, TLR4를, Omp10이 Bax를, Omp2b, SodC이 TLR4 증가시키는 것을 확인하였으며 Bcl2 유전자 발현을 증가시킨 항원 단백질은 확인할 수 없었다. 따라서 6종의 고면역원성 항원 중 Omp19, Omp28, 그리고 OmpA이 두 개 이상 apoptosis 조절 유전자 발현을 자극함을 확인하였다.

5. 실험동물에서 감염 시기별 고면역원성 재조합 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가

(1) 각 항원에 대한 숙주 면역반응 평가

1) 고면역원성 재조합 항원 AspC를 마우스에 면역

- 항원을 마우스에 투여한 후 5주 및 7주 경과한 시점에서 세포성 면역에 관여하는

IgG1과 체액성 면역과 연관되어진 것으로 알려져 있는 IgG2a의 발현정도를 ELISA 기법을 이용하여 비교 분석하였다. 그 결과 대조군 pMal 단백 면역한 마우스에 비해 rAspC 단백 면역한 마우스군에서 그 발현 정도가 현저하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 84).

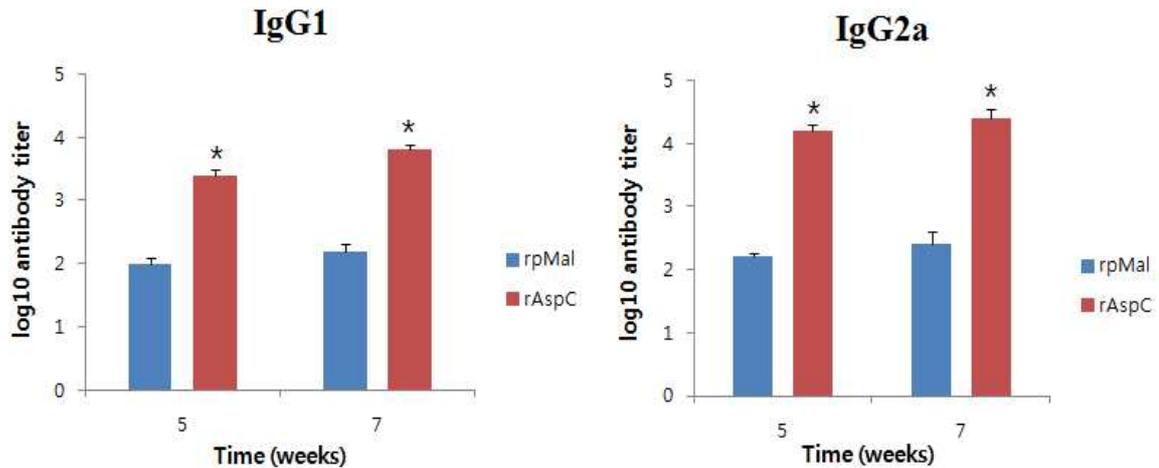


Fig. 84. IgG response after 5 and 7 weeks in mice vaccinated with rpMal or rpMal-AspC (* $p < 0.05$)

- 항원을 마우스에 투여한 후 5주 및 7주 경과한 시점에서 면역반응에 따른 cytokine의 발현량을 cytometric bead array 기법을 이용하여 비교 분석하였다. 그 결과 대조군 pMal 단백 면역한 마우스에 비해 rAspC 단백 면역한 마우스군에서 그 발현 정도가 현저하게 증가하는 것을 확인하였다 (Table 31-32).

Table 31. Concentration of cytokines after 5 weeks in mice vaccinated with rpMal, rpMal-AspC

Cytokine	Concentration (pg/ml) of cytokines in mice vaccinated with:		
	PBS	rpMal	rAspC
IL-12p70	0.17 ± 0.02	0.21 ± 0.08	5.33 ± 0.49
TNF	1.06 ± 0.09	3.47 ± 0.22	5.51 ± 0.35
IFN- γ	0	0.04 ± 0.03	2.79 ± 0.28
MCP-1	11.79 ± 0.68	12.54 ± 0.48	32.14 ± 2.76
IL-10	0	0.05 ± 0.03	1.48 ± 0.17
IL-6	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.96 ± 0.1

Table 32. Concentration of cytokines after 7 weeks in mice vaccinated with rpMal, rpMal-ASPC

Cytokine	Concentration (pg/ml) of cytokines in mice vaccinated with:		
	PBS	rpMal	rAspC
IL-12p70	0.19 ± 0.05	0.24 ± 0.07	5.47 ± 0.65
TNF	0.97 ± 0.13	3.55 ± 0.36	8.43 ± 0.88
IFN- γ	0	0.16 ± 0.09	5.74 ± 0.57
MCP-1	12.86 ± 2.03	14.71 ± 1.92	30.06 ± 3.12
IL-10	0	0.12 ± 0.04	2.66 ± 0.22
IL-6	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	1.08 ± 0.31

2) 고면역원성 재조합 항원 OsmC를 마우스에 면역

- 항원을 마우스에 투여한 후 5주 및 7주 경과한 시점에서 세포성 면역에 관여하는 IgG1과 체액성 면역과 연관되어진 것으로 알려져 있는 IgG2a의 발현정도를 ELISA 기법을 이용하여 비교 분석하였다. 그 결과 대조군 pMal 단백 면역한 마우스에 비해 rOsmC 단백 면역한 마우스군에서 그 발현 정도가 현저하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 85).

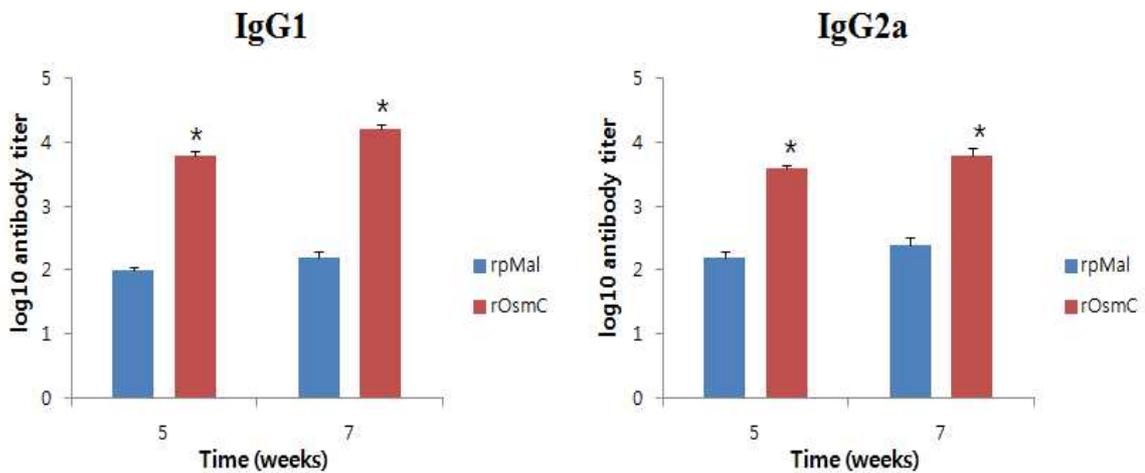


Fig. 85. IgG response after 5 and 7 weeks in mice vaccinated with rpMal or rpOsmC (* $p < 0.05$)

- 항원을 마우스에 투여한 후 5주 및 7주 경과한 시점에서 면역반응에 따른

cytokine의 발현량을 cytometric bead array 기법을 이용하여 비교 분석하였다. 그 결과 대조군 pMal 단백 면역한 마우스에 비해 rOsmC 단백 면역한 마우스군에서 그 발현 정도가 현저하게 증가하는 것을 확인하였다 (Table 33-34).

Table 33. Concentration of cytokines after 5 weeks in mice vaccinated with rpMal or rpMal-OsmC

Cytokine	Concentration (pg/ml) of cytokines in mice vaccinated with:		
	PBS	rpMal	rOsmC
IL-12p70	0	0	1.83 ± 0.21
TNF	1.97 ± 0.25	4.07 ± 0.36	12.51 ± 1.46
IFN- γ	0.06 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.92 ± 0.17
MCP-1	12.23 ± 2.29	11.17 ± 0.94	50.07 ± 3.48
IL-10	0	0	1.49 ± 0.31
IL-6	0	0	0.6 ± 0.16

Table 34. Concentration of cytokines after 7 weeks in mice vaccinated with rpMal or rpMal-OsmC

Cytokine	Concentration (pg/ml) of cytokines in mice vaccinated with:		
	PBS	rpMal	rOsmC
IL-12p70	0.08 ± 0.05	0.19 ± 0.07	3.67 ± 0.47
TNF	2.76 ± 0.36	4.43 ± 0.81	12.59 ± 1.05
IFN- γ	0.3 ± 0.12	0.26 ± 0.08	3.43 ± 0.55
MCP-1	12.86 ± 1.04	14.21 ± 2.07	55.97 ± 8.44
IL-10	0.05 ± 0.03	0.07 ± 0.04	5.23 ± 0.09
IL-6	0	0	2.19 ± 0.05

3) 고면역원성 재조합 항원 DPS를 마우스에 면역

- 항원을 마우스에 투여한 후 5주 및 7주 경과한 시점에서 세포성 면역에 관여하는 IgG1과 체액성 면역과 연관되어진 것으로 알려져 있는 IgG2a의 발현정도를 ELISA 기법을 이용하여 비교 분석하였다. 그 결과 대조군 pMal 단백 면역한 마우스에 비해 rdps 단백 면역한 마우스군에서 그 발현 정도가 현저하게 증가하는

것을 확인하였다 (Fig. 86).

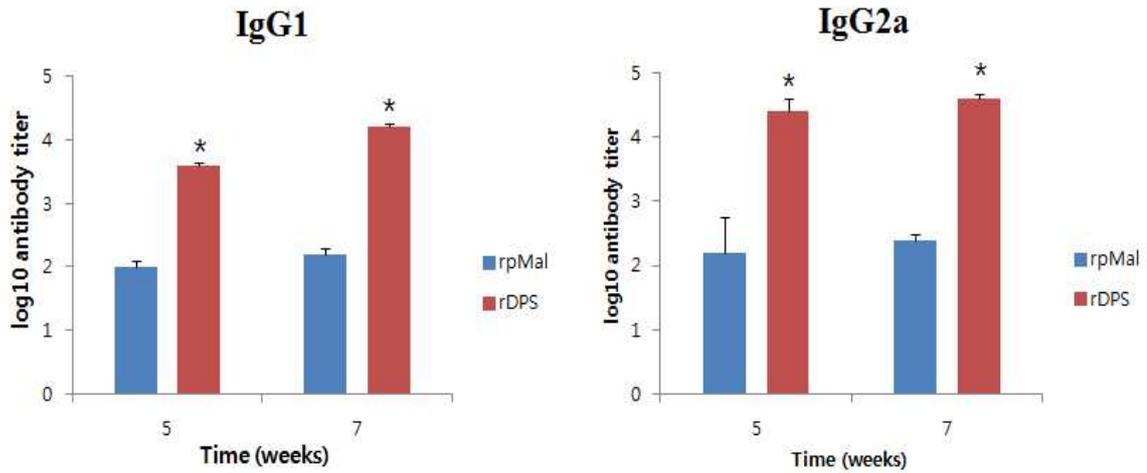


Fig. 86. IgG response after 5 and 7 weeks in mice vaccinated with rpMal or rpMal-DPS (* $p < 0.05$)

- 항원을 마우스에 투여한 후 5주 및 7주 경과한 시점에서 면역반응에 따른 cytokine의 발현량을 cytometric bead array 기법을 이용하여 비교 분석하였다. 그 결과 대조군 pMal 단백 면역한 마우스에 비해 rDPS 단백 면역한 마우스군에서 그 발현 정도가 현저하게 증가하는 것을 확인하였다 (Table 35-36).

Table 35. Concentration of cytokines after 5 weeks in mice vaccinated with rpMal or rpMal-DPS

Cytokine	Concentration (pg/ml) of cytokines in mice vaccinated with:		
	PBS	rpMal	rDPS
IL-12p70	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.08	1.71 ± 0.26
TNF	1.37 ± 0.22	2.98 ± 0.31	6.89 ± 0.43
IFN- γ	0	0.08 ± 0.05	2.91 ± 0.36
MCP-1	10.3 ± 0.47	12.58 ± 0.8	28.54 ± 1.9
IL-10	0	0.02 ± 0.02	1.35 ± 0.22
IL-6	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.96 ± 0.1

Table 36. Concentration of cytokines after 7 weeks in mice vaccinated with rpMal or rpMal-DPS

Cytokine	Concentration (pg/ml) of cytokines in mice vaccinated with:		
	PBS	rpMal	rDPS
IL-12p70	0.19 ± 0.06	0.21 ± 0.04	4.64 ± 0.29
TNF	1.25 ± 0.31	2.61 ± 0.37	11.72 ± 0.48
IFN- γ	0	0.23 ± 0.08	6.01 ± 0.44
MCP-1	12.87 ± 0.97	14.36 ± 2.71	41.07 ± 3.48
IL-10	0	0.04 ± 0.02	1.42 ± 0.08
IL-6	0	0.05 ± 0.03	1.04 ± 0.12

4) 고면역원성 재조합 항원 omp10, omp19 및 ompA를 마우스에 면역

- 항원을 마우스에 투여한 후 5주 및 7주 경과한 시점에서 세포성 면역에 관여하는 IgG1과 체액성 면역과 연관되어진 것으로 알려져 있는 IgG2a의 발현정도를 ELISA 기법을 이용하여 비교 분석하였다. 그 결과 대조군 rpcold 단백 면역한 마우스와 romp10, romp19 및 rompA 단백 면역한 마우스군에서 그 발현 정도의 차이를 보이지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 87).

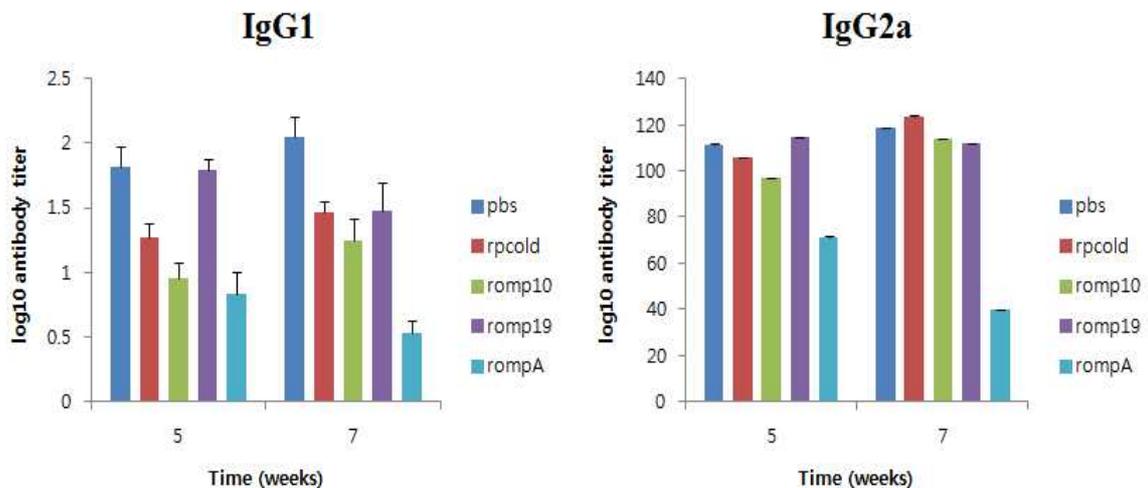


Fig. 87. IgG response after 5 and 7 weeks in mice vaccinated with rpcold or rpcold-omp10, omp19 and ompA

- 항원을 마우스에 투여한 후 5주 및 7주 경과한 시점에서 면역반응에 따른 cytokine의 발현량을 cytometric bead array 기법을 이용하여 비교 분석하였다. 그 결과 대조군 rpcold 단백 면역한 마우스와 romp10, romp19 및 rompA 단백 면역한 마우스군에서 그 발현 정도의 차이를 보이지 않는 것을 확인하였으나 7주 경과

한 시점에서 몇몇의 cytokine들은 고면역원성 재조합 항원에 반응 하는 것을 확인 하였다 (Table 37-38).

Table 37. Concentration of cytokines after 5 weeks in mice vaccinated with rpcold, romp10, romp19 and rompA

Cytokine	PBS	pCold	Omp10	Omp19	OmpA
IL-12p70	32.84±3.71	16.95±1.62	<0.1	<0.1	<0.1
TNF	8.38±1.04	3.17±2.27	2.27±0.23	0.64±0.495	<0.1
INF- γ	3.05±0.43	2.38±1.90	0.3±0.14	<0.1	<0.1
MCP-1	52.04±36.19	36.58±21.18	23.82±9.39	16.32±4.42	27.795±10.55 2
IL-10	27.80±2.86	18.71±1.84	4.785±0.903	<0.1	3.04
IL-6	4.032±0.45	1.9±0.24	1.3±.74	0.545	<0.1

Table 38. Concentration of cytokines after 7 weeks in mice vaccinated with rpcold, romp10, romp19 and rompA

Cytokine	PBS	pCold	Omp10	Omp19	OmpA
IL-12p70	26.92±3.89	14.46±10.84	19.49±10.51	46.86±7.59	51.34
TNF	3.165±1.90	3.93±3.22	9.195±3.71	2.65±2.34	8.99±0.95
INF- γ	1.74±1.14	1.41±0.90	2.35±2.10	1.3	4.83
MCP-1	36.666±23.04	42.94±25.58	34.02±15.66	22.517±15.37	33.51±19.45
IL-10	11.056±11.73	7.49±5.52	9.586±5.75	17.02	35.31
IL-6	1.91±1.69	1.37±0.705	2.64	4.98	4.67

6. 고면역원성 재조합 항원 (5종)의 대량생산을 위한 배양 조건 확립 및 대량 정제

(1) 고면역원성 재조합 항원의 배양 조건

- 고면역원성 재조합 항원 5 종 (Outer Membrane Protein 28 (OMP28;88kDa), Malate dehydrogenase (mdh;93kDa), Elongation factor Ts (tsf;91kDa), Arginase (rocF;93kDa), and Metal-dependent hydrolase (0628;85kDa))의 대량생산을 위한 배양조건 및 대량정제를 위한 조건을 확립하였다.

1) 고면역원성 재조합 항원의 배양

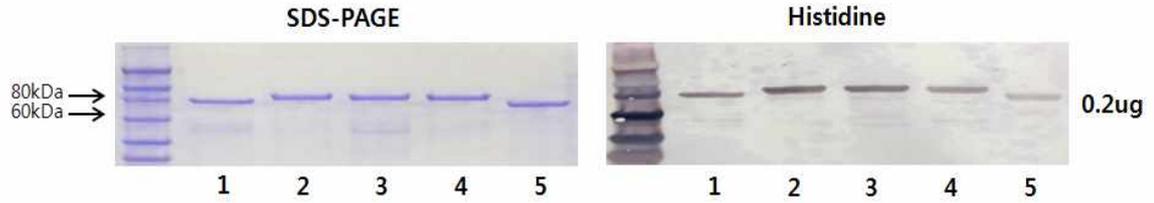
- 제 1 세부과제 연구팀으로부터 제공되어진 5종의 고면역원성 재조합 항원을 각각의 배양 조건에 맞추어 배양시켰다.
- 5종의 고면역원성 재조합 항원 stock을 LB agar plate (ampicillin 100 µg/mL 첨가)를 이용하여 37 °C에서 배양시켰다.
- LB agar plate에서 배양되어진 각각의 고면역원성 재조합 항원의 colony를 picking하여 LB broth medium (ampicillin 100 µg/mL 첨가)에 다시 한 번 배양시킨 후, IPTG (0.5 mM) induction을 통하여 최종적으로 고면역원성 재조합 단백질 sample을 확보하였다.
- Histidine을 이용하여 실험에 사용되어질 고면역원성 재조합 항원을 정제하였다.

2) 고면역원성 재조합 항원의 분리 및 정제

- 배양이 완료된 각각의 고면역원성 재조합 항원들은 원심분리를 통하여 pellet down을 실시하였다.
- 각각의 고면역원성 재조합 항원 pellet을 이용하여 다음 과정을 진행하였다.

: 단백질 정제를 위하여 His SpinTrap (GE Healthcare, UK)을 이용하였고 Denaturing condition buffer 10 mL 을 각각의 tube에 첨가하여 pellet을 suspension 시켜주고 4°C에서 overnight시킨 후 sonication을 30분 동안 실시하였다. 그리고 sonication 실시 후 최고속도로 원심분리하여 상층액을 600 µl 씩 His SpinTrap column에 넣고 70 - 100 x g에서 1분간 원심분리를 실시하였다. 마지막으로 denaturing condition buffer 600 µl를 column에 내린 후, Elution buffer를 500 µl 씩 넣어서 단백질 정제를 실시하였다.

- 5종의 고면역원성 재조합 항원을 정제한 뒤 각각의 재조합 단백질의 크기 및 정제 수준을 SDS-PAGE와 Western blot (anti-his Ab 사용)을 통하여 확인하였다 (Fig. 88).



1: OMP28 (88kDa) 2: mdh (93kDa) 3: tsf (91kDa) 4: rocF (93kDa) 5: 0628 (85kDa)

Fig. 88. 5종의 재조합 단백질 분리 정제 및 anti-histidine antibody을 이용한 Western blot

3) 고면역원성 재조합 항원의 농도 확인

- 고면역원성 재조합 항원들의 농도를 BCA protein assay kit (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 측정한 뒤에 각각의 실험에 사용하였으며, 정제된 고면역원성 재조합 항원의 농도는 아래와 같다 (Table 39).

Table 39. BCA protein assay로 측정한 고면역원성 재조합 단백질 농도 및 총 생산량

	OMP28	mdh	tsf	rocF	0628
농도 (mg/mL)	0.2809	0.1104	0.2948	0.1704	0.3009
총생산량 (mg)	0.9832	0.3864	1.0318	0.5964	1.0532

7. 목적동물 대상 감염 시기별 고면역원성 재조합 항원에 대한 숙주의 면역반응 평가

(1) 고면역원성 재조합 항원에 대한 야외주 감염 목적동물의 면역반응 분석

1) 감염시기별 감염우 혈청 확보

- 감염시기별 *Brucella abortus* 균에 대한 혈청학적 반응을 분석하기 위하여 농림축산검역본부로부터 감염시기별 혈청을 확보하였고, 혈청의 특성은 Table 40-42과 같다.
- 또한, 제 1 세부과제를 통해 몽골로부터 제공받은 감염시기별 혈청과 Golden Standard 혈청을 확보하여 실험을 실시하였다.

Table 40. 감염우 혈청 보유 현황 (총 20개)

대상 감염균	인식번호	보유 현황
<i>B. abortus</i> 2308 (양성시료)	3766	3주(1), 5주(1), 7주(1)
	61	3주(1), 5주(1), 7주(1), 9주(1), 10주(1)
	56	3주(1), 5주(1), 7주(1), 9주(1), 10주(1)
	3528	3주(1), 5주(1), 7주(1), 9주(1), 10주(1)
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 (교차반응 검사용)	9810	1주(2)

Table 41. 감염우 혈청의 시험관응집반응 결과

	실험개체 식별번호	1주차	3주차	5주차	6주차	7주차	8주차	9주차	10주차
브루셀라균 감염우	3766	음성	50	100	100	100	200	·	·
	61		200의 십	100	100	100	100	50	50
	561		100	400	400	400	400	400	400
	3528		400	100	200의 십	·	100	100	100
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 감염우	9810	균집중 1주일 시험관응집반응에서 1:400 역가							

Table 42. 감염우 혈청의 로즈벵갈 응집반응 결과

	실험개체 식별번호	1주차	3주차	5주차	6주차	7주차	8주차	9주차	10주차
브루셀라균 감염우	3766	음성	*	**	**	***	***	·	·
	61	음성	**	*	**	**	**	**	***
	561	음성	**	*	**	***	***	***	***
	3528	음성	*	*	*	***	**	**	**
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 감염우		로즈벵갈 음성							

2) 야외 *Brucella* 양성 및 음성 혈청 확보

- 야외 *Brucella* 양성혈청은 현재 각 시 · 도 가축위생시험소에서 수행하고 있는 *Brucella* 정기 검사과정에서 양성으로 진단된 양성우의 혈청을 각 시험소의 협조

하에 수집하였다.

- 또한, 음성혈청도 함께 수집하였다.

- 감염 시기별 양성 혈청 20 개, 야외 감염우 양성 혈청 150 개 이상, 음성 혈청 500개 이상을 확보하였고, 추후 감염시기별 양성 혈청을 수집하였으며, 응집반응을 실시하여 브루셀라 양성임을 검증 실험에 사용하였다.

(2) 고면역원성 재조합 항원에 대한 목적동물의 세포 면역반응 분석

1) 소 말초혈액단핵세포 (PBMC)를 이용한 고면역원성 재조합 항원의 면역활성능력 평가

가) 소 PBMC의 분리

- 국내 사육우에서 혈액을 채취하여 헤파린을 이용하여 항응고 처리를 한 후 Histopaque 1077 (Sigma, USA)를 이용하여 PBMC를 분리하였다.

- 분리된 PBMC는 5×10^6 cell/mL 의 세포 수로 RPMI 1640 (10% FBS) 에 배양하여 실험에 이용하였다.

나) 분리된 소 PBMC에 재조합 단백질 자극

- 5종의 고면역원성 재조합 항원을 최종농도 각각 5 와 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 PBMC를 자극하였으며 polymixin B 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 처리하여 LPS 오염을 방지하였다. Positive control로써 concanavalin A (ConA) 를 사용하였으며 최종 농도 또한 5 와 10 $\mu\text{g/mL}$ 으 로 동일하게 PBMC를 자극 하였다.

- 분리 배양 후 자극된 PBMC는 각각 12, 24, 그리고 48 시간 간격으로 수거하여 RNeasy kit (Qiagen, USA) 를 이용하여 RNA를 추출하였다.

다) Cytokine 및 apoptosis 등 면역 반응 관련 유전자 발현 측정

- RNeasy kit (Qiagen, USA) 를 사용하여 RNA 추출하고 추출된 RNA 500ng을 QuantiTect Reverse transcription kit (Qiagen, USA)를 이용하여 cDNA로 합성 하였다. 고면역원성 재조합 항원으로 감염된 소 PBMC에서 발현된 cytokines 발현 유전자 및 apoptosis 유전자의 양을 측정하기 위해 상기에서 합성된 cDNA를 template로 하여 Rota-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen, USA) 와 Rota-Gene-Q real-time PCR 기계 (Qiagen, USA) 를 이용하여 quantitative

real-time PCR를 실시하여 면역반응 관련 cytokine 및 apoptosis 인자의 발현을 정량 측정하였다 (Table 43).

- Quantitative real-time PCR을 통해 확인된 cytokines와 apoptosis 유전자의 발현량은 house keeping gene인 β -actin의 상대적 발현량으로 비교 분석하였다.

Table 43. 소 PBMC의 cytokines 및 apoptosis 관련 유전자의 primer set

Primer	Sequence	Product size
iNOS Forward	5'-AGCGGAGTGACTTTCCAAGA-3'	97 bp
iNOS Reverse	5'-TTTTGGGGTTCATGATGGAT-3'	
IL-1 β Forward	5'-ACCTTCATTGCCAGGTTTCT-3'	120 bp
IL-1 β Reverse	5'-TGTTTGGGGTCATCAGCCTCAA-3'	
IL-4 Forward	5'-CAAAGAACAACAATAAGAAG-3'	181 bp
IL-4 Reverse	5'-AGGTCTTTCAGCGTACTTGT-3'	
IL-6 Forward	5' · -TCCAGAATGAGTATGAGG-3'	236 bp
IL-6 Reverse	5'-CATCCGAATAGCTCTCAG-3'	
IL-12p40 Forward	5' · -AACCTGCAACTGAGACCATT-3'	186 bp
IL-12p40 Reverse	5'-ATCCTTGTGGCATGTGACTT-3'	
IFN- γ Forward	5'-ATAACCAGGTCATTCAAAGG-3'	218 bp
IFN- γ Reverse	5'-ATTCTGACTTCTCTTCCGCT-3'	
TNF- α Forward	5'-TAACAAGCCAGTAGCCCACG-3'	277 bp
TNF- α Reverse	5'-GCAAGGGCTCTTGATGGCAGA-3'	
β -actin Forward	5'-CGCACCCTGGCATTGTCAT-3'	227 bp
β -actin Reverse	5'-TCCAAGGCGACGTAGCAGAG-3'	
Bax Forward	5'-TCTCCCCGAGAGGTCTTTTT-3'	151 bp
Bax Reverse	5'-TGATGGTCCTGATCAACTCG-3'	
Bcl-2 Forward	5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3'	146 bp
Bcl-2 Reverse	5'-CTAGGGCCATACAGCTCCAC-3'	
TLR4 Forward	5'-TGACATCTTCACAGAACTGACTA-3'	164 bp
TLR4 Reverse	5'-GGAGTGGTTCATAAAGAAATGTA-3'	

2) 소 PBMC를 이용한 고면역원성 재조합 항원의 면역활성능력 평가 결과

가) Inflammatory cytokine 유전자의 발현 분석

- Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)는 세포성 면역인 Th1 반응을 유도하는 cytokine에 의하여 발생되어지며 이를 통하여 생체내의 Nitric Oxide (NO)의 수치가 증가하게 되는 것으로 알려져 있으며 고면역원성 재조합 항원 10ug으로 PBMC를 자극하였을 때 48시간 후에 rocF 항원이 유의적으로 높게 발현하는 것을

확인하였다 (Fig. 89). 그러나 다른 항원 자극에 있어서는 그 유의성이 나타나지 않음을 확인하였다.

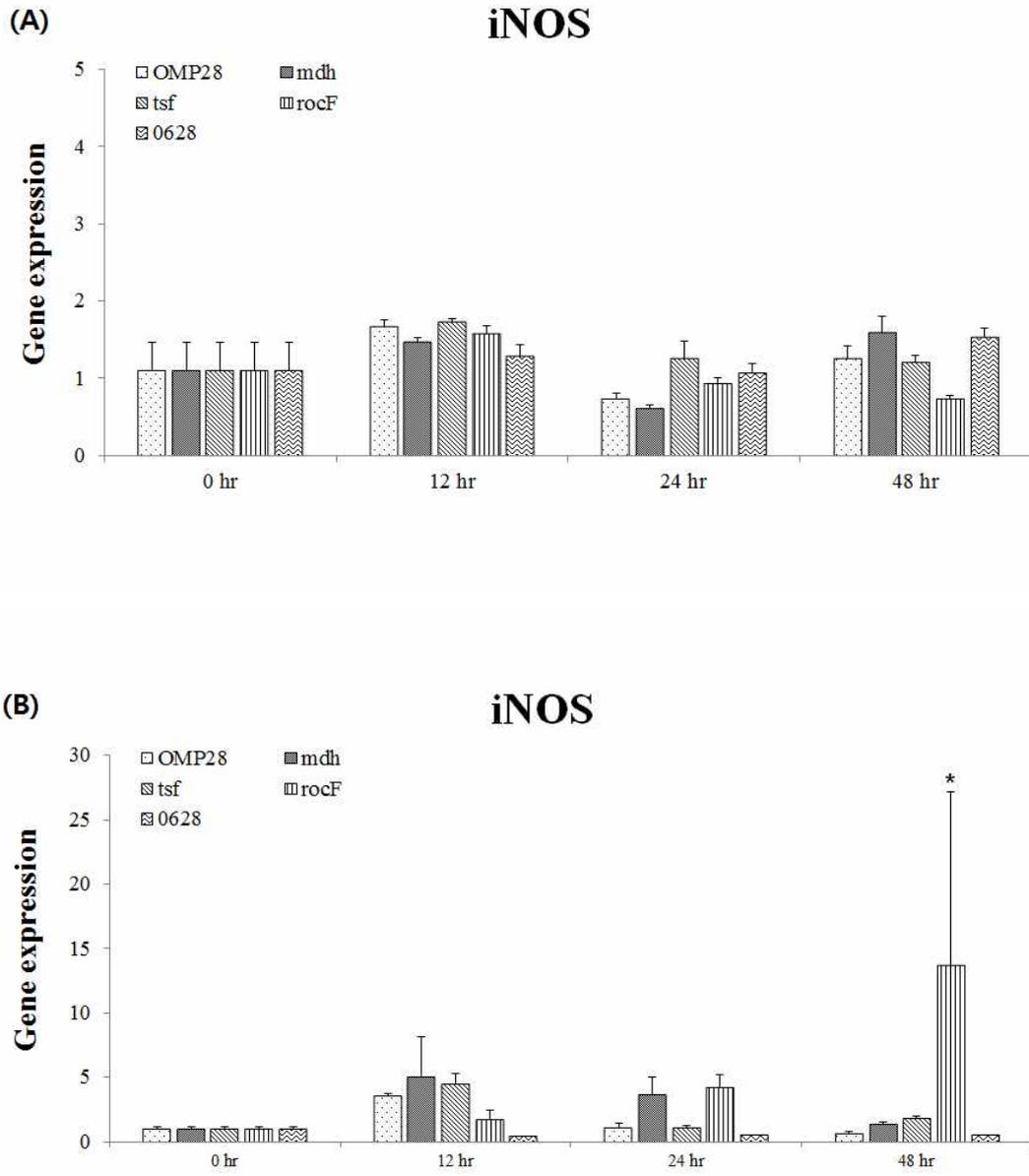


Fig. 89. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 iNOS 발현량 (* $p < 0.05$)

- 세포성 면역인 Th1 반응 유도에 관여하는 cytokine 의 한 종류인 IL-1 β 를 소 PBMC에 5ug 및 10ug의 고면역원성 재조합 항원을 자극하였을 때 0시간에 비하여 발현이 증가하는 양상이 보이지는 않았다. 하지만, rocF의 경우 10ug의 농도로 PBMC를 자극을 하였을 때 48시간 때에 IL-1 β 의 발현량이 다른 고면역원성 재조

합 항원을 처리하였을 때의 발현량보다 현저하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 90).

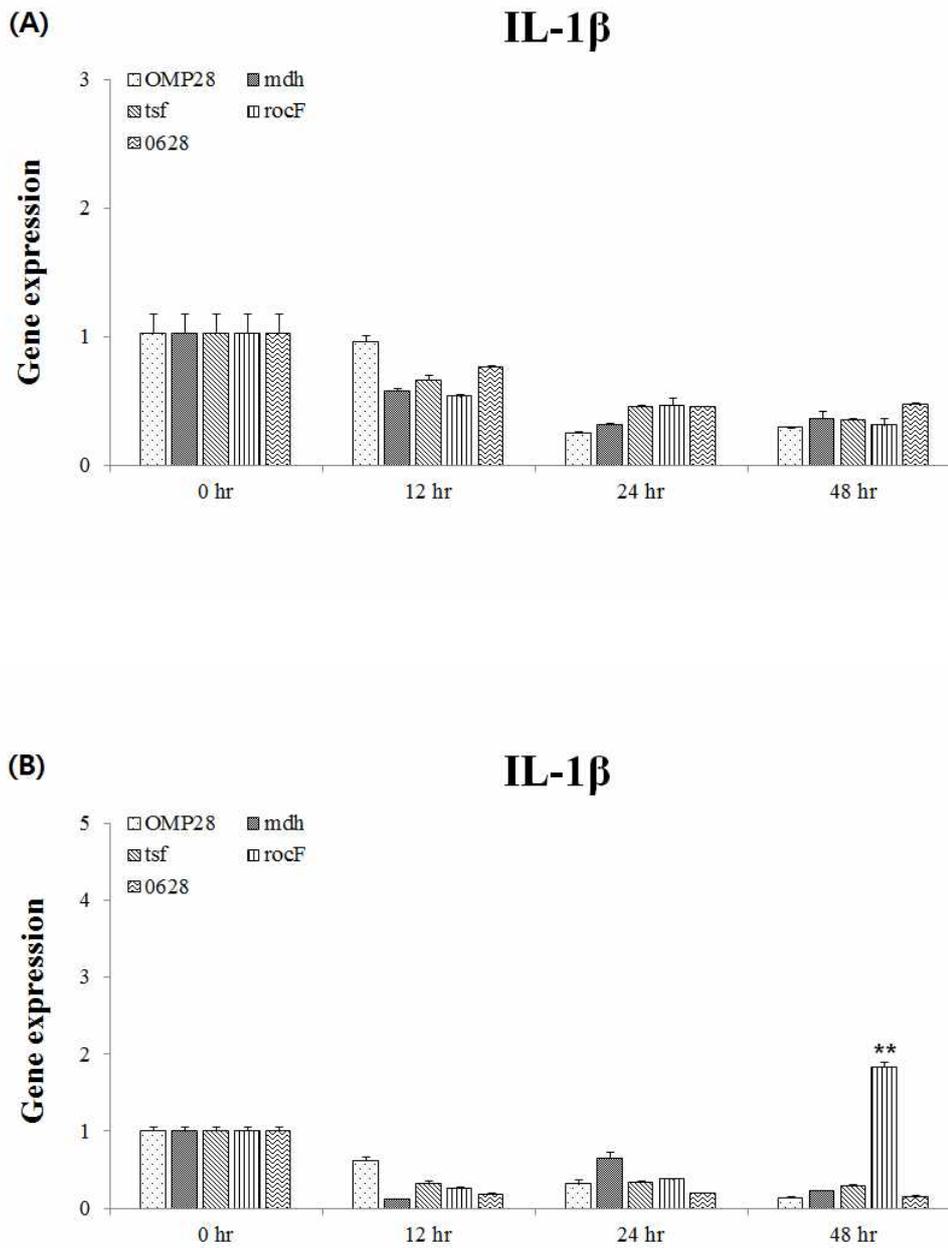


Fig. 90. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 IL-1 β 발현량 (** $p < 0.01$)

- IL-4는 체액성 면역인 Th2 반응 유도에 관여하는 cytokine으로 알려져 있으며 소 PBMC 에서 고면역원성 재조합 항원으로 자극하였을 때 0시간 때의 발현량과 비

교하여 관찰한 결과 5ug을 처리하였을 경우 24시간때에 rocF의 발현량이 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 10ug의 농도로 PBMC에 자극을 주었을 때 또한 rocF 재조합 단백질만이 24시간, 48시간에 다른 4종의 단백질에 비교하여 그 발현량이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 91).

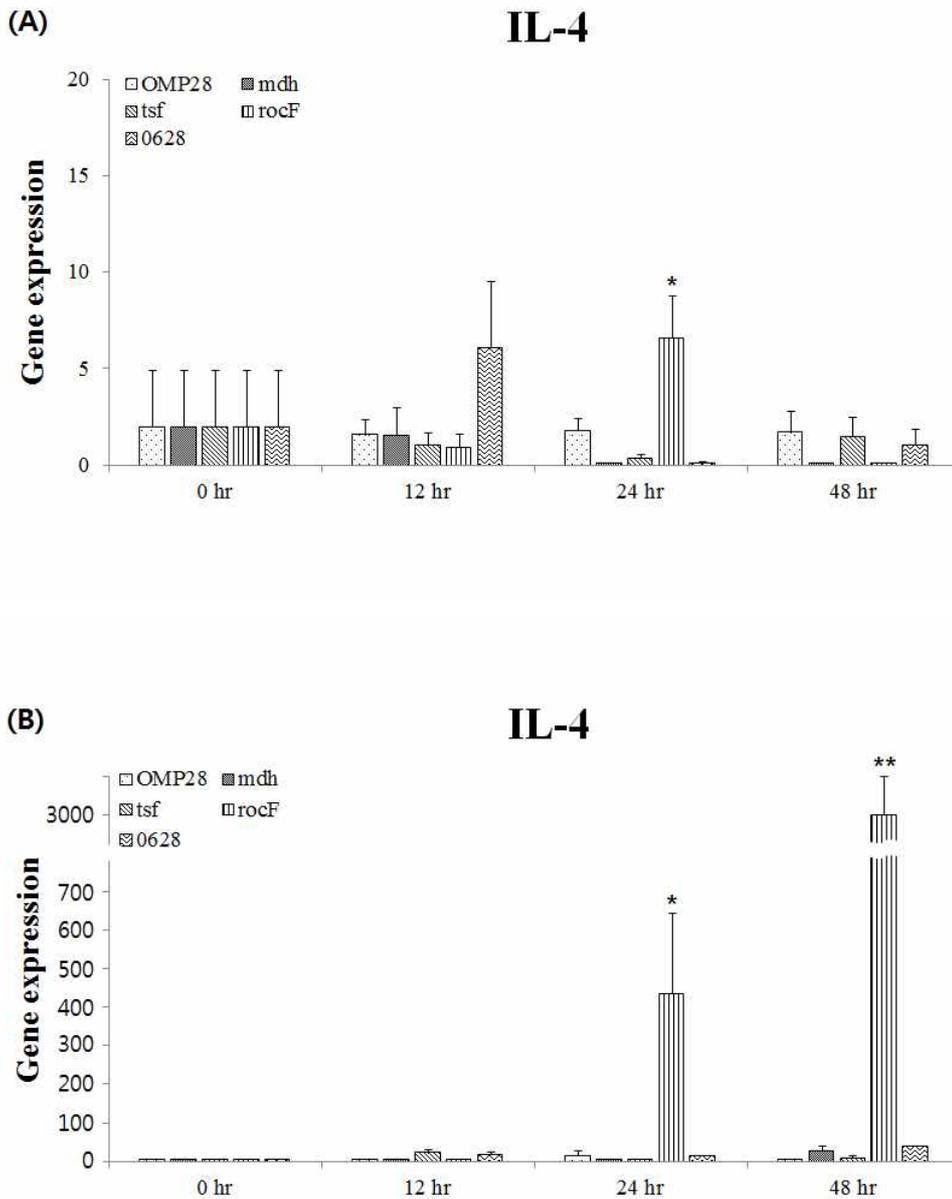
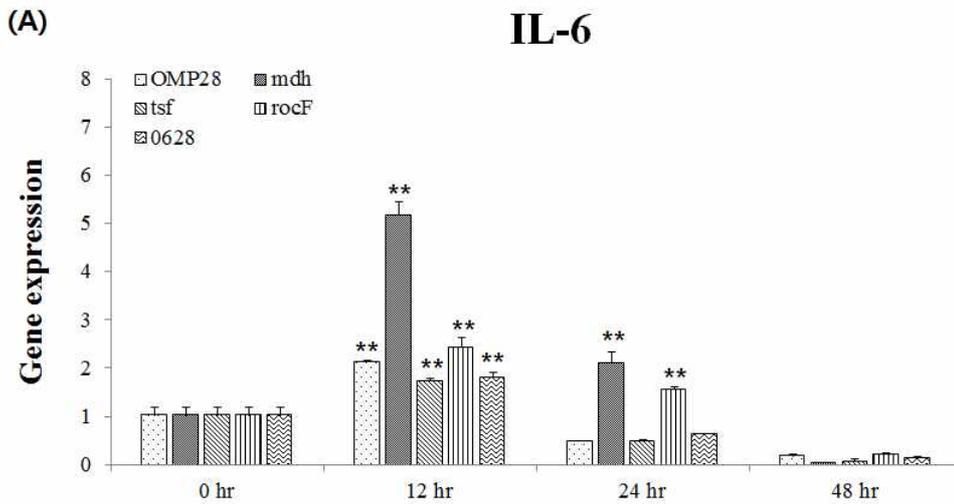


Fig. 91. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 IL-4 발현량 (* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- 체액성 면역인 Th2 반응 유도에 관여하는 cytokine 중에 하나인 IL-6의 변화를

관찰하기 위하여 소 PBMC에 각각 고면역원성 재조합 항원 5종을 5ug 그리고 10ug의 농도로 자극하였을 때 IL-6의 발현량은 시간이 지남에 따라 변화하는 것을 확인하였다 (Fig. 92). 5ug의 농도로 고면역원성 재조합 항원을 PBMC에 자극한 뒤 12시간 뒤에 IL-6의 발현량이 모든 실험군에서 증가함을 확인하였으며 24시간 후에는 mdh와 rocF를 자극한 세포에서만 0시간에 비교하여 지속적으로 증가함을 관찰하였다 (Fig. 92A). 하지만, 10ug의 농도로 자극한 실험군에 있어서는 그 발현정도가 5ug의 농도로 자극시켰을 때와는 다른 양상을 나타내는 것을 확인하였다. 고면역원성 재조합 항원 자극 후 12시간 뒤에, mdh와 tsf는 0시간에 보다 발현량이 증가함을 볼 수 있었지만, 24시간 후에는 5ug의 농도로 처리한 군과 같이 mdh와 rocF 두 항원을 자극 시킨 세포에서 IL-6의 발현량이 증가함을 확인하였다 (Fig. 92B). 이를 제외한 다른 항원에서는 발현량에 유의성이 없음을 확인하였다.



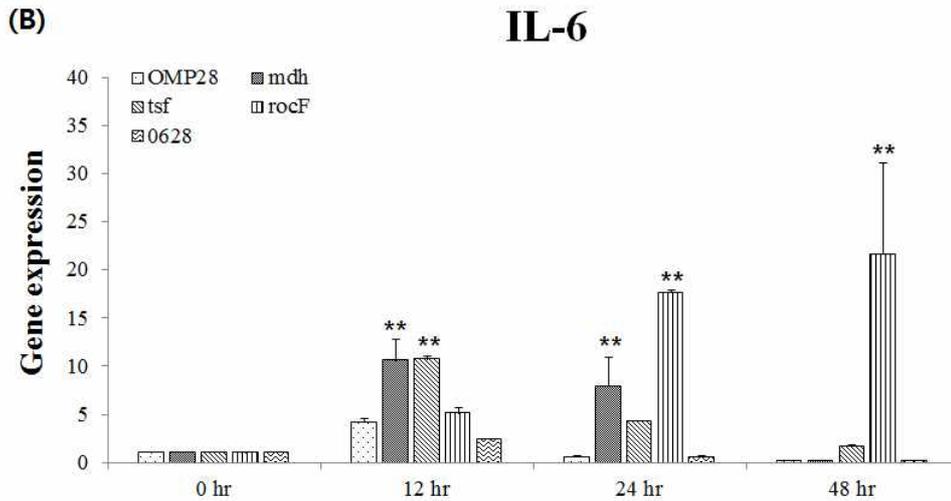


Fig. 92. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 IL-6 발현량 (** $p < 0.01$)

- Th1 면역반응과 관련이 있으며 염증반응시 IFN γ 와 CD4 $^+$ T cell의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있는 IL-12의 subunit인 IL-12p40의 발현 수준을 소 PBMC를 이용하여 확인하였다 (Fig. 93). 고면역원성 재조합 항원 5종을 각각 5ug 및 10ug의 농도로 자극을 시킨 결과 5ug의 농도 자극에서 12시간에 OMP28, mdh, tsf, rocF, 그리고 0628 모두 그 발현량이 0시간에 비하여 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 24시에 역시 OMP28, tsf, 그리고 0628 재조합 단백질을 처리한 실험군에서는 그 발현량이 많음을 확인할 수 있었다 (Fig. 93A). 반면에, 10ug의 농도를 처리한 실험군에 있어서는 12시간 때에 OMP28과 0628, 24시간 때에 mdh와 0628을 처리한 군에서만 IL-12p40의 발현이 증가하는 것으로 확인할 수 있었다 (Fig. 93B).

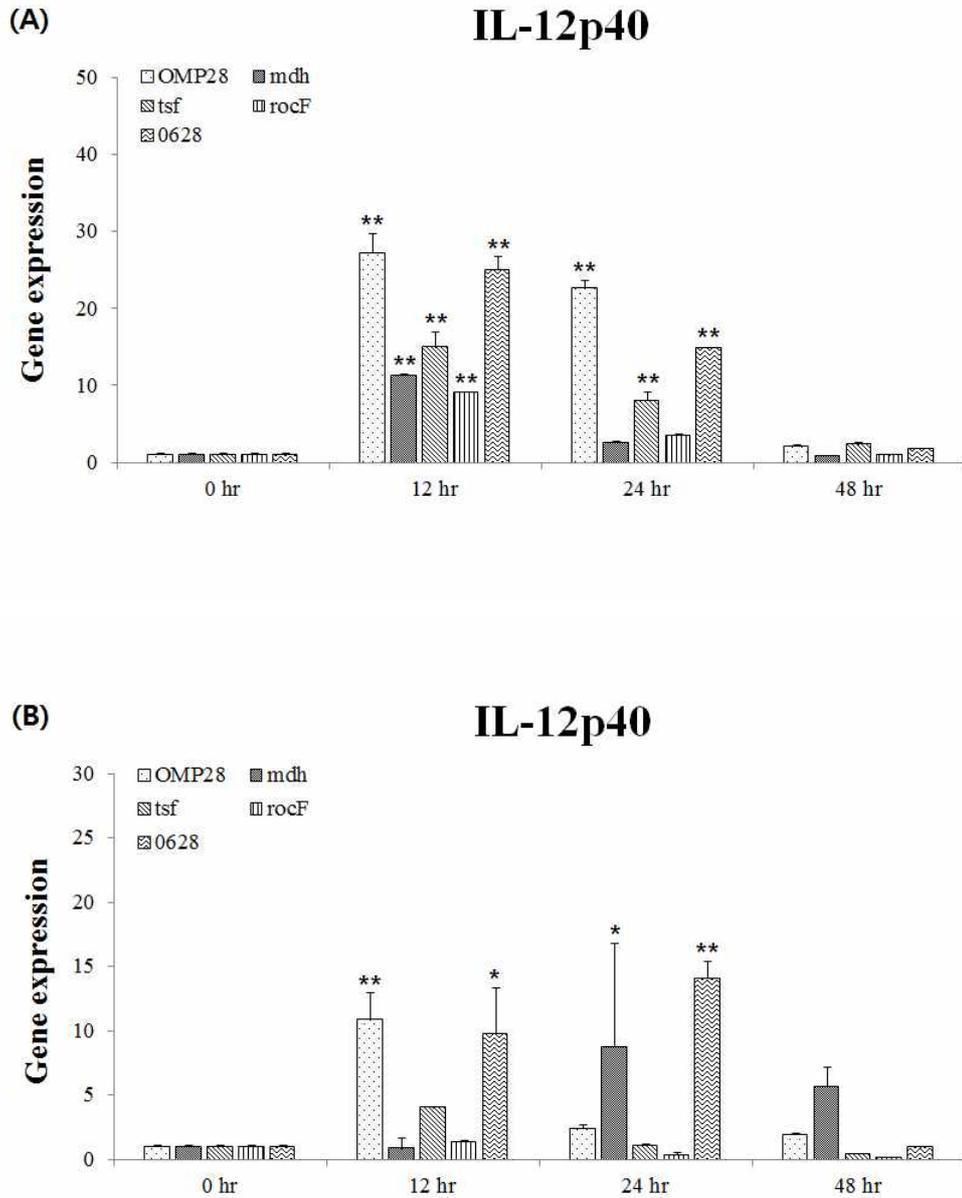


Fig. 93. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 IL-12p40 발현량 (* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- $IFN\gamma$ 는 세포성 면역인 Th-1 반응 유도에 관여하는 cytokine이며 소 PBMC에서 고면역원성 재조합 항원 5ug과 10ug으로 각각 자극하였을 때 5ug의 농도로 자극한 PBMC에서 12, 24, 그리고 48시간 후에 $IFN\gamma$ 유전자의 발현이 증가함을 확인할 수 있었지만, mdh와 rocF를 자극시킨 경우 12시간까지는 그 발현량이 증가하였지만 이후 24시와 48시간에 그 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 94A). 반면에, 10ug의 농도로 자극한 PBMC에서는 12시간 때 OMP28과 0628을

자극한 PBMC에서만 그 발현량이 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 94B).

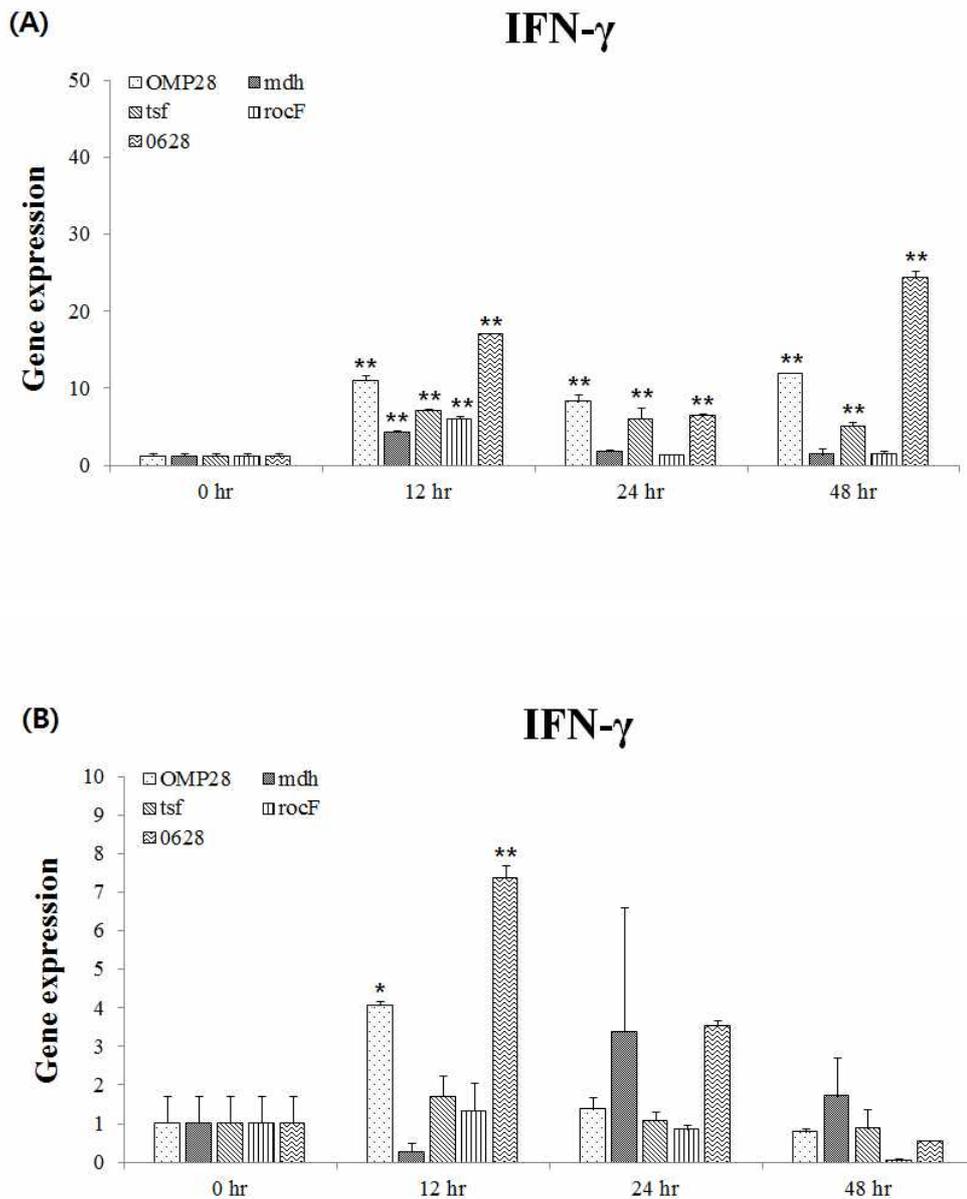


Fig. 94. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 IFN γ 발현량 (* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- 세포성 면역인 Th-1 반응 유도에 관여하는 TNF α 유전자의 발현정도를 관찰하기 위하여 소 PBMC에 고면역원성 재조합 항원 5종을 각각 5ug와 10ug으로 자극하였다. 5ug의 농도로 자극을 주었을 때의 유전자의 변화는 24시간 때에 tsf, 48시간 때에 tsf와 0628 단백질 자극군에서만 유의하게 변화가 있음을 확인할 수 있었다

(Fig. 95A). 반면에, 10ug의 농도로 자극을 주었을 때에는 12시간 때에 mdh, tsf, rocF, 24시간 때에 mdh, 그리고 48시간 때에 rocF 단백질 자극 실험군에서만 0시간에 비교하여 TNF α 유전자의 발현량이 유의하게 변화하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 95B).

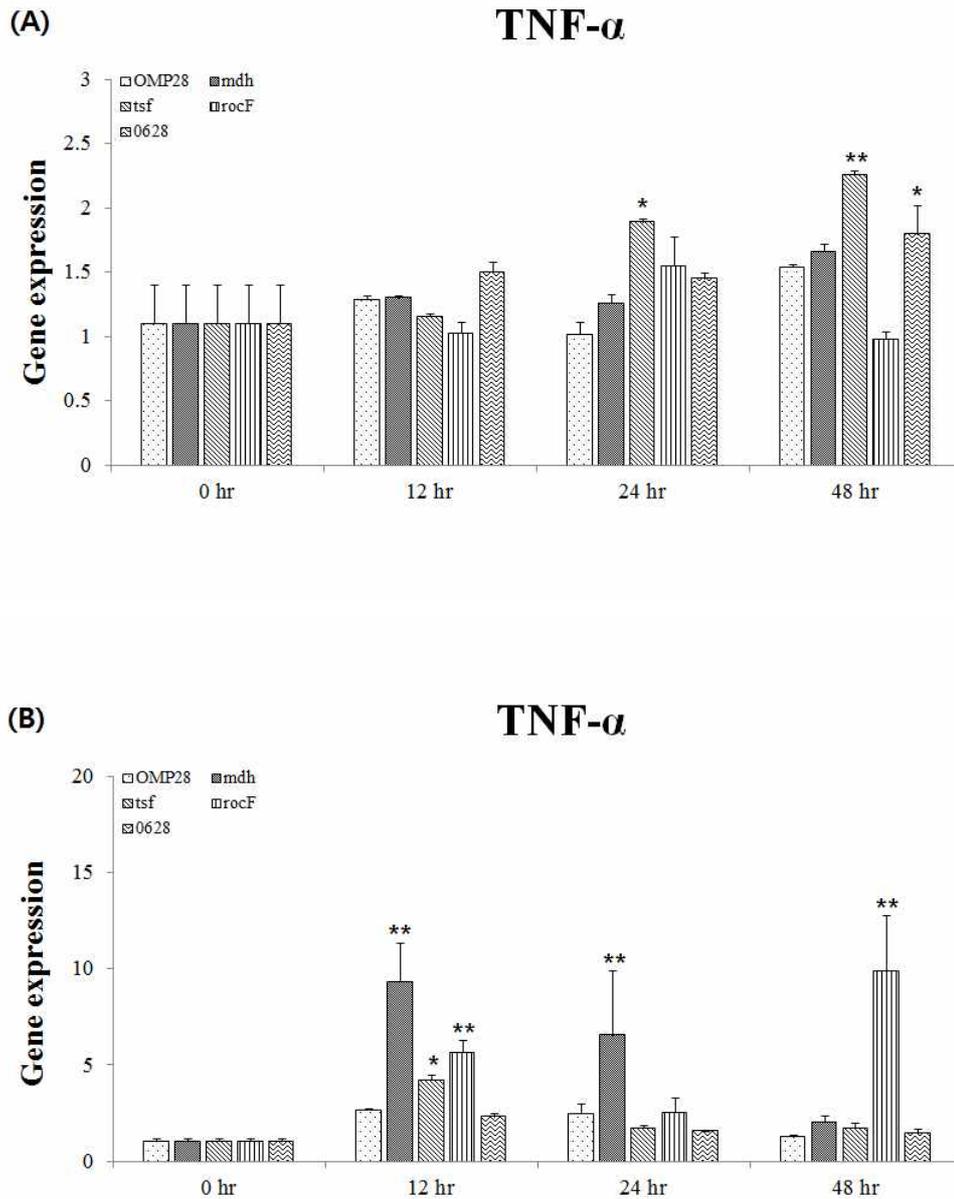


Fig. 95. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 TNF α 발현량 (* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- 결과적으로 5종의 고면역원성 재조합 항원으로 소 PBMC를 자극하였을 때, 세포 내에서의 염증반응과 관련이 있는 유전자의 발현 양상은 각각 5종의 고면역원성

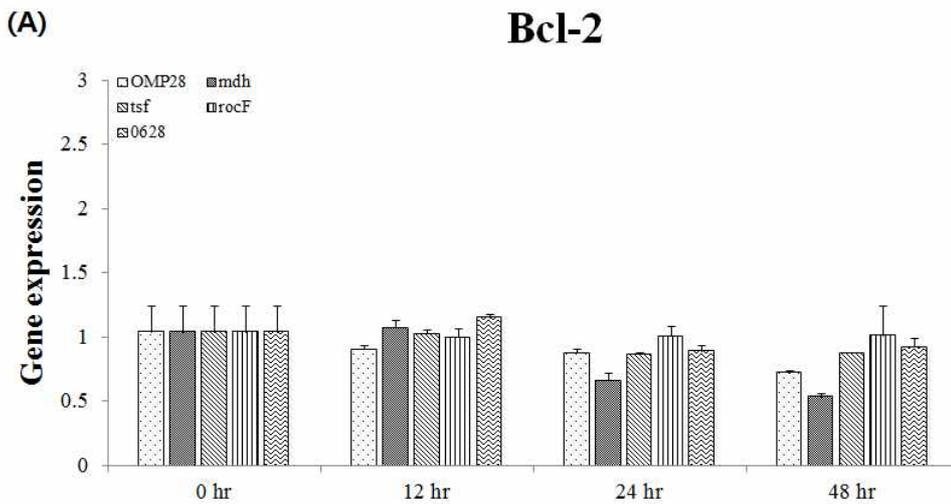
재조합 항원 농도와 시간의 변화에 따라 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

- 5ug의 농도로 처리한 실험군에 있어서는 IL-6, IL-12p40, 그리고 IFN γ 유전자의 발현이 12시간 때 모든 고면역원성 재조합 항원에서 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 이후 24시간, 48시간 때에는 유의하게 증가하는 발현량이 단백질의 종류에 따라 OMP28은 IL-12p40과 IFN γ , tsf는 IL-12p40, IFN γ , TNF α , rocF는 IL-1 β , IL-4, IL-6, 0628은 IL-12p40, IFN γ , TNF α 에서 각각 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 5종의 고면역원성 재조합 항원을 소 PBMC에 자극시킨 후 염증반응은 12시간까지 활발하게 발생하는 것으로 사료된다.

- 10ug의 농도로 처리한 실험군에 있어서는 고면역원성 재조합 항원의 종류와 자극 시간에 따라 각각의 유전자들의 발현량이 달라지는 것을 확인할 수 있었다.

나) Apoptosis 유전자의 발현 분석

- Bcl-2는 apoptosis 유발에 관여하는 조절 단백질이며 소 PBMC에서 고면역원성 재조합 항원 5종을 5ug, 10ug으로 각각 자극하였을 때 두 실험군 모두 발현량에 차이를 보이지 않았지만 10ug의 농도로 PBMC를 자극하였을 때 Bcl-2 유전자의 발현이 48시간에 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 96).



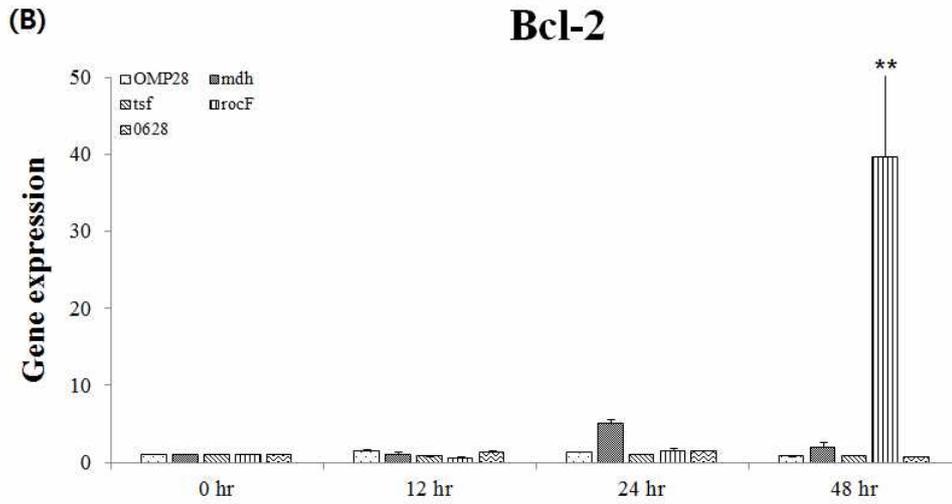
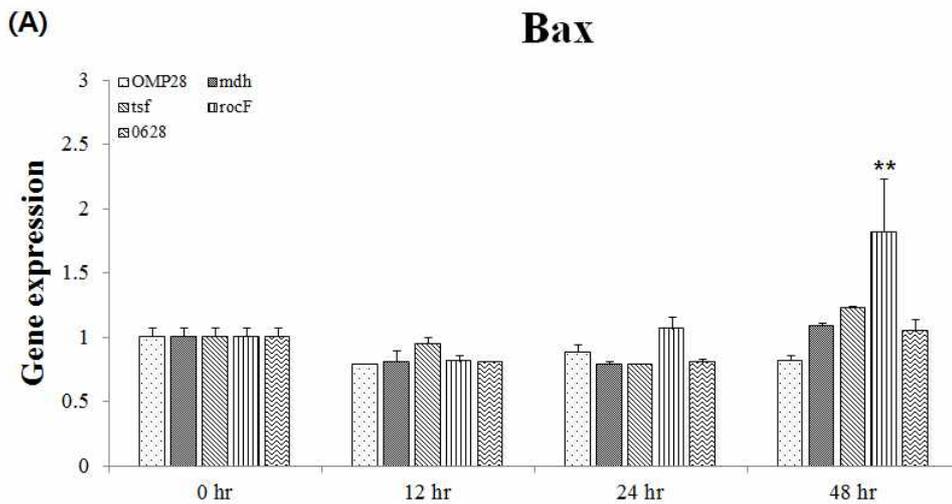


Fig. 96. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 Bcl-2 발현량 (** $p < 0.01$)

- Bax 또한 apoptosis 유발에 관여하는 조절 단백질로써 소 PBMC에서 고면역원성 재조합 항원 5종을 5ug, 10ug으로 각각 자극하였을 때 두 실험군 모두 발현량에 차이를 보이지 않았지만 5ug의 농도로 PBMC를 자극하였을 때 Bax 유전자의 발현이 점차 증가하여 48시간에 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 97).



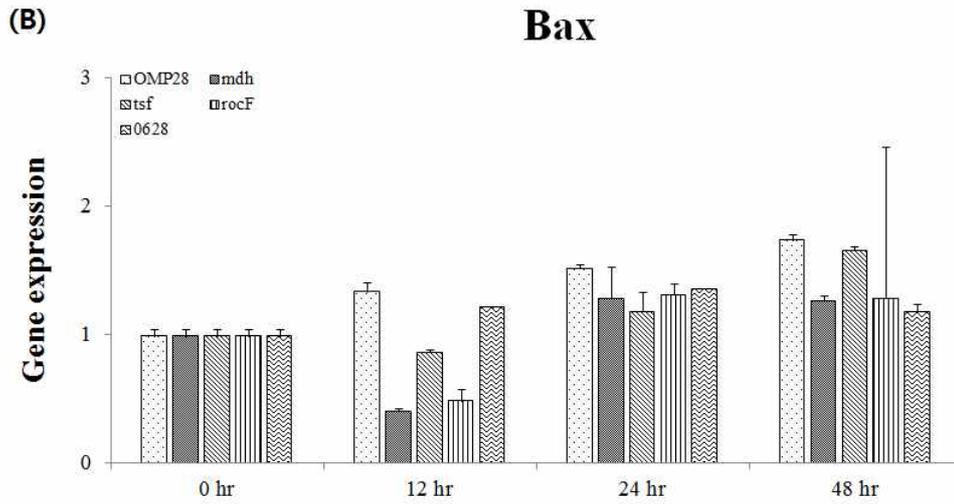
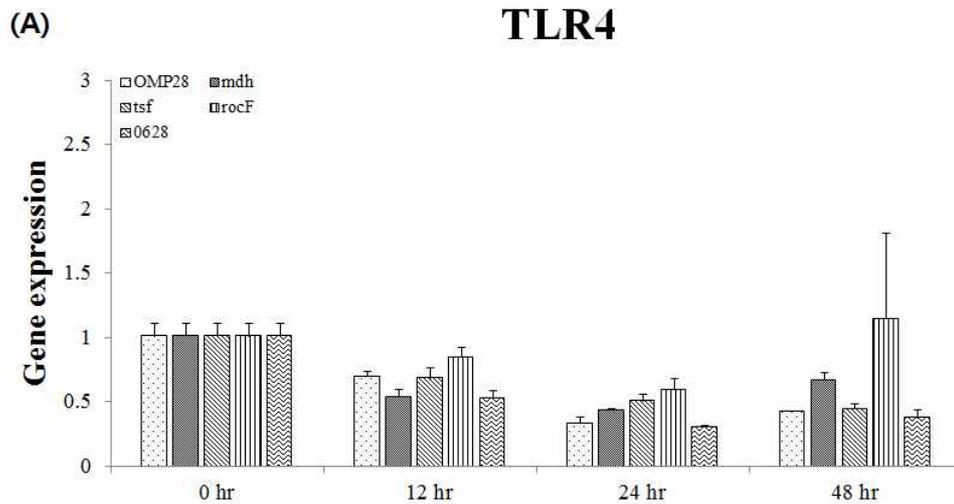


Fig. 97. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 Bax 발현량 (** $p < 0.01$)

- TLR4 apoptosis 유발에 관여하는 세포막 수용체이며 소 PBMC에서 고면역원성 재조합 항원을 각각 5ug, 10ug으로 자극하였을 때 시간이 지남에 따라 TLR4 유전자의 발현량의 변화가 발생하지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 98).



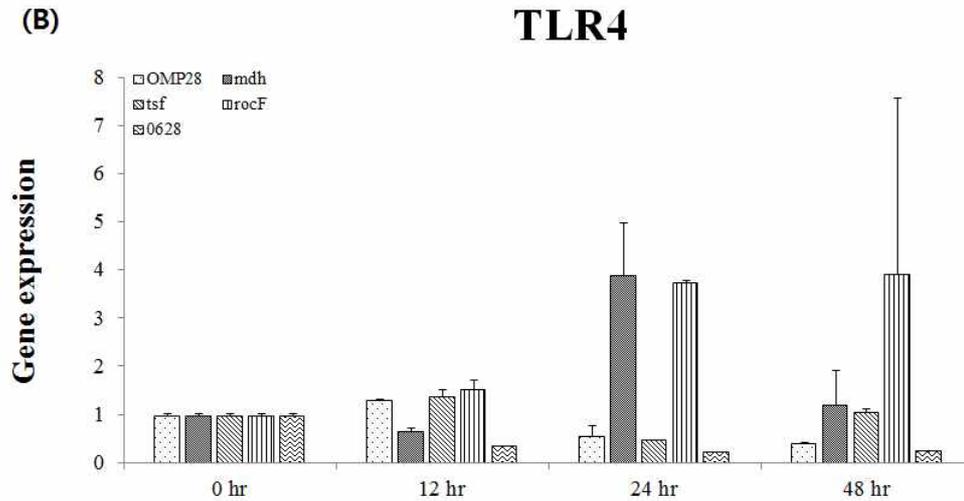


Fig. 98. 고면역원성 재조합 항원 5ug (A), 10ug (B) 자극에 대한 시간대별 TLR4 발현량

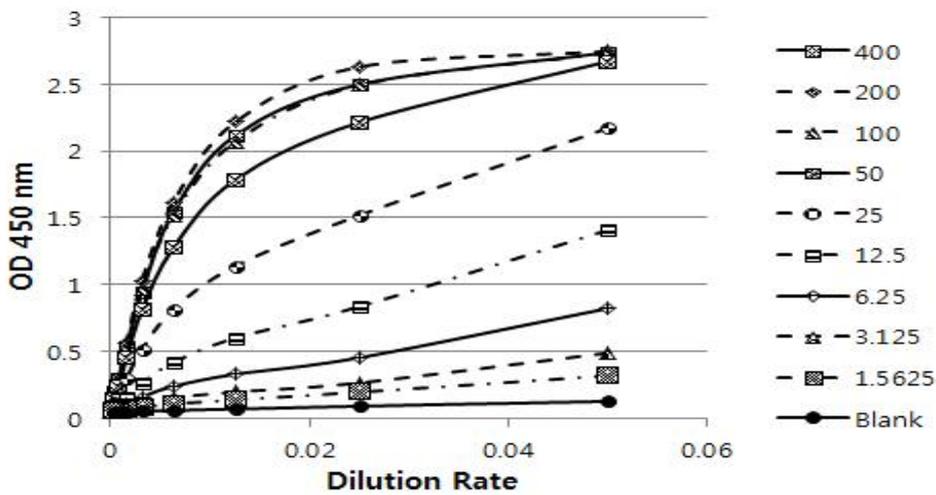
- 고면역원성 재조합 항원 5종을 각각 5ug 및 10ug의 농도로 소 PBMC에 자극을 가하였을 때, 시간이 지남에 따라 Bcl-2, Bax, 그리고 TLR4의 발현량의 변화가 유의적으로 나타나지 않았다.
- 하지만, 고면역원성 재조합 항원 (rocF) 의 경우 그 발현량의 차이가 48시간에 나타났지만 이는 지속적이지 않았으며 자극 농도와 시간에 따라 그 차이가 달라짐을 확인하였다.
- 결과적으로 고면역원성 재조합 항원 5종을 소 PBMC에 자극시킨 후 apoptosis 관련 유전자의 발현양상을 확인한 결과 이들 5종 모두 세포 사멸에 직접적인 원인을 제공하지 않는 것으로 사료된다.
- 또한, Apoptosis와 관련된 3개의 유전자 (Bcl-2, Bax, 그리고 TLR4)들을 5종의 고면역원성 재조합 항원 5ug과 10ug으로 각각 자극하였을 때의 발현 변화를 관찰한 결과 rocF를 5ug의 농도로 자극하였을 때 48시간에 Bax 유전자가 유의성 있게 증가하는 것을 확인하였으며 10ug의 농도로 자극하였을 때는 48시간에 Bcl-2 유전자가 증가하는 것을 확인하였다. 이외의 모든 유전자에 있어서 고면역원성 재조합 항원의 농도 및 시간에 따른 유전자의 발현변화에 대한 유의성이 나타나지 않았음을 확인하였다.

8. 고면역원성 재조합 항원을 이용한 감염우 혈청반응 기준 확립

(1) 고면역원성 재조합 항원을 이용한 ELISA 진단 기준 확립

- 5종의 고면역원성 재조합 항원과 야외 감염우 혈청과의 반응을 측정하기 위한 기준을 확립하고자 ELISA 기법을 이용하였다.
- 야외 감염우 양성 혈청 및 음성 혈청은 1/20부터 1/2560까지 2배씩 순차적으로 희석하였으며 고면역원성 재조합 항원 (OMP28)은 400ng부터 1.5625까지 순차적으로 희석하여 Check board titration을 실시하였다 (Fig. 99).

(A) Optimal concentration of Antigen (Positive)



(B) Optimal concentration of Antigen (Negative)

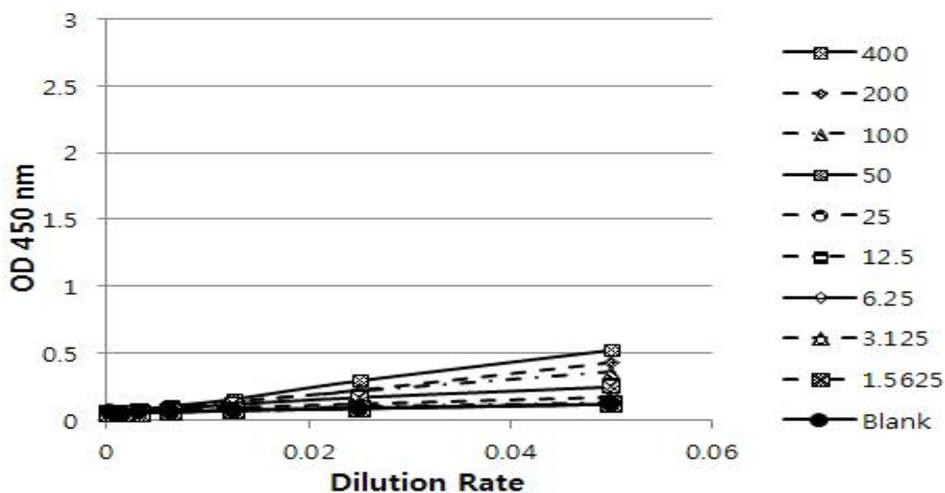


Fig. 99. 항원 및 항체 농도 검사 (A) 양성 혈청 및 (B) 음성 혈청 반응

- ELISA 기법을 이용하여 적정 항원 및 항체 농도를 설정한 뒤, 브루셀라 양성 혈청 및 음성혈청을 이용하여 직접적인 ELISA를 실시하였다.
- 5종의 고면역원성 재조합 항원을 25ng의 농도로 coating을 실시한 뒤, 1/40의 양성 혈청 및 음성 혈청을 이용하여 반응시킨 결과 OMP28은 브루셀라 음성혈청에 비하여 양성혈청에서 유의성 있는 뚜렷한 증가를 나타내었으나, 다른 4종의 항원들에서는 음성혈청과 양성혈청간에 유의성 있는 차이를 나타내지 못하였다 (Fig. 100).

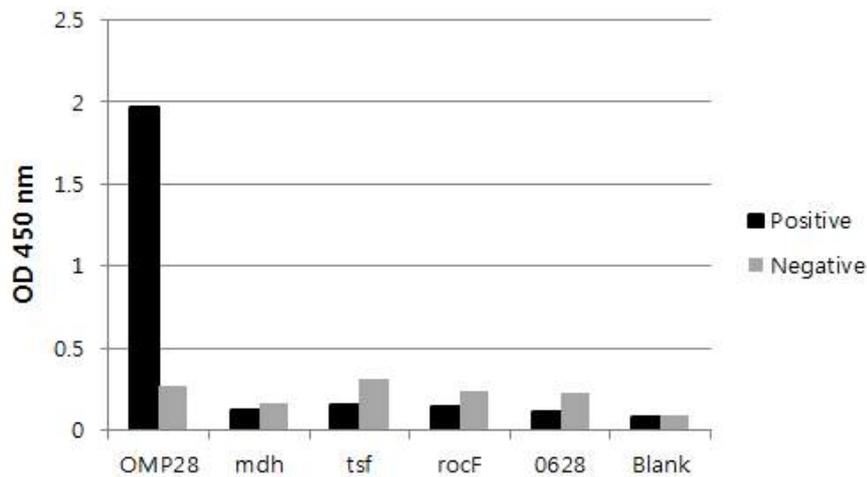


Fig. 100. 고면역원성 재조합 항원에 따른 ELISA 양성 혈청 및 음성 혈청 반응

- 제 1 세부 연구팀으로부터 추가적으로 고면역원성 재조합 항원을 제공받아 위와 같은 연구를 지속적으로 수행하여 가장 높은 특이도와 민감도를 나타내는 항원을 발굴하는 실험을 진행하였다.

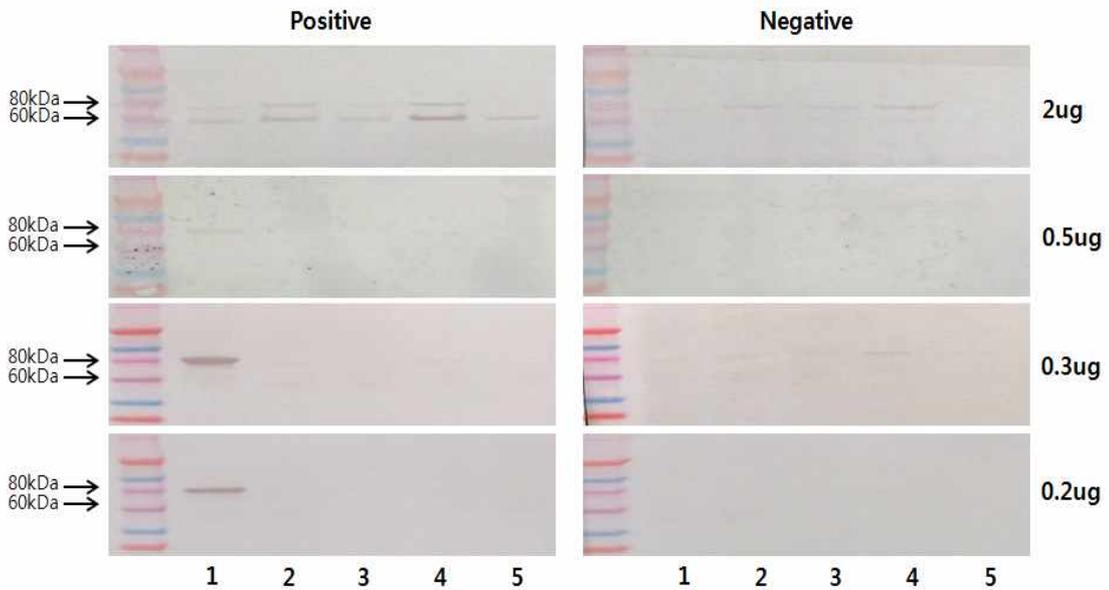
(2) 고면역원성 재조합 항원을 이용한 Western blot

- 고면역원성 재조합 항원 5종을 정제하여 목적동물 (소)의 혈청을 이용한 민감도를 western blot을 통하여 확인하였다. 브루셀라 양성 혈청 및 음성 혈청을 1차 antibody로 사용하여 적정 항원 및 항체 농도를 확인하였다 (Fig. 101).
- Western Blot은 다음과 같은 방법으로 실행하였다.

: BCA assay를 통하여 5종의 고면역원성 재조합 항원의 농도를 기준으로 0.2ug, 0.3ug, 0.5ug, 그리고 2ug의 4가지 항원 농도를 준비하였다.

: 이들 고면역원성 재조합 항원들을 NuPAGE kit (Invitrogen, US)를 이용하여 loading sample을 제작하고 이렇게 제작된 sample들을 100°C heat block에서 8분간 방치 후 전기영동을 실시한 후 iBlot Gel Transfer System (Invitrogen, US)을 이용하여 transfer를 실시한다. Transfer 실시 후 5% skim milk를 이용하여 blocking을 1시간 실시한 후, primary antibody로 사용할 양성 혈청 (1:100)과 음성 혈청 (1:100)을 준비하여 4°C에서 overnight을 실시한다.

: Primary antibody를 제거한 후, 1X TBS를 이용하여 washing (3회)을 실시한 뒤, secondary antibody (Rabbit anti-bovine IgG AP, Sigma, US)를 처리한 뒤 2시간동안 상온에 방치한 후, 1X TBS를 이용하여 washing (3회)을 실시한 뒤, AP conjugate substrate kit (BIO-RAD, US)를 이용하여 development를 실시하였다.



1: OMP28 (88kDa) 2: mdh (93kDa) 3: tsf (91kDa) 4: rocF (93kDa) 5: O628 (85kDa)

Fig. 101. 5종의 고면역원성 재조합 항원을 이용한 농도별에 따른 Western blot

- 결과적으로 고면역원성 재조합 항원 5종을 이용하여 브루셀라 감염시기별 감염우를 효율적으로 진단을 위해 ELISA 및 Western blot 기법을 확립하였다. ELISA를 통하여 각각의 고면역원성 재조합 항원의 적정 농도 및 감염 혈청의 적정 농도를 조사하기 위하여 OMP28 항원을 이용한 check board titration을 실시하여 그 기준을 설정하였으며 Western Blot을 이용하여 각 시기별 감염우 혈청의 민감도를 확인하고자 적정 항원 농도에 실험을 실시하였다.

- 그 결과 OMP28을 제외한 다른 항원에서의 감염우 혈청에 대한 민감도 반응은 나타나지 않음을 확인하였다. 이는 ELISA를 통한 민감도 검사의 결과와도 일치함을 보인다. 따라서, ELISA 및 Western blot을 이용한 브루셀라 감염우 혈청과 고면역원성 재조합 항원과의 반응검사를 위한 기법을 확립한 것으로 평가된다.

9. Recombinant protein을 이용한 혈청 민감도 검사 실시

(1) Recombinant protein 정제 및 SDS-PAGE and Western blot

: 재조합 단백질 (9종)들과 혈청 (야외가검혈청)들과의 반응성 검사를 통한 혈청학적 진단을 위한 항원후보 물질 탐색을 위해 실험을 진행하였다.

- SDS-PAGE 와 Western blot을 통한 재조합 단백질 검증 및 야외가검혈청과의 반응성을 확인하기 위하여 다음과 같은 과정으로 실험을 진행하였다 (Fig. 102).

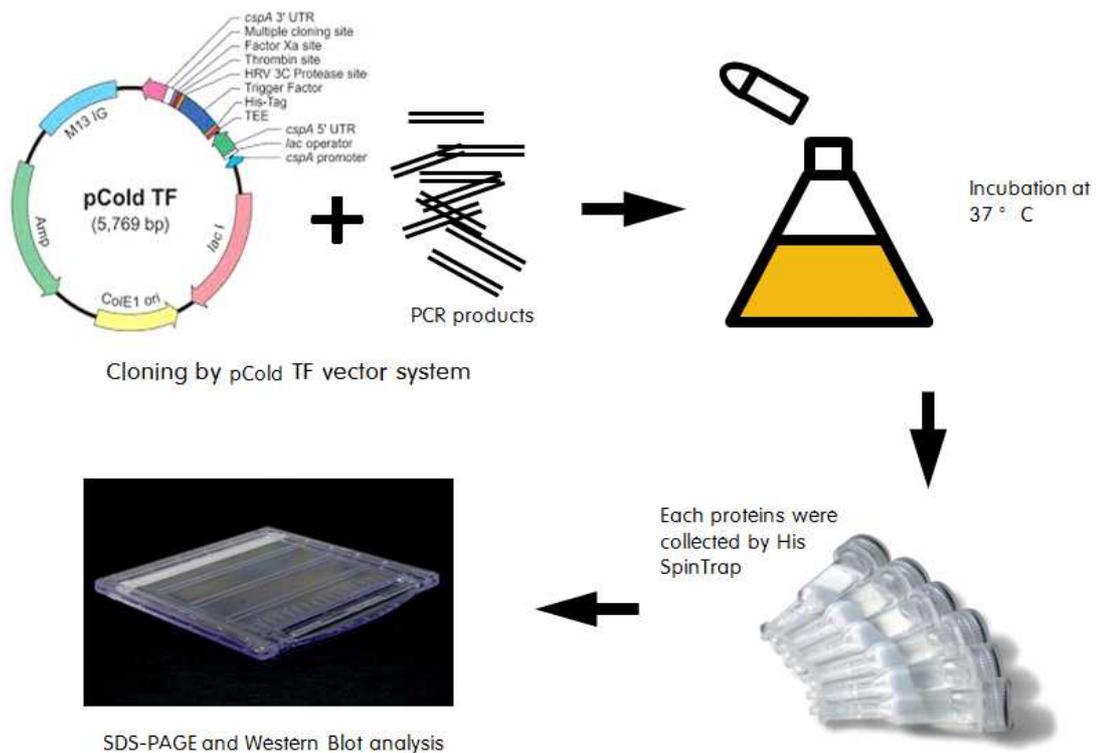


Fig. 102. SDS-PAGE 및 Western blot 모식도

- Western Blot은 다음과 같은 방법으로 실행하였다.

: BCA assay를 통하여 9종의 고면역원성 재조합 항원 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, OsmC, TbpA OMP10, and OMP19)의 농도를 기준으로 0.3ug의 재조합 단백질들을 준비하였다.

: 이들 고면역원성 재조합 항원들을 NuPAGE kit (Invitrogen, US)를 이용하여 loading sample을 제작하고 이렇게 제작된 sample들을 100°C heat block에서 8분간 방치 후 전기영동을 실시한 후, iBlot Gel Transfer System (Invitrogen, US)을 이용하여 transfer 한 뒤 5% skim milk를 이용하여 blocking을 1시간 실시하고 primary antibody로 사용할 양성 혈청 (1:100)과 음성 혈청 (1:100)을 준비하여 4°C에서 overnight을 실시하였다. 그리고 다음날 1X TBS를 이용하여 washing (3회)을 실시한 뒤, secondary antibody (Rabbit anti-bovine IgG AP, Sigma, US)를 처리한 뒤 2시간동안 상온에 방치한 후, 1X TBS를 이용하여 washing (3회)을 실시한 뒤, AP conjugate substrate kit (BIO-RAD, US)를 이용하여 development를 실시하였다 (Fig. 103).

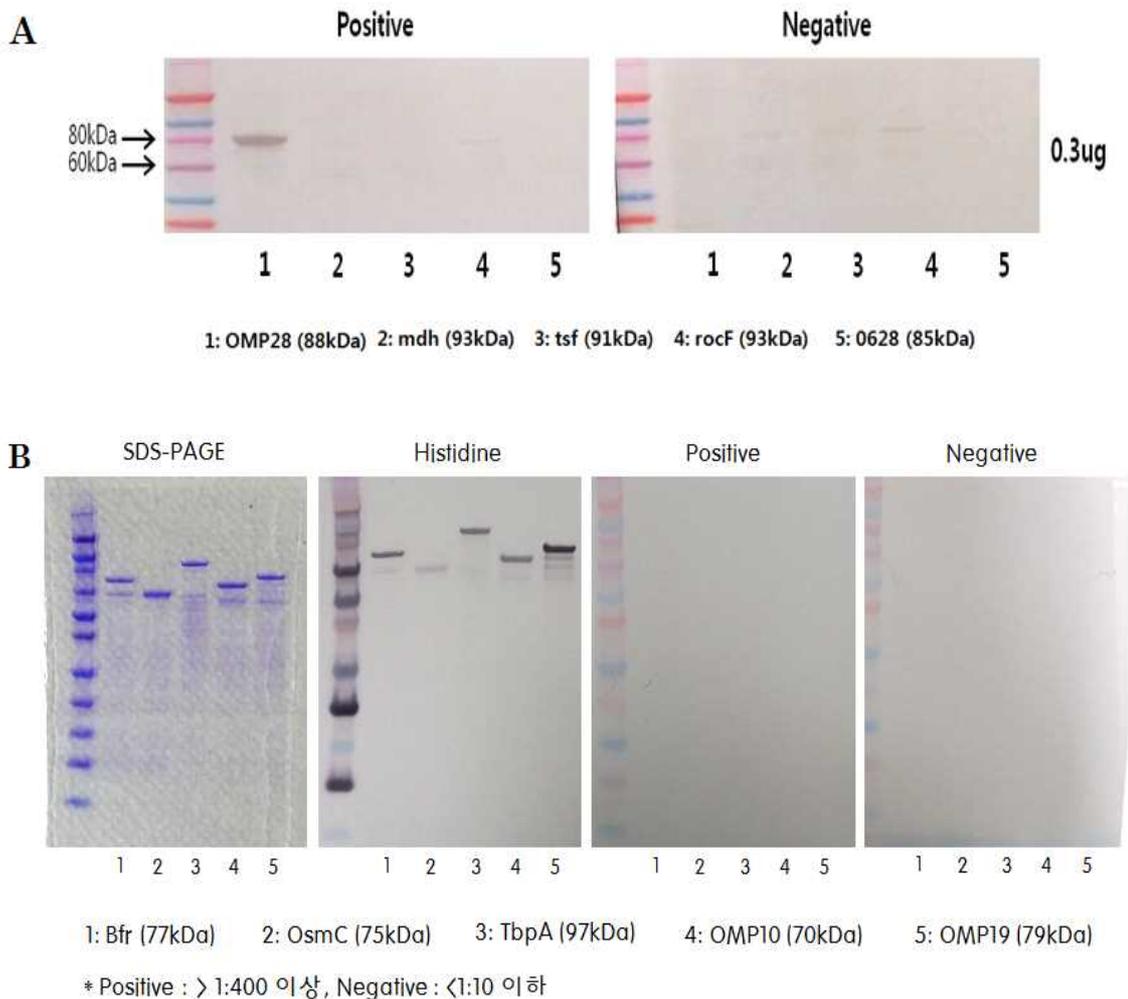


Fig.103. Western blot을 통한 혈청학적 분석. (A) OMP28, mdh, tsf, rocF, 그리고

0628. (B) Bfr, OsmC, TbpA, OMP10, 그리고 OMP19

- 10종의 재조합 단백질을 이용하여 Western blot을 실시한 결과 OMP28 단백질만이 민감도가 높게 발현하는 것을 확인하였다. 반면에, OsmC 재조합 단백질의 경우에는 SDS-PAGE 결과에서 예상되어지는 단백질의 크기와 다르게 나오는 것을 확인하여 향후 실험에 있어서 적합하지 않을 것으로 판단하였다.
- 또한, 5가지 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628)을 이용하여 ELISA를 실시하였다 (Fig. 104).

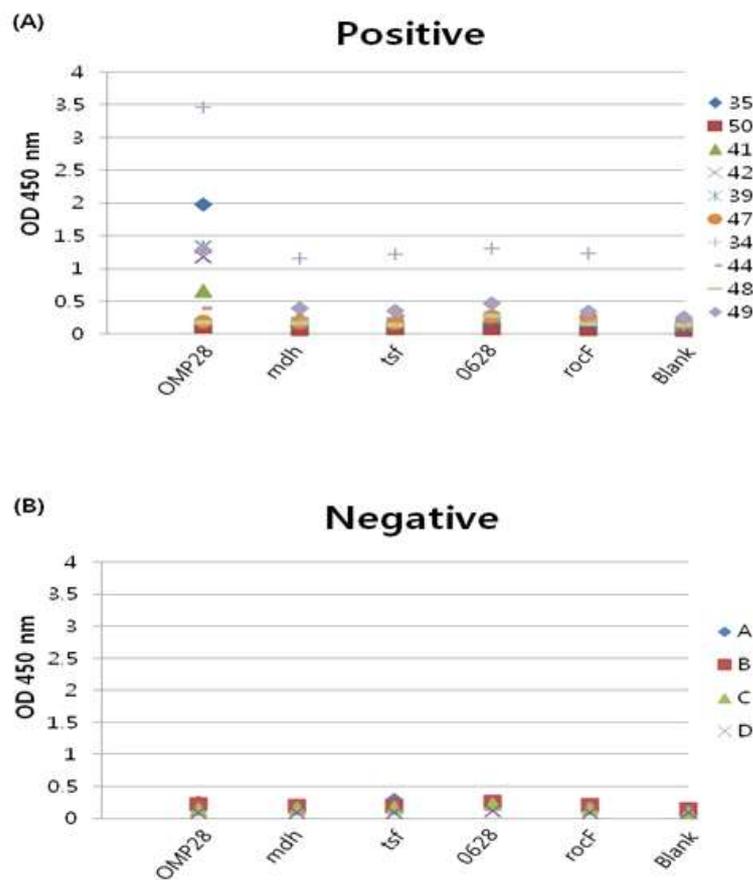


Fig. 104. 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628)을 이용한 ELISA 분석

- 총 10개의 positive sera 와 4개의 negative sera를 이용하여 ELISA 분석을 실시한 결과 Western blot 결과와 동일하게 OMP28 재조합 단백질만이 민감도가 높게 나타나는 것을 확인하였으며 다른 재조합 단백질에 있어서는 민감도 변화의 차이가 크지 않음을 확인하였다. 따라서, 이러한 결과는 각각의 야외가검혈청에 따라 고면역원성 재조합 단백질의 민감도에 차이가 발생할 것으로 판단된다.

- 브루셀라 감염시기별 혈청에 대한 고면역원성 재조합 단백질의 민감도를 분석하기 위하여 실험동물(소)에 직접 공격접종을 실시한 후, 29일 49일 그리고 70일 째에 혈액을 회수하여 인공감염우 혈청을 확보하였다.
- 인공감염우 혈청을 이용하여 5개의 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628)과의 반응성 실험을 실시하였다 (Fig. 105).

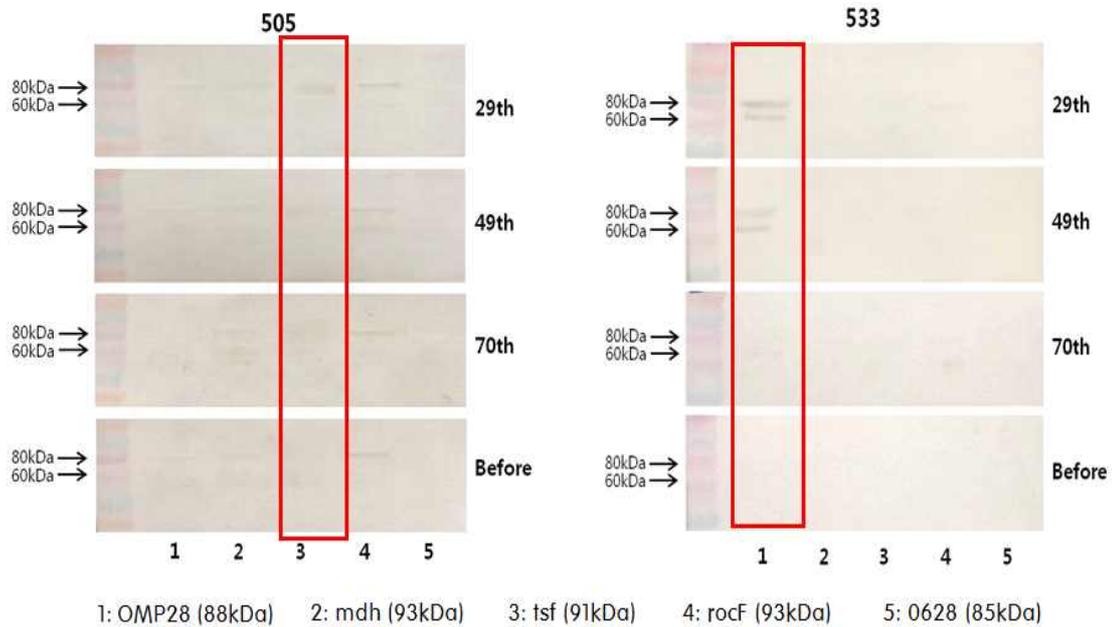
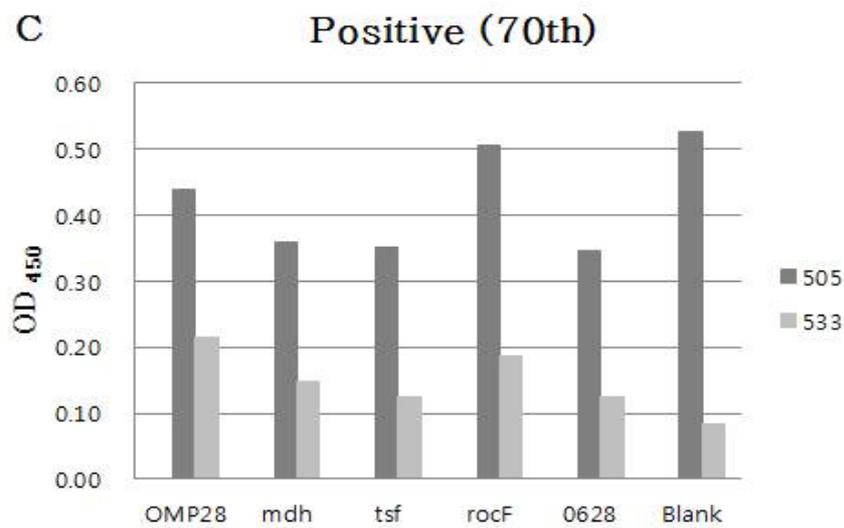
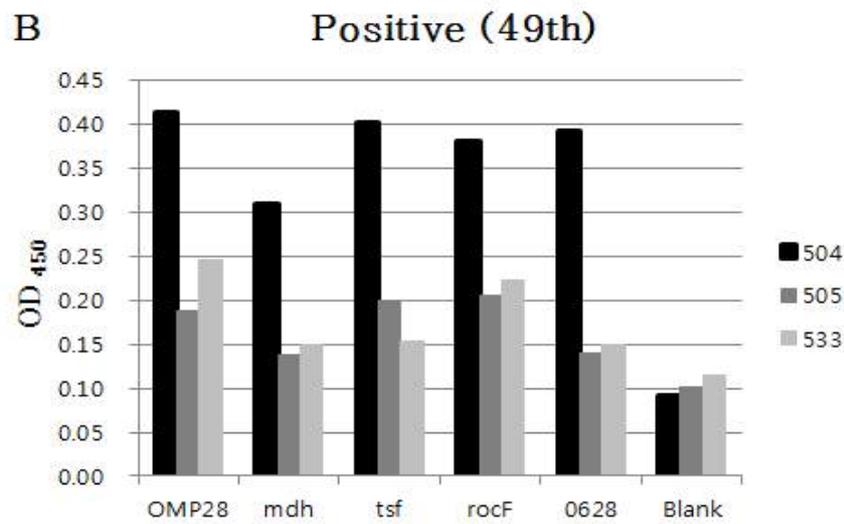
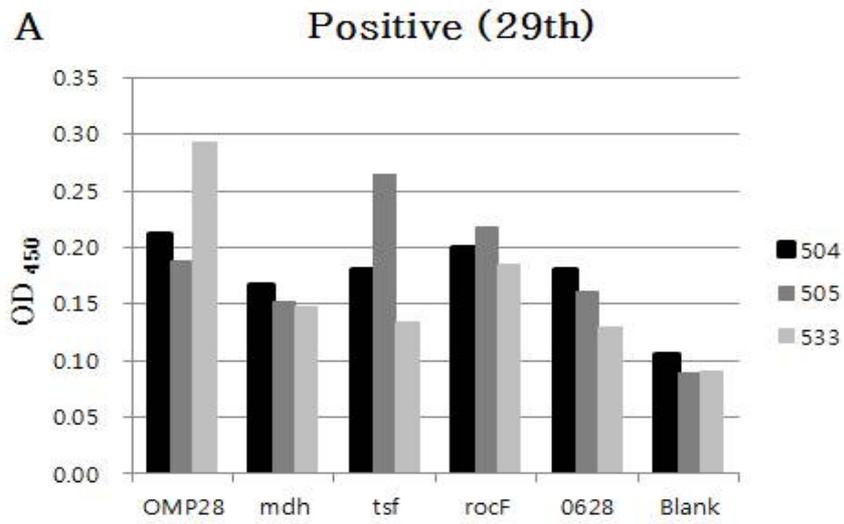


Fig. 105. Western blot을 통한 인공감염우 혈청을 이용한 재조합 단백질과의 반응성 분석

- 위의 그림에서 확인할 수 있듯이 505개체의 혈청은 tsf 재조합 단백질과의 반응성을 나타냈으며 533개체의 혈청은 OMP28과의 반응성이 높게 나타났다. 따라서, 각각의 고면역원성 재조합 단백질의 반응성에 있어서 개체간의 차이가 있음을 확인하였다.

또한, ELISA를 통하여 혈청학적 분석을 실시하였다 (Fig. 106).



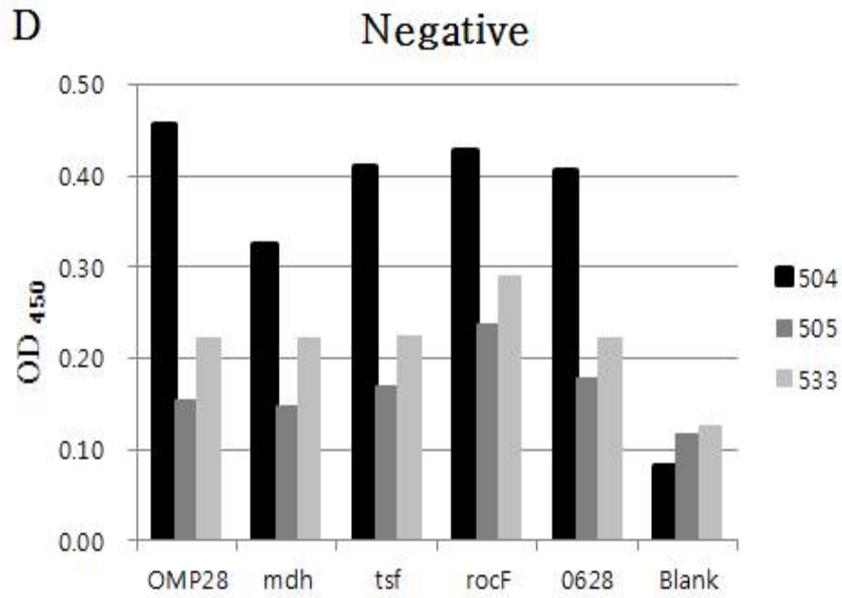
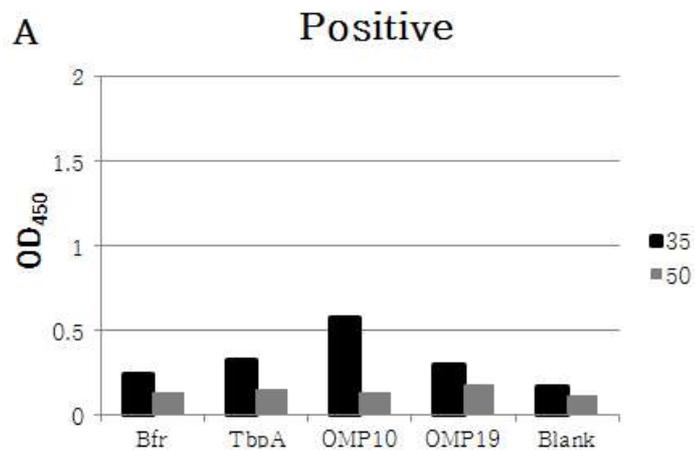


Fig. 106. 인공감염우 공격접종 후 (A) 29일, (B) 49일, (C) 70일, (D) 음성혈청을 통한 ELISA 분석

- ELISA를 통한 고면역원성 재조합 단백질들의 반응성 실험 결과 인공우감염 혈청에서는 유의성 있는 차이를 나타내지 않음을 확인하였다. 그리고 추가적으로 실시한 Bfr, TbpA, OMP10, OMP19 재조합 단백질의 ELISA의 반응성 역시 유의성을 확인하지 못하였다 (Fig. 107).



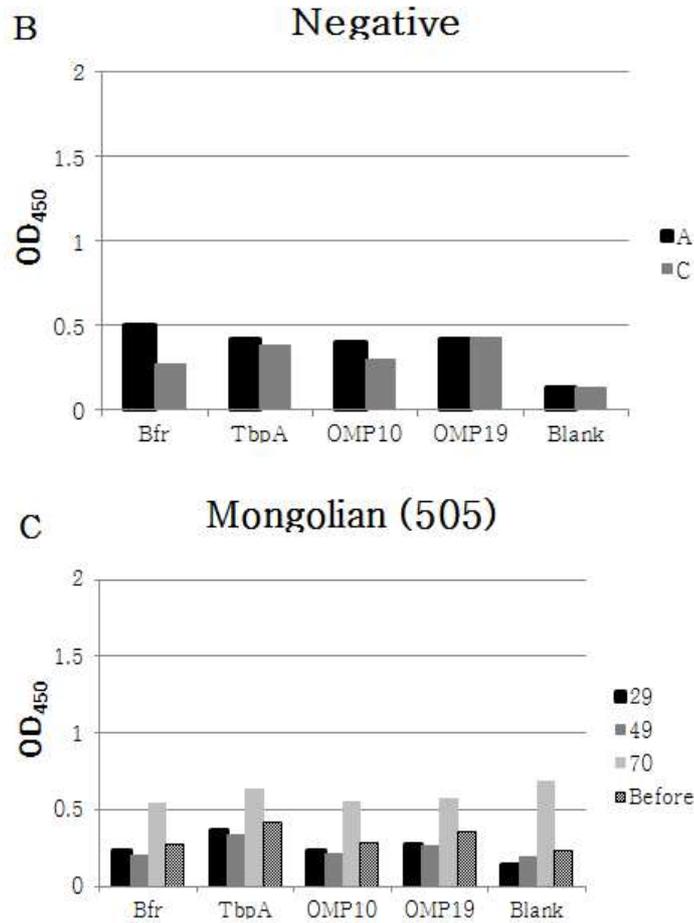


Fig. 107. 고면역원성 재조합 단백질 (Bfr, TbpA, OMP10, OMP19)을 이용한 ELISA 분석. (A) 양성 야외가검혈청, (B) 음성 혈청, (C) 인공감염우 혈청

10. RAW 264.7 cell에서의 고면역원성 재조합 단백질 자극에 따른 면역매개물질 (Nitric Oxide 및 cytokines) 발현 분석

: 고면역원성 재조합 단백질에 의한 면역세포 (Macrophage)의 직접적인 면역유도 반응을 분석하기 위하여 NO 및 염증성 cytokines의 발현 양상을 분석하였다.

- 연구수행은 다음과 같은 방법을 통하여 진행하였다.

: RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂하에서 배양을 실시하여 RAW 264.7 cell을 1 x 10⁶ cells / ml로 12 well plate에 옮겨서 8시간동안 안정화를 시킨다. 이때, 2% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지를 사용하였다. 안정화 과정 후, 9가지 고면역원성 재조합 단백질을 10 ug / well의 농도로 RAW 264.7 cell을 자극시켰다. 고면역원성 재조합 단백질 자극 후, 4, 8, 24, 그리고 48 시간째 RAW 264.7 cell 상층액을 수거하여 NO assay 및 ELISA 실험을 실시하

였다.

(1) RAW 264.7 cell에 고면역원성 재조합 단백질 자극 후 NO assay을 통한 면역매개물질인 Nitric oxide 발현량 분석

- 9가지 고면역원성 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, 그리고 OMP19)을 이용하여 Nitric Oxide의 발현량을 NO assay 방법을 이용하여 분석하였다 (Fig. 108).

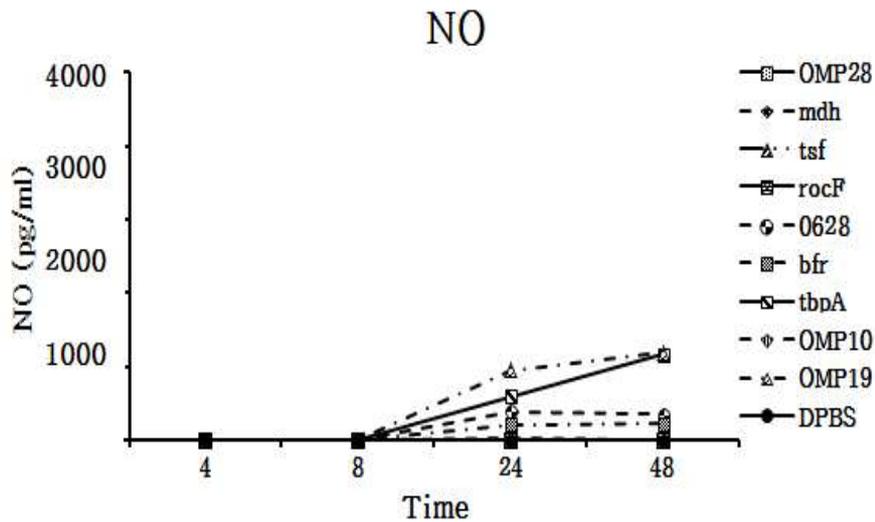


Fig. 108. 고면역원성 재조합 단백질 자극에 시간에 따른 Nitric Oxide 발현 변화 분석

- NO assay 결과 시간이 지남에 따라 면역매개물질인 NO 발현량이 점차 증가하는 것을 관찰할 수 있다 (Fig.51.A). 또한, 고면역원성 재조합 단백질 자극 후, 24 시간과 48시간에 0628, Bfr, TbpA, OMP19의 NO 발현량이 크게 증가했음을 확인하였다.

- 따라서, 재조합 단백질 자극을 통한 Raw 264.7 cell의 면역반응이 유도됨을 확인하였다.

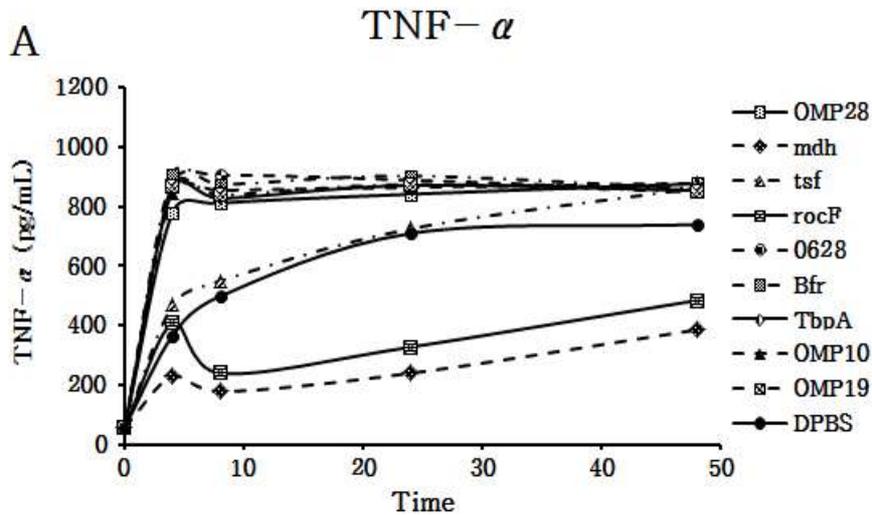
(2) RAW 264.7 cell에 고면역원성 재조합 단백질 자극 후 ELISA를 통한 pro-inflammatory cytokines 발현량 분석

- Raw 264.7 cell에 고면역원성 재조합 단백질 자극 후, pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IFN- γ , TNF- α)의 발현유도를 확인하고자 ELISA 실험을 실시하였다.

- ELISA는 다음과 같은 방법으로 실시하였다 (ebioscience, ready-set-go kit).

: 각각의 cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IFN- γ , TNF- α)의 capture antibody를 96 well plate에 coating 한 뒤, 4°C에서 overnight 시켰다. 다음날 1X PBST (300ul)를 이용하여 washing을 3회 실시하고 1X assay diluent를 200ul 넣고 1시간동안 상온에서 blocking을 실시하였다. 그 후 standard 및 각각의 상층액 샘플을 준비하여 100ul 씩 넣고 2시간동안 상온에서 반응시켰다. 다음으로 1X PBST (300ul)를 이용하여 washing을 3회 실시한 후 1X assay diluent에 희석한 detection antibody 100ul를 넣고 1시간동안 상온에서 반응시켰다. 다시 1X PBST (300ul)를 이용하여 washing을 3회 실시하고 1X assay diluent에 희석한 Avidin-HRP 100ul를 넣고 30분동안 상온에서 반응시킨 후, 1X PBST (300ul)를 이용하여 washing을 5회 실시하였다. 마지막으로 100ul의 substrate solution을 넣고 상온에서 15분간 발색을 실시하고 50ul의 STOP solution을 넣어 준 뒤 450nm에서 plate를 reading 하였다.

- 위와 같은 방법으로 ELISA를 실시한 결과 TNF- α 와 IL-6의 발현 유도를 확인하였다 (Fig. 109).



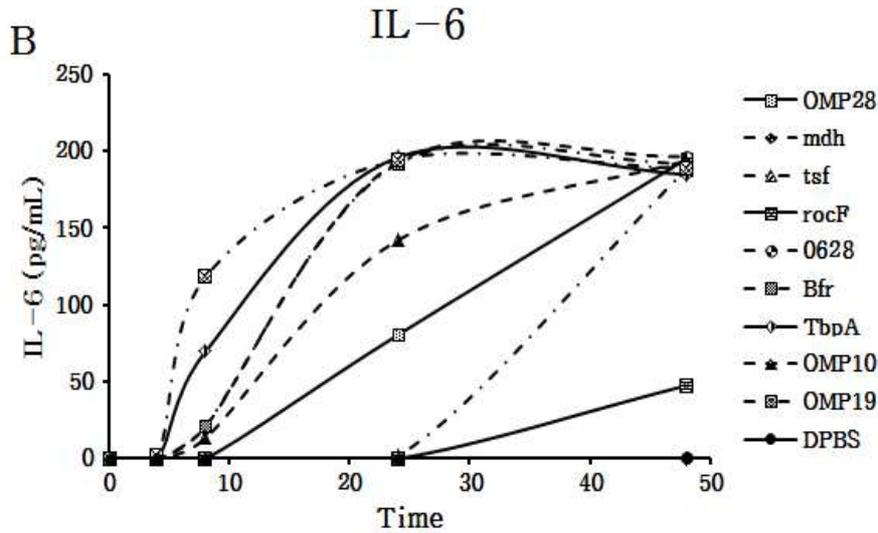


Fig. 109. 고면역원성 재조합 단백질 자극 후, 시간대별 (A) TNF- α 와 (B) IL-6 발현량 분석

- ELISA 분석 결과 TNF- α 는 시간이 지남에 따라 발현량이 증가함을 확인하였으며, IL-6의 발현량은 고면역원성 재조합 단백질 마다 다르게 나타나는 것을 확인하였다.
- IL-1b, IL-12p70, IFN- γ 3개의 cytokines의 발현은 모든 재조합 단백질에 있어서 검출량 이하로 유도하는 것으로 확인되었다.
- 따라서, 고면역원성 재조합 단백질에 의한 Raw 264.7 cell의 면역 유도능 실험은 Th2 면역반응을 유도시키는 IL-6의 발현이 시간이 지남에 따라 증가하는 양상을 보이는 것으로 확인되어 Th1보다는 Th2반응을 유도하는 것으로 판단된다.

11. In vivo 면역 또는 Prime 된 후 면역기관에서의 면역반응 유도능 분석

- : 고면역원성 재조합 단백질로 면역된 동물의 면역기관 (splenocytes)에서의 면역반응 유도능 분석을 실시하였다.
- 9종의 고면역원성 재조합 단백질을 각각 30ug 농도로 BALB/C 마우스 복강을 통해 접종한 후 14일 후 2차 접종을 실시하여 In vivo 면역 동물모델을 확보하였다 (서울대학교 실험동물 위원회 승인번호: SNU-150225-2-1 and SNU-150302-2-1).
- 면역 동물모델로부터 3, 7, 14, 28일 후 심장채혈을 통하여 혈액을 확보한 뒤, 확보된 혈액으로부터 혈청을 분리 ELISA 실험에 사용하였다.

- 또한, 면역시킨 후 28일째 BALB/c mouse로부터 spleen을 제거하여 splenocyte를 확보하였다. Splenocyte 회수는 다음과 같은 방법으로 실시하였다.

: 면역된 mouse로부터 spleen을 제거하여 70% 알코올을 이용하여 washing을 실시한 뒤 RPMI1640 (10% FBS) 배지를 이용하여 spleen을 다시 washing 한 후 spleen을 분쇄하고 strainer (100um)를 이용하여 여과시킨 후 300 x g에서 7분간 centrifugation을 실시한다. 그다음 모아진 pellet에 2 mL의 red blood cell (RBC) lysis buffer에서 2분간 lysis 시킨 후 40ml의 RPMI 1640 (10% FBS)를 넣어서 잘 섞어준 뒤 300 x g에서 7분간 centrifugation을 실시한 후 다시 20ml의 RPMI1640 (10% FBS)을 넣어 pellet을 부유시킨 후 centrifugation을 2-3회 실시한다. 마지막 washing 뒤 5ml의 RPMI1640 (10% FBS)를 넣어 pellet을 부유시킨 후 cell counting을 실시하였다.

- 이렇게 확보된 splenocytes를 이용하여 면역세포의 변화를 확인하기 위한 ELISpot을 실시하였다.

(1) 고면역원성 재조합 단백질 자극에 의한 Naive splenocytes로부터 면역매개물질 발현량 비교

- Normal BALB/C mouse의 spleen으로부터 splenocyte를 분리하여 5×10^6 cell / well로 12 well plate에 옮긴 후 9종의 단백질을 10ug의 농도로 자극하였다.

- 재조합 단백질 자극 후 12, 24시간째 상층액을 수거하여 면역매개 cytokine (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5)의 발현량을 ELISA를 통하여 비교 분석하였다 (Fig. 110-111).

- IFN- γ 와 IL-2는 Th1 면역에 관여하는 cytokines로 잘 알려져 있으며 IL-4와 IL-5는 Th2 면역에 관여하는 대표적인 cytokines로 알려져 있다.

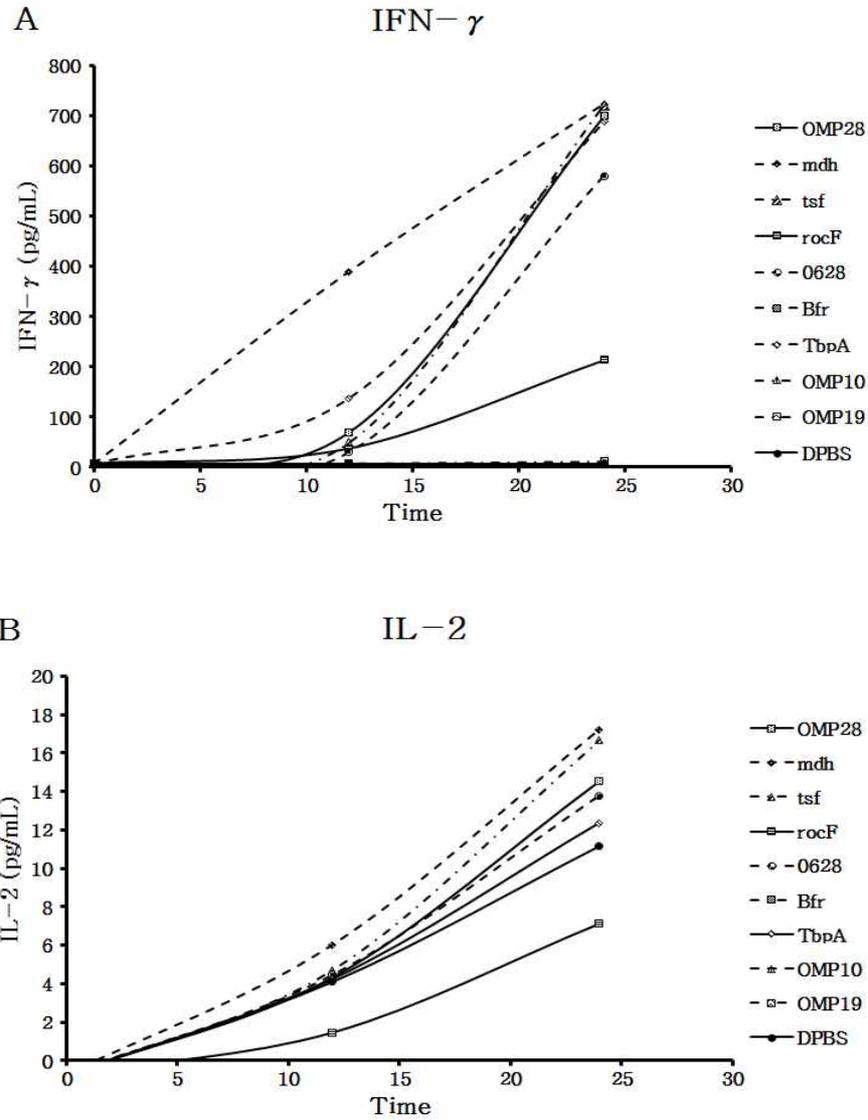


Fig. 110. 재조합 단백질 자극 후 splenocyte에서 유도되어진 (A) IFN- γ 와 (B) IL-2의 발현량 분석

- 수거한 상층액을 이용하여 ELISA를 실시한 결과 Th1 면역에 관여하는 IFN- γ 와 IL-2의 발현량은 IFN- γ 에 있어서는 재조합 단백질에 따라 그 발현량에 차이가 있음을 확인하였지만 IL-2는 재조합 단백질에 따른 차이는 없었다.
- 반면에, Th2 면역에 관여하는 IL-4와 IL-5의 발현량은 고면역원성 재조합 단백질마다 차이가 없었으며 발현이 유도되지 않음을 확인하였다 (Fig. 111)

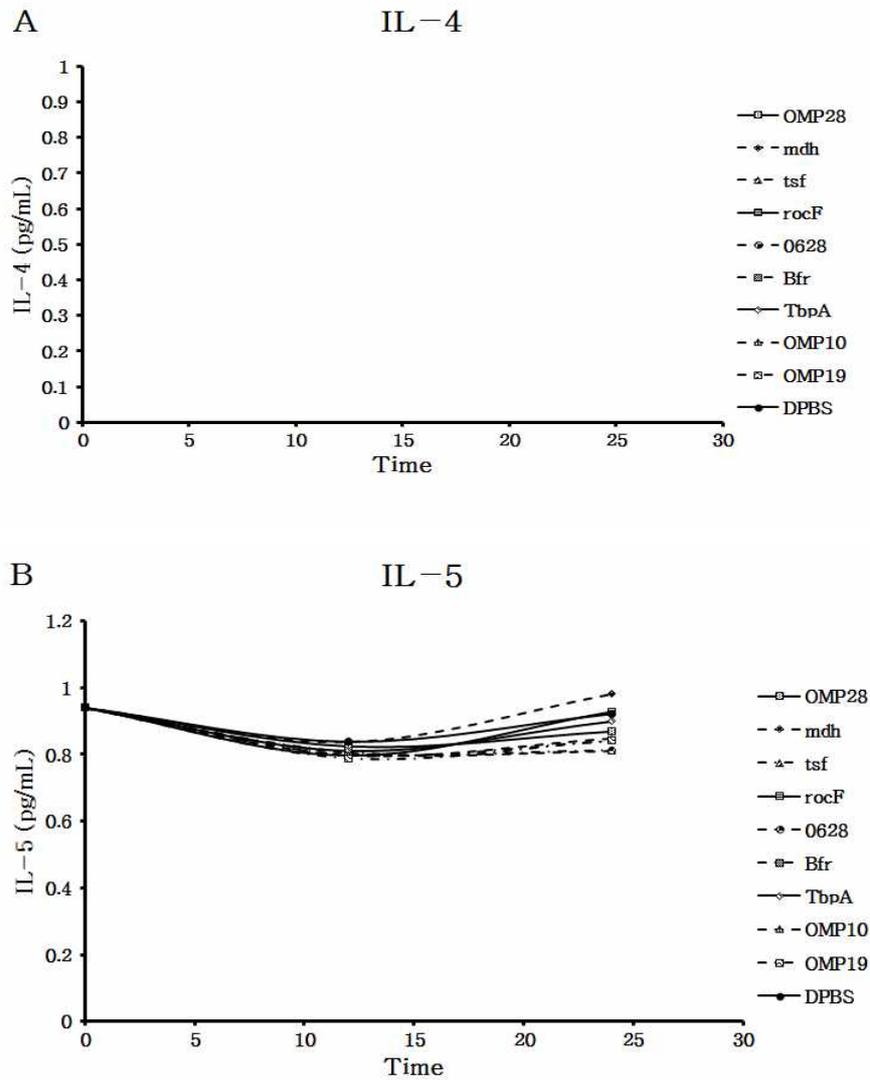


Fig. 111. 재조합 단백질 자극 후 splenocyte에서 유도되어진 (A) IL-4와 (B) IL-5의 발현량 분석

(2) 면역시킨 동물의 sera를 이용한 항체 생성능 분석

- 9종의 고면역원성 재조합 단백질로 면역시킨 동물의 혈청을 시기별 (3, 7, 14, 28일)로 회수하여 혈청내 Total IgG 및 IgM의 생성을 ELISA를 통하여 비교 분석하였다 (Fig. 112-113).

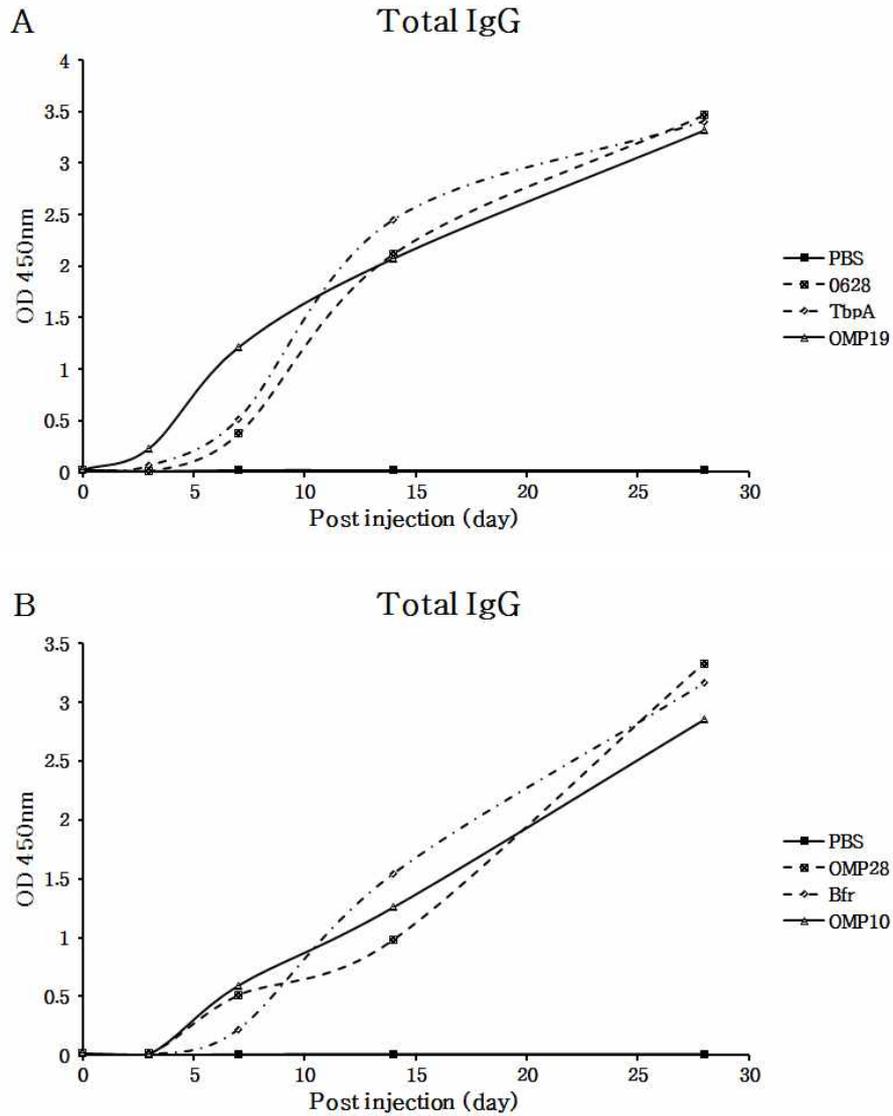


Fig. 112. 재조합 단백질 자극 후 면역동물 혈청으로부터 Total IgG 생성능 분석

- 재조합 단백질 접종 후 3, 7, 14, 28일째 혈청을 이용하여 IgG 생성능을 분석한 결과 6종의 재조합 단백질 모두에서 초기에는 생성능이 작았지만 28일째 높은 생성능을 보이는 것을 확인하였다. 이를 통하여 mouse에 고면역원성 재조합 단백질 면역 후 효율적인 IgG의 생성능력을 나타냄을 알 수 있다.
- 또한, IgM의 생성능도 ELISA를 통하여 확인하였다 (Fig. 113)

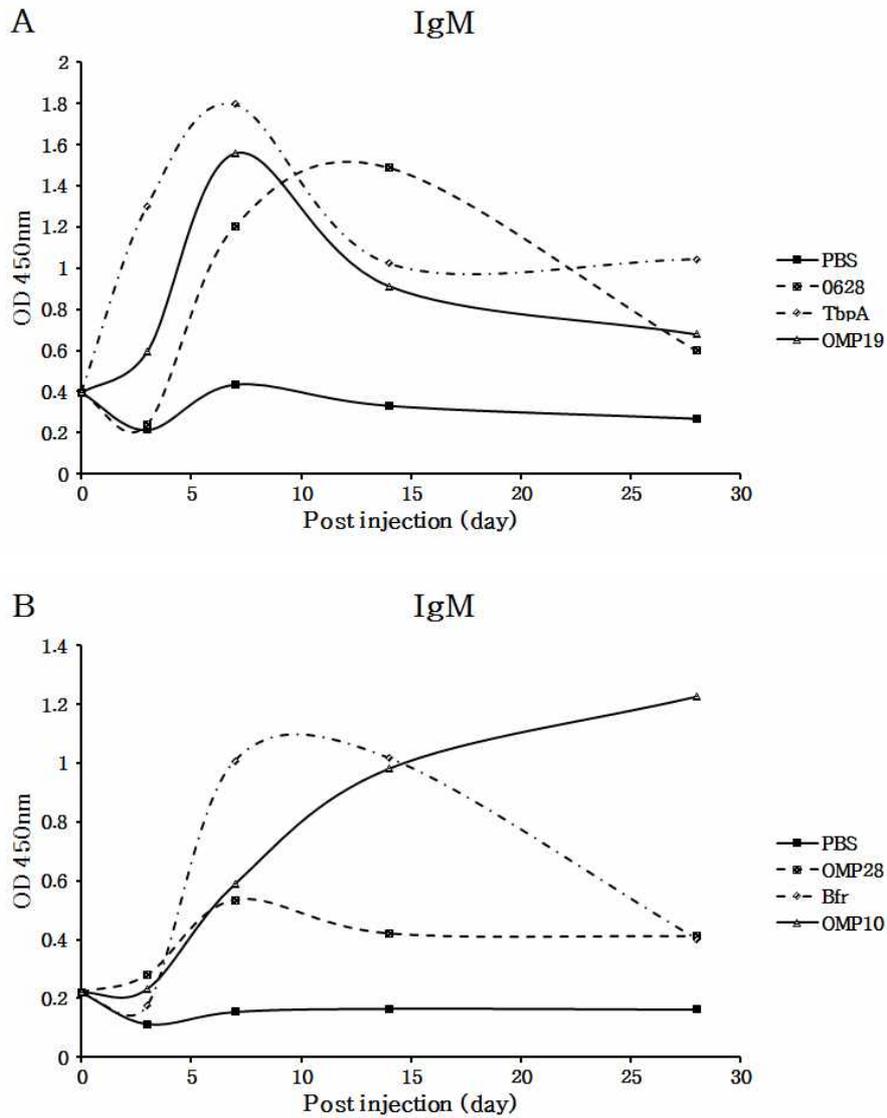


Fig. 113. 고면역원성 재조합 단백질 자극 후 면역동물 혈청으로부터 IgM 생성능 분석

- 재조합 단백질 접종 후 3, 7, 14, 28일째 혈청을 이용하여 IgM 생성능을 분석한 결과 6종의 재조합 단백질 모두에서 초기에 높은 생성능을 보였고 28일째 생성능이 낮아짐을 확인하였다. 이를 통하여 mouse에 재조합 단백질 면역 후 효율적인 IgM의 생성능력을 나타냄을 알 수 있다. 하지만, OMP10 재조합 단백질에 있어서 IgM의 생성능이 지속적으로 증가하는 것을 확인하였고 이는 다른 5가지 재조합 단백질과 상이한 결과를 나타내고 있다.

(3) 면역시킨 동물의 면역기관 (spleen)에서 면역세포 발현 분석

- ELISpot을 통하여 splenocytes에서 IgG, IFN- γ , IL-4의 발현을 유도하는 면역세포를 분석하였다 (Fig. 114-116).

- ELISpot은 splenocytes를 수거한 뒤 ELISpot kit (Mabtech, Sweden)를 이용하여 실시하였다.

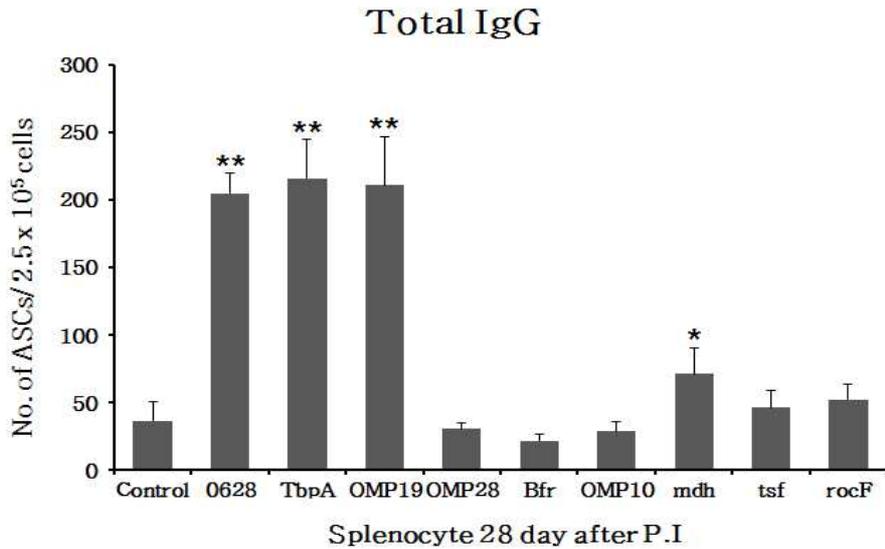


Fig. 114. 고면역원성 재조합 단백질 접종 후 28일 마우스 splenocyte 중 항원 특이 IgG 생성 세포 수 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- IgG 생성 세포 수를 분석한 결과 0628, TbpA, OMP19, mdh 재조합 단백질에서 그 생성능이 높게 나타나는 것을 확인하였으며 OMP28, Bfr, OMP10, tsf, rocF 재조합 단백질에서는 상대적으로 적게 생성하는 것으로 나타났다 (Fig. 114).
- 면역매개 cytokine IFN- γ 와 IL-4의 발현 세포 수를 분석하였다 (Fig. 115-116).

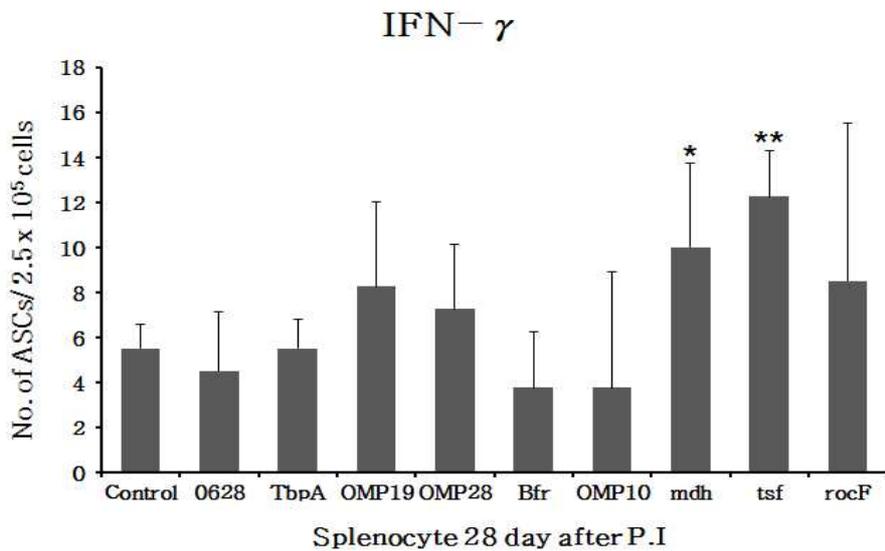


Fig. 115. 고면역원성 재조합 단백질 접종 후 28일 마우스 splenocyte 중 항원 특이 IFN-r 생성 세포 수 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

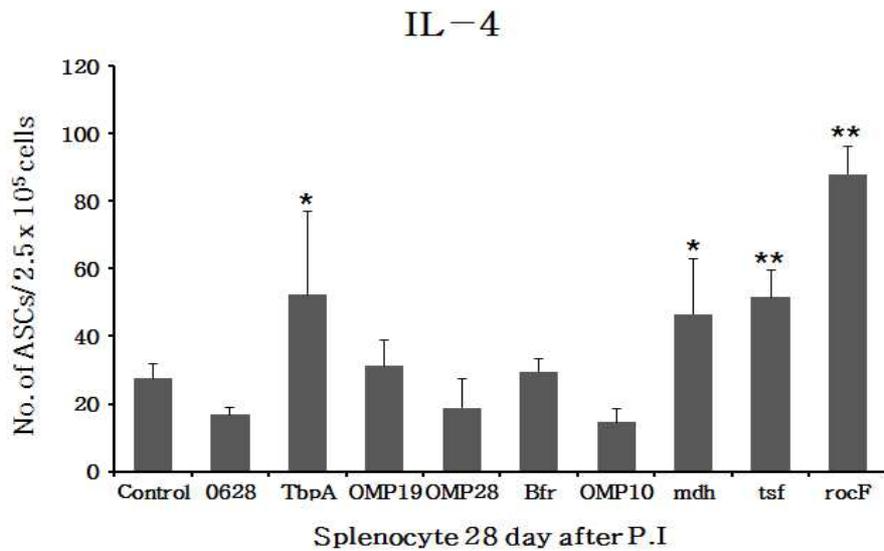


Fig. 116. 고면역원성 재조합 단백질 접종 후 28일 마우스 splenocyte 중 항원 특이 IL-4 생성 세포 수 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- Th1 면역에 관여하는 IFN- γ 생성 세포 수를 분석한 결과 mdh와 tsf 재조합 단백질에서 그 생성능이 높게 나타나는 것을 확인하였으며 다른 재조합 단백질에서는 상대적으로 유의성이 낮은 것을 확인하였다.
- Th2 면역에 관여하는 IL-4 생성 세포 수를 분석한 결과 TbpA, mdh, tsf, rocF 재조합 단백질에서 그 생성능이 높게 나타나는 것을 확인하였으며 0628, OMP19, OMP28, Bfr, OMP10 재조합 단백질에서는 상대적으로 적게 생성하는 것을 확인하였다.
- 따라서, 재조합 단백질 면역 후 28일째 혈청 및 splenocytes에서 동일하게 IgG의 생성능이 높게 나타나는 것을 확인하였으며 Th1 면역과 관련 된 cytokine IFN- γ 는 초기 면역에 관여하는 것으로 사료되며 Th2 면역과 관련된 cytokine IL-4는 체액성 면역에 관여하는 것으로 사료된다.

결과 종합

1. 재조합 단백질의 생산 및 분석

제 1 세부과제에서 발굴된 9종의 숙주특이 브루셀라 pMal vector system을 이용한 고면역원성 재조합 단백질 (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC, AspC,

OsmC, DPS)과 pCold TF vector system을 이용한 9종의 고면역원성 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19)에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치를 평가하기 위하여 고면역원성 재조합 단백질의 대량 정제를 실시하였으며, 분리 정제된 고면역원성 재조합 단백질들은 SDS-PAGE, Western blot, ELISA, in vitro, 그리고 in vivo 실험등에 각각 사용되었다.

2. 고면역원성 재조합 단백질을 이용한 혈청학적 분석

고면역원성 재조합 단백질을 분리 정제하여 야외가검혈청 및 인공감염우 혈청을 이용한 SDS-PAGE, Western blot, 그리고 ELISA 분석을 실시한 결과

○ SDS-PAGE 및 Western blot

: pMal vector system을 이용한 재조합 단백질 중에서 OMP28이 Western blot 실험에서 야외가검혈청과 가장 높은 반응성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, pCold TF vector system을 이용한 재조합 단백질 중에서 OMP28은 야외가검혈청 및 인공감염우혈청을 이용한 Western blot에서 높은 민감도를 나타내었고 tsf는 인공감염우혈청을 이용한 Western blot에서 높은 민감도를 나타내었다. 반면에, 다른 단백질들은 양성혈청에 대한 민감도가 매우 낮게 나타났다.

○ ELISA

: 고면역원성 재조합 단백질을 이용한 야외가검혈청 및 인공감염우 혈청과의 반응성을 검사하기 위해서 ELISA 기법을 이용하여 항원 및 혈청의 농도를 결정하였다. 이를 통하여 고면역원성 재조합 단백질을 이용한 혈청 민감도 검사를 실시하였고 OMP28 재조합 단백질이 가장 민감도가 높은 단백질로 확인되었다. 또한, ELISA 실험 결과에서 고면역원성 재조합 단백질들이 각각의 혈청 마다 다른 민감도를 나타내었다.

3. In vitro cytokines 생성 분석

6종의 고면역원성 재조합 단백질 (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC)을 RAW 264.7 cell에 자극시킨 후 TNF- α 의 생성능을 확인한 결과 6종의 재조합 단백질 모두 자극 후 24시간부터 높은 생성능을 보이는 것을 확인하였다. 특히, Omp10 재조합 단백질의 TNF- α 생성능이 가장 높은 것으로 나타났다. 또한, 9종의 고면역원성 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19)자극에 따른 면역 매개물질 (NO 및 cytokines) 발현을 분석한 결과 RAW 264.7 cell에서 TNF- α 와 IL-6의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다. 하지만, IL-1 β , IL-12p70, IFN- γ 의 생성은 검출량 이하였다. 특히, IL-6의 발현은 Th2 면역반응을 유도하는 물질로 잘 알려져 있으며 0628, Bfr, TbpA, OMP19 재조합 단백질 자극에 있어서는 초기부터 발현을 유도하는 것을 확인하였으며, rocF는 48시간부터 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 이

들 고면역원성 재조합 단백질이 Th2 면역반응을 유도하는 것으로 판단된다.

4. In vivo 면역반응 유도능 분석

- Mouse -

첫 번째 실험에서 6종의 고면역원성 재조합 단백질 (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC)을 접종 후 혈청 내 항원 특이 항체 생성능 평가에서 IgM 생성능이 가장 높은 항원은 OmpA, Omp2b 이었으며, IgG 생성능이 가장 높은 항원은 Omp28, Omp2b 이었다. 세포성 면역을 확인한 고면역원성 항원을 마우스에 접종한 실험에서 접종된 마우스의 비장세포 중 항원 특이 항체 IgG 발현 세포 생성능이 높은 고면역원성 항원은 Omp28 이었으며 IL-4, INF- γ 발현 세포 생성능이 높은 항원은 Omp2b 이었다. 따라서 5종의 고면역원성 재조합 단백질을 통한 면역유도능 실험에서 면역반응이 가장 높게 관찰된 고면역원성 재조합 항원은 Omp28과 Omp2b 로 평가된다.

두 번째 실험에서 고면역원성 재조합 단백질 AspC, OsmC, DPS로 면역시킨 mouse 혈청을 이용한 ELISA test 결과 IgG1, IgG2a 그리고 cytokine 생성능이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

세 번째 실험에서 Normal BALB/C mouse의 spleen으로부터 splenocytes를 분리하여 재조합 단백질로 자극시킨 결과 면역 초기 Th1 면역과 연관된 cytokines (IFN- γ 와 IL-2)의 유도가 증가하는 것을 확인하였다. 반면에, Th2 면역과 관련된 cytokines (IL-4와 IL-5)의 발현은 확인할 수 없었다. 이는 재조합 단백질 자극이 naive한 splenocytes에 있어서 면역 초기 세포성 면역반응을 유도하는 것으로 판단된다.

네 번째 실험에서 pCold TF vector system을 이용한 고면역원성 재조합 단백질 9종 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19)을 면역 후 면역기관 (spleen)에서의 면역반응여부를 평가하였다. BALB/C mouse를 고면역원성 재조합 단백질로 면역을 시킨 후 3, 7, 14, 28일째 혈청을 회수하여 ELISA를 통해 IgG 및 IgM의 항체 생성능을 확인한 결과 OMP28, 0628, Bfr, TbpA, OMP10, OMP19에 의한 항체 생성능은 매우 효율적으로 나타남을 확인하였다. 하지만, OMP10의 경우 IgM의 생성에 있어서 다른 재조합 단백질들과 달리 시간경과에 따라 발현량이 증가하는 것을 확인하였다.

Mouse 면역 후 28일째 splenocyte를 회수하여 항체 또는 cytokine 발현 세포 수를 ELISpot으로 측정된 결과 0628, TbpA, OMP19, mdh 재조합 단백질에서 IgG 생성 세포 수가 유의하게 증가했음을 확인하였고 OMP28, Bfr, OMP10은 유의성을 확인할 수 없었다. 그리고, Th1 면역에 관련된 IFN- γ 생성 세포 수에 있어서는 mdh와 tsf 재조합 단백질만이 유의하게 증가된 것을 확인하였고 Th2 면역에 관련된 IL-4 생성 세포 수에 있어서는 TbpA, mdh, tsf, rocF 재조합 단백질이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다.

또한, in vivo 면역 후 면역기관에서 28일째 IFN- γ 생성 세포 수 보다 IL-4 생성 세포 수에 있어서 그 발현량이 더 많은 것이 확인되었으며 이를 통하여 Th1 면역보다 Th2 면역반응의 증가를 유도하는 것으로 판단된다.

- Bovine -

목적동물(소)의 PBMC에서 고면역원성 재조합 단백질 (Omp10, Omp19, Omp28, OmpA, Omp2b, SodC) 자극 후 cytokines 유전자 발현능 평가에서 3 가지 cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 유전자에서 발현증가율을 나타낸 항원은 Omp19, 2 가지 cytokines (IL-1 β , TNF- α) 유전자 발현증가를 나타낸 항원은 Omp28 이었다. Apoptosis 유전자 발현능 평가에서 2 가지 apoptosis (Bax, TLR4) 유전자 발현증가를 나타낸 항원은 Omp19, Omp28, OmpA 이었다.

또다른, 고면역원성 재조합 단백질 (OMP28, mdh, tsf, rocF, 0628)을 이용한 목적동물 (소)의 PBMC에서 생성되는 cytokines의 발현을 비교분석한 결과 IL-6, IL12p40, IFN- γ , and TNF- α 4종류의 cytokine의 경우 시간의 변화에 따라 각각의 항원들에 의한 발현정도가 현저하게 차이가 나는 것을 확인하였으나 다른 3종류의 cytokine (iNOS, IL-1 β , 및 IL-4)의 발현량은 시간에 따른 비교에서 크게 차이를 나타내지 않음을 확인하였다. 또한, cytokine들의 발현양상은 자극하는 항원의 양에 따라 다르게 나타났다.

이상의 실험결과를 바탕으로 고면역원성 재조합 단백질의 대량 정제기법을 확립할 수 있었고 in vitro 및 in vivo 면역유도능 실험을 통하여 고면역원성 재조합 단백질들이 Th1 면역보다는 Th2 면역유도능이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 면역반응에 기초할 때에 본 실험에 사용한 고면역원성 재조합 항원 중 OMP28, OMP2b, TbpA, mdh는 향후 브루셀라 진단용 후보물질로 이용가능성이 매우 높으며, 특히 초기 감염우 검출을 위한 진단에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

1절. 연구개발목표 및 목표달성도

1. 1차년도 (2012년도)

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<제1세부과제> 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 숙주특이 고면역원성 항원 발굴 -순수 배양된 브루셀라의 균체항원단백질 추출 및 2DE 및 silver stain을 통한 전체적인 균단백질 패턴 파악 -브루셀라 균체항원단백질을 Western blot 분석을 통해 실험동물(마우스) 및 목적동물(소)의 감염시기별 면역원성 분석 -고면역원성 항원의 단위 및 복합 조합 분석을 통한 감염시기별 최적 항원의 조합 설정 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Brucella abortus</i> 544 표준균주를 영양배지상에 순수배양한 후, TCA/acetone 침전을 통해 균체항원단백질을 추출. 2DE을 통해 2D gel 상에서 총 단백질을 분리하여 silver stain을 통해 균체단백질을 염색한 후, 이미지프로그램을 이용해 gel 이미지를 분석 ○ 2DE를 통해 분리된 총 항원단백질을 PVDF membrane으로 transfer한 후 실험동물(마우스) 및 목적동물(소) 감염시기별(감염초기, 중기 및 말기) 혈청을 이용해 Western blot을 수행하여 항원반응성 및 면역원성 확인(5종이상) ○ 감염시기별 마우스 및 소 혈청과 반응하는 브루셀라 균체단백질 spots을 개별적 또는 복합적으로 비교 분석하고 비특이반응(비감염) 및 교차반응(<i>Y. enterocolitica</i> O:9 감염) spots과 일치되는 공통 spots은 모두 배제시켜 비교 분석해 감염시기별 최적 항원 spots을 선별
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발굴된 항원의 특성분석 및 재조합항원 생산 -LC 및 MS/TOF 이용한 균체항원단백질 분리 및 동정 -고면역원성 항원단백질의 유전자 분석 및 gene cloning 기법을 통한 재조합항원생산 -재조합 항원의 발현 및 Western blot 분석을 통한 면역원성 분석 -발굴 항원의 cell line 감염을 통한 세포안전성 및 세포독성 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선별된 최적 항원 spots을 picking한 후 특정 enzyme(trypsin)을 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 한 번 더 MS/MS분석을 하여 amino acid 단위까지 쪼개진 mass값을 측정하여 database search를 하고 동정 ○ 발굴된 최적 항원단백질의 유전자 염기서열에 기초한 primer를 제작하고 PCR 증폭산물과 pMAL vector를 이용한 recombinant DNA를 작제한 후 <i>E. coli</i> DH5a을 이용한 transformation 및 발현을 통해 recombinant protein을 생산 ○ IPTG를 이용해 recombinant protein의 발현을 유도한 후 pMAL purification을 통해 정제된 재조합항원단백질은 SDS-PAGE 및 브루셀라 양성 혈청을 이용한 Western blot을 수행하여 항원반응성 및 면역원성 확인 ○ 마우스 대식세포유래 cell line인 RAW264.7 cell에 정제된 항원단백질들을 농도별(0, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 후 MTT assay를 이용한 세포독성을 분석

<p><제 1 협동과제> 속주특이 브루셀라 고면역원성 재조합 항원에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 세포주를 이용한 유효 물질의 <i>in vitro</i> 면역활성능력 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 유효물질 감작 후 세포주에서 분비되는 면역관련 cytokine을 단백질 수준에서 ELISA를 측정 • 면역관련세포주에 목표항원 혹은 병원체를 감염시킨 후 microarray를 실시하여 면역관련 유전자 중 발현 증가/감소 현상을 검색하여 면역반응 파악 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마우스 마크로파지 세포주 (RAW 264.7)를 이용하여 실험실적 (<i>in vitro</i>) 면역활성능력 평가 - 고면역원성 항원 감작 이후 시간대별 배양상층액 내 cytokine 생성량을 ELISA로 측정 - RAW 264.7 세포에 <i>B. abortus</i> 1119-3을 감염시킨 후 microarray를 실시하여 면역관련 유전자 발현 현황을 검사하였으며 향후 유효물질의 감작 실험 시 비교자료 및 목표 유전자로 활용
	<ul style="list-style-type: none"> • 실험동물에서 (<i>in vivo</i>) 면역활성능력 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 항원을 투여한 실험동물의 혈청에서의 항원 특이 항체 생성량 분석 - 면역 관련 장기를 분리하여 cytokine 및 chemokine 등의 발현, 생성 여부 조사 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마우스 (BALB/C)에 고면역원성 항원을 접종하여 생체적 (<i>In vivo</i>) 면역활성능력 평가 실시 - 혈청 채취 및 혈청 내 항원단백질 특이 항체 (IgG, IgM)생성량을 ELISA로 측정 - 비장세포 (splenocyte)를 채취하여 항원단백질 감작 시 생성 cytokine을 ELISA 측정 - 비장세포의 항원단백질에 대한 activated B cell 생성 여부 확인을 위한 ELISpot 측정
	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물 야외주 감염시기별 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 발굴된 고면역원성 항원에 대한 각 감염시기별 야외 감염우 혈청의 반응을 평가할 수 있는 Western blot 기법 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 브루셀라 야외 감염우 혈청을 단계 희석한 후 고면역원성 항원에 대한 반응을 비교 분석하여 ELISA 측정 기준을 확립하고 감염우 혈청의 반응을 평가할 수 있는 Western blot 기준 비교 분석 (단백질 농도 및 혈청 희석농도) - 농림축산검역본부 보유 감염시기별 감염우 혈청 확보하여 실험을 실시
	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물의 실험실적 (<i>in vitro</i>) 숙주세포 면역반응 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 목적동물인 소 유래의 macrophage cell line 확보 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 일본 Kifu 대학으로부터 자체 개발한 소 마크로파지 세포주 (BO·120) 확보완료 및 차후 항원단백질을 이용한 면역반응평가
	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물의 면역활성능력 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 소의 면역반응 관련 유전자에 대한 primer 제작 및 이를 정량하기 위한 quantitative real-time PCR 기법 확립 · 항원 투여 시기별 및 투여량에 따른 면역반응 정도 분석 · 소 세포주에서 분비되는 항체, cytokine 등의 생성 여부 조사 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 건강한 소 말초혈액단핵세포 (PBMC)를 혈액으로부터 분리 배양하여 고면역원성 항원으로 자극시킨 후 시간대 별, 투여량 별 PBMC 발현 mRNA를 추출하여 quantitative real-time PCR로 측정

2. 2차년도 (2013년도)

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<p><제 1 세부과제> 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 발굴된 항원의 특성분석 및 재조합항원 생산 -LC 및 MS/TOF 이용한 균체항원단백질 분리 및 동정 -고면역원성 항원단백질의 유전자 분석 및 gene cloning기법을 통한 재조합항원생산 -재조합 항원의 발현 및 Western blot 분석을 통한 면역원성 분석 -발굴 항원의 cell line 감염을 통한 세포안전성 및 세포독성 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선별된 최적 항원 spots을 picking한 후 특정 enzyme(trypsin)을 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 한 번 더 MS/MS분석을 하여 amino acid 단위까지 쪼개진 mass값을 측정하여 database search를 하고 동정 ○ 발굴된 최적 항원단백질의 유전자 염기서열에 기초한 primer를 제작하고 PCR 증폭산물과 pCold vector를 이용한 recombinant DNA를 작제한 후 <i>E. coli</i> DH5a을 이용한 transformation 및 발현을 통해 recombinant protein을 생산 ○ IPTG를 이용해 recombinant protein의 발현을 유도한 후 pCold purification을 통해 정제된 재조합항원단백질은 SDS-PAGE 및 브루셀라 양성 혈청을 이용한 Western blot을 수행하여 항원반응성 및 면역원성 확인 ○ 마우스 대식세포유래 cell line인 RAW264.7 cell에 정제된 항원단백질들을 농도별(0, 5, 10, 50, 100 µg/ml)로 처리한 후 MTT assay를 이용한 세포독성을 분석
	<ul style="list-style-type: none"> • 항원조합을 통한 고민감도 혈청학적 진단기법 개발 - 고민감도 진단기법 개발을 위한 최적 항원 조합설정 및 고민감도 혈청학적 진단기법 적용 - 최적항원 조합 설정 및 간이 혈청학적 진단기법 적용 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 감염우에 반응하는 최적항원 조합 설정 및 고민감도 혈청학적 진단기법 적용 -발현항원에 대한 감염우 혈청의 면역반응 평가 (Western, ELISA 등) -최적 조합 항원을 이용한 진단기법 적용 (ELISA 등) ○ 간이 혈청학적 진단기법 적용 (latex bead agglutination방법 응용) -감염우 혈청을 이용한 최적 조합 설정 -최적 조합 항원을 이용한 진단기법 적용 및 평가
	<ul style="list-style-type: none"> • 고면역원성 항원의 분리 및 정제 - 고면역원성 항원의 배양 및 분리 정제 조건 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 제 1 세부과제 연구팀으로부터 제공 되어진 고면역원성 재조합 단백질 후보군들을 이용하여 배양조건 확립 - 배양된 단백질을 column (anti-histidine) 기법을 이용하여 분리 정제 - 정제되어진 단백질들을 SDS-PAGE 및 Western Blot 기법을 이용하여 검증 - 브루셀라 야의 감염우 혈청을 이용한 각각의 후보 단백질들의 면역반응을 Western Blot 기법을 이용하여 확인
	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물의 면역활성능력평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 건강한 소 말초혈액단핵세포 (PBMC)를 혈

	<ul style="list-style-type: none"> - 소의 면역반응 관련 유전자에 대한 primer 제작 및 이를 정량하기 위한 quantitative real-time PCR 기법 확립 - 항원 투여 시기별 및 투여량에 따른 면역반응 정도 분석 - 소 말초혈액단핵세포 (PBMC)에서 분비되는 항체, cytokine 등의 생성여부 조사 		<p>액으로부터 분리 배양하여 고면역원성 항원으로 자극시킨 후 시간대 별, 투여량별 PBMC 발현 mRNA를 추출하여 quantitative real-time PCR로 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고면역원성 항원에 자극된 말초혈액단핵세포로부터 분비되어지는 cytokine (iNOS, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-12p40, IFN-γ, TNF-α) 및 apoptosis (Bax Bcl-2, TLR-4)에 관련된 유전자들을 Real-time PCR기법을 이용하여 비교 분석
	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물 야외주 감염시기별 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 - 발굴된 고면원성 항원에 대한 각 감염시기별 야외 감염우 혈청의 반응을 평가할 수 있는 기법 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 브루셀라 야외 감염우 혈청을 단계 희석한 후 고면역원성 항원에 대한 반응을 비교 분석하여 ELISA 측정 기준을 확립 (단백질 농도 및 혈청 희석농도) - 농립축산검역본부 보유 감염시기별 감염우 혈청 및 야외 감염우 혈청 확보 완료 및 실험실시 예정
	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물의 교차반응 평가 - <i>Y. enterocolitica</i> O:9, <i>E. coli</i> 에 감염된 소 혈청 확보 - 고면역원성 항원을 이용한 타균과의 교차반응 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 브루셀라 야외 감염우 혈청과 <i>Y. enterocolitica</i> O:9, <i>E. coli</i> 에 감염된 소 혈청을 확보하여 ELISA 기법을 이용하여 교차반응을 비교 분석할 예정 - ELISA를 통한 교차반응 결과를 토대로 감염시기별 최적 다중항원 조합을 설정할 예정

3. 3차년도 (2014년도)

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<제 1 세부과제> 숙주특이 브루셀라 고면역원성 항원 발굴 및 고민감도 혈청학적 진단기법 개발	개발된 진단방법의 정확도, 특이도 등 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> • 개발된 진단법의 기존 방법과의 민감도, 특이도, 정확도 조사(Rose bengal, TAT, ELISA 등);제 1협동 공동수행 • 개발된 간이진단법의 기존 방법과의 민감도, 특이도, 정확도 조사(Rose bengal, TAT, ELISA 등): 제 1협동 공동수행 • 개발된 진단키트의 산업화 전략 수립
	고면역원성 항원의 대량생산체계 확립 및 산업화	100	<ul style="list-style-type: none"> • 고면역원성 항원의 대량생산체계 확립 및 산업화
<제1협동과제>	<ul style="list-style-type: none"> • 감염시기별 기존 방법의 	100	<ul style="list-style-type: none"> o 타 축종에 대한 진단 적용 평가

<p>속주특이 브루셀라 고면역원성 항원에 대한 면역반응 분석 및 진단적 가치 평가</p>	<p>민감도, 정확도, 특이도 등 조사</p>		<ul style="list-style-type: none"> - 개발된 진단법의 국내 브루셀라 감염 보고된 타 축종 혈청을 이용한 진단평가 (개 등) o 기존 방법과의 비교를 통한 민감도, 정확도, 특이도 등 조사 (제 1세부 공동) o 실험동물을 이용한 실험을 통하여 민감도가 높은 고면역원성 재조합 항원을 목적동물 (소) 에 적용 면역반응 분석 및 비교 평가 o 감염시기별 혈청을 확보 이에 대한 ELISA 평가 및 타균과의 교차반응에 대한 비교 분석 o 진단에 사용가능한 재조합 단백질의 최적조합 분석
---	---------------------------	--	---

2절. 관련분야 기여도

브루셀라 감염증을 정확히 진단하기 위한 고민감도 진단법의 부재로 인해 발생하는 문제점을 개선하고, 국내 감염우의 색출과 유통의 차단을 위해 브루셀라 균의 항원성을 분석, 고면역원성을 보이는 항원을 발굴 고민감도의 진단기법을 확립하여 본 감염증의 근절을 위한 토대를 구축하기 위한 단백질을 발굴 및 이를 재조합 단백질로 개발하였으며, 혈청학적 민감도 및 면역유도능에 대한 전반적인 연구를 실시함으로써 향후 브루셀라 연구에 면역학적인 측면에서의 접근을 가능케하는 기초자료로 사용될 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

1) 연구성과 목표

구분	특허		신품종				(예시) 유전자 원 등록	논문		기타 (학술발 표)
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 산 수입 판 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	달성	-	-	-	-	-	-	3	1	5
2차 년도	목표	2	-					1	1	
	달성	2						4	3	5
3차 년도	목표	-	2					2	2	
	달성	2	0					2	1	4
4차 년도	목표									
	달성									
5차 년도	목표									
	달성									
계	목표	2	2					3	4	
	달성	4	0					9	5	14

(1) 특허

-[특허명칭] 박테리오페리틴을 이용한 브루셀라 감염증 진단방법

- 출원번호 : 10-2014-0066500

- 출원일자 : 2014년 5월 30일

-[특허명칭] 브루셀라 균주 유래 NDK 재조합 항원을 이용한 브루셀라 감염증 예방방법

- 출원번호 : 10-2014-0066499

- 출원일자 : 2014년 05월 30일

-[특허명칭] 브루셀라 아보투스 균주 유래의 Ohr 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물

- 출원번호 : 10-2015-0095013

- 출원일 : 2015년 7월 3일

-[특허명칭] 브루셀라 아보투스 균주 유래의 다중 재조합 외막단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도

- 출원번호 : 10-2015-0095014

- 출원일 : 2015년 7월 3일

(2) 논문

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Protective efficacy of <i>Brucella abortus</i> recombinant Omp28(Omp28) subunit vaccine against <i>Brucella abortus</i> infection in mouse model	Jung Ju Lim	Suk Kim	DH Kim, J J Lee, DG Kim, W Min, HJ Lee, MH Rhee	J. Vet. Sci	13(3)	국내	SCIE
2013	Impaired bacterial proliferation, and compromised immune response in diabetic db/db mice infected with <i>Brucella abortus</i> .	Dae Geun Kim	Suk Kim	JJ Lee,H Simborio, AWB Reyes, W Min, HJ Lee, HH Chang	J. Agri. Life Sci.	47(2)	국내	연구재단 등재
2013	Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase (betB) as an essential virulence factor of <i>Brucella abortus</i>	Jin Ju Lee	Suk Kim	JJ Lee, JH Kim, DH Kim, DG Kim, W Min, MH Rhee	Vet. Microbiol	168 ; 131-140	국외	SCI (2.8)
2014	Antibacterial effects of <i>Coptis chinensis</i> Franch against <i>Brucella abortus</i>	Dae Geun Kim	Suk Kim	HLT Simborio, A W B Reyes, W Min, H J Lee, J J Lee, H H Chang, DH Kim	J.Agri.Life Sci.	48(1), p107-114	국내(연구재단등재)	
2014	The key roles of toll-like receptor (TLR) for intracellular survival of <i>Brucella</i>	Dae Geun Kim	Suk Kim	DG Kim, H LT Simborio, AW B Reyes, W Min, HJ Lee, JJ Lee	J. Prev. Vet. Med.	37(4), p186-193	국내(연구재단등재)	
2014	Immunoproteomic identification of immunodominant antigens independent of the time of infection in experimental <i>Brucella abortus</i> 544-challenged cattle	Jin Ju Lee	Suk Kim	HLT Simborio, A W B Reyes, W Min, H J Lee, J J Lee, H H Chang, SC Jung, HS Yoo	Vet. Research	46; 17-28	국외	SCI (3.5)
2014	Proteomic analyses of the time course responses of mice infected with <i>Brucella abortus</i> 544 reveal immunogenic antigens	Jin Ju Lee	Suk Kim	HLT Simborio, A W B Reyes, W Min, H J Lee, J J Lee, H H Chang, SC Jung, HS Yoo	FEMS Microbio. Lett	357, 164-174	국외	SCI (2.1)
2014	Characterization of culture supernatant proteins from <i>Brucella abortus</i> and its protection effects against murine brucellosis.	Jin Ju Lee	Suk Kim	Lim JJ, Kim DG, Simborio HL, Kim DH, Reyes AW, Min W, Lee HJ, Kim DH, Chang HH	Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.	37, 221-228	국외	SCI (2.1)
2015	Evaluation of the combined use of the recombinant <i>Brucella abortus</i> Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis.	Simborio HL	Suk Kim	Lee JJ, Bernardo Reyes AW, Hop HT, Arayan LT, Min W, Lee HJ, Yoo HS	Microb. Patho.	16, 41-46,		SCI (2.0)
2015	Molecular cloning, purification and immunogenicity of recombinant <i>Brucella abortus</i> 544 malate dehydrogenase	Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes	Suk Kim	Lee JJ, Bernardo Reyes AW, Hop HT, Arayan LT, Min W,	J. Vet. Sci,	In press	국내	SCIE (1.3)
2015	Evaluation of recombinant AspC of <i>Brucella abortus</i> for serological diagnosis of bovine brucellosis in Korea	Lauren Togonon Arayan	Suk Kim	Huynh Tan Hop, Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Hannah Leah	J. Preven. Vet. Med.	2; 33-37	국내(연구재단등재)	

				Tadeja Simborio, WonGi Min				
2015	Dextran sulfate sodium upregulates MAPK signaling for the uptake and subsequent intracellular survival of <i>Brucella abortus</i> in murine macrophages	Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes	Suk Kim	Hannah Leah Tadeja Simborio, Huynh Tan Hop, Lauren Togonon Arayan	Microbial pathogenesis	2 nd revision	국외	SCI(2.0)
2015	Immunization of mice with recombinant <i>Brucella abortus</i> organic hydroperoxide resistance (Ohr) protein protects against a virulent <i>Brucella abortus</i> 544 infection	Huynh Tan Hop	Suk Kim	Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Hannah Leah Tadeja Simborio, Lauren Togonon Arayan	Journal of Microbiol. Biotech	2 nd revision	국외	SCI (1.5)
2015	Immune modulation and protective effects of recombinant <i>Brucella abortus</i> OmpA against <i>Brucella abortus</i> 544 infection in mice	Hannah Leah Tadeja Simborio	Suk Kim	Huynh Tan Hop, Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Lauren Togonon Arayan	F E M S Microbiol. Lett.	Submitted	국외	SCI(2.1)
2015	Evaluation of an ELISA using recombinant <i>Brucella abortus</i> bacterioferritin (Bfr) for bovine brucellosis	Huynh Tan Hop	Suk Kim	Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Hannah Leah Tadeja Simborio, Lauren Togonon Arayan	C o m p . Immunol. Microbiol. Infect. Dis	Submitted	국외	SCI(2.1)
2013	Early transcriptional responses of internalization defective <i>Brucella abortus</i> mutants in professional phagocytes, RAW 264.7	Seung Bin Cha	Han Sang Yoo	WS Lee, MK Shin, MH Jung, AN Yoo, JW Kim	BMC Genomics	14 426-435	국외	SCI(3.3)
2014	Host immune responses during <i>Brucella</i> infection : A brief review	Kyung Yong Sung	Han Sang Yoo		J. Prev. Vet. Med.	38(1) 26-34	국내 (연구재단 등재후보지)	
2014	Induction of Immune Responses by Two Recombinant Proteins of <i>Brucella abortus</i> , Outer Membrane Proteins 2b Porin and Cu/Zn Superoxide Dismutase, in Mouse Model	Kyung Yong Sung	Han Sang Yoo	MH Jung, MK Shin, HE Park, JJ Lee, S Kim	J. Microbiol. Biotechnol.	24(6) 854-861	국내	SCIE(1.3)
2015	Expression of cytokine and apoptosis-related genes in bovine peripheral blood mononuclear cells stimulated with <i>Brucella abortus</i> recombinant proteins	Young Bin Im	Han Sang Yoo	MH Jung, MK Shin, S Kim	Vet. Res.	submitted	국외	SCI(3.5)

(3) 기타: 학술대회 발표

- Characterization of Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BetB) as an Essential Virulence Factor of *Brucella abortus*. 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2013 04.
- Impaired bacterial proliferation, and compromised immune response in diabetic *db/db* mice infected with *Brucella abortus*. 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2013 04.
- Antibacterial effects of *Coptis Chinensis* Franch against *Brucella abortus*, 제5회 세계보건협회연맹 아시아태평양지역 국제컨퍼런스, 2014 04.
- Evaluation of an ELISA using recombinant *Brucella abortus* bacterioferritin (Bfr) for bovine brucellosis. 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2015 04.
- Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and

Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis. 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2015 04.

- Cytokine production profiling of six sero-reactive proteins of *Brucella abortus* to RAW 264.7 cells, 2013 대한 수의학회 춘계 학술대회, 2013 04.
- Immuno-stimulating activities of six sero-reactive proteins of *Brucella abortus* to RAW 264.7 cells, 한국예방 수의학회 춘계 학술대회, 2013 04.
- Cytokine Expression Profile in Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cell Stimulated with *B. abortus* Recombinant Proteins, 2013 대한 수의학회 추계 학술대회, 2013 10.
- In vitro and in vivo analysis of immunogenicities of *Brucella abortus* recombinant proteins, Omp2b and SodC, 2013 대한 수의학회 추계 학술대회, 2013 10.
- Cytokine Expression Analysis in Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cell with Stimulated *B. abortus* Recombinant Proteins by Real-Time PCR, 제5회 세계보건협회연맹 아시아태평양지역 국제컨퍼런스, 2014 04.
- Analysis of Cytokine Gene expression in Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated with five *Brucella abortus* Recombinant Proteins, 2014 대한 수의학회 춘계 학술대회, 2014 05.
- Analysis of Inflammatory Cytokines Secreted by Raw 264.7 cells with stimulated *Brucella abortus* Mutants, 2015 대한 수의학회 춘계 학술대회, 2015 04.
- Profiles of Cytokine Production in Raw 264.7 cells stimulated with *Brucella abortus* Mutants, 2015 춘계인수공통전염병학회, 2015 05.
- Cytokine expression profile in Raw 264.7 cells stimulated with *Brucella abortus* Mutants, FEMS 2015, 2015 06.

2) 연구성과 활용 목표

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	2			1	
	달성	-	-			-	

3) 연구성과 활용 계획

(1). 브루셀라 진단과 관련하여 다음과 같이 특허출원(등록)을 하였으며, 개발된 연구내용을 참여기업인 (주) 메디안디노스틱에 기술이전 할 계획임

[특허명칭] 박테리오페리틴을 이용한 브루셀라 감염증 진단방법

- 출원번호 : 10-2014-0066500

- 출원일자 : 2014년 5월 30일

[특허명칭] 브루셀라 균주 유래 NDK 재조합 항원을 이용한 브루셀라 감염증 예방방법

- 출원번호 : 10-2014-0066499

- 출원일자 : 2014년 05월 30일

[특허명칭] 브루셀라 아보투스 균주 유래의 Ohr 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는
브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물

- 출원번호 : 10-2015-0095013

- 출원일 : 2015년 7월 3일

[특허명칭] 브루셀라 아보투스 균주 유래의 다중 재조합 외막단백질을 유효성분으로 포함하
는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도

- 출원번호 : 10-2015-0095014

- 출원일 : 2015년 7월 3일

- 특허출원(등록)된 기술을 참여기업(메디안디노스틱)에 기술을 이전할 계획임
- 참여기업이 기술을 이전받은 후 산업화 및 보급할 계획임

4). 인력양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
4	2	2			4		2		2

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2014.05.30
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2014-0066500 (접수번호 1-1-2014-0517596-46)
 출원인명칭 경상대학교산학협력단(2-2004-010719-4)
 대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
 발명자성명 김석
 발명의명칭 박테리오페리틴을 이용한 브루셀라 감염증 진단방법

특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2014.05.30
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2014-0066499 (접수번호 1-1-2014-0517595-01)
출원인명칭 경상대학교산학협력단(2-2004-010719-4)
대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
발명자성명 김희
발명의명칭 브루셀라 균주 유래 NDK 재조합 항원을 이용한 브루셀라 감염증 예방 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

출원번호통지서

출원일자 2015.07.03
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1)
출원번호 10-2015-0095013 (접수번호 1-1-2015-0646251-37)
출원인명칭 경상대학교산학협력단(2-2004-010719-4)
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명 김석
발명의명칭 브루셀라 어보투스 균주 유래의 Ohr 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드>
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기조로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적고안허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

출원번호통지서

출원일자 2015.07.03
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(2)
출원번호 10-2015-0095014 (접수번호 1-1-2015-0646252-83)
출원인명칭 경상대학교산학협력단(2-2004-010719-4)
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명 김석
발명의명칭 브루셀라 어보투스 균주 유래의 다중 재조합 외막단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.

RESEARCH

Open Access

Immunoproteomic identification of immunodominant antigens independent of the time of infection in *Brucella abortus* 2308-challenged cattle

Jin Ju Lee¹, Hannah Leah Simborio², Alisha Wehnesday Bernardo Reyes², Dae Geun Kim², Huynh Tan Hop², Wongi Min², Moon Her¹, Suk Chan Jung¹, Han Sang Yoo³ and Suk Kim^{2,4*}

Abstract

Brucellosis is a vital zoonotic disease caused by *Brucella*, which infects a wide range of animals and humans. Accurate diagnosis and reliable vaccination can control brucellosis in domestic animals. This study examined novel immunogenic proteins that can be used to detect *Brucella abortus* infection or as an effective subcellular vaccine. In an immunoproteomic assay, 55 immunodominant proteins from *B. abortus* 544 were observed using two dimensional electrophoresis (2DE) and immunoblot profiles with antisera from *B. abortus*-infected cattle at the early (week 3), middle (week 7), and late (week 10) periods, after excluding protein spots reacting with antisera from *Yersinia enterocolitica* O:9-infected and non-infected cattle. Twenty-three selected immunodominant proteins whose spots were observed at all three infection periods were identified using MALDI-MS/MS. Most of these proteins identified by immunoblot and mass spectrometry were determined by their subcellular localization and predicted function. We suggest that the detection of prominent immunogenic proteins during the infection period can support the development of advanced diagnostic methods with high specificity and accuracy; subsidiarily, these proteins can provide supporting data to aid in developing novel vaccine candidates.

Introduction

Brucella spp. are the etiological agents for brucellosis, a debilitating and chronic disease infecting a variety of domestic animals and humans. Brucellosis is characterized by abortion and sterility in livestock as well as undulant fever, arthritis and neurological disorders in humans [1]. Definitive diagnosis is commonly performed by isolation and identification of the causative organism(s), but because the isolation is time-consuming and dangerous, serological analysis is widely preferred [2]. Several specific serological tests have been developed for the definitive diagnosis of brucellosis, and these tests have been upgraded repeatedly to obtain reliable data [3]. However, a large number of tests still rely on presumptive evidence of

infection. Most serological tests for *Brucella* infection use antibodies against common antigens of *Brucella* [4]. O-polysaccharide (OPS), a well-known immunodominant epitope in smooth lipopolysaccharide (SLPS) is a commonly used antigen in serological tests for the diagnosis of brucellosis [5,6]. Consequently, the serological diagnosis of brucellosis is complicated by cross-reactions of the antibodies against other Gram-negative bacteria, such as *Y. enterocolitica* O:9, which have conserved and highly analogous OPS structures [7,8]. Therefore, it is crucial to discover highly specific *Brucella* antigens that are immunogenic in the host. Several studies have focused on the use of antigenic proteins for alternative diagnostic methods and to improve vaccine efficacy. Recent studies have focused on the use of immunogenic proteins for serodiagnosis of brucellosis [9].

Several immunogenic proteins of *B. abortus* have been identified [10], but the antigens that are immunogenic at different stages of the infection have not been defined.

* Correspondence: skimsu@gnu.ac.kr

¹Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Republic of Korea

²Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Republic of Korea

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Lee et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Evaluation of recombinant AspC of *Brucella abortus* for serological diagnosis of bovine brucellosis in Korea

Lauren Togonon Arayan^{1*}, Huynh Tan Hop^{1*}, Alisha Wehnesday Bernardo Reyes^{1,2}, Hannah Leah Tadeja Simborio¹, WonGi Min¹, Hu Jang Lee¹, Suk Kim^{1*}

¹Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea
²Department of Veterinary Paraclinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of the Philippines Los Baños, College, Laguna, Philippines 4031
*These authors contributed equally to this work

Abstract: To date, most serodiagnostic methods for brucellosis screening are based on antibodies against lipopolysaccharides of *Brucella* spp. However, this approach has the drawback of yielding false-positive results due to cross-reactivity with lipopolysaccharides of other related pathogens, especially *Yersinia enterocolitica* O:9. In this study, *Brucella abortus* AspC was cloned and expressed by PCR amplification into a pCold TF expression system to obtain recombinant AspC (rAspC). The immunogenicity of rAspC was confirmed by western blotting of *Brucella*-positive bovine serum. rAspC-based ELISA was performed to determine whether rAspC could be used in the serodiagnosis of bovine brucellosis. rAspC reacted strongly with anti-*Brucella* antibodies in positive sera in the tube agglutination test (TAT), but did not show strong reaction with most negative samples. In particular, the average OD₄₉₂ value at the highest TAT titer showed a 1.4-fold increase with respect to the cutoff value. The accuracy, specificity, and sensitivity of rAspC were 71.88%, 78.33%, and 88%, respectively. These findings suggest that rAspC might be valuable for the serological diagnosis of bovine brucellosis.

Key words: *Brucella abortus*, AspC, ELISA, serodiagnosis

INTRODUCTION

Brucella abortus is a Gram-negative cocco-bacillus that is known to cause brucellosis in animals and humans. Brucellosis is a chronic debilitating condition in humans, and it causes abortion and infertility in cattle and other animals, leading to severe economic losses as well as public health problems worldwide [16]. To date, there is no effective and safe vaccine for humans. Therefore, the prevention of animal infection is the predominant approach to control human brucellosis [18]. However, current diagnostic protocols for brucellosis in both animals and humans have only a limited effectiveness due to many reasons. Cross-reactivity of the diagnostic tools and overlaps in the clinical profile with other pathogens are the major complications in the diagnosis of brucellosis [19]. Typically, serodiagnostic methods for brucellosis screening rely on the detection of antibodies against the lipopolysaccharide (LPS) fraction of *Brucella* spp. However, this

poses a risk for false positive reactions with the LPSs of other pathogens, especially with *Yersinia enterocolitica* O:9 which has an OPS, 1,2-linked 4,6-dideoxy-4-formamido- α -D-mannopyranosyl (α -perosamine) that is identical to that of *Brucella* spp. [13,14,17,20].

The development of immunoproteomics has paved the way for the identification of immunogenic proteins of several different pathogens and subsequent application of immunogenic proteins of *B. abortus* has proved to be an effective approach to minimize cross-reactions in the diagnosis of brucellosis [6]. Therefore, several surface or cytoplasmic components of *Brucella* have been used as potential markers for diagnosis of brucellosis including lumazine synthase [18,19], type IV secretion system protein VirB5 [13], outer membrane protein Omp28 [14], and periplasmic immunogenic protein Bp26 [17].

In particular, AspC was found to be immunogenic in a study using a 2-DE method in *B. abortus* 2308 infected cattle, which allows the analysis of protein expression (unpublished data). This previous study provided sufficient data to consider the application of this protein for

Received 01 May 2015, Revised 12 June 2015, Accepted 20 June 2015
* Corresponding Author: Suk Kim, Tel: +82-55-772-2359, Fax: +82-55-772-2349,
E-mail: kimsuk@gnu.ac.kr
Copyright © 2015 The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine.
The full text is freely available on the web at <http://www.jpvm.kr>.



RESEARCH LETTER

Proteomic analyses of the time course responses of mice infected with *Brucella abortus* 544 reveal immunogenic antigens

Jin Ju Lee¹, Hannah Leah Simborio², Alisha Wehnesday Bernardo Reyes², Dae Geun Kim², Huynh Tan Hop², Wongi Min², Moon Her¹, Suk Chan Jung¹, Han Sang Yoo³ & Suk Kim^{2,4}

¹Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang, Gyeonggi-do, Korea; ²Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Korea; ³Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea; and ⁴Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

Correspondence: Suk Kim, Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea.
Tel.: +82 55 772 2359;
fax: +82 55 772 2349;
e-mail: kimsuk@gnu.ac.kr

Received 15 May 2014; revised 2 June 2014;
accepted 18 June 2014. Final version
published online 22 July 2014.

DOI: 10.1111/1574-6968.12522

Editor: Akio Nakane

Keywords

Brucella abortus; immunogenic proteins; serodiagnosis; infection period.

Abstract

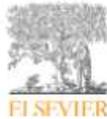
Brucellosis is a major zoonotic disease caused by pathogens of the genus *Brucella*. The eradication of brucellosis in domestic animals, associated with the prevention of human infection, can be attained through accurate diagnosis. However, the conventional serological diagnosis of brucellosis has limitations, particularly in detecting the infection period. Accordingly, the aim of this study was to determine reliable immunogenic proteins to detect *Brucella abortus* infection according to time course responses to aid in the appropriate management of this disease. Proteomic identification through two-dimensional electrophoresis (2DE), followed by immunoblotting, revealed 13, 24, and 55 immunodominant *B. abortus* 544 proteins that were reactive to sera from experimentally infected mice at early (10 days), middle (30 days), and late (60 days) infection periods, respectively. After excluding several spots reactive to sera from *Yersinia enterocolitica* O:9-infected and noninfected mice, 17 of the 67 immunodominant proteins were identified through MALDI-TOF MS. Consequently, the identified proteins showed time course-dependent immunogenicity against *Brucella* infection. Thus, the results of this study suggest that the production of immunogenic proteins during infection periods improves the diagnosis and discovery of vaccine candidates.

Introduction

Brucella is a genus of major zoonotic pathogens that induce chronic infections in a broad range of animals, including livestock, wildlife, and humans (Pappas *et al.*, 2005). These bacteria are considered to be a major health threat, reflecting the highly infectious nature of these organisms and the worldwide outbreak of this disease (Seleem *et al.*, 2010). Importantly, these pathogens escape immune detection, and subsequent elaborate virulence is a fundamental aspect of the pathogenic lifestyle of these microorganisms (Roop *et al.*, 2009).

In the last few decades, various diagnostic test methods have been developed for the successful surveillance and control of *Brucella* infection. The standard diagnostic techniques for brucellosis include the isolation of causative

organisms through bacterial culture, molecular assays for bacterial genome detection, and serology through antibody detection. Bacterial culture, however, requires bio-safety level three conditions and a skilled expert, while genomic detection is a rapid but limited technique for the recognition of active infection. Current serological assessments are more reliable and generally approved (Al Dahouk & Nockler, 2011). For the serological diagnosis of brucellosis in animals and humans, classical methods, such as the Rose Bengal test (RBT), agglutination test, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), have been widely established in various countries and are preferred in routine clinical practice (Al Dahouk *et al.*, 2003; Nielsen & Yu, 2010). However, more enhanced sensitivity and specificity in the confirmatory diagnosis of brucellosis are still needed (Christopher *et al.*, 2010; McGiven, 2013).



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis



Hannah Leah Tadeja Simborio ^a, Jin Ju Lee ^b, Alisha Wehnesday Bernardo Reyes ^a, Huynh Tan Hop ^a, Lauren Togonon Arayan ^a, Wongi Min ^a, Hu Jang Lee ^a, Han Sang Yoo ^c, Suk Kim ^{a, d, *}

^a Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Republic of Korea

^b Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang, Gyeonggi-do, 430-757, Republic of Korea

^c Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, 151-742, Republic of Korea

^d Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 March 2015

Received in revised form

7 May 2015

Accepted 15 May 2015

Available online 16 May 2015

Keywords:

Brucella abortus

Recombinant protein

Outer membrane protein

Serodiagnosis

ABSTRACT

Currently, there are several serodiagnostic tools available for brucellosis, however, it is difficult to differentiate an active infection from vaccination. Hence, there is a great need to develop alternative means that can distinguish between these two conditions without utilizing lipopolysaccharide (LPS). This study was an attempt to determine the efficacy of combined recombinant *Brucella* (*B.*) *abortus* outer membrane proteins (rOmps) and individual rOmps in the serodiagnosis of brucellosis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), utilizing both that standard tube agglutination test (TAT)-positive and -negative serum samples from Korean native cattle. The results are very interesting and promising because the combined rOmp antigens used in the study were highly reactive with the TAT-positive serum samples. The combined rOmps sensitivity, specificity and accuracy were 215/232 (92.67%), 294/298 (98.66%) and 509/530 (96.04%), respectively. While these results are preliminary, the tests performed have very high potential in the serodiagnosis of brucellosis and likewise, the combined rOmps can be used for future vaccine production.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Brucellosis is a zoonotic disease that occurs worldwide and is caused by bacteria of the genus *Brucella*, which are Gram-negative, non-spore-forming and nonencapsulated coccobacilli or short rods with rounded ends [1,2]. Brucellosis is transmitted from domestic animals to humans and is endemic in many areas [3]. The organism mainly affects the reproductive system of domesticated animals, causing abortion and infertility, which in turn can cause a serious economic crisis [4].

The definitive diagnosis of brucellosis is isolation and identification of the causative organism [5]. However, diagnosis and

disease control are generally based on serological testing. The Rose Bengal plate test and the complement fixation test are the most acceptable diagnostic methods worldwide [6]; however, Korea utilizes the standard tube agglutination test (TAT) as the main serodiagnostic tool for brucellosis [7]. At present, many developed countries have declared that brucellosis is eradicated and no longer present in their countries [3]. Eradication of the disease can be attained through accurate diagnosis. However, current serological tools available are based on lipopolysaccharide (LPS) components of the organism that cannot distinguish naturally-infected from vaccinated animals with *Brucella abortus* S19. Therefore, new serological diagnostic tools that not employ LPS are needed.

Lindler et al. reported that one non-LPS group of immunogens focused on vaccine and diagnostic purposes is the outer membrane protein (Omp) [8]. The major mechanisms of Omp-mediated bacterial adaptive responses to the host environment include iron uptake, antimicrobial peptide resistance, serum resistance, multidrug resistance and bile resistance, among others [9]. However, the

Abbreviations: OMP, outer membrane protein; TAT, standard tube agglutination test; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay.

* Corresponding author. Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Republic of Korea.
E-mail address: kimsuk@gnu.ac.kr (S. Kim).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.05.004>
0882-4010/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect
**Comparative Immunology, Microbiology
and Infectious Diseases**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cimid



Characterization of culture supernatant proteins from *Brucella abortus* and its protection effects against murine brucellosis

Jin Ju Lee^{a,b,1}, Jeong Ju Lim^{b,1}, Dae Geun Kim^b, Hannah Leah Simborio^b,
Dong Hyeok Kim^b, Alisha Wehndnesday Bernardo Reyes^b, WonGi Min^b,
Hu Jang Lee^b, Dong Hee Kim^c, Hong Hee Chang^d, Suk Kim^{b,d,*}

^a Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang, Gyeonggi-do 430-757, Republic of Korea

^b College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

^c School of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

^d Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2014
Received in revised form 13 May 2014
Accepted 5 June 2014

Keywords:

Brucella abortus
Culture supernatant proteins
Virulence
Protection

ABSTRACT

In this study, we characterized the secreted proteins of *Brucella abortus* into the enriched media under the bacterial laboratory growth condition and investigated the pathogenic importance of culture supernatant (CS) proteins to *B. abortus* infection. CS proteins from stationary phase were concentrated and analyzed using 2D electrophoresis. In MALDI TOF/TOF analysis, more than 27 proteins including CuZn SOD, Dps, Tat, OMPs, Adh, LivF, Tuf, SucC, GroEL and DnaK were identified. Cytotoxic effects of CS proteins were found to increase in a dose-dependent manner in RAW 264.7 cells. Upon *B. abortus* challenge into phagocytes, however, CS proteins pre-treated cells exhibited lower bacterial uptake and intracellular replication compared to untreated cells. Immunization with CS proteins induced a strong humoral and cell mediated immune responses and exhibited significant higher degree of protection against virulence of *B. abortus* infection compared to mice immunized with Brucella broth protein (BBP). Taken together, these results indicate that *B. abortus* secreted a number of soluble immunogenic proteins under laboratory culture condition, which can promote antibody production resulted in enhancing host defense against to subsequently bacterial infection. Moreover, further analysis of CS proteins may help to understand the pathogenic mechanism of *B. abortus* infection and host–pathogen interaction.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Brucellosis leads to sterility and abortion in animals and an undulant fever associated with severe fatigue in humans including endocarditis, osteoarthritis, and neurological damage [1]. *Brucella* spp. are uptaken by phagocytes within the host and establish a replicative niche within macrophages and dendritic cells [2]. Although killed *Brucella* are engulfed by macrophages, they fail to associate with the ER and are rapidly degraded, suggesting that

* Corresponding author at: College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea.
Tel.: +82 55 772 2359; fax: +82 55 772 2349.
E-mail address: kimsuk@gnu.ac.kr (S. Kim).

¹ These authors contributed equally to this work.

Antibacterial Effects of *Coptis chinensis* Franch against *Brucella abortus*

Dae Geun Kim¹ · Hannah Leah Tadeja Simborio¹ · Alisha Wednesday Bernardo Reyes¹ · Wongi Min¹ ·
Hu Jung Lee¹ · Jin Ju Lee² · Hong Hee Chang³ · Dong Hyeok Kim¹ · Suk Kim^{1,3*}

¹College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea

²Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang, Gyeonggi-do, 430-824, Korea

³Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea

Received: NOV. 26, 2013, Revised: DEC. 5, 2013, Accepted: DEC. 20, 2013.

ABSTRACT

Brucellosis is an important bacterial zoonotic infection worldwide responsible for economic losses in livestock industries which represents a considerable and increasing public health burden. The disease is caused by *Brucella* which possess the ability to invade and replicate within phagocytes and may result to chronic infection, leading to difficulty in medical therapy of the disease. The treatment for brucellosis employs conventional principles that have been applied for a long time and a combination of antibiotics is currently used due to low efficacy of monotherapies. However, vital effects with respect to health and safety are neglected. Nevertheless, the preventive methods and treatments for brucellosis using traditional medicine have not yet been thoroughly studied, hence, alternative therapies such as the use of natural plant extracts as traditional medicine that are safe, efficient and economical should be explored in order to identify candidates that eliminate complications due to brucellosis.

Coptis chinensis Franch (Huanglian) is a traditional Chinese medicinal herb and its extract has been known to possess strong antibacterial activity. In this study, the antibacterial effects of *C. chinensis* Franch extracts, and the major components of the herb namely berberine and palmatine, were investigated on *B. abortus*. The *C. chinensis* Franch ethanol extracts (CCFE) showed bactericidal effects at 1,000 µg/ml concentration and berberine at 100 µg/ml concentration. However, *C. chinensis* Franch and its components did not affect invasion and intracellular growth of *B. abortus* in RAW 264.7 cells. In conclusion, *C. chinensis* Franch ethanol extracts, water extract and its major components such as berberine and palmatine would be a beneficial antimicrobial agent without affecting phagocytic pathway within macrophages, and further study for the precise mechanisms of antibacterial effect would be necessary.

Key words - *Coptis chinensis* Franch, *Brucella abortus*, Antibacterial effect, Natural herb

*Corresponding author: Suk Kim
Tel: +82-55-772-2339
Fax: +82-55-772-2349
E-mail: kimsuk@gnu.ac.kr



The key roles of toll-like receptor (TLR) for intracellular survival of *Brucella*

Dae Geun Kim¹, Hannah Leah Tadeja Simborio¹, Alisha Wehnesday Bernardo Reyes¹, Wongi Min¹,
Hu Jang Lee¹, Jin Ju Lee², Suk Kim^{1,3*}

¹College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

²Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Republic of Korea

³Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

Abstract: *Brucella* spp. are facultative intracellular pathogens that have the ability to survive and multiply in professional and nonprofessional phagocytes and cause abortion in domestic animals and undulant fever in humans. *Brucella* species can survive in a variety of cells, including macrophages and their virulence and chronic infections are thought to be due to their ability to avoid the killing mechanisms within macrophages. Inhibition of phagosome-lysosome fusion has been proposed as a mechanism for intracellular survival of *Brucella* in professional and nonprofessional phagocytes. Toll-like receptors (TLRs) are part of a skillful system for detection of invasion by microbial pathogens. Recognition of microbial components by TLRs triggers signaling pathways that promote expression of genes and regulate innate immune responses. Recent studies for the interaction between TLRs-*Brucella* have indicated the importance of control of *Brucella* infection. Here, we review selected aspects of TLRs-*Brucella* interaction, which may be helpful to understanding the mechanism of *Brucella* pathogenesis.

Key words: *Brucella*, phagocytes, TLRs, intracellular survival

INTRODUCTION

Brucellosis known as undulant fever in humans is a major zoonotic disease that causes a serious debilitating disorder in humans and abortion and sterility in domestic animals.

Brucella spp. are small Gram-negative and facultative intracellular bacteria, which can multiply within professional and nonprofessional phagocytes [21, 22]. The genus *Brucella* consists of six well-recognized species classified according to host preference - *B. melitensis* (sheep and goats), *B. abortus* (cattle), *B. suis* (hogs), *B. ovis* (sheep), *B. canis* (dogs) and *B. neotomae* (wood rats) [37]. In recent years, *Brucella* has been recovered from several marine mammals, including cetaceans and pinnipeds. These marine isolates belong to two potential new species, *B. pinnipedialis* and *B. ceti* [27]. A new species of *Brucella*, *B. microti*, was recently isolated from wild common voles suffering from a systemic disease [32, 59]. *B. melitensis*, *B. abortus* and *B. suis* strains

cause abortion and infertility in their natural hosts - goats and sheep, cattle and swine, respectively. Humans can also acquire a severe, debilitating febrile illness known as brucellosis, resulting from contact with infected animals or their products [48]. *B. ovis*, a natural pathogen of sheep, primarily causes epididymitis and infertility in rams [11].

B. canis infection causes abortion and infertility in dogs [23, 67]. Although *B. ovis* and *B. canis* are important in animals, human infection with *B. canis* is rare [18], and human infection with *B. ovis* has not been reported. *B. neotomae*, a *Brucella* strain that infects only desert wood rats is not known to be associated with clinical disease in any host species.

Contrary to other intracellular pathogens, *Brucella* species do not produce exotoxins, antiphagocytic capsules or thick cell walls, resistance forms or fimbriae and do not show antigenic variation [25]. The ability of *Brucella* to avoid the killing mechanisms within macrophages is thought to be the key aspect of their virulence [58, 64].

In brucellosis, respiratory, digestive, and genital tracts are the most common point of entry for both animals and humans. *Brucella* enter phagocytic cells at an unknown cellular site and spread throughout the body by the regional lymph nodes. *Brucella* show high tropism in macrophages;

* Received 15 September 2013, Revised 30 October 2013, Accepted 15 November 2013

* Corresponding author: Suk Kim, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea. Tel: +81-55-772-2359, Fax: +81-55-772-2349, E-mail: kimsuk@gnu.ac.kr

Copyright © 2013 The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine.
The full text is freely available on the web at <http://www.jpvm.kr>.

Impaired bacterial proliferation, and compromised immune response in diabetic *db/db* mice infected with *Brucella abortus*

Dae-Geun Kim¹ · Jin-Ju Lee² · Hannah Leah Simborio¹ · Alisha Wednesday Bernardo Reyes¹ ·
Wongi Min¹ · Hu-Jung Lee¹ · Hong-Hee Chang² · Suk Kim^{1,2*}

¹ College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea

² Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea

Received: MAR. 22. 2013, Revised: APR. 6. 2013, Accepted: APR. 22. 2013

ABSTRACT

Brucellosis is an important bacterial zoonosis in humans and domestic animals. *Brucella* spp. are taken up, and survive within non-professional and professional phagocytes. In common belief, diabetes mellitus increases susceptibility to pathogenic infection. In this study, *Brucella (B.) abortus* was inoculated into a diabetic animal model, *db/db* mice, in order to show the course of brucellosis in diabetic state. The liver proliferation, bacterial burden of the liver, level of cytokines in serum and macrophage migration into liver, were investigated at 14 days post-infection. In comparison with the uninfected control mice, the results revealed that the weight of the liver of infected *db/db* mice was higher but with lower bacterial load in this organ. The level of MCP-1 mRNA expression in the liver was lower, the levels of IL-12p70, IL-10, TNF- α and IFN- γ in serum was significantly higher and the macrophages migration was significantly lower in infected mice than in the control group. In conclusion, this present study suggested that MCP-1 suppression by *B. abortus* infection may inhibit the macrophages migration, and consequently may induce to abrogate the bacterial survival in *db/db* mouse liver. Furthermore, the increased inflammatory cytokines may contribute to inhibition of *B. abortus* proliferation in diabetic mice.

Key word - *Brucella abortus*, Diabetic *db/db* mice, Liver, Bacterial proliferation

Original Article

Protective effects of recombinant *Brucella abortus* Omp28 against infection with a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in mice

Jeong Ju Lim¹, Dong Hyeok Kim¹, Jin Ju Lee¹, Dae Geun Kim¹, Wongi Min¹, Hu Jang Lee¹, Man Hee Rhee², Suk Kim^{1,2,*}

¹College of Veterinary Medicine, and ²Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

³College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

The outer membrane proteins (OMPs) of *Brucella* (*B.*) *abortus* have been extensively studied, but their immunogenicity and protective ability against *B. abortus* infection are still unclear. In the present study, *B. abortus* Omp28, a group 3 antigen, was amplified by PCR and cloned into a maltose fusion protein expression system. Recombinant Omp28 (rOmp28) was expressed in *Escherichia coli* and was then purified. Immunogenicity of rOmp28 was confirmed by Western blot analysis with *Brucella*-positive mouse serum. Furthermore, humoral- or cell-mediated immune responses measured by the production of IgG1 or IgG2a in rOmp28-immunized mice and the ability of rOmp28 immunization to protect against *B. abortus* infection were evaluated in a mouse model. In the immunogenicity analysis, the mean titers of IgG1 and IgG2a produced by rOmp28-immunized mice were 20-fold higher than those of PBS-treated mice throughout the entire experimental period. Furthermore, spleen proliferation and bacterial burden in the spleen of rOmp28-immunized mice were approximately 1.5-fold lower than those of PBS-treated mice when challenged with virulent *B. abortus*. These findings suggest that rOmp28 from *B. abortus* is a good candidate for manufacturing an effective subunit vaccine

macrophages, thereby leading to the establishment of chronic infection [9,10]. *Brucella* spp. may occur as either smooth or rough, expressing smooth lipopolysaccharide (S-LPS) or rough LPS (R-LPS) as major surface antigen (Ag). S-LPS expressed by *Brucella* is the strongest Ag compared to other antigenic molecules that are involved in the immune response against brucellosis [16]. Currently, *Brucella* (*B.*) *abortus* S19 is used to immunize cattle whereas *B. melitensis* Rev 1 is used to immunize goats and sheep [28]. In general, the use of live attenuated organisms as vaccines is associated with safety concerns during vaccine production, and attenuated *Brucella* vaccines have many specific disadvantages, including abortion in animals administered during pregnancy [26,28]. For these reasons, different strategies are being sought for the production of safe, non-replicating vaccines that are easy to reproduce with consistent quality [20].

Recently, outer membrane proteins (OMPs) of *Brucella* have been evaluated as a non-LPS group of immunogens and vaccine [6,8,16]. *Brucella* OMP Ag are categorized according to their molecular weight into three groups: group 1, 2, and 3. Group 1, 2, and 3 AOs have approximate

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Early transcriptional responses of internalization defective *Brucella abortus* mutants in professional phagocytes, RAW 264.7

Seung Bin Cha¹, Won Jung Lee¹, Min Kyoung Shin¹, Myung Hwan Jung¹, Seung Won Shin¹, An Na Yoo¹, Jong Wan Kim² and Han Sang Yoo^{1*}

Abstract

Background: *Brucella abortus* is an intracellular zoonotic pathogen which causes undulant fever, endocarditis, arthritis and osteomyelitis in human and abortion and infertility in cattle. This bacterium is able to invade and replicate in host macrophage instead of getting removed by this defense mechanism. Therefore, understanding the interaction between virulence of the bacteria and the host cell is important to control brucellosis. Previously, we generated internalization defective mutants and analyzed the envelope proteins. The present study was undertaken to evaluate the changes in early transcriptional responses between wild type and internalization defective mutants infected mouse macrophage, RAW 264.7.

Results: Both of the wild type and mutant infected macrophages showed increased expression levels in proinflammatory cytokines, chemokines, apoptosis and G-protein coupled receptors (*Gpr84*, *Gpr109a* and *Adora2b*) while the genes related with small GTPase which mediate intracellular trafficking was decreased. Moreover, cytohesin 1 interacting protein (*Cytip*) and genes related to ubiquitination (*Arrdc3* and *Fbxo21*) were down-regulated, suggesting the survival strategy of this bacterium. However, we could not detect any significant changes in the mutant infected groups compared to the wild type infected group.

Conclusions: In summary, it was very difficult to clarify the alterations in host cellular transcription in response to infection with internalization defective mutants. However, we found several novel gene changes related to the GPCR system, ubiquitin-proteasome system, and growth arrest and DNA damages in response to *B. abortus* infection. These findings may contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying host-pathogen interactions and need to be studied further.

Keywords: *Brucella abortus*, Infection, Macrophage, Response, Transcription

Background

Brucella abortus is a zoonotic pathogen that causes undulant fever, endocarditis, arthritis and osteomyelitis in humans and abortion and infertility in cattle [1,2]. They are small, non-motile, non-spore-forming Gram-negative rods and facultative intracellular organisms that are very difficult to isolate and have a long latent period that makes early diagnosis after infection impossible. Instead of producing toxins or utilizing classical virulence factors, these

microbes are able to grow in phagocytes where they are inaccessible to the host humoral immune response. They also employ several intracellular survival strategies both in professional and nonprofessional phagocytic host cells [3,4]. Therefore, understanding the interaction between bacterial virulence and the host cell is important to control brucellosis.

Several studies have described the host cell responses to *Brucella* infection. Genes from macrophage RAW 264.7 demonstrated up-regulation of proinflammatory cytokines and antibacterial response-related chemokines [5,6]. In contrast, genes involved in cell cycling, apoptosis, and intracellular trafficking were decreased after four hours of

* Correspondence: yoohs@snu.ac.kr

¹Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Brain Korea 21 for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea

Full list of author information is available at the end of the article





Host immune responses during *Brucella* infection : A brief review

Kyung Yong Sung, Han Sang Yoo[†]

Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

Abstract: Brucellosis is a zoonotic infectious disease of domestic animals, wild animals and humans. Innate immunity is a rapid and non-specific immune response that occurs during the early stages of *Brucella* invasion. Physical barriers such as epithelial cells and gastric juice secretions form the first line of defense. Humoral components such as complement and lysozyme can remove microorganisms by opsonization and bactericidal actions. Cellular components of the immune system, including macrophages, dendritic cells, neutrophils and innate T cells, have major roles in innate immunity. They recognize invading *Brucella* spp. by various cell surface receptors and then kill both the invading microorganisms and infected cells owing to their phagocytic or cytotoxic activity. In addition, they present *Brucella* antigens or produce cytokines to trigger adaptive immunity. Activated adaptive immunity consists of T helper cells, cytotoxic T cells and antigen-specific antibody-producing B cells. These can eliminate *Brucella* spp. effectively via antigen-specific mechanisms and by immunological memory. T cells activate bactericidal functions in macrophages by producing cytokines such as IFN- γ and by exerting cytotoxic effects on the infected cells. B cells produce antigen-specific antibodies that neutralize or opsonize the antigen. Because *Brucella* spp. can survive in macrophages and other host cells, Th-1 cellular immunity that enhances the bactericidal effects of phagocytic cells and the cytotoxic effects of lymphocytes is more important than humoral immunity in *Brucella* infection.

Key words: *Brucella* spp., innate immunity, adaptive immunity, cytokines, lymphocytes

INTRODUCTION

Brucellosis is a zoonotic infectious disease of domestic animals, wild animals, and humans. It was first identified in Malta by David Bruce in the 1860s and became known as Malta fever [3]. The causative organisms *Brucella* spp. are small, gram-negative, aerobic, facultative intracellular, coccobacilli. They can invade, multiply, and survive for long periods within host cells [53, 59]. Unlike other pathogenic bacteria, *Brucella* spp. do not have well-known bacterial virulence factors such as exotoxins, cytolysins, capsules, fimbriae or plasmids [16, 58]. The genus *Brucella* consists of 10 species that are differentiated on the basis of antigen variation and their primary hosts: *Brucella abortus* (cattle), *B. melitensis* (sheep and goats), *B. ovis* (sheep), *B. suis* (pigs), *B. canis* (dogs), *B. neotomae* (desert wood rats), *B. ceti* (cetaceans), *B. pinnipedialis* (seals), *B. microti* (common voles) and *B. inopinata* [6, 71].

Brucellosis is transmitted via the ingestion or inhalation

of organisms from an infected animal. The organism can penetrate mucosal epithelium in the gastrointestinal and respiratory tracts and then spread via macrophages, further multiplying in the lymph nodes, spleen, liver, bone marrow, mammary glands and sex organs [53, 59, 71]. Bovine brucellosis caused by *B. abortus* is the most widespread form of the infection, and it causes devastating economic effects on livestock production due to abortion and infertility [2]. *B. melitensis*, *B. abortus*, and *B. suis* are the major zoonotic pathogens of human brucellosis, causing various clinical signs such as undulant fever, endocarditis, meningitis, arthritis and osteomyelitis [71]. Direct contact with infected animals and the consumption of unpasteurized dairy products obtained from infected animals are major causes of human brucellosis [33].

The control of brucellosis in livestock is crucial for the prevention of human brucellosis. An ideal control program should consist of prevention, monitoring, elimination of infected animals via testing and slaughter programs, and vaccination. The general diagnosis for brucellosis is based on serological tests in both animals and humans [43].

The host immune response can be functionally classified into innate and adaptive immunity. The innate immune

Received 15 February 2014, Revised 17 March 2014, Accepted 24 March, 2014
[†] Corresponding Author. Han Sang Yoo, Phone: +82-2-880-1263, Fax: +82-2-874-2738,
E-mail: yochs@snu.ac.kr
Copyright © 2013 The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine.
The full text is freely available on the web at <http://www.jpvm.kr>.

Induction of Immune Responses by Two Recombinant Proteins of *Brucella abortus*, Outer Membrane Proteins 2b Porin and Cu/Zn Superoxide Dismutase, in Mouse Model

Kyung Yong Sung¹, Myunghwan Jung¹, Min-Kyoung Shin¹, Hyun-Eui Park¹, Jin Ju Lee², Suk Kim², and Han Sang Yoo^{1,3*}

¹Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

²College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

³Institute of Green Bio Sciences and Technology, Seoul National University, Pyeongchang 232-916, Republic of Korea

Received: December 24, 2013
Revised: March 6, 2014
Accepted: March 6, 2014

First published online
March 10, 2014

*Corresponding author
Phone: +82-2-880-1263;
Fax: +82-2-874-2738;
E-mail: yoohs@snu.ac.kr

p-ISSN 1017-7825, e-ISSN 1738-8872

Copyright © 2014 by
The Korean Society for Microbiology
and Biotechnology

The diagnosis of *Brucella abortus* is mainly based on serological methods using antibody against LPS, which has diagnostic problems. Therefore, to solve this problem, we evaluated two proteins of *B. abortus*, Cu/Zn superoxide dismutase (SodC) and outer membrane proteins 2b porin (Omp2b). The genes were cloned and expressed in a pMAL system, and the recombinant proteins, rOmp2b and rSodC, were purified as fusion forms with maltose-binding protein. The identity of the proteins was confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis with sera of mice infected with *B. abortus*. Production of cytokines and nitric oxide (NO) was investigated in RAW 264.7 cells and mouse splenocytes after stimulation with the proteins. Moreover, cellular and humoral immune responses were investigated in BALB/c mice after immunization with the proteins. TNF- α , IL-6, and NO were significantly inducible in RAW 264.7 cells. Splenocytes of naive mice produced IFN- γ and IL-4 significantly by stimulation. Moreover, number of IgG, IFN- γ , and IL-4 producing cells were increased in immunized mice with the two proteins. Production of IgG and IgM with rOmp2b was higher than those with rSodC in immunized mice. These results suggest that the two recombinant proteins of *B. abortus* may be potential LPS-free proteins for diagnosis.

Keywords: *Brucella abortus*, cytokine, immunogenicity, Omp2b, SodC

Introduction

Brucellosis is a major zoonotic disease with public health importance worldwide and causes huge economic loss on the livestock industry. The causative agent of brucellosis is the genus *Brucella*, which is a group of facultative intracellular bacteria [3]. The genus consists of six classical species according to primary preferred host and antigenic variation: *Brucella melitensis* (sheep and goats), *B. suis* (hogs), *B. abortus* (cattle), *B. ovis* (sheep), *B. canis* (dogs), and *B. neotomae* (rats) [17]. Recently, *B. ceti* and *B. pinnipedialis* isolated from marine mammals [10] were included in this genus. The zoonotic potential of *Brucella* species is variable: *B. melitensis*, *B. abortus*, and *B. suis* are considered as the most pathogenic

species for humans, and *B. canis*, *B. ceti*, and *B. pinnipedialis* also cause human brucellosis but with comparatively low zoonotic potential.

Infections of *B. abortus* show different clinical signs. This zoonotic pathogen causes undulant fever, endocarditis, arthritis, and osteomyelitis in humans, and abortion and infertility in cattle [11]. *B. abortus* organisms are present in the reproductive tissue and fetal fluids, and also concentrate in the udders of animals that produce milk. Therefore, the predominant route of exposure for *B. abortus* between animals is through ingestion or inhalation of organisms that are present in the products of parturition. Human brucellosis is usually transmitted from infected animals by direct contact with the bacteria highly presented in tissues,

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 브루셀라 감염우 양성혈청(골덴 스탠다드혈청) 및 감염시기별 감염우 혈청 확보: 몽골 국립 수의연구소 Erdenebaatar Janchivdorj 박사의 도움으로, 당 연구소 감염시설을 이용하여, 브루셀라 감염 실험을 수행하고, 감염시기별 혈청을 확보하여, 현재 수입검역중에 있음. 또한, 브루셀라 양성 혈청 (혈청검사 양성판정우로부터 균분리 혈청; 골덴스탠다드 혈청) 120 샘플을 기여 받아, 본 연구결과로 얻어진 진단방법의 정확성을 제고할 계획임. 특히 골덴스탠다드 혈청은 본 연구개발로 얻어진 진단 기법의 민감도 및 특이도 검사에 핵심적으로 사용할 중요한 샘플이기 때문에 본 연구개발의 산업화 및 국제특허 제출에 중요한 기여를 할 것임.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

- 연구실 안전점검 및 정밀안전진단을 경상대학교 및 서울대학교 공동실습실과 공동으로 수행하였음
- 안전사고에 대비하여 전 연구원은 경상대학교 및 서울대학교 주관 상해보험에 가입되어 있음
- 기타 실험실 안전에 대한 교육을 수행하였음

제 9 장 참고문헌

- Kim, S., Lee, D. S., Watanabe, K., Furuoka, H., Suzuki, H. and Watarai, M. Interferon- γ promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiol.* 5:22, 2005.
- Kim, S., Watanabe, K., Suzuki, H. and Watarai, M. Roles of *Brucella abortus* SpoT in morphological differentiation and intramacrophagic replication. *Microbiology* 151: 1607-1617, 2005.
- Watarai, M., Yamato, Y., Murakata, K., Kim, S., Omata, Y., and Furuoka, H. Detection of *Lawsonia intracellularis* by using immunomagnetic beads and ATP bioluminescence. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 449-451, 2005.
- Kim, S., Watanabe, K., Shirahata, T. and Watarai, M. Zinc uptake system (*znuA* locus) of *Brucella abortus* is essential for intracellular survival and virulence in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 1059-1063, 2004.
- Kim, S., Kurokawa, D., Watanabe, K., Makino, S., Shirahata, T. and Watarai, M. *Brucella abortus* nicotinamidase (*PncA*) contributes to its intracellular replication and infectivity in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 234: 289-295, 2004.
- Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S-I., Kodama, T. and Shirahata, T. Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb. Pathog.* 37: 11-19, 2004.
- Sieira, R., Comerci, D. J., Sanchez, D. O., and Ugalde, R. A. 2000. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *Journal of Bacteriology.* 182:4849-4855.
- Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieuille, C., Michaux-Charachon, S., and O'Callaghan, D. 1999. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infection and Immunity* 68:1297-1303.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J. L., and Gorvel, J. P. 1998. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infection and Immunity.* 66: 2387-2392.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jacobzick, U., and Timmis, K. N. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of Bacteriology.* 172:6568-6572.
- Morgan, W. J., MacKinnon, D. J., Lawson, J. R. and Cullen, G. A. 1969. The rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.* 85: 636-641.
- Ficht, T. A., Bearden, S. W., Sowa, B. A. and Adams, L. G. 1988. A 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. *Infect. Immun.* 56: 2036-2046.
- Erdenebaatar, J., Bayarsaikhan, B., Watarai, M., Makino, S. and Shirahata, T. 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals

- infected with *Brucella* species from those of animals infected with *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**: 710-714.
- Detilleux, P. G., Deyoe, B. L. and Cheville, N. F. 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.* **58**: 2320-2328.
- Baldi, P. C., Giambartolomei, G. H., Goldbaum, F. A., Abdon, L. F., Velikovsky, C. A., Kittelberger, R. and Fossati, C. A. 1996. Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with *B. abortus* S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**: 472-476.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.