

국내 주요 동물질병의 병원체에 대한 프로테오믹스  
데이터베이스 구축

Establishment of proteome database for major  
pathogens in Korea livestock industry

연구기관

경상대학교 수의과대학

농 립 부

## 최 종 보 고 서

2004년도 농림 기술 개발사업에 의하여 완료한 국내 주요 동물 질병의 병원체에 대한 프로테옴 데이터 베이스 구축의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 1 매

2004. 8.

주관연구기관 : 경 상 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 용 환 (인)

주관연구기관장 : 경상대학교총장 직인

농 립 부 장 관 귀 하

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 주요 동물 질병의 병원체에 대한 프로테옴 데이터 베이스 구축”과  
제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 8월 6일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 김 용 환

세부연구책임자 : 김 곤 섭

정 대 성

정 우 식

연 구 원 : 서 명 득

신 용 승

남 택 수

Feliza E. Justiniane

박 현 수

한 대 용

# 요 약 문

## I. 제 목

국내 주요 동물 질병의 병원체에 대한 프로테오믹 데이터 베이스 구축

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

차세대 생물학연구의 기본 축인 proteomics에 대한 기술축적은 가축사양에서 외국과 경쟁력을 높이는데 있어서 필수 불가결한 위치에 있다. 그 좋은 예로써 2000년 국내에 발생한 구제역의 신속진단에서 선진기술의 국내 확보가 얼마나 중요한 지 입증되었다. 현재까지 진행된 genome에 대한 연구는 proteomics의 연구와 상호 보완 관계에 놓여 있다. 따라서 proteomics에 의한 지속적인 연구는 그 파급효과가 의학을 포함한 전체 생물학에 걸쳐있으며 앞으로 다른 질병의 연구에 있어서도 기반이 될 것이다.

유전자의 기능을 밝히는 분자생물학적 방법으로는 DNA array chip, protein chip, proteomics, structural genomics 그리고 transgenic animals 등이 있으며, 그 중 proteomics가 유전자의 기능해석에 가장 유력한 도구로서 주목받고 있다. 한편, 이 학문은 새롭게 시작하는 신흥학문임으로 우리나라도 해외 우수 경쟁력 있는 연구소와 대결하여 국제경쟁력을 충분히 갖출 수 있다. 고부가가치를 창출할 수 있는 지식기반의 사회를 이루기 위해서 새로운 학문과 기술의 도입이 필요한데, 생명공학 분야에서 그 선두에 있는 proteomics를 통하여 그 꿈을 실현 시킬 수 있다.

모든 생명현상의 핵심은 단백질 활동의 결과이다. Proteomics는 genome의 기능을, 특히 단백질, 밝히려는 학문이자 테크닉으로서 생물학의 연구에 있어서 새로운 paradigm으로 그 중요도가 세계적으로 증가하고 있다. 2000년 10월에는 인간게놈프로젝트를 성공리에 마쳤으며, 또한 현재까지 약 26개의 병원체에 대한 염기 서열의 완수는 DNA자체를 이해하기 위한 것이 아니라 단백질의 생명현상을 이해하기 위한 것이다. Proteomics의 선발국인 스위스(Molecular scanner기술), 호주(Molecular printer 기술), 덴마크(mass 분석기술) 뿐만 아니라 미국의 Celera Genomics는 proteomics를 통하여 유용한 단백질의 해석과 이용을 목적으로 많은 연구를 진행 중이다. Proteomics를 위해서는 생물체를 분석하고 신물질을 발견하는 기법의 도입이 무엇보다도 시급하다.

축산업의 연간 총생산액은 7조원(1997년 농림통계자료)에 달하며 그 중에서 양돈업계의 생산액이 2조원에 달한다. 그러나 돼지 질병으로 인한 경제적 손실은 총생산액의 20%를 추정하고 있다. 돼지의 질병 중에서 가장 큰 피해를 주는 것은 신생 및 포유 자돈에서 발생하는 설사병과 이유자돈의 부종병이 대표적인 질환이다. 특히 부종

병에서 감염된 자돈은 대부분 폐사하며 회복되더라도 위축돈이 되므로 양돈업계에 큰 피해를 준다. 따라서 질병에 의한 피해를 최소화하기 위해서는 신속·정확한 진단이 필요하다. 자돈의 설사병은 주로 장출혈성 (EHEC), 장병원성(EPEC) 및 장독소형질 (ETEC) 대장균이 유발되며, 수많은 혈청형이 알려져 있으나 혈청형간의 생화학적인 특징 및 genetic marker가 없다. 그래서 원인균을 신속하게 진단하는데 어려움이 많고 긴 시간이 요구된다. 첨단 proteomics 기술을 응용하여 병원성 대장균의 공통 특이 항원 spot을 분리하여 진단 marker로 이용할 경우 신속한 진단 및 예방대책의 확립이 가능하다. 또한 Blanttner등이 1996년 대장균 유전체의 염기서열을 완전 제시하였으며, Timoney 등(1997)이 EPEC의 "Pathogenicity island"의 염기서열을 제시함으로써 단백질의 기능해석이 훨씬 용이하게 되었다.

Neosporosis는 다소 최근에 밝혀진 질병으로서, *Neospora caninum* (*N. caninum*)의 감염으로 발생하는 원충성 질병이다. 이 원충은 소와 개를 비롯한 여러 동물에서 유·사산과 신경증상을 일으키는 원인체로 알려져 있으며, 현재까지 소의 *N. caninum* 감염은 미국, 캐나다, 영국, 일본 등 12 개국에서 발생이 보고 되었으며, 우리나라에서도 1997년 *N. caninum*은 김 등에 의하여 소 유산태아에서 최초로 분리 보고하였다. 또한 김 등은 이 원충의 감염으로 인한 동일한 소의 반복유산 (repeated abortion)을 증명하였다. 국내에서의 발병상황에 대한 보고에서 김 등은 1996년부터 유산과 사산이 문제시되고 있는 경기도와 충북지역의 젓소목장에서 60두의 유산태아를 검사하여 5두에서 *N. caninum* 감염을 관찰한 바 있다. 허 등은 국내 10개 시·도의 젓소에 대하여 *N. caninum* 항체보유 여부를 간접형광항체법으로 조사하여 평균 약 21%의 양성율을 보고하였다. *N. caninum*에 대한 연구는 국내적으로 그리고 국제적으로 미진하다. 결과적으로 이 병원체에 대한 부족한 지식은 *N. caninum* 감염의 예방뿐만 아니라 신속, 정확 그리고 높은 특이성을 갖고 진단 할 수 있는 방법이나 또는 감염된 동물을 치유할 수 있는 약제가 없는 실정이다.

*Salmonella* 속균에 대한 경제적 피해 및 먹거리의 안정성에 대한 문제가 심각하게 제기되고 있다. *Salmonella* 속균은 닭에서 추백리(*S. pullorum*), 닭 티푸스(*S. enteritidis*) 등을 일으켜 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 준다. 계육 및 계란은 인체 살모넬라 식중독에서 가장 중요한 전염원으로 생각되어 진다. 1992년 일본 오사카 지방에서 1800여명의 식중독 발생 사건이 있었는데 그 원인은 도시락에 사용된 계란부침에 *S. enteritidis*가 오염된 것으로 판명되었다. 또한 미국에서는 1985 - 1990년 간에 *S. enteritidis*에 의한 식중독 사건이 284건 발생하여 47명이 사망하였는데 대부분 계란과 관련된 식품인 것으로 보고되었다. 1992년 영국에서 조사된 산란계에 있어서의 *S. enteritidis*의 분리율은 18.7%로 비교적 높은 분리율을 나타내었으며, 분리한 *Salmonella* 균주 중 *S. enteritidis*가 12%로서 높은 분리율을 나타내고 있다. 따라서, *Salmonella* 속균은 닭의 분변 및 계육에서 높은 분리율을 나타내고 있어 이에 대한 감소 대책이 절실히 요구된다. 더욱이 최근 가격이 저렴한 외국산 냉장 식육류가 수

입되는 등 국내시장 점유율이 점차 증가하고 있다. 따라서 국내산 계육의 안전성 확보는 물론 *Salmonella* 속균에 대한 진단 방법의 개발과 예방대책에 대한 연구는 시급한 실정이다.

모든 생명현상은 단백질활동의 결과이며, 모든 질병은 단백질 수준에서 발생하며, DNA와 RNA는 얼마만큼의 단백질이 있어야 하며, 어느 곳에 있어야 하는지를 결정할 뿐이다. 따라서 proteomics적인 접근을 통하여 동물 질병 특히, 공중위생학적으로 중요할 뿐 아니라 소, 돼지, 닭 그리고 개 등 가축사양에서 경제적 피해를 주고 있는 *E. coli* 균, *Salmonella* 균, *Neospora caninum*을 대상으로 예방과 치유의 새로운 지견을 제공함으로써 안정적으로 양축가가 축산물 생산을 도모토록 하고자 본 실험을 수행코져 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 연구개발사업 목표

본 과제에서는 proteomics적인 접근으로 동물 질병의 예방과 치료의 새로운 기술 확립을 목표로 한다. 특히, 공중위생학적으로 중요할 뿐 아니라 소, 돼지, 닭 그리고 개 등 가축사양에서도 경제적 피해를 주고 있는 *E. coli* 균, *Salmonella* 균, *Neospora caninum*의 프로테오믹 데이터 베이스를 확립하여 연구를 수행하려고 한다. 이러한 프로테오믹 데이터 베이스는 장기적으로 국내 가축질병의 예방과 치료에 기여함으로써 양축가와 소비자들에게 안정적 생산과 소비를 창출할 수 있다.

#### 2. 연구내용 및 범위

##### 가. 자돈 하리 원인 대장균의 프로테오믹 분석

- 1) Immobilised pH Gradient gel을 이용한 2-Dimensional Gel Electrophoresis을 위한 병원성 대장균 Sample조제 방법 개발
- 2) 병원성 대장균의 2-Dimensional Gel Electrophoresis Map 완성
- 3) 2-Dimensional Gel Electrophoresis한 항원을 각 strain특이 항혈청을 이용한 immunoblotting 조건의 확립
- 4) 병원성 대장균의 특이항원 spot의 분리와 MALDI-TOF-MS를 이용한 단백질 database 구축

##### 나. *Neospora caninum*의 프로테오믹 연구

- 1) *N. caninum* 분리주에 대한 배양방법과 항원의 순수 분리법의 개발

- 2) Immobilised pH Gradient gel을 이용한 2-Dimensional Gel Electrophoresis을 위한 Sample조제 방법 개발
- 3) *Toxoplasma gondii*와 상이한 단백질 항원의 발견 위한 항혈청 생산
- 4) 2-Dimensional Gel Electrophoresis 후 *N. caninum*의 양성 혈청을 이용한 immunoblotting 조건 확립
- 5) *N. caninum*의 특이 항원 Spot의 분리와 MALDI-TOF-MS을 이용한 단백질 database 구축

#### 다. *Salmonella enteritidis* 의 프로테옴 연구

- 1) *S. enteritidis* 분리주의 확보 및 프로테옴 연구를 위한 배양법 확립
- 2) Immobilised pH Gradient gel을 이용한 2-Dimensional Gel Electrophoresis을 위한 Sample조제 방법을 개발
- 3) 국내 분리주 및 국외 분리주에 대한 2-Dimensional Gel Electrophoresis Map을 완성
- 4) 2-Dimensional Gel Electrophoresis 된 분리주간의 비교 및 특이 단백질 선별
- 5) *S. enteritidis*의 특이 항원 Spot의 분리와 MALDI-TOF-MS을 이용한 단백질 database 구축

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

#### 1. 연구개발 결과

##### 가. 자돈 하리 원인 대장균의 프로테옴 연구

병원성 *E. coli* 8종의 strain에 대한 항원성 단백질을 규명하고 비교하였다. 각 strain에 대해 토끼 *E. coli*O157:H7 항혈청을 이용해 immunoblot 한 결과 ACH5 strain에서는 182개 spot중 69개의 항원성 spot과 42개의 동정된 항원성 spot을 찾았고, K88에서는 총 182개 spot중 87개의 항원성 spot과 43개의 동정된 항원성 spot을 찾았다. K99에서는 총 154개 spot중 86개의 항원성 spot과 30개의 동정된 항원성 spot을 찾았고, O148에서는 총 210개 spot중 91개의 항원성 spot과 14개의 동정된 항원성 spot을 찾았다. O59에서는 총 222개 spot중 50개의 항원성 spot과 10개의 동정된 항원성 spot을 찾았으며 O157:H7에서는 총 247개 spot중 75개의 항원성 spot과 38개의 동정된 항원성 spot을 찾았다. C2에서는 총 286개 spot중 83개의 항원성 spot과 22개의 동정된 항원성 spot을 찾았고 O26에서는 총 156개 spot중 67개의 항원성 spot과 42개의 동정된 항원성 spot을 찾았다. 아울러 각각의 strain에 특징적인 항혈청을 이용한 immunoblot의 결과 K88 strain에서는 46개, K99에서는 10개, O148에서는 18개, O157:H7에서는 75개 그리고 O26에서는 29개의 strain specific spot을 찾았다.

#### 나. *Neospora caninum*의 프로테오믹스 연구

이차원 전기영동법과 immunoblot 법 그리고 MALDI TOF-MS를 이용해서 *Neospora caninum*에 대한 프로테오믹스 분석을 실시 하였다. pH 3-10 그리고 pH 4-7의 13cm IPGstrip을 이용해서 총 350여개의 단백질 spot을 관찰 할 수 있었으며, 이들 중 관심있는 spot을 선택하여 MALDI-TOF MS를 이용해 단백질 동정을 한 결과 20개의 서로 다른 단백질로 구성된 31개의 단백질 spot을 동정 할 수 있었다. 이들 중 6개의 단백질(NTPase, 14-3-3 protein homologue, NcMIC1, NCDG1, NcGRA1 그리고 NcGRA2)은 *N. caninum* database로부터 동정 하였으며, 11개의 단백질 (HSP70, HSP60, pyruvate kinase, tubulin  $\alpha$ - 그리고  $\beta$ -chain, putative protein disulfide isomerase, enolase, actin, fructose-1,6-bisphosphatase, lactate dehydrogenase 그리고 glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase)은 서로 계통분류학적으로 유사한 *T. gondii* database를 이용해 동정을 하였다. *N. caninum* 가토화 혈청을 이용한 pH 4.7 IPG strips을 이용한 immunoblot법에서는 102개의 항원성 spot을 관찰할 수 있었으며 이들 중 11개의 단백질로 구성된 17개의 항원성 spot을 동정 할 수 있었다.

#### 다. *Salmonella enteritidis*의 프로테오믹스 연구

*S. enteritidis*를 이용한 이차원 전기영동결과 pH 4-7범위 13cm silver stained gel 에서 788개의 spot을 count할 수 있었고 이들을 MALDI-TOF MS 분석법으로 단백질 동정을 한 결과 65개의 단백질로 구성된 70개의 spot을 동정 할 수 있었다. 아울러 *S. enteritidis* 가토화 혈청을 이용한 immunoblot 결과 100여개의 항원성 spot을 확인 할 수 있었으며 이들 중 35개의 단백질을 동정 할 수 있었다. 동정된 단백질들은 chaperone에 관련되거나 단백질 생합성의 transcription, translation에 관련된 단백질이 발견 되었고 대다수는 에너지 대사에 관련된 단백질들을 확인 할 수 있었다.

## 2. 활용에 대한 건의

가축질병의 신속·정확한 진단방법과 치료법의 개발을 위한 proteome database를 확립함으로써 국내 가축질병의 예방과 치료약재 개발 그리고 특이 항원성 단백질 marker를 이용한 질병역학조사에도 기여할 수 있을 것으로 기대되며 이러한 결과는 양축가와 소비자들에게 안정적 생산과 소비를 창출할 수 있을 것이다.



# SUMMARY

## I. Title

Establishment of proteome database for major pathogens in Korea livestock industry.

## II. Purpose and Significance of Research

This study was conducted for the establishment of proteome database for pathogens such as *E. coli*, *Neospora caninum*, and *Salmonella enteritidis*.

*Escherichia coli* is a gram-negative bacterium that causes serious diseases, particularly in digestive and urinary tract of humans and animal. *Neospora caninum* (*N. caninum*) is an obligate intracellular protozoan parasite of the family *Sarcocystidae*, belonging to the phylum *Apicomplexa*. This parasite has caused a serious disease in animals as a abortion, stillbirth or paralysis, particularly cattle and dogs worldwide. *Salmonella* spp. are facultative intracellular pathogens causing localized systemic infection, in addition to a chronic asymptomatic carrier state.

Currently, control of disease as a stated above was usually considered as a difficult task. A variety of drugs and vaccine candidates have been tested *in vitro* or *in vivo*, but control of these pathogens was not possible until now.

Due to the evolvement of post-genomic era, proteomics has become one of the most important research areas. Proteomics was able to characterize gene and protein function, understand functional linkages between protein molecules, and provide valuable informations regarding the mechanisms of biological processes in the body. Proteomics was built upon genomic sequence data providing new approaches and insights for pathogenesis of infective organisms. In the study of pathogens, the combined technologies of genomics, proteomics and bioinformatics might serve as valuable tools for the study of complex phenomena determining the action of multiple gene sets. Protein expression profiling might determine the identification of proteins in particular samples as a function of a particular state of an organism or cell (e.g., differentiation, developmental, or disease state) or as a function of exposure to a drug, chemical, or physical stimulus. These data provided a better understanding of disease processes, development of new biomarkers for diagnosis and early detection of diseases, and acceleration of drug development.

The overall objectives of the study were to establish the proteome database for

pathogens such as *E. coli*, *N. caninum*, and *S. enteritidis* and these kind of studies might provide new perspectives in pathogenesis.

### **III. Contents and Scope of Research**

#### **1. Proteome analysis of pathogenic *E. coli*.**

Several reports and researches were conducted concerning *E. coli* pathogenicity, infections and genome identifications in various strains. But information on its proteins was still limited. Therefore, this particular study aims in establishing a 2-DE map in eight strains of pathogenic *E. coli* and determine the antigenic proteins in each strain in two ways. First, is by the use of O157:H7 antiserum and second, is by the strain specific antisera (K88, K99, O157:H7, O148 and O26) that were selected based on their commercial availability. Finally, comparison of all the identified proteins between pathogenic *E. coli* strains were also conducted employing MALDI-TOF MS analysis.

#### **2. Proteome analysis of *N. caninum*.**

We established 2-DE map of *N. caninum* tachyzoites including conserved proteins between *N. caninum* and *Toxoplasma gondii*. On the basis of the study, the protein and antigen profiles expressed in tachyzoites of two isolates of *N. caninum* between Korea and Japan (KBA-2 and JPA1) were explored and classified as a manner of each immunoglobulin class. In addition, between *N. caninum* and *T. gondii* tachyzoites were compared by proteomic approach.

#### **3. Proteome analysis of *S. enteritidis*.**

Proteomics traditionally used the separation power of two-dimensional electrophoresis for the quantitative analysis of protein amount in complex extract. Two-dimensional electrophoresis can separate several hundred to a thousand of proteins in a single procedure with high resolution. This study aimed to provide a global analysis of the expressed protein including an antigen of *S. enteritidis* by using proteomics.

### **IV. Results of Research**

In the *E. coli* study, a total of 69 antigenic spots out of 182 and corresponds to 42 proteins were determined in strain ACH5 using *E. coli*O157:H7 antiserum, 87 of 182 spots corresponding to 43 proteins in K88, 86 of 154 spots that corresponds to 30 proteins in K99, 91 of 210 spots in O148 which corresponds to 14 proteins, 50 of 222 spots that corresponds to 10 proteins in O59, 38 proteins corresponded to 75 of 247 spots in O157:H7, 83 of 286 spots which corresponds to 22 proteins in C2, and 67 antigenic spots out of 156 that corresponds to 42 proteins were determined in O26. On the other hand, strain specific antisera detected a total of 46 out of 102 spots in K88 strain, 10 of 31 spots in K99, 18 of 35 spots in O148, 75 of 247 spots in O157:H7 and 29 of 41 spots in O26. Common as well as specific antigenic proteins were being noted and differentiated between respective strains.

Comparison conducted reveals a total of 15 common antigenic spots present in each strain as recognized by *E. coli* O157:H7 antiserum. In contrast, specific antigenic proteins identified differs in total numbers between strains. *E. coli*K88 and O148 were identified having 17 specific antigenic spots, a total of 10 in strains K99 and O59, 7 in *E. coli* C2, O157:H7 and O26 strains, whereas 4 were present in ACH5.

In the *N. caninum* study, 31 spots corresponding to 20 different proteins were identified from *N. caninum* tachyzoites by peptide mass fingerprinting (PMF). Six proteins were identified from a *N. caninum* database (NTPase, 14-3-3 protein homologue, NcMIC1, NCDG1, NcGRA1 and NcGRA2), and 11 proteins were identified in closely related species, namely the *T. gondii* database (HSP70, HSP60, pyruvate kinase, tubulin - and -chain, putative protein disulfide isomerase, enolase, actin, fructose-1,6-bisphosphatase, lactate dehydrogenase, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). One hundred and two antigen spots were observed using pH 4-7 IPG strips on immunoblot profiles. Among them, 17 spots corresponding to 11 antigenic proteins were identified from a *N. caninum* protein map.

In the *S. enteritidis* study, a total of 788 spots were observed on a silver stained gel using pH 4-7 IPG strip (13 cm). Among them, 70 spots corresponding to 65 different proteins were successfully identified by MALDI-TOF MS analysis. With rabbit anti-*S. enteritidis* sera, 100 spots were observed as antigenic proteins and 35 proteins were identified from database search after MALDI-TOF MS. Most of the proteins identified were belonging to chaperone like action, protein synthesis, and metabolic pathway of G(-) bacteria.

In conclusion, 2-DE combined with immunoblotting assay proved very useful for

the analysis of antigenic proteins. The maps established in the present study will provide useful basic information for the development of a diagnostic tool for the understanding the pathogenesis and for the development of vaccines or drugs for the disease of *E. coli*, *N. caninum*, and *S. enteritidis*

## CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
Section 1. Objective of research development.....	1
Section 2. The Significance of the study.....	4
Section 3. The scope of the study.....	4
Section 4. The process system of the study.....	5
<b>Chapter 2. Research Background.....</b>	<b>6</b>
<b>Chapter 3. Contents and Results .....</b>	<b>8</b>
Section 1. Introduction.....	8
Section 2. Material and Method.....	48
Section 3. Contents & Results.....	88
<b>Chapter 4. Contribution.....</b>	<b>97</b>
Section 1. Study of <i>E. coli</i> proteome.....	97
Section 2. Study of <i>Neospora caninum</i> proteome.....	98
Section 3. Study of <i>Salmonella enteritidis</i> proteome.....	99
<b>Chapter 5. Usefulness of the Results.....</b>	<b>100</b>
Section 1. Application of the results.....	100
Section 2. The industry of the results.....	100
<b>Chapter6. Information on foreign biotechnology.....</b>	<b>101</b>
<b>Chapter 7. References.....</b>	<b>103</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	1
제 1 절 연구개발의 목적.....	1
제 2 절 필요성.....	4
제 3 절 연구범위.....	4
제 4 절 연구개발 추진체계.....	5
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	6
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	8
제 1 절 <i>E. coli</i> 의 프로테움 연구 .....	8
제 2 절 <i>Neospora caninum</i> 의 프로테움 연구 .....	48
제 3 절 <i>Salmonella enteritidis</i> 의 프로테움 연구.....	88
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야의 기여도.....	97
제 1 절 연구평가의 착안점.....	97
제 2 절 연구목표 달성도.....	98
제 3 절 관련분야의 기술발전의 기여도.....	99
제5 장 연구개발 결과의 활용계획.....	100
제 1 절 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 응용.....	100
제 2 절 기업화 추진방안.....	100
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	101
제 7 장 참고문헌.....	103

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

### 1. 연구개발의 필요성

최근 우리나라의 산업 경기가 침체되면서 축산업계도 심각한 불황에 시달리고 있다. UR타결이후 GATT/ WTO체제의 출범과 무역제한의 철폐로 국내 축산물은 시장의 전면개방과 무한경쟁시대를 맞이하게 됨에 따라 생산과 유통 기반이 취약하고 가격과 품질 면에서 외국산 축산물보다 열등한 위치에 처해 있는 국내산 축산물은 수입 축산물과의 경쟁에서 탈락될 위기에 놓여 있으며 이는 국내 축산업의 몰락으로까지 치달을 수도 있다.

우리나라 축산업은 오래전부터 음식찌꺼기와 같은 농수산부산물을 이용한 농가부업으로 시작하여, 관혼상제나 명절과 같은 크고 작은 행사에 제물이나 중요한 영양식품 공급원으로써 발전되어 왔다. 그러나 최근에 와서는 국민소득증대와 식생활향상으로 고품질 영양식품 공급확대의 필요에 따라 축산업이 급속히 발전되어 원래 농가부업형태의 사육농가는 거의 사라지고 전업 또는 기업농으로 전환되는 과정에 있다. 그 예로 1983년 12월과 비교한 2003년 12월의 국내 축산업규모를 살펴보면, 전체 평균 약 73%P의 농가수가 줄어들고 사육두수는 55%P로 늘어나서, 육성우의 경우 사육농가가 농가당 사육두수가 2두인 것이 8두로, 유우의 경우는 9두에서 49두로, 양돈의 경우는 7두에서 606두 그리고 양계의 경우는 91수에서 686수로 증가하였음을 들 수 있다. 그러나 사육두수의 증가에 따른 가축 질병발생도 점점 늘어나고 집약사육에 따른 질병의 전파등의 가능성이 커져 질병피해로 인한 경제적 손실이 20%이상 증가되었음이 추정되고 있다. 이러한 질병과 위생은 축산업의 생산성을 저하시킬 뿐만 아니라 축산식품의 품질까지 저하시킴으로써 소비자에게 외면당함은 물론 축산업도 사양화될 수도 있을 것이다. 따라서 가축 질병관리는 무역개방화를 맞는 우리 축산분야에서는 생산가격과 품질경쟁 면에서 한 치의 소홀함이 있어서는 안 될 것이다. 따라서 세계화 시대의 축산에 걸맞은 가축질병의 예방과 위생적 관리에 관한 인식을 새로이 하고 그에 따른 대책과 실천을 철저히 수립해야 할 것이다.

### 가. 기술적 측면

모든 생명현상의 핵심은 단백질 활동의 결과이다. Proteomics는 genome 및 proteome의 기능을 밝히려는 학문이자 테크닉으로서 생물의학의 연구에 있어서 새로운 paradigm으로 그 중요도가 세계적으로 증가하고 있다. 2000년 10월에는 인간게놈 프로젝트를 성공리에 마쳤으며, 또한 현재까지 약 26개의 병원체에 대한 염기 서열의 완수는 DNA자체를 이해하기 위한 것이 아니라 단백질의 생명현상을 이해하기 위한

것이다. Proteomics의 선발국인 스위스(Molecular scanner기술), 호주(Molecular printer 기술), 덴마크(mass 분석기술) 뿐만 아니라 미국의 Celera Genomics는 proteomics를 통하여 유용한 단백질의 해석과 이용을 목적으로 많은 연구를 진행 중이다. Proteomics를 위해서는 생물체를 분석하고 신 물질을 발견하는 기법의 도입이 무엇보다도 시급하다.

유전자의 기능을 밝히는 분자생물학적 방법으로는 DNA array chip, protein chip, proteomics, structural genomics 그리고 transgenic animals등이 있으며, 그 중 proteomics가 유전자의 기능해석에 가장 유력한 도구로서 주목받고 있다. 한편, 이 학문은 새롭게 시작하는 신흥학문임으로 우리나라도 해외 우수 경쟁력 있는 연구소와 대결하여 국제경쟁력을 충분히 갖출 수 있다. 고부가가치를 창출할 수 있는 지식기반의 사회를 이루기 위해서 새로운 학문과 기술의 도입이 필요한데, 생명공학 분야에서 그 선두에 있는 proteomics를 통하여 그 꿈을 실현 시킬 수 있다.

#### 나. 경제적 측면

축산업의 연간 총생산액은 7조원(1997년 농림통계자료)에 달하며 그 중에서 양돈업계의 생산액이 2조원에 달한다. 그러나 돼지 질병으로 인한 경제적 손실은 총생산액의 20%를 추정하고 있다. 돼지의 질병중에서 가장 큰 피해를 주는 것은 신생 및 포유자돈에서 발생하는 설사병과 이유자돈의 부종병이 대표적인 질환이다. 특히 부종병에서 감염된 자돈은 대부분 폐사하며 회복되더라도 위축돈이 되므로 양돈업계에 큰 피해를 준다. 따라서 질병에 의한 피해를 최소화하기 위해서는 신속·정확한 진단이 필요하다. 자돈의 설사병은 주로 장출혈성(EHEC), 장병원성(EPEC) 및 장독소형성(ETEC) 대장균이 유발되며, 수많은 혈청형이 알려져 있으나 혈청형간의 생화학적인 특징 및 genetic marker가 없다. 그래서 원인균을 신속하게 진단하는데 어려움이 많고 긴 시간이 요구된다. 첨단 proteomics 기술을 응용하여 병원성 대장균의 공통 특이 항원 spot을 분리하여 진단 marker로 이용할 경우 신속한 진단 및 예방대책의 확립이 가능하다. 또한 Blanttner등이 1996년 대장균 유전체의 염기서열을 완전 제시하였으며, Timoney 등(1997)이 EPEC의 "Pathogenicity island"의 염기서열을 제시하므로써 단백질의 기능해석이 훨씬 용이하게 되었다.

Neosporosis는 다소 최근에 밝혀진 질병으로서, *Neospora caninum*의 감염으로 발생하는 원충성 질병이다. 이 원충은 소와 개를 비롯한 여러 동물에서 유·사산과 신경증상을 일으키는 원인체로 알려져 있으며, 현재까지 소의 *N. caninum* 감염은 미국, 캐나다, 영국, 일본 등 12 개국에서 발생이 보고되었으며, 우리나라에서도 1997년 *N. caninum*은 김 등에 의하여 소 유산태아에서 최초로 분리 보고하였다. 또한 김 등은 이 원충의 감염으로 인한 동일한 소의 반복유산(repeated abortion)을 증명하였다. 국내에서의 발병상황에 대한 보고에서 김 등은 1996년부터 유산과 사산이 문제시되고 있는 경기도와 충북지역의 젓소목장에서 60두의 유산태아를 검사하여 5두에서 *N.*



*caninum* 감염을 관찰한 바 있다. 허 등은 국내 10개 시·도의 젓소에 대하여 *N. caninum* 항체보유 여부를 간접형광항체법으로 조사하여 평균 약 21%의 양성율을 보고하였다. *N. caninum*에 대한 연구는 국내적으로 그리고 국제적으로 미진하다. 결과적으로 이 병원체에 대한 부족한 지식은 *N. caninum* 감염의 예방뿐만 아니라 신속, 정확 그리고 높은 특이성을 갖고 진단 할 수 있는 방법이나 또는 감염된 동물을 치유 할 수 있는 약제가 없다.

*Salmonella* 속균에 대한 경제적 피해 및 먹거리의 안정성에 대한 문제가 심각하게 제기되고 있다. *Salmonella* 속균은 닭에서 추백리(*S. pullorum*), 닭 티푸스(*S. enteritidis*) 등을 일으켜 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 준다. 계육 및 계란은 인체 살모넬라 식중독에서 가장 중요한 전염원으로 생각되어 진다. 1992년 일본 오사카 지방에서 1800여명의 식중독 발생 사건이 있었는데 그 원인은 도시락에 사용된 계란부침에 *S. enteritidis*가 오염된 것으로 판명되었다. 또한 미국에서는 1985 - 1990년 간에 *S. enteritidis*에 의한 식중독 사건이 284건 발생하여 47명이 사망하였는데 대부분 계란과 관련된 식품인 것으로 보고되었다. 1992년 영국에서 조사된 산란계에 있어서의 *S. enteritidis*의 분리율은 18.7%로 비교적 높은 분리율을 나타내었으며, 분리한 *Salmonella* 균주 중 *S. enteritidis*가 12%로서 높은 분리율을 나타내고 있다. 따라서, *Salmonella* 속균은 닭의 분변 및 계육에서 높은 분리율을 나타내고 있어 이에 대한 감소 대책이 절실히 요구된다. 더욱이 최근 가격이 저렴한 외국산 냉장 식육류가 수입되는 등 국내시장 점유율이 점차 증가하고 있다. 따라서 국내산 계육의 안전성 확보는 물론 *Salmonella* 속균에 대한 진단 방법의 개발과 예방대책에 대한 연구는 시급한 실정이다.

#### 다. 사회적 측면

고품질의 저렴한 외국산 축산물의 수입이 확대됨에 따라 국민들의 선택폭이 다양해졌고, 경제성을 감안할 때 국내 축산업계에서도 경쟁력 강화를 위한 대등한 혹은 우위를 점할 수 있는 축산기술이 절실히 요구되며 특히 수의 및 공중위생분야에 대한 안전성이 낮은 상태의 축산물생산은 국민의 생명을 위협할 뿐 아니라, 국내 축산업계의 존망에 치명적인 영향을 줄 수 있다.

차세대 생물학연구의 기본 축인 proteomics에 대한 기술축적은 가축사양에서 외국과 경쟁력을 높이는데 있어서 필수 불가결한 위치에 있다. 그 좋은 예로써 2000년에 국내에 발생한 구제역의 신속진단에서 선진기술의 국내 확보가 얼마나 중요한 지 입증되었다. 현재까지 진행된 genome에 대한 연구는 proteomics의 연구와 상호 보완 관계에 놓여 있다. 따라서 proteomics에 의한 지속적인 연구는 파급효과가 의학을 포함한 전체 생물학에 걸쳐 있으며, 앞으로 다른 질병의 연구에 있어서도 기반이 될 것이다.

## 제 2 절 필요성

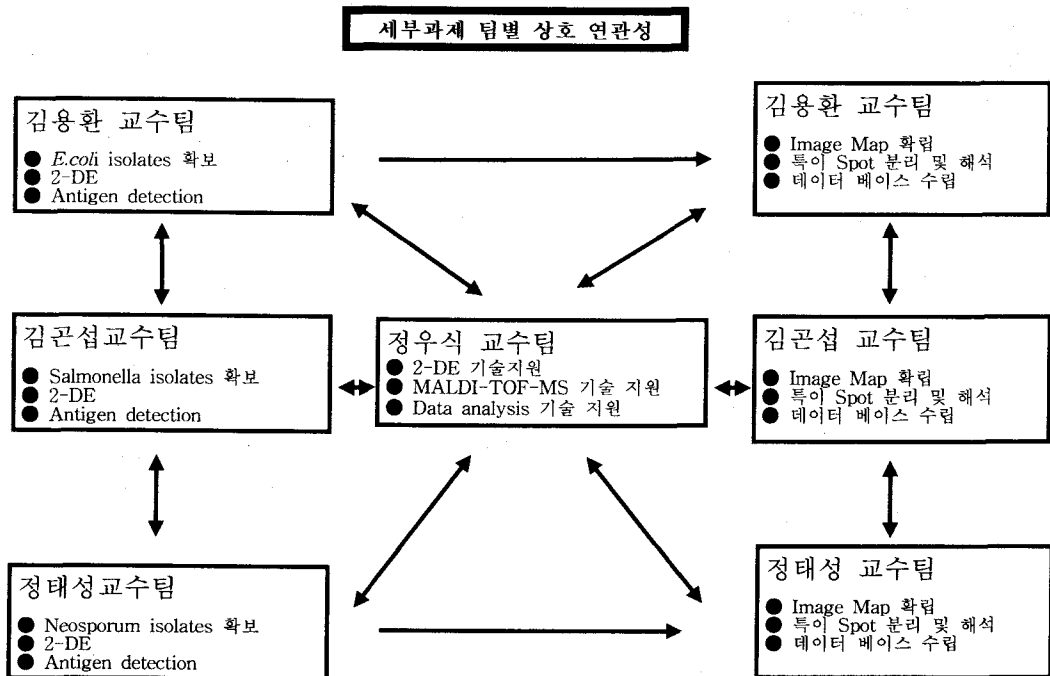
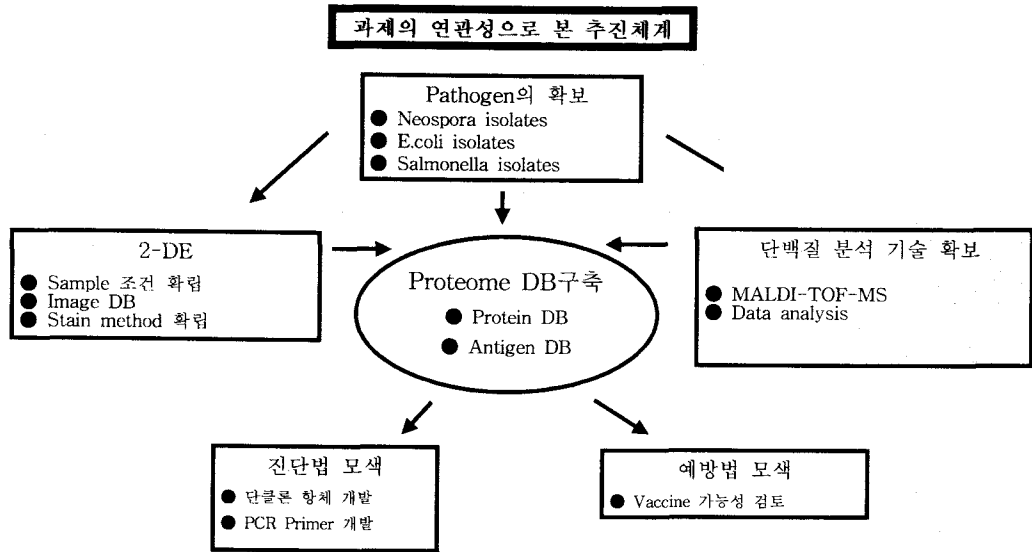
모든 생명현상은 단백질활동의 결과이며, 모든 질병은 단백질 수준에서 발생하며, DNA와 RNA는 얼마만큼의 단백질이 있어야 하며, 어느 곳에 있어야 하는지를 결정할 뿐이다. 따라서 proteomics적인 접근을 통하여 동물 질병 특히, 공중위생학적으로 중요할 뿐 아니라 소, 돼지, 닭 그리고 개 등 가축사양에서 경제적 피해를 주고 있는 *E. coli*균, *Salmonella* 균, *Neospora caninum*을 대상으로 예방과 치유의 새로운 지견을 제공함으로써 안정적으로 양축가가 축산물 생산을 도모토록 할 수 있을 것이다.

## 제 3 절 연구범위

연차별 연구개발 목표와 범위

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차 년도 ( 2001 )	병원체 Strain 대한 2-Dimensional Gel Electrophoresis의 기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 병원성 세균 및 원충의 표준주 및 야외주를 확보</li> <li>● 각 병원체의 2-DE위한 배양 조건 확립</li> <li>● 각 병원체에 대한 2-Dimensional Gel Electrophoresis 전기영동을 위한 샘플 조제방법 확립</li> </ul>
2차 년도 ( 2002 )	프로테옴 분석 및 단백질 동정	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 2-Dimensional Gel Electrophoresis된 단백질 맵간의 비교</li> <li>● 질량분석용 시료제조 방법 확립</li> <li>● MALDI-TOF-MS에 의한 단백질 sequencing 방법확립</li> </ul>
3차 년도 ( 2003 )	데이터베이스 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 2-Dimensional Gel Electrophoresis된 각 개체별 단백질 맵의 비교</li> <li>● MALDI-TOF-MS에 의한 단백질 sequencing 방법확립</li> <li>● 프로테옴 데이터 베이스 구축</li> </ul>

## 제 4 절 연구개발 추진체계



## 제 2 장 국내 · 외 기술개발현황

사람을 비롯한 많은 생물체의 유전체가 밝혀졌거나 밝혀지고 있는 가운데 우리의 관심은 자연스럽게 유전자의 기능 쪽으로 향하고 있다. 유전자의 기능을 알아내기 위하여 진행되고 있는 연구의 주요 접근방법으로는, 유전체수준에서 총괄적으로 유전자 발현을 분석하는 일, 특정 유전자를 제거(형질전환 생물)하거나 과잉 발현시킨 후 그 표현형을 관찰하는 방법, 단백질과 상호작용하는 단백질 또는 다른 물질의 정체를 밝히는 일, 그리고 다양한 세포학적, 면역학적 기법을 이용하는 방법 등이 동원되고 있다. 특히 단백질 수준에서의 유전체의 기능에 대한 연구를 proteomics라 하여 암과 같은 질병과 연관 지어 이 분야의 연구 활동은 최근 몇 년간 비약적인 증가를 보이고 있으며, 많은 세계적인 바이오 벤처 회사에서 각종 질병에 대하여 연구를 수행하고 있는 것으로 추정되고 있다. 이러한 생명탐구의 패러다임이 변화하고 있는 시기에 인간게놈프로젝트의 후속으로 도출된 인간 프로테오믹스 프로젝트 (Human Proteome Project: HPP)는 세계기구인 HUPO에서는 기구 차원에서 인간 혈장 단백질 지도 작성사업(Human Plasma Proteome Project: HPPP)을 선두로 하여, 간 단백질 지도작성사업(HLPP), proteome 정보표준화사업(PSI), 뇌 단백질사업(Human Brain Proteome Project: HBPP) 및 최근에 일본연구진을 중심으로 시작한 Human Disease Glycomics Proteome Initiative (HGPI)를 중심으로 사업을 진행시키고 있다. 우리나라에서는 proteome이라는 개념이 도입되던 1990년대 말부터 이미 proteomics에 대한 기술적 우위를 점하고 있어왔다. 그러던 중 산개적으로 연구에 몰두하던 연구자들은 2002년 KHUPO라는 기구를 설립하여 proteomics 발전을 위한 초석을 마련하였고, 국가적인 차원에서도 보건복지부가 질병 유전 proteome 연구 지원센터를 2003년 7월1일 부로 설립하여 총 8년간 15개의 보건의료 유전체센터를 기술적으로 지원하고, proteome 생물 정보 인프라를 구축하며, 유전체센터의 유전체연구와 proteome 연계기능연구를 활성화와 이의 활용연구를 통해, 국가 보건의료분야발전에 기여하고자 하고 있다.

질병에 대한 이해를 위한 proteomics의 응용은 질병조직과 정상조직의 단백질 프로필을 조사 분석하는 protein profiling (또는 display proteomics, expression proteomics 등의 용어가 비슷한 의미로 사용되고 있다), 단백질 사이의 상호작용을 체계적으로 분석하고자 하는 pathogenesis분야, 단백질의 입체구조분석을 통하여 기능을 알고자하는 structural genomics등의 분야가 각각 연구영역을 개척해가고 있으며, 궁극적으로는 상호보완적으로 발전 할 것으로 전망된다. 질병에 대한 proteome 연구의 목표는 조기진단, 예후판정, 및 치료법 선택 등을 위한 biomarker를 개발하고 신약개발의 타겟을 찾는 것이라 할 수 있다. 이러한 목표를 위하여 국내 · 외적으로 다양한 접근들이 이루어지고 있다.

질병의 원인체에 대한 proteomics적 접근방법은 병원체에 대한 구조적인 분석, 생리

학적 분석 및 숙주와의 관계를 찾아보기 위해 많은 연구가 되어오고 있으며 최근까지 여러 가지 병원성 미생물 (세균, 진균, 기생충)에 대한 프로테옴 분석 자료가 쏟아져 나오고 있다. 아울러 이와 같은 지식을 집약해서 병원체에 대한 효과적인 치료제나 예방법을 수립하는 것이 proteome 연구의 최종 목표라 할 수 있다.

## 제 3 장 연구개발내용 및 결과

### 제 1 절 *E. coli*의 프로테옴 연구

#### 1. 이차원전기영동을 이용한 *E. coli* O157:H7 균주 간 항원 spot의 비교

##### 가. 서론

*Escherichia coli* (*E. coli*)는 인간과 동물의 장내 정상세균총으로 존재하면서 장관 계질환 또는 비장관계 질환의 중요 원인체로 작용하여 여러 가지 질병을 유발시킨다 (McNeish 등, 1975; Truszczynski 와 Pilaszek, 1970). 설사유발 대장균은 혈청형, 독소와 부착인자의 생산능력 및 장상피세포에 대한 작용 그리고 임상증상과 증후 등을 기초로 하여 enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) 및 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)의 4가지 주요한 균으로 분류한다 (Albert, 1991). 최근에는 EHEC균의 verotoxin (VT)생산 대장균에 의한 환자가 전 세계적으로 다발함에 따라 균의 항원성 및 생리·생화학적 성상에 관하여 많은 연구가 이루어지고 있다 (Garwin 등, 1980; Cleary 등, 1985). VT 생산 대장균 O157:H7의 집단적 발생 예는 1982년 오염된 햄버거의 섭취로 인하여 오레건주와 미시건주에서 발생한 예가 있으며 특히, 1996년 일본에서는 9,346여명의 환자가 발생하여 그중 12명의 노약자들이 사망하여 세계적으로 문제시 되었다 (Rocchi 와 Capozzi, 1999; Pebody 등, 1999; Michino 등, 1999).

VT생산 대장균은 사람에서 설사병, 용혈성 요독증후군, 출혈성 결장염 및 수종성 질환 등을 유발하는 중요한 원인체이며 (Konowalchuk 등, 1977; Karmali 등, 1985; Pai 등, 1988), 이 균의 혈청형은 43종 이상이 있는 것으로 알려져 있다 (Albert, 1991). 또한, *E. coli*에 감염된 환자로부터 분리되는 균의 절반이상이 O157:H7인 것으로 보고되었다 (Hockin 과 Lior, 1987).

VT생산대장균의 분리율은 소의 분변 재료에서 11-84%, 원유에서 10%, 돈육에서 1.5-3.8%, 계육에서 1.5%로 보고된 바 있어 공중보건학적인 측면에서 많은 주의가 필요하다 (Read 등, 1990; Suthienkul 등, 1990).

*E. coli*를 포함한 주요 병원성 세균에 대한 DNA수준의 많은 연구에 이어 최근에는 최종 생리 활성물질인 단백질 수준에서의 접근의 필요성이 증대되고 있다 (Blattner 등, 1997; Hayashi 등, 2001). 이러한 유전자의 기능을 밝히는 분자 생물학적 방법으로는 DNA array chip, protein chip, structural genomics, transgenic animals, proteomics 등이 있다. 그 중 proteomics는 genome의 기능을 밝히려는 학문이자 기법으로서 발현 단백질의 유형을 비교 분석하여 특정 생명현상에 관여하는 중요한 단백질을 찾아 그 기능을 밝히려는 연구 방법으로, 현대 생명과학 연구의 두드러진 특징

인 신속대량분석법의 발달에 따라 총체적인 접근이 가능하게 되었다. 특히 의학미생물에 있어서 proteomics는 병원균의 역학조사 및 명명, 병원성 발현기작의 규명, 균력 결정기의 발현, 병원성균주와 비병원성균주의 구분 및 병원균에 대한 약제 내성 등을 연구하는데 응용 될 수 있다 (Williams, 1999; O'Connor 등, 2000).

따라서 본 연구의 목적은 병원성 대장균 *E. coli* O157:H7 균주들에 대해서 2-dimensional gel electrophoresis(2-DE)를 통해서 균주 간 단백질 발현의 특성을 비교하고, O157 항혈청에 대한 각 균주의 공통항원과 특이항원을 규명함으로써, 특이항원을 백신후보로서의 이용가능성을 조사하는 한편 특이항원은 질병의 진단 marker로서의 이용가능성을 검토하고자 하였다.

## 나. 재료 및 방법

### 1) 공시 균주

실험에 사용한 *E. coli* O157 균주는 Enteric reference laboratory for disease control health and welfare (Ottawa, Canada) 에서 분양받은 ACH 5, 국립보건원에서 분양 받은 ATCC 43894, 국내 분리균주인 KSC 109등의 3 균주를 사용 하였다.

### 2) 배양조건 및 배양 세균의 회수

각 균주는 12시간 예비 배양한 후 100 $\mu$ l를 15ml의 LB borth 에 접종하고, 37 $^{\circ}$ C에서 220 rpm으로 진탕하여 흡광도 0.7-0.9 (at 600nm) 수준까지 배양하였다. 배양액을 4 $^{\circ}$ C, 950 x g에서 10분간 원심, 침전시킨 후 균괴를 PBS(pH 7.4)에 부유 시킨 다음, 950 x g로 10분간 3회 세척하였다. 침전된 균괴는 SDS-PAGE 및 2차원 전기영동의 시료로 사용하였다.

### 3) SDS-PAGE 및 immunoblot

생산된 시료에 200 $\mu$ l의 PBS를 가하고 동량의 SDS-PAGE sample buffer (Bio-Rad) 를 혼합하여 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하였다. 변성된 단백질은 12.5% SDS-polyacrylamide gel에 well 당 20 $\mu$ l (10 $\mu$ g of protein/20 $\mu$ l)를 loading 하였으며, Laemmli의 방법에 따라 SDS-PAGE를 수행하였으며, Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250으로 염색한 후 탈색시켜 단백질 분획을 확인하였다.

SDS-PAGE한 gel에서 항원 단백질 분획을 검출하기 위하여 nitrocellulose(NC) membrane 에 전사시킨 후, 5% skim milk를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 blocking을 하였다. 1:100으로 희석한 O157 특이 다가혈청을 가하여 2시간동안 가볍게 진탕하면서 반응을 시킨 다음 1 : 1,000으로 희석된 Anti rabbit-HRP conjugated IgG를 가한 후 1시간 동안 가볍게 진탕하면서 반응을 시키고, 세척한 다음 ECL kit를 이용하여 항원을 검출하였다.

#### 4) 이차원 전기영동을 위한 시료 준비

세균으로 부터의 단백질 추출은 O' Farrell의 방법을 준용하였으며, 균괴에 1ml의 lysis buffer (9M urea, 4% CHAPS, 40mM Tris-HCl, 65mM DTT, and 0.5% Phamalyte)를 가하여 얼음에서 1시간 동안 반응시킨 다음 15,000 x g 에서 30분간 원심시켜 상층액을 회수하고, 회수된 상층액은 Bradford 법을 준용하여 단백질을 정량하였다.

#### 5) 이차원 전기영동

##### 가) 1차원 Isoelectric focusing(IEF)

정량한 시료 단백질 40 $\mu$ g을 500 $\mu$ l의 rehydration buffer에 넣은 후 phamalyte와 소량의 bromophenol blue를 혼합하고 IPGphore strip holder 에 100 $\mu$ l를 로딩한 후 immobilized pH Gradient (IPG) strip을 잘 올려놓고, 시료가 건조되지 않도록 cover fluid oil을 가하였다.

IPGphor를 이용한 IEF 조건은 전류가 7cm strip당 50 $\mu$ A가 넘지 않도록 하였으며, 20 $^{\circ}$ C의 온도조건에서 12시간 rehydration 후 500V에서 30분, 1,000V 30분, 4,500V에서 10시간 통전하여 최종 45,750Vhs까지 IEF를 실시 하였다. IEF가 끝난 IPG strip은 2차원 SDS-PAGE를 수행하였다.

##### 나) 2차원 SDS-PAGE

IEF가 끝난 IPG strip은 1%(w/v) DTT를 첨가한 equilibration buffer (1.5M Tris-HCl, pH8.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue)에 15분간 반응시키고 다시 1.25%(w/v)의 iodoacetamide를 첨가한 equilibration buffer에 15분간 반응시킨 다음 IPG strip을 12.5% acrylamide gel의 상단부에 loading 시키고 빈 공간은 low melting agarose gel을 분주하였다. 15mA의 조건으로 5분 전개한 후 30mA로 변환시켜 bromophenol이 gel의 하단부에 도달할 때까지 전개하였다.

#### 6) 도은염색

2차원 SDS-PAGE를 마친 gel에서 단백질 spot을 검출하기 위하여 도은염색을 하였다. Gel 을 고정액 (50% MeOH, 12% AcOH, 37% HCOH)으로 한시간 이상 고정한 다음 50% EtOH으로 30분간 2회 반복 세척하고, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-5HO 로 1분간 전처리 하였다. 전처리 한 Gel을 3차 증류수로 20초간 3번 세척하고 AgNO<sub>3</sub>와 37% HCOH로 30분간 반응시킨 다음 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>와 37% HCOH로 발색시켰다. 단백질 Spot을 확인 한 후 stop solution (50% MeOH, 12% AcOH)으로 발색을 중지하였다.

#### 7) Immunoblotting

2-DE 한 gel에서 항원spot을 검출하기 위하여 nitrocellulose (NC) membrane으로



60 Volt에서 70분 동안 transfer 후 membrane은 5% skim milk로 37℃에서 1시간 동안 blocking한 다음 TBS-T (10 mM Tris buffer solution 그리고 0.01% Tween-20)로 10분간 세번 세척하였으며 O157 특이 다가혈청 (Difco Co.)을 TBS-T에 1:100으로 희석하여 membrane에 가한 후 2시간동안 가볍게 진탕하면서 반응을 시킨 다음 세척은 앞의 과정과 동일하게 하였다. Anti-rabbit horse radish conjugated IgG는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 1시간 동안 가볍게 진탕하면서 반응을 시켜 세척한 다음 ECL kit (Amersham Pharmacia Biotec Inc.)를 이용하여 항원을 검출하였다.

8) Image 처리

도은염색한 결과는 scanning 한 후 전용 이미지 분석 프로그램인 Phoretix 2D program (Ver. 5.01) 을 이용하여 분석하였다.

나. 결과

1) 균주간 SDS-PAGE 및 immunoblot 결과

그림 1은 실험에 사용한 세 균주로부터 추출한 단백질에 대하여 12.5% SDS-PAGE를 실시한 결과로 분리된 단백질에 대한 분자량을 확인할 수 있었으며, O157 다가 항혈청으로 다양한 분자량의 단백질이 검출되었으며 항원단백질에 대한 분획을 확인할 수 있었다.

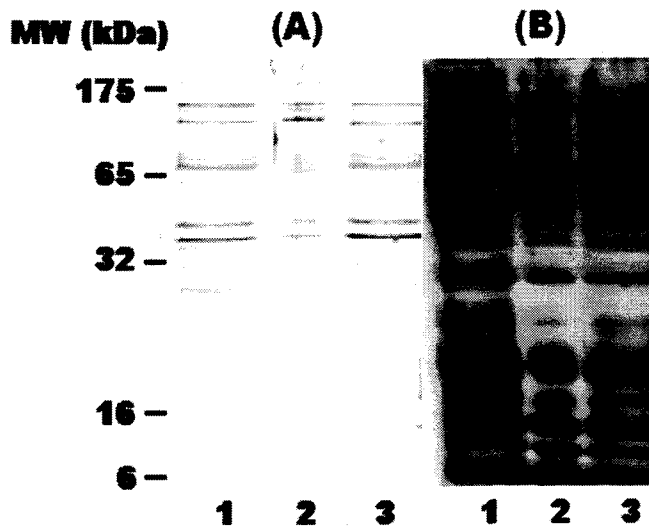


Figure 1 (A). SDS-PAGE pattern for whole proteins of *E. coli* O157:H7. Gel was revealed by Coomassie Brilliant Blue R-250. (B). The immunoblotted image of *E. coli* O157:H7, proteins separated by SDS-PAGE were transferred to nitrocellulose

membrane and then reacted it using O157 polyclonal antisera. Lane 1 ; ACH 5, Lane 2 ; KSC 109, Lane 3 ; ATCC 43894.

2) 각 균주에 대한 2-DE 유형

각 균주의 단백질 분포를 확인하기 위한 2-DE 결과는 그림2와 같다. ATCC 43894(Fig. 2A)에 대하여 이차원 전기영동을 실시하고 도은염색한 다음 Phoretix 2D software를 이용하여 분석한 결과 약 390개의 spot들이 검출되었으며, ACH 5(Fig. 2B)에서는 약 380개, KSC 109(Fig. 2C)에서는 약 360개의 단백질 spot을 검출할 수 있었다.

3) 각 균주에 대한 2-DE immunoblotting 유형

세 균주에 대해서 2-DE후 O157 다가항체로 immunoblotting을 한 결과 ACH5는 41개 (Fig. 3A), KSC109는 45개 (Fig. 3B), 그리고 ATCC 43894 (Fig. 3C)에서는 51개의 항원성 spot들을 확인 할 수 있었다.

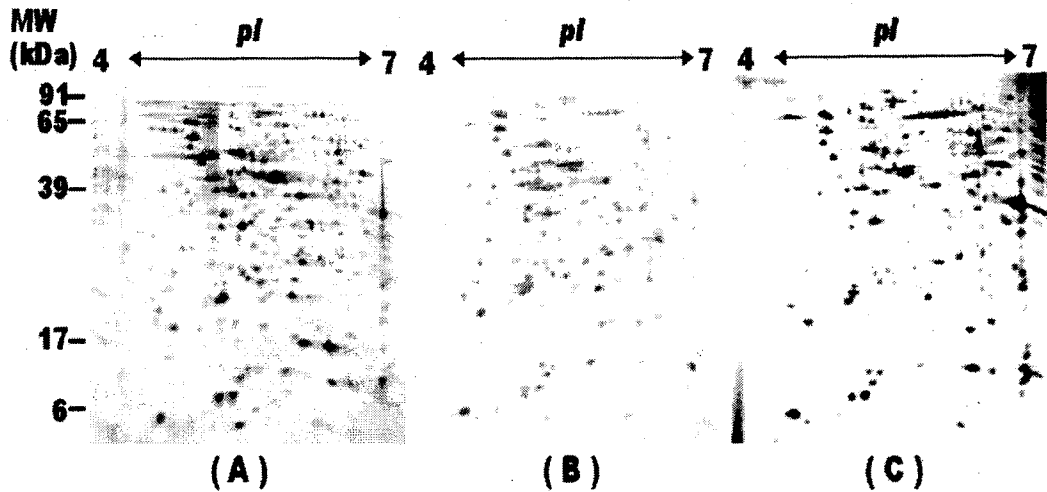


Figure 2. 2-DE image of (A)ATCC 43894, (B)ACH5, (C)KSC109. Gels were stained with silver nitrate, and spots were detected using Phoretix 2D software

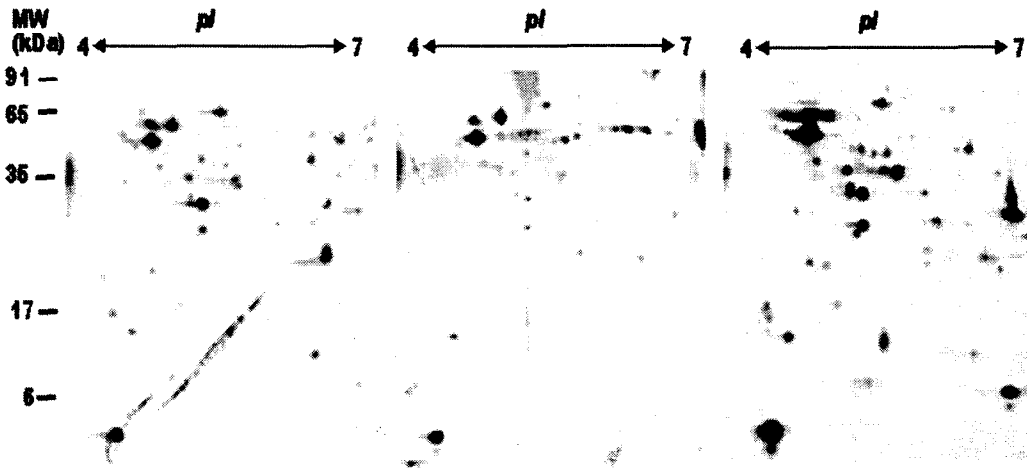


Figure 3. Immunoblotting images of ACH5, KSC109 and ATCC 43894 using rabbit anti-sera raised against O157. Approximately 41, 45, and 51 spots were observed from ACH5, KSC109, ATCC 43894, respectively.

#### 4) Data 분석

ATCC43894주에 대한 2-DE immunoblotting한 결과를 토대로 하여 공통항원과 각 균주별 특이 항원을 2-DE gel 전용프로그램으로 분석 하여 한 gel에 표시하였고(Fig. 4), 각 항원성 spot에 대한 pI값과 MW을 구하였다 (Table 1). 그 결과 ATCC43894항원성 단백질은 ACH 5에 대해서 약 65%, 그리고 KSC109에 대해서는 약 45%가 일치하였다. ATCC43894 균주는 KSC109균주와는 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. 특히 국내분리주인 KSC109의 경우 분자량이 50-70kDa 에서 많은 항원성 단백질들이 검출되었고 또한 이 부위에서 다른 두 분리주와는 많은 차이가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4).



ACH 5 ● KSC 109 ● ATCC 43894 ● Common antigen ●

Figure 4. Common and specific antigenic spots between strains of O157:H7 examined. A total of 51 spots (orange color) were identified as common antigens among 3 strains. 3 spots were shared between ATCC 43894 and KSC 109, and 13 spots were between ATCC 43894 and ACH 5. Specific antigenic spots were found as 15, 8, and 22 spots to ATCC 43894, ACH 5 and KSC 109, respectively.

Table 1. Spot number, isoelectric point and molecular weights of common and specific spots

Strain	Spot	pI	MW	Strain	Spot	pI	MW	Strain	Spot	pI	MW	Strain	Spot	pI	MW
Com. spot (20)	2	5.5	91.66	KSC 109 spot (5)	11	5.2	83.99	Only at KSC 109 spot (22)	69	5.8	88.64		69	5.8	88.64
	3	5.1	76.81		17	5.1	51.26		71	5.1	51.26				
	7	4.9	76.12		41	4.9	77.48		72	5.2	88.28				
	8	4.8	81.84						73	5.2	88.28				
	9	4.8	83.81						74	5.2	88.28				
	10	5.0	81.82						75	5.2	88.28				
	11	5.2	88.28						76	5.2	88.28				
	13	5.3	84.75						77	5.2	88.28				
	16	5.5	81.88						78	5.2	88.28				
	19	5.9	48.88						79	5.2	88.28				
	20	6.2	45.78						80	5.2	88.28				
	24	5.6	44.37						81	5.2	88.28				
	27	5.3	48.78												
	29	5.4	48.78												
	33	5.4	33.89												
	44	4.9	78.87												
	48	6.2	18.24												
	49	6.8	11.88												
	50	4.8	6.21												
	51	4.6	4.27												

2. *E. coli* O157:H7 항혈청을 이용한 *E. coli* strain 간의 항원성 단백질 비교

가. 서론

대장균이 설사의 원인이 될 수 있다는 사실은 19세기부터 알려져 있었지만 건강한 변종의 대장균과 설사변종의 대장균을 구별하는 방법이 1945년에 확립되어 비로서 병원성대장균이라고 불리워지게 되었다. 침습성대장균은 이질균과 같이 병원성을 가진 대장균으로 감염되었을 경우 대장의 점막상피세포내로 침입하여 증식하고 점막을 괴사시켜 궤양을 형성하는 대장균이며, 독소원성대장균은 설사를 일으키는 독소(Enterotoxin)를 생산하는 대장균으로서 이들 독소는 열에 쉽게 파괴되는 독소(이열성)과 열에 파괴되지 않는 독소(내열성) 두 종류가 보고되어 있다.

장출혈성 대장균증의 한 원인체인 *E. coli* O157:H7은 설사를 주 증상으로 하고 있으며 동물뿐만 아니라 사람에서도 흔히 발견되는 병원균이다. 이 균은 1977년 처음 발견되었으며 출혈성 장염을 동반한 첫 발견은 1982년에 있었다. 이때 이후로 전세계적으로 공중보건학적으로 중요한 병원균 중 하나가 되었다 (Griffin 과 Tauxe,1991). 지금까지도 이 균에 의한 발병과 만성 설사병에 대한 보고가 지속되어오고 있다. 장출혈성 대장균 (enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC))인 O157:H7의 감염은 불현성 감염이 이루어지거나 경미한 혈성 하리에서부터 심한 복통과 혈양성 하리를 동반한 출혈성 장염 및 용혈성 요독 증후군까지 감염에 대한 증후는 다양하다. (Sowers 등, 1996; Haarmann 등, 1997). 이 균이 생산하는 단백질 합성을 저해하는 Shiga toxins

이나 Verocytotoxins같은 독소들은 hemolytic-uremic syndrome 이나 thrombocytopenic purpura같은 증상이 일어나는데 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨지고 있다 (O'Brien 등., 1992).

인체에서의 이 균의 발생은 연령의 구분 없이 발생 보고가 있어왔는데 그 중에서도 50대의 성인보다도 5세 미만의 어린이에서 성별에 관계없이 높은 감염율을 보인다고 한다. 아울러 감염에는 계절적 영향도 있는데 주로 6월에서 9월 사이에 감염의 peak가 오른다고 한다. (Su 등, 1995). 이 균의 감염원으로는 apple cider에서부터 hamburger meat에 이르기까지 다양한 감염원이 보고되어 있다. 분변을 통한 사람 대 사람간의 감염도 보고되어 있다. 마찬가지로 대장균 감염은 동물에게서도 널리 분포되어 있다 (Smith, 2004).

*E. coli* O157:H7를 포함한 서로다른 *E. coli* strain들에 대한 항원성 단백질에 대한 연구는 아직까지 많이 이루어 지고 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 8종의 병원성 *E. coli*에 대하여 O157:H7을 이용하여 항원성 단백질을 조사하고 각각의 strain에 대한 결과를 proteomics기법을 이용하여 비교해 보고자 한다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 공시균주

본 연구에서는 사람과 동물로부터 유래된 병원성 *E. coli* strain들을 사용 하였다. 이들 중 *E. coli* strain K88, O26, K99 그리고 O148은 경상대학교 병원 미생물학교실로부터 분양받아 사용하였고, strains ACH5, O59, C2 그리고 O157:H7은 경상대학교 수의과대학 수의미생물학교실에서 분양 중이던 것을 사용하였다. 사용된 균주는 table 1.에 설명하였다.

**Table1.** List of bacterial isolates used.

<i>E. coli</i> strains	Origin	Mode of Pathogenicity
K88	human	ETEC
K99	human	ETEC
ACH5	human	ETEC
O148	human	ETEC
O59	human	ETEC
O157:H7	cattle	EHEC
C2	cattle	EHEC
O26	swine	EPEC

## 2) 균 배양 및 2-DE sample 준비

모든 *E. coli* strain들은 Luria Bretani (LB) broth (Oxoid, Oxford, UK)를 이용하여 배양하였다. 모든 strain들은 동시에 220g의 continuous shaking rotor를 이용해 37°C에서 6시간동안 배양되어졌다. 배양 후 배양액이 610 nm에서 흡광도치가 1.0이 되도록 조정 한 뒤 원심분리기를 이용해 균체를 수거하고 곧 이어 세척과정 PBS를 이용하여 3회 연속으로 실시하였다. 세척 후 균체는 6M urea, 2M thiourea, 40mM Tris 그리고 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)가 함유된 lysis buffer로 재부유 한 뒤 13,000×g의 4°C에서 1시간 동안 원심 시켰다. 원심분리 후 상층액을 회수하여 일부는 BCA protein assay kit (Pierce Chemical Co. Rockford, IL, USA)를 이용해 단백질의 정량을 하고 나머지는 실험에 공시되기 전까지 -70°C에서 보관 하였다.

## 3) 2-DE와 immunoblot analysis

이차원전기영동을 하기 위해 먼저 준비된 sample을 9M urea, 4% CHAPS, 0.4% dithiothreitol (DTT), 0.5% IPG buffer (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) 그리고 0.002% bromophenol blue가 함유된 rehydration buffer를 넣고 녹인 후 등전점 분리를 수행 하였다.

등전점분리 (Isoelectric focusing; IEF)는 Gorg 등 (2000)의 방법을 준용하여 IPGphor System (Amersham Biosciences)과 IPG strip (Immobiline Dry Strip, pH4-7, 13 cm from Amersham Biosciences)을 이용하여 수행하였다. 준비된 sample은 자동 program mode를 이용하여 20°C에서 최종 85,760 Vhr가 될 때까지 전개 시켰다. 이러한 일차원 전기영동과정이 끝난 후에는 IPG gel strip을 1% DTT가 함유된 equilibration buffer (6M urea, 2% SDS, 30% glycerol, 50mM Tris-HCl, pH 8.8)와 15분간 반응 시키고 다시 추가로 15분을 DTT대신에 2.5% iodoacetamide가 첨가된 equilibration buffer를 이용해 반응 시킨 후 12.5% SDS-PAGE slab gel을 이용해 단백질을 전개시켰다. 이차원 단계는 phenol red 염색액이 gel의 바닥에 닿을 때까지 유지 시켰다

Immunoblotting을 위해 2-DE gel소의 전개된 단백질 spot들은 PVDF membrane (Immobilon-PTM, 0.45 mm; Millipore, Billerica, USA)으로 이동 시켰다. 이 membrane은 0.05% Tween-20이 함유된 PBS (PBS-T; pH 7.4)에 5% skim milk가 함유된 blocking buffer를 이용해 1시간 동안 실온에서 또는 4°C에서 밤새도록 반응 시켰다. 이후 PBS-T로 세척과정을 거친 후 토끼 *E. coli* O157:H7 항혈청(Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)을 1:500으로 희석한 용액과 실온에서 1시간 동안 감작 시켰다. 반응 후 재차 세척과정을 거치고 이번에는 goat anti-rabbit IgG conjugated HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)를 1:2000으로 희석해 1시간 반응 시킨 후 반응의 결과는 Enhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham

Biosciences)용액을 이용해 알아보았다.

#### 4) Image 분석

염색된 이차원전기영동 gel과 immunoblotted spot들은 Agfa Arcus 1200™ image scanner (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgium)를 이용해 디지털화 하였고 측정된 image는 Phoretix™ 2D software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)를 이용해서 분석하였다. Gel의 spot 위치를 분석하기 위해 2D SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용해서 각각의 spot의 Mr 와 pI를 측정하였다.

#### 5) 질량분석기를 이용한 단백질 동정

관심 있는 단백질 spot들은 염색된 gel로 부터 추출되어 진 후 50% acetonitrile로 세척 한 후 건조하고 다시 10 mM DTT/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해서 실온에서 가수화 시켰다. Gel 조각들은 다시 실온의 암실에서 55 mM iodoacetamide/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해 반응 시킨 후 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>로 세척하고 다시 건조 시켰다. 건조된 gel 조각들은 다시 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해 재수화 한 다음 5 mM CaCl<sub>2</sub> 와 12.5 ng/ul의 sequence-grade의 porcine trypsin (Promega, Madison, USA)을 첨가하여 ice속에서 45분간 반응 시켰다. 반응 후 여분의 액체는 제거한 후에 37°C에서 밤새 반응 시켰다. 반응 후 5% formic acid 와 acetonitrile이 1:1 (v/v)로 희석된 용액을 넣고 반응을 시킨 후 상층액은 회수하고 이는 다시 vacuum centrifuge를 이용하여 건조 시켰다.

Tryptic digest된 건조된 peptide들은 증류수, acetonitrile 그리고 trifluoroacetic acid 가 각각 93:5:2로 희석된 용액 2 μl를 이용해 재부유 시키고 MALDI-TOF mass spectrometry를 위한 target preparation을 위해 solution-phase nitrocellulose 방법을 적용하였다. α-cyano-4-hydroxycinamic acid (40 mg/ml) 와 nitrocellulose (20 mg/ml)를 각각 acetone에 녹인 것을 isopropanol과 섞었다. 이 용액에 internal standard를 위해 des-Arg-Bradykinin (monoisotopic mass, 904.4681) 과 angiotensin I (1296.6853)을 섞어 trypsin digestion된 peptide에 넣어 이 중 용액 1 μl을 target plate의 circle에 점적 한 후 건조시켰다. Target에 있는 sample spot들은 Voyager-DE STR MALDI-TOF MS (PerSeptive Bio-systems, Framingham, USA) 기기를 이용해 peptide mass를 측정하였다. 측정된 data는 MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>) 프로그램과 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 프로그램을 이용해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 protein sequence database를 참조하여 datamining하였다. 이때 mass tolerance는 ±50 ppm으로 하였고 한개 까지의 missed cleavage site는 인정하였다. 아울러 carbamidomethylation of cysteines 과 oxidation of methionine을 protein modification의 인자로써 감안 하였다.



## 다. 결과

### 1) 병원성 *E. coli* strain간의 2-DE 비교

*E. coli* 각 strain 간의 2-DE에서의 단백질 분포의 차이를 알아보기 위한 연구의 실험으로써 2종류의 immobilized pH gradient (IPG) strip (broad-range (pH 3-10) 과 narrow-range (pH 4-7))을 사용하여 단백질의 표현상태를 알아보았다. 그 결과 pH 4-7 IPG strip에서 많은 spot과 보다 좋은 분리력을 보여 향후 pH 4-7 IPG strip을 이용해 연구를 수행하고자 결정하였다.

본 연구에서는 총 8종의 병원성 *E. coli* strain을 사용하였다. 아울러 각각의 strain 별 병원성 발생 방식에 따라 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)에 속하는 5개의 strain (K88, K99, O148, ACH5 및 O59), enterohemorrhagic (EHEC) group에 속하는 2개의 strain (O157:H7 및 C2), enteropathogenic (EPEC) group에 속하는 *E. coli* O26 로 구분하여 분석 하였다. 그러나 본 연구에서는 enteroinvasive (EIEC) 또는 enteroaggregative (EaggEC) group에 속하는 strain은 없었다.

Figure 1 에서 8은 각 strain들의 2-DE silver stained map과 *E. coli* O157:H7 항원 청을 이용한 immunoblot profile들을 보여주고 있다. 아울러 동일 strain에 대한 두 가지의 image에 대해 spot간의 공통 또는 특이한 spot을 찾아보았다. ETEC group에서는 strain O59이 총 222개의 spot을 2-DE profile에서 나타내 가장 많은 spot수를 나타냈으며 그 다음으로 O148 (210 spot), K88 과 ACH5 (각각 182 spot) 마지막으로 K99 (154 spot) strain이 상대적으로 가장 적은 수의 spot갯수를 나타내었다. 아울러 immunoblot 분석에서의 항원성 spot의 개수는 O148에서는 91개, K88에서는 87개, K99에서는 86개, ACH5에서는 69개 그리고 O59에서는 50개의 spot을 관찰 할 수 있었다.

EHEC group의 silver stained gel에서는 C2 strain은 총 247개의 spot을 관찰할 수 있었고 O157:H7 strain에서는 247개의 spot을 관찰 할 수 있었다. Immunoblot분석에서는 C2 strain에서는 83개의 항원성 spot을 그리고 O157:H7 strain에서는 75개의 항원성 spot을 관찰 할 수 있었다. 반면에, EPEC group인 O26strain 은 156개의 spot들 중에서 67개의 항원성 spot을 관찰 할 수 있었다.

이들 *E. coli* 2-DE map들에서, 15개의 공통 항원성 spot에 대해 각 gel image에서의 위치가 동일함을 확인하였다 (table 2).

### 2) *E. coli* 단백질 동정

ACH5 strain에서는 총 69개의 antigenic protein spot 중 42개의 spot에 대해 MALDI-TOF MS analysis를 통하여 그 이름을 동정 할 수 있었다. 동정된 단백질은 groEL protein (spot #7), PEPCK (spot #13), D-ribose-binding PPP (spot #19), EF-Tu (spot 29), Tryptophanase (spot #31) Dihydrolipoamide acetyltransferase

(spot #2), ProRS (spot #5), Aspartase (spots # 9, 10), Probable beta-ketoadipyl CoA thiolase (spot #11), PK-1 (spot #14), IMPDH (spot #16), ATP synthase beta chain (spot #18), NADP (spot #22), TdRPase (spot #23), G1PASE (spot #24), Ferrichrome transport ATP-binding protein (spot #25), Enolase (spot #27), Tryptophanase (spot #32), Acetate kinase (spots #34, 35), Serine methylase (spot #38), TolB (spot #39), Phosphoglycerate kinase (spot #41), MMBP (spot #43), Glycerophosphodiester phosphodiester (spot #45), PSAT (spot #46), FBP aldolase (spot #47), EF-Ts (spot #56), Acetyl-coenzyme A carboxylase (spot #60), GAPDH-A (spots #64, 65), UrdPase (spot #70), D-ribose-binding PPP (spot #72)FE (spot #77, 78), DNA protection during starvation protein (spot #88), DMRL synthase (spot #88), Protein H1 (spot #90), 50S ribosomal protein L9 (spot 92) 그리고 Carbon starvation proteinC (spot #94)이었다. 이들 중 처음 5개의 단백질은 다른 strain의 profile에서도 관찰 할 수 있는 공통항원성 spot으로 판단되었고 나머지 단백질들은 ACH5 strain 특이 단백질을 알 수 있었다.

*E. coli* K88 strain의 경우에는 총87개의 spot이 항원성 spot 중 43개의 antigenic spot이 동정 되었는데 이들은 60 kDa chaperonin (spot #8,44), Phosphoenolpyruvate carboxykinase (spots #10,11,45), CTP synthase (spot #12,47), ATP synthase beta chain (spot #16,30,49), Prophage CP4-57 integrase (spot #19), Pyruvate kinase I (spot #20), Fumarate hydratase class I (spots #22, 23, 24), TolB protein precursor (spot #25), Fumarate hydratase class 1 (spot #27), Aspartate ammonia-lyase (spot #28), Ethanolamine ammonia-lyase (spot #29), Enolase (spot #31,38), KAS I (spot #32), Aspartate ammonia-lyase (spot #33), Type I restriction enzyme EcoEI R (spot #34), Phosphoglycerate kinase (spot #35), MMBP (spot #36), ClpB protein (spot #37), EF-Tu (spot #39, 41), Bifunctional aspartokinase (spot #40), Ethanolamine utilization protein eutE (spot #42), Transaldolase (spot #43), Topoisomerase IV subunit B (spot #52), K88 fimbrial protein AB precursor (spot #53), Transcription termination factor rho (spot #54), DNA protection during starvation protein (spot #56), Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase (spot #60), Purine nucleoside phosphorylase (spot #62), PTS system, mannose-specific IIAB (spot #71), N-acetylneuraminatase lyase (spot #73), RRF (spot #79), 그리고 50s ribosomal protein L9 (spot #86) 이었다.

K99 strain에서는 86개의 항원성 spot 중 30개의 spot이 동정 되었다. 이들은 HSP70 (spot #1), 30S ribosomal protein S1 (spot #2), ProRS (spots #3,4), Fumarate reductase flavoprotein subunit (spot #7), groEL protein (spots #9,10), Aspartase (spots #12,13), PEPCK (spot #16), PK-1 (spot #18), Glucans biosynthesis protein G precursor (spot #20), Dihydrolipoamide dehydrogenase (spot #23), ATP synthase

alpha chain (spot #24) Cell division protein ftsZ (spot #25), NADP (spot #28), 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (spot #29), Phosphoglycerate kinase (spot #30), MMBP (spot #31), Enolase (spot #32), ASPAT (spot #35), KAS II (spot #37), AKB ligase (spot #38), Transaldolase B (spot #41), NADH (spot No.), EF-Ts (spot No.) D-ribose-binding periplasmic protein precursor, R.EcoEI (spot No.), Colicin Ia protein (spot No.), 그리고 EF-Tu (spot No.) 이었다.

*E. coli* O148 strain에서는 91개의 항원성 spot들 중에서 Glycerol metabolism operon regulatory protein (spot #5), 30S ribosomal protein S1 (spot #9), ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA (spot #14), Aspartase (spots #17,18), PK-1 (spot #21), TRXR (spot #46), ATP synthase alpha chain (spot #22, 48), Dihydrolipoamide dehydrogenase (spot #24), ATP synthase beta chain (spot #30), Tyrosine-protein kinase wzc (spot #58), AlaRS (spot #62), 그리고 RNase HIII (spot #85과 같은 단백질에 대해 동정을 할 수 있었다.

*E. coli* O59 strain에서는 EF-G (spot #1), Phosphotransacetylase (spot #2), HSP70 (spot #4), 30S ribosomal protein S1 (spot #5), ProRS (spot #6), groEL protein (spot #8), MukF protein (spot #11), ATP synthase alpha chain (spot #14), NADH (spot #16) 그리고 EF-Tu (spot #22)에 대한 ehdwjddmf 할 수 있었다.

*E. coli* strain O157:H7은 HSP70 (spot #2), 30S ribosomal protein S1 (spot #3), Dihydrolipoamide acetyltransferase (spot #4), ProRS (spot #5), groEL protein (spot #6), TF (spot #7), Aspartase (spot #8), Peptidase D (spot #10), PEPCK (spot #11), Alkyl hydroperoxide reductase subunit F (spot #12), Glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein precursor (spot #13), Mlc protein (spot #15), Fumarase (spot #17), Glucans biosynthesis protein G precursor (spot #19), ATP synthase beta chain (spot #20), GAD-beta (spot #21), ATP synthase alpha chain (spot #23), TdRPase (spot #25), NADP (spot #26), Enolase (spots #27,28), EF-Tu (spots #29,30), Phosphoglycerate kinase (spots #36,37), MMBP (spot #38), Protein E (spot #40), Transaldolase A (spot #41), FBP aldolase (spot #42), Prophage CP4-57 integrase (spot #47), EF-Ts (spot #49), NADH (spot #52), DPGM (spot #58), UPF0234 protein yajQ (spot #72), DNA protection during starvation protein (spot #73), Universal stress protein A (spot #80), 50S ribosomal protein L9 (spot #83), 그리고 EIII-GLC (spot #89)에 대한 동정을 할 수 있었다.

*E. coli* C2 strain에서는 Aconitase 2 (spot #2), Aconitase 2 (spot #4), Fumarate reductase flavoprotein subunit (spot #7), GlnRS (spot #12), Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (spot #13), ProRS (spot #14), Dihydrolipoamide acetyltransferase (spot #15), Periplasmic oligopeptide-binding protein precursor (spot #20), PK-1 (spot #21), PEPCK (spot #22), 2',3'-cyclic-nucleotide

2'-phosphodiesterase precursor (spot #23), Alkyl hydroperoxide reductase subunit F (spot #28), GAD-beta (spots #29, 32), ADP-heptose synthase (spot #30), Peptidase D (spot #31), SHMT (spot #37), TolB protein precursor (spot #38), MMBP (spot #45), PGM (spot #46), SSI8 (spot #74) 그리고 Outer-membrane protein yhbX precursor (spot #80)과 같은 단백질들이 동정 되었다.

마지막으로 *E. coli*, O26 strain에서는 Aconitase 2 (spot #1), EF-G (spots #2,3), Fumarate reductase flavoprotein subunit (spot #4), ProRS (spot #9), PEPCK (spot #10,11), groEL protein (spot #13), iPGM (spot #14), Aspartase (spot #15), PGM (spot #21), PK-1 (spot #25), ATP synthase alpha chain (spot #26,28), Dihydrolipoamide dehydrogenase (spot #27), Glucans biosynthesis protein G precursor (spot #29), Transcriptase alpha chain (spot #30), Phosphopentomutase (spot #31), Phosphopentomutase (spot #32), 6-phosphogluconate dehydrogenase (spot #33), TdRPase (spot #34), NADP (spot #35), Enolase (spots #36,37), KAS II (spot #41), Transcription termination factor rho (spot #45), MMBP (spot #47), FBP aldolase (spot #51), TolB protein precursor (spot #53), KAS III (spot #55), EF-Ts (spot #57), D-ribose-binding periplasmic protein precursor (spot #60), Spots T26/PR37 (spot #62), GAPDH-A (spot #64), Stringent starvation protein A (spot #66), ASPAT (spot #68), EIII-Man (spot #70), DPGM (spot #72), EIII-GLC (spot #78), Ferric uptake regulation protein (spot #80), Protease Ti (spot #83) 그리고 Ecotin precursor (spot #84)와 같은 단백질들이 동정 되었다.

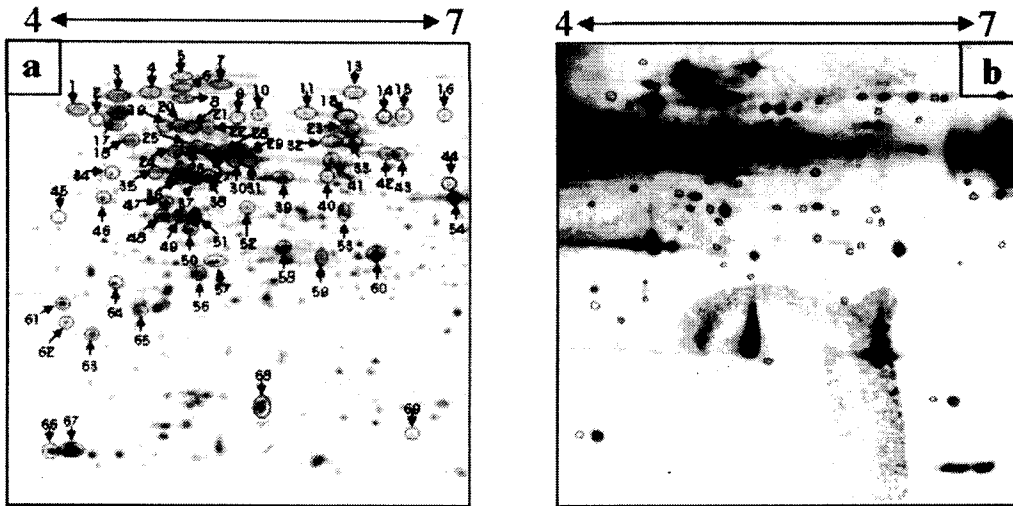


Figure 1. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* ACH5. Samples of 60  $\mu$ g of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. The pH range is shown on the top of each map.

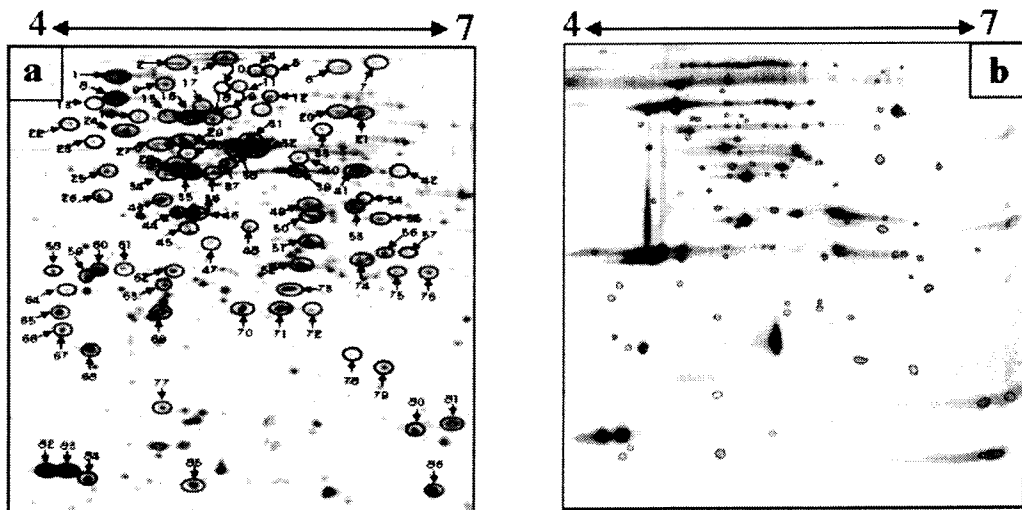


Figure 2. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* K88. Samples of 60  $\mu$ g of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. The pH range is shown on the top of each map.

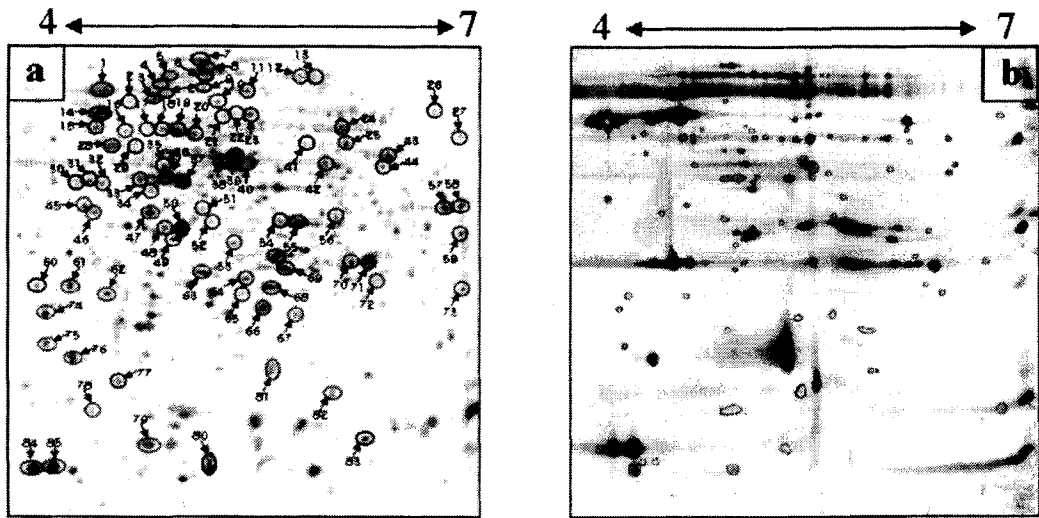


Figure 3. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* K99. Samples of 60  $\mu\text{g}$  of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. The pH range is shown on the top of each map.

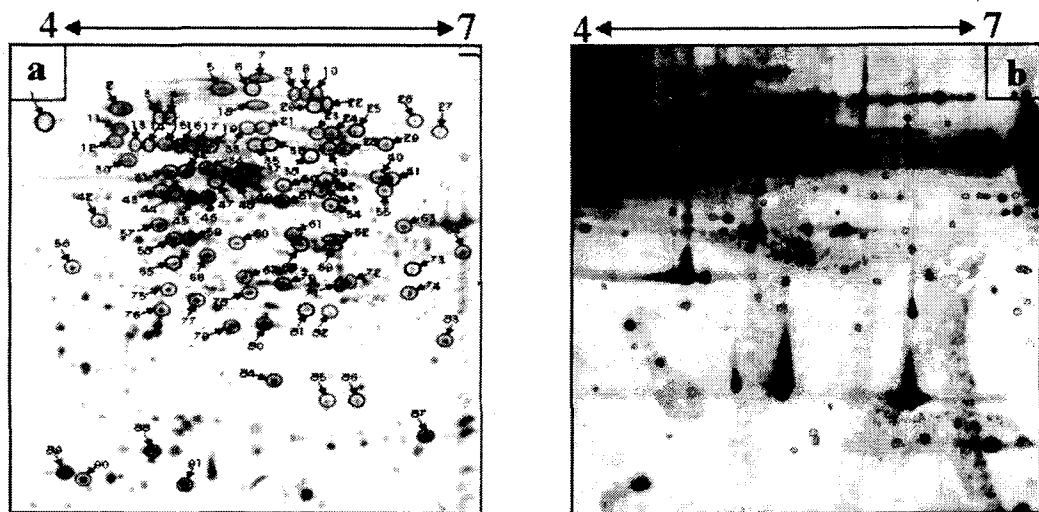


Figure 4. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* O148. Samples of 60  $\mu\text{g}$  of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. The pH range is shown on the top of each map.

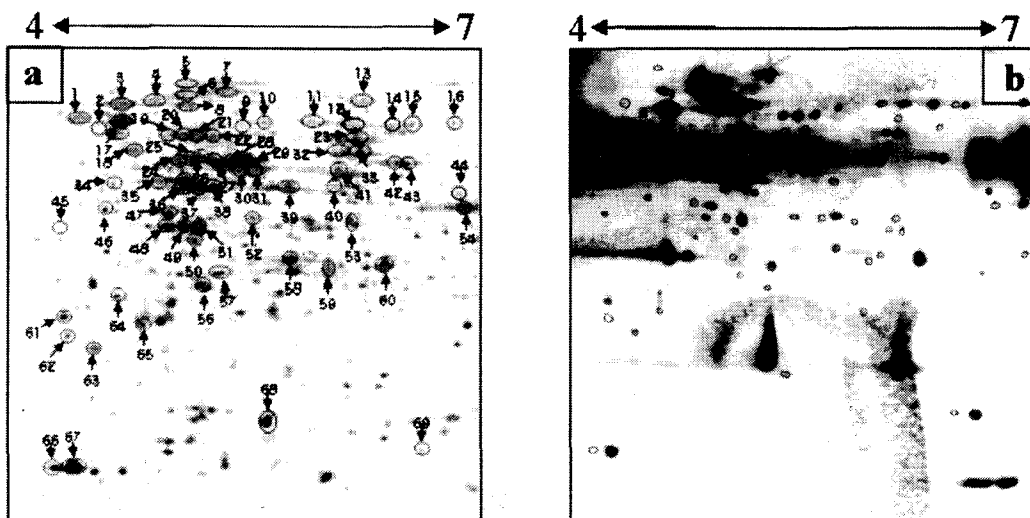


Figure 5. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* ACH5. Samples of 60  $\mu$ g of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. The pH range is shown on the top of each map.

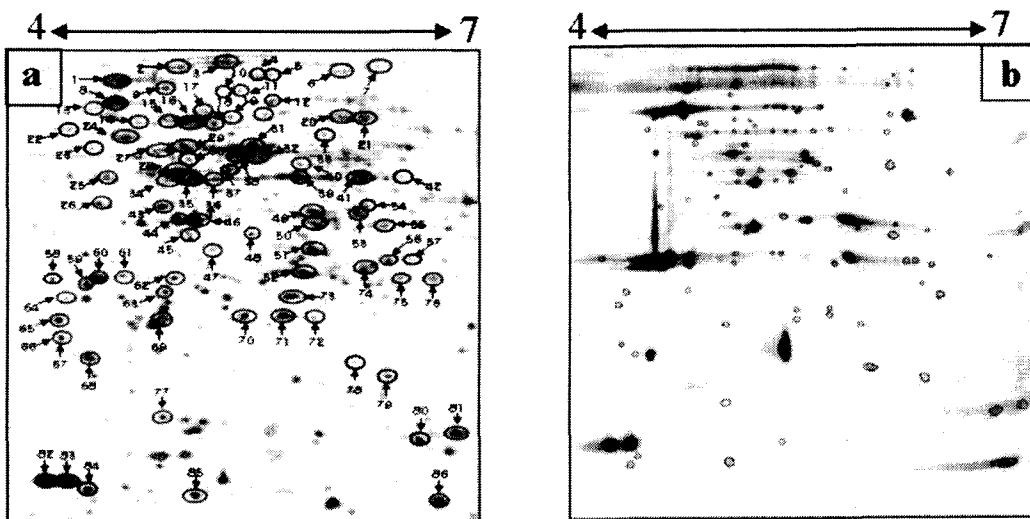


Figure 6. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* K88. Samples of 60  $\mu$ g of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. The pH range is shown on the top of each map

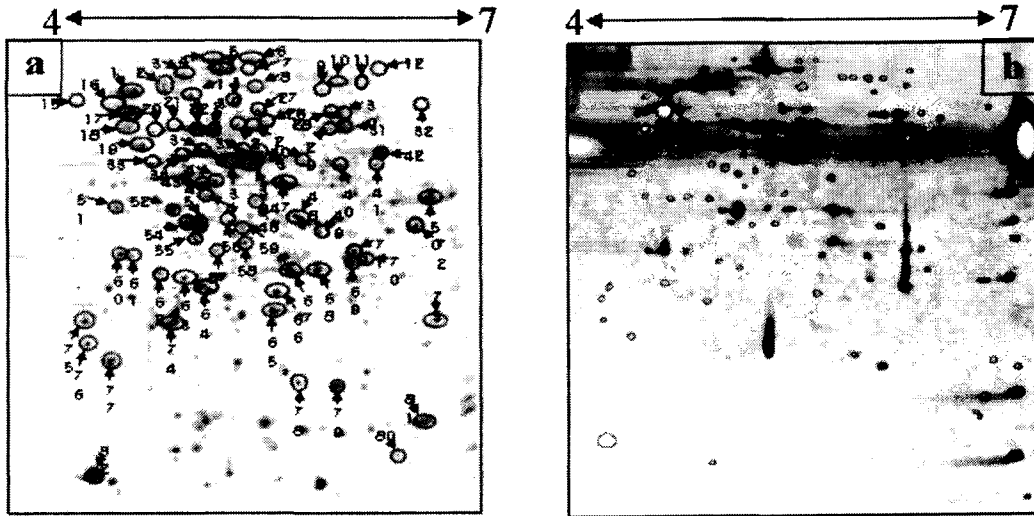


Figure 7.. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* C2. Samples of 60  $\mu\text{g}$  of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. The pH range is shown on the top of each map.

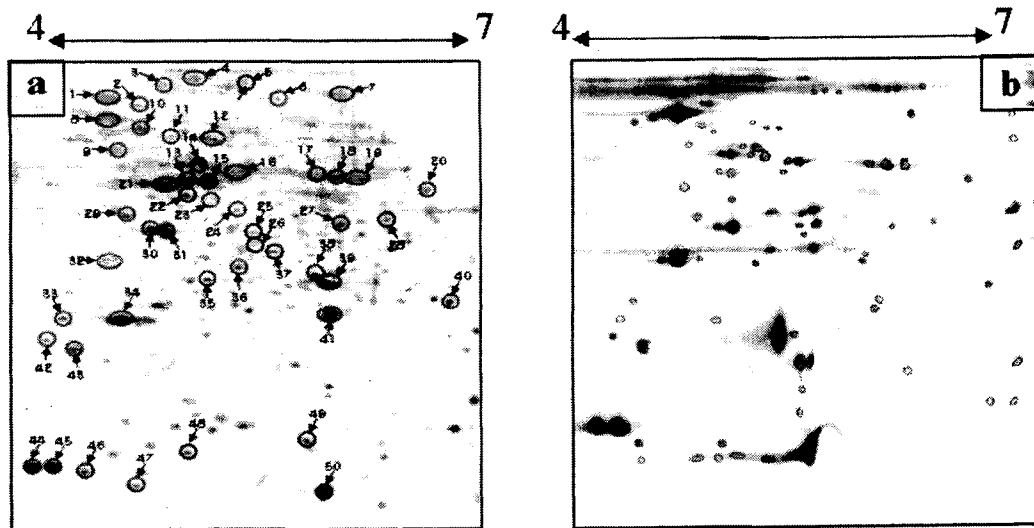


Figure 8.. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* O26. Samples of 60  $\mu\text{g}$  of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. The pH range is shown on the top of each map.



Table 2. Antigenic protein spots of pathogenic *E. coli* serogroups recognized by *E. coli* O157:H7 antiserum.

ACH5		C2		K88		K99		O148		O157:H7		O26		O59	
CA	SA	CA	SA	CA	SA	CA	SA	CA	SA	CA	SA	CA	SA	CA	SA
3	12	1	11	1	4	1	6	2	1	1	14	1	8	1	5
17	14	17	16	8	5	14	9	11	4	7	26	6	15	8	17
4	44	2	45	9	22	6	29	3	14	2	27	2	19	2	22
7	68	5	62	3	23	8	30	5	20	4	41	4	22	4	25
13		10	64	6	30	13	31	9	22	15	59	5	39	7	26
33		31	71	21	33	25	41	28	25	32	68	21	51	19	28
29		39	72	31	37	39	54	37	29	23	67	26	64	14	37
30		37		22	42	40	60	49	36	28		27		16	46
31		38		38	50	38	77	48	38	22		37		15	48
19		21		15	54	17		15	47	8		10		11	49
51		53		46	55	50		39	62	38		42		31	
49		54		44	57	48		58	65	48		40		30	
67		82		83	58	85		90	68	73		67		45	
58		67		52	78	69		70	69	53		53		39	
40		40		41	79	42		53	73	29		28		27	
					80				81						
					84				86						

CA common antigen

SA specific antigen

Table 3. Common antigenic proteins of pathogenic *E. coli* strains identified on peptide mass finger printing.

Protein name	K88	K99	O148	ACH5	O59	O157: H7	C2	O26
Aconitate hydratase 2	X	X	X	X	X	X	●	●
Aspartate ammonia-lyase	●	●	●	●	X	●	X	●
Aspartate aminotransferase	X	●	X	X	X	X	X	●
ATP synthase alpha chain	X	●	●	X	●	●	X	●
ATP synthase beta chain	●	X	●	X	X	●	X	X
Chaperone protein dnaK	X	●	X	X	●	●	X	X
Dihydrolipoamide dehydrogenase	X	●	●	●	X	●	X	●
DNA protection during starvation protein	●	X	X	●	X	●	X	X
D-ribose-binding periplasmic protein precursor	X	●	X	X	X	X	X	●
EIII-GLC	X	X	X	X	X	●	X	●
EIII-Man	●	X	X	X	X	X	X	●
Elongation factor G	X	X	X	X	●	X	X	●
Elongation factor Tu (EF-Tu)	●	●	X	X	●	●	X	X
Elongation factor Ts (EF-Ts)	X	●	X	X	X	●	X	●
Enolase	●	●	X	X	X	●	X	●
Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	X	●	X	X	X	●	X	X
Fumarate hydratase class I	●	X	X	X	X	●	X	X
Fumarate reductase flavo-protein	X	●	X	X	X	X	X	●
GAD-beta	X	X	X	X	X	●	●	X
GAPDH-A	X	X	X	●	X	X	X	●
Glucans biosynthesis protein	X	●	X	X	X	●	X	●
Isocitrate dehydrogenase	X	●	X	●	X	●	X	●
KAS II	X	●	X	X	X	X	X	●
MMBP	●	●	X	●	X	●	●	●
Phosphoenolpyruvate (ATP)	●	●	X	●	X	●	●	●
Phosphoglucomutase	X	X	X	X	X	X	●	●
Phosphoglycerate kinase	●	●	X	●	X	●	X	X
Prolyl-tRNA synthetase	X	●	X	●	●	●	●	●

● present

X not present

Cont. of table 3.

Protein name	K88	K99	O148	ACH5	O59	O157: H7	C2	O26
Pyruvate kinase I (PK-I)	●	●	X	●	X	X	●	●
Serine hydroxymethyltransferase	X	X	X	●	X	X	●	X
Thymidine phosphorylase	X	X	X	●	X	X	X	●
TolB protein precursor	●	●	X	●	X	X	●	●
Transaldose B	●	●	X	X	X	X	X	X
Transcription termination	●	X	X	X	X	X	X	●
Type I restriction EcoEI R	●	●	X	X	X	X	X	X
6-phosphogluconate dehydrogenase	X	●	X	X	X	X	X	●
30S ribosomal protein S1	X	●	●	X	●	●	X	X
50S ribosomal protein L9	●	X	X	●	X	●	X	X
60 kDa chaperonin	X	●	X	●	●	●	X	●

● present

X not present

Table 4. List of identified proteins of pathogenic *E. coli* by peptide mass fingerprinting. A) K99, B) K99, C) O148, D) ACH5, E) O59, F) O157:H7, G) C2 and H) O26.

A) K99

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pI	MOWSE score	Species
1	Chaperone protein dnaK	17 (28)	30.0	69116/4.8	5.789e+08	<i>E. coli</i>
2	30S ribosomal protein S1	8 (18)	18.0	61159/4.9	2.291e+04	<i>E. coli</i>
3	Prolyl-tRNA synthetase	14 (26)	27.0	63693/5.1	1.594e+09	<i>E. coli</i>
4	Prolyl-tRNA synthetase	9 (12)	18.0	63693/5.1	2.892e+04	<i>E. coli</i>
7	Fumarate reductase flavoprotein subunit	11 (15)	23.0	65972/5.9	3.948e+06	<i>E. coli</i>
9	60 kDa chaperonin	24 (28)	43.0	57329/4.8	3.211e+12	<i>E. coli</i>
10	60 kDa chaperonin	9 (16)	20.0	57329/4.8	1.399e+04	<i>E. coli</i>
12	Aspartate ammonia-lyase (Aspartase	14 (20)	32.0	52357/5.2	6.573e+08	<i>E. coli</i>
13	Aspartate ammonia-lyase (Aspartase	16 (29)	35.0	52357/5.2	6.013e+09	<i>E. coli</i>
16	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	6 (9)	17.0	59644/5.5	5.052e+04	<i>E. coli</i>
18	Pyruvate kinase I (PK-1)	11 (19)	30.0	50730/5.8	3.629e+05	<i>E. coli</i>
20	Glucans biosynthesis protein G precursor	7 (10)	16.0	57883/6.7	6.920e+04	<i>E. coli</i>
23	Dihydrolipoamide dehydrogenase	6 (12)	16.0	50689/5.8	1521	<i>E. coli</i>
24	ATP synthase alpha chain	22 (33)	40.0	55223/5.8	3.527e+12	<i>E. coli</i>
25	Cell division protein ftsZ	15 (26)	54.0	40324/4.7	9.525e+10	<i>E. coli</i>
28	Isocitrate dehydrogenase	14 (21)	36.0	45757/5.2	3.135e+08	<i>E. coli</i>
29	6-phosphogluconate dehydrogenase	11 (18)	25.0	51626/5.1	2.607e+07	<i>E. coli</i>
30	Phosphoglycerate kinase	10 (13)	31.0	41119/5.1	3.782e+06	<i>E. coli</i>
31	MMBP	16 (23)	54.0	43388/5.5	8.127e+10	<i>E. coli</i>
32	Enolase	9 (23)	31.0	45655/5.3	6.400e+06	<i>E. coli</i>
35	Aspartate aminotransferase	16 (22)	52.0	43574/5.5	1.258e+09	<i>E. coli</i>
37	KAS II	8 (11)	34.0	43046/5.7	4.371e+05	<i>E. coli</i>
38	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	11 (17)	31.0	43117/5.6	1.637e+06	<i>E. coli</i>
41	Transaldolase B	13 (25)	46.0	35220/5.1	2.378e+08	<i>E. coli</i>
?	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	4 (6)	25.0	27864/5.6	729	<i>E. coli</i>
?	Elongation factor Ts (EF-Ts)	8 (12)	27.0	30423/5.2	1.743e+04	<i>E. coli</i>
?	D-ribose-binding periplasmic protein	4 (6)	17.0	30951/6.8	184	<i>E. coli</i>
?	Type I restriction enzyme EcoEI R protein	4 (6)	9.0	92628/5.3	1110	<i>E. coli</i>
?	Colicin Ia protein	4 (6)	7.0	69407/9.1	14.3	<i>E. coli</i>
?	Elongation factor Tu (EF-Tu) (P-43)	7 (9)	18.0	43314/5.3	1.437e+05	<i>E. coli</i>

## B) K88

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pl	MOWSE score	Species
7	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	7 (10)	20.0	59644/5.5	2063	<i>E. coli</i>
8	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	10 (9)	24.0	59644/5.5	8.686e+05	<i>E. coli</i>
9	CTP synthase	10 (12)	20.0	60375/5.6	1.170e+05	<i>E. coli</i>
10	Pyruvate kinase I (PK-1)	17 (21)	48.0	50730/5.8	1.319e+10	<i>E. coli</i>
11	Fumarate hydratase class I	7 (8)	19.0	60106/5.9	9.307e+04	<i>E. coli</i>
12	Fumarate hydratase class I	10 (12)	21.0	60106/5.9	2.516e+05	<i>E. coli</i>
13	Ethanolamine ammonia-lyase heavy chain	8 (6)	18.0	49403/4.8	1.044e+04	<i>E. coli</i>
14	ATP synthase beta chain	15 (22)	52.0	50326/4.9	1.305e+11	<i>E. coli</i>
15	ATP synthase beta chain	25 (44)	70.0	50326/4.9	9.770e+16	<i>E. coli</i>
16	Aspartate ammonia-lyase	10 (14)	24.0	52357/5.2	1.830e+06	<i>E. coli</i>
17	Aspartate ammonia-lyase	11 (19)	22.0	52357/5.2	1.069e+05	<i>E. coli</i>
19	Bifunctional aspartokinase	4 (5)	7.0	89121/5.5	83.5	<i>E. coli</i>
20	ClpB protein	8 (12)	13.0	95586/5.4	1.590e+04	<i>E. coli</i>
21	Prophage CP4-57 integrase	15 (22)	52.0	46652/9.6	1.347e+04	<i>E. coli</i>
23	Enolase	8 (12)	26.0	45655/5.3	9.716e+05	<i>E. coli</i>
24	Enolase	11 (21)	36.0	45655/5.3	4.511e+07	<i>E. coli</i>
25	KAS I	8 (12)	27.0	42614/5.3	8.056e+04	<i>E. coli</i>
26	Elongation factor Tu (EF-Tu)	19 (37)	54.0	43314/5.3	2.853e+12	<i>E. coli</i>
27	Elongation factor Tu (EF-Tu)	15 (34)	44.0	43314/5.3	3.288e+10	<i>E. coli</i>
29	Ethanolamine utilization protein eutE	5 (6)	16.0	49022/6.2	756	<i>E. coli</i>
30	Transcription termination factor rho	7 (5)	22.0	47005/6.8	5.527e+04	<i>E. coli</i>
31	TolB protein precursor	6 (8)	19.0	45956/7.0	2.293e+04	<i>E. coli</i>
32	Type I restriction enzyme EcoEI R protein	10 (12)	15.0	92628/5.3	2054	<i>E. coli</i>
33	Phosphoglycerate kinase	11 (11)	42.0	41119/5.1	3.773e+06	<i>E. coli</i>
34	MMBP	8 (11)	25.0	43388/5.5	2368	<i>E. coli</i>
35	MMBP	8 (11)	25.0	43388/5.5	2368	<i>E. coli</i>
36	MMBP	14 (21)	53.0	43388/5.5	1.015e+09	<i>E. coli</i>
39	FBP aldolase	6 (26)	20.0	39148/5.5	1.108e+04	<i>E. coli</i>
40	Transaldolase B	7 (17)	26.0	35220/5.1	1.010e+05	<i>E. coli</i>
47	Malate dehydrogenase	9 (18)	42.0	32338/5.6	2.316e+06	<i>E. coli</i>
48	N-acetylneuraminatase lyase	9 (19)	23.0	32594/5.6	3.790e+05	<i>E. coli</i>
50	EIII-Man	11 (23)	44.0	35048/5.7	7.765e+07	<i>E. coli</i>
52	Unknown protein from 2D-page	5 (12)	19.0	32666/5.9	1870	<i>E. coli</i>

cont. B)

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pI	MOWSE score	Species
60	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate	4 (6)	27.0	17446/6.9	133	<i>E. coli</i>
61	Purine nucleoside phosphorylase	7 (18)	33.0	25950/5.4	1.419e+04	<i>E. coli</i>
63	Hypothetical protein yieK	11 (14)	36.0	26021/5.7	1.601e+06	<i>E. coli</i>
64	Topoisomerase IV subunit B	7 (10)	15.0	70245/5.4	4809	<i>E. coli</i>
80	DNA protection during starvation protein	7 (12)	42.0	18695/5.7	3.682e+05	<i>E. coli</i>
81	Ribosome recycling factor	5 (10)	40.0	20639/6.4	3218	<i>E. coli</i>
83	Unknown protein from 2D-page	7 (9)	52.0	15935/6.0	9.312e+04	<i>E. coli</i>
84	50S ribosomal protein L9	14 (18)	83.0	15769/6.2	3.594e+07	<i>E. coli</i>

C) O148

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pI	MOWSE score	Species
9	30S ribosomal protein S1	11 (26)	30.0	61159/4.9	1.217e+05	<i>E. coli</i>
14	ATP-dependent Clp protease	9 (15)	17.0	84208/5.9	1.424e+04	<i>E. coli</i>
17	Aspartate ammonia-lyase	7 (13)	17.0	52357/5.2	1.850e+04	<i>E. coli</i>
18	Aspartate ammonia-lyase	11 (14)	32.0	52357/5.2	1.527e+06	<i>E. coli</i>
21	Pyruvate kinase I (PK-1)	8 (13)	27.0	50730/5.8	2.213e+05	<i>E. coli</i>
22	ATP synthase alpha chain	8 (17)	20.0	55223/5.8	1.856e+04	<i>E. coli</i>
24	Dihydrolipoamide dehydrogenase	9 (12)	26.0	50689/5.8	5.423e+05	<i>E. coli</i>
30	ATP synthase beta chain	11 (23)	37.0	50326/4.9	2.371e+07	<i>E. coli</i>
45	Thioredoxin reductase (TRXR)					<i>E. coli</i>
48	ATP synthase alpha chain	7 (10)	14.0	55223/5.8	2.181e+04	<i>E. coli</i>
58	Tyrosine-protein kinase wzc	15 (24)	24.0	79344/6.5	5.709e+05	<i>E. coli</i>
62	Alanyl-tRNA synthetase	18 (29)	27.0	96033/5.5	3.628e+07	<i>E. coli</i>
85	Ribonuclease HII (RNase HII)	7 (10)	45.0	21466/7.1	3.565e+05	<i>E. coli</i>

## D) ACH5

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pl	MOWSE score	Species
2	Dihydrolipoamide acetyltransferase	13 (25)	23.0	66097/5.1	6.976e+07	<i>E. coli</i>
5	Prolyl-tRNA synthetase	10 (14)	24.0	63693/5.1	9.304e+06	<i>E. coli</i>
7	60 kDa chaperonin	19 (31)	33.0	57329/4.8	9.101e+09	<i>E. coli</i>
9	Aspartate ammonia-lyase	4 (7)	10.0	52357/5.2	121	<i>E. coli</i>
10	Aspartate ammonia-lyase	11 (22)	24.0	52357/5.2	5.910e+06	<i>E. coli</i>
11	Probable beta-ketoadipyl CoA thiolase	4 (7)	9.0	42277/6.0	822	<i>E. coli</i>
13	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	4 (8)	11.0	59644/5.5	277	<i>E. coli</i>
14	Pyruvate kinase I (PK-1)	10 (18)	31.0	50730/5.8	6.412e+05	<i>E. coli</i>
16	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	21 (42)	29.0	52023/6.0	4.413e+15	<i>E. coli</i>
18	ATP synthase beta chain	21 (42)	59.0	50326/4.9	4.413e+15	<i>E. coli</i>
19	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	9 (16)	41.0	30951/6.8	1.457e+05	<i>E. coli</i>
22	Isocitrate dehydrogenase	14 (20)	34.0	45757/5.2	3.847e+07	<i>E. coli</i>
23	Thymidine phosphorylase	8 (12)	22.0	47208/5.2	4.492e+04	<i>E. coli</i>
24	Glucose-1-phosphatase precursor	7 (12)	20.0	45683/5.5	3267	<i>E. coli</i>
25	Ferrichrome transport ATP-binding protein fluC	5 (8)	23.0	28887/6.8	1355	<i>E. coli</i>
27	Enolase	6 (11)	22.0	45655/5.3	2.415e+04	<i>E. coli</i>
29	Elongation factor Tu (EF-Tu)	7 (10)	19.0	43314/5.3	4.003e+04	<i>E. coli</i>
31	Tryptophanase	10 (22)	25.0	52774/5.9	1.132e+06	<i>E. coli</i>
32	Tryptophanase	15 (27)	32.0	52774/5.9	7.398e+08	<i>E. coli</i>
34	Acetate kinase	8 (15)	22.0	43291/5.8	1.885e+05	<i>E. coli</i>
35	Acetate kinase	8 (14)	30.0	43291/5.8	5.248e+06	<i>E. coli</i>
38	Serine hydroxymethyltransferase	10 (14)	33.0	45317/6.0	6.720e+05	<i>E. coli</i>
39	TolB protein precursor	7 (10)	19.0	45956/7.0	1.478e+04	<i>E. coli</i>
41	Phosphoglycerate kinase	9 (15)	37.0	41119/5.1	7.619e+05	<i>E. coli</i>
43	MMBP	13 (24)	44.0	43388/5.5	3.950e+09	<i>E. coli</i>
45	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	6 (12)	14.0	40844/5.4	2250	<i>E. coli</i>
46	Phosphoserine aminotransferase	5 (8)	19.0	39772/5.4	1184	<i>E. coli</i>
47	Fructose-bisphosphate aldolase class II	7 (11)	26.0	39148/5.5	6.487e+04	<i>E. coli</i>
56	Elongation factor Ts (EF-Ts)	11 (18)	44.0	30423/5.2	4.059e+06	<i>E. coli</i>
60	Acetyl-coenzyme A carboxylase	9 (12)	35.0	35242/5.8	7.577e+04	<i>E. coli</i>
64	GAPDH-A	6 (8)	26.0	35533/6.6	7038	<i>E. coli</i>
65	GAPDH-A	9 (13)	31.0	35533/6.6	2.373e+05	<i>E. coli</i>
70	Uridine phosphorylase	6 (9)	35.0	27159/5.8	2.917e+04	<i>E. coli</i>

cont. of D)

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pI	MOWSE score	Species
77	Superoxide dismutase [Fe]	5 (8)	35.0	21266/5.6	1.423e+04	<i>E. coli</i>
78	Superoxide dismutase [Fe]	5 (8)	35.0	21266/5.6	1.422e+04	<i>E. coli</i>
83	DNA protection during starvation protein	5 (7)	26.0	18695/5.7	9513	<i>E. coli</i>
88	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	4 (6)	28.0	16157/5.2	1508	<i>E. coli</i>
90	DNA-binding protein H-NS	5 (8)	45.0	15540/5.4	2471	<i>E. coli</i>
92	50S ribosomal protein L9	13 (26)	71.0	15769/6.2	3.190e+07	<i>E. coli</i>
94	Succinylornithine transaminase	5 (9)	10.0	43666/5.9	1013	<i>E. coli</i>

E) O59

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pI	MOWSE score	Species
2	Phosphate acetyltransferase	9 (14)	16.0	77173/5.3	6.243e+05	<i>E. coli</i>
4	Chaperone protein dnaK	14 (20)	25.0	69116/4.8	2.030e+08	<i>E. coli</i>
5	30S ribosomal protein S1	9 (14)	25.0	61159/4.9	4.341e+04	<i>E. coli</i>
6	Prolyl-tRNA synthetase	6 (11)	17.0	63693/5.1	6080	<i>E. coli</i>
8	60 kDa chaperonin	8 (12)	19.0	57329/4.8	582	<i>E. coli</i>
11	MukF protein (Killing factor kicB)	5 (7)	19.0	50579/4.8	202	<i>E. coli</i>
14	ATP synthase alpha chain	16 (59)	29.0	55223/5.8	1.103e+12	<i>E. coli</i> S
16	NADH	7 (18)	18.0	50640/5.9	9144	<i>typhimurium</i>
22	Elongation factor Tu (EF-Tu)	11 (19)	35.0	43314/5.3	6.150e+07	<i>E. coli</i>



## F) O157:H7

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pl	MOWSE score	Species
3	30S ribosomal protein S1	14 (28)	31.0	61159/4.9	4.120e+06	<i>E. coli</i>
4	Dihydrolipoamide acetyltransferase	7 (11)	11.0	66097/5.1	6041	<i>E. coli</i>
5	Prolyl-tRNA synthetase	12 (20)	26.0	63693/5.1	5.659e+07	<i>E. coli</i>
6	60 kDa chaperonin	8 (15)	20.0	57329/4.8	2.351e+04	<i>E. coli</i>
7	Trigger factor (TF)	28 (46)	53.0	48193/4.8	2.135e+14	<i>E. coli</i>
8	Aspartate ammonia-lyase	8 (16)	20.0	52357/5.2	5.366e+05	<i>E. coli</i>
10	His dipeptidase	6 (9)	14.0	52916/5.2	5824	<i>E. coli</i>
11	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	8 (14)	24.0	59644/5.5	7.921e+05	<i>E. coli</i>
12	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	10 (16)	29.0	56178/5.5	2.253e+07	<i>E. coli</i>
13	Glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein	5 (8)	7.0	48449/6.3	459	<i>E. coli</i>
15	Mlc protein	4 (7)	19.0	44316/5.8	923	<i>E. coli</i>
17	Fumarate hydratase class I, anaerobic	7 (11)	15.0	60106/5.9	5779	<i>E. coli</i>
19	Glucans biosynthesis protein G precursor	5 (7)	11.0	57883/6.7	7377	<i>E. coli</i>
20	ATP synthase beta chain	21 (42)	56.0	50326/4.9	7.424e+15	<i>E. coli</i>
21	GAD-beta	10 (19)	23.0	52669/5.3	5.974e+06	<i>E. coli</i>
23	ATP synthase alpha chain	10 (17)	22.0	55223/5.8	2.459e+06	<i>E. coli</i>
25	Thymidine phosphorylase	14 (25)	43.0	47208/5.2	1.066e+09	<i>E. coli</i>
26	Isocitrate dehydrogenase	14 (24)	37.0	45757/5.2	2.059e+08	<i>E. coli</i>
27	Enolase	4 (7)	14.0	45655/5.3	414	<i>E. coli</i>
28	Enolase	9 (15)	33.0	45655/5.3	9.492e+05	<i>E. coli</i>
29	Elongation factor Tu (EF-Tu)	8 (11)	31.0	43314/5.3	1.434e+06	<i>E. coli</i>
30	Elongation factor Tu (EF-Tu)	14 (24)	39.0	43314/5.3	5.749e+09	<i>E. coli</i>
36	Phosphoglycerate kinase	4 (6)	15.0	41119/5.1	206	<i>E. coli</i>
37	Phosphoglycerate kinase	12 (27)	46.0	41119/5.1	1.510e+08	<i>E. coli</i>
38	Maltose-binding periplasmic protein precursor	18 (26)	51.0	43388/5.5	8.956e+11	<i>E. coli</i>
40	Protein E	10 (14)	27.0	40684/5.9	7.284e+06	<i>E. coli</i>
41	Transaldolase A	10 (17)	31.0	35659/5.9	1.454e+07	<i>E. coli</i>
42	Fructose-bisphosphate aldolase class I	9 (16)	20.0	38110/6.2	6.058e+04	<i>E. coli</i>
47	Prophage CP4-57 integrase	5 (9)	10.0	46652/9.6	1.738e+04	<i>E. coli</i>
49	Elongation factor Ts (EF-Ts)	16 (23)	51.0	30423/5.2	6.379e+10	<i>E. coli</i>
52	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	6 (12)	21.0	27864/5.6	9769	<i>E. coli</i>
58	PGAM	8 (16)	36.0	28557/5.8	3.225e+05	<i>E. coli</i>
72	UPF0234 protein yajQ	6 (10)	43.0	19047/6.0	2079	<i>E. coli</i>

## Cont. of F)

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pi	MOWSE score	Species
80	Universal stress protein A	6 (12)	30.0	16067/5.1	4.726e+04	<i>E. coli</i>
83	50S ribosomal protein L9	12 (27)	67.0	15769/6.2	4.998e+06	<i>E. coli</i>
89	EIII-GLC	6 (8)	38.0	18251/4.7	5.237e+04	<i>E. coli</i>

## G) C2

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pi	MOWSE score	Species
4	Fumarate reductase flavoprotein subunit	13 (24)	19.0	93499/5.2	2.695e+08	<i>E. coli</i>
7	Fumarate reductase flavoprotein subunit	13 (23)	27.0	65972/5.9	2.922e+07	<i>E. coli</i>
12	Glutaminyl-tRNA synthetase	10 (13)	22.0	63510/5.9	2.251e+05	<i>E. coli</i> 57
13	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	13 (20)	27.0	64422/5.8	6.546e+08	<i>E. coli</i>
14	Prolyl-tRNA synthetase	16 (26)	33.0	63693/5.1	1.654e+10	<i>E. coli</i>
15	Dihydrolipoamide acetyltransferase	11 (16)	21.0	66097/5.1	1.033e+06	<i>E. coli</i>
20	Periplasmic oligopeptide-binding protein precursor	8 (13)	23.0	60899/6.1	4.248e+05	<i>E. coli</i>
21	Pyruvate kinase I (PK-1)	12 (22)	31.0	50730/5.8	1.571e+07	<i>E. coli</i>
22	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	9 (15)	22.0	59644/5.5	6.738e+05	<i>E. coli</i>
23	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase precursor	6 (10)	15.0	70833/5.5	4530	<i>E. coli</i>
28	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	7 (10)	16.0	56178/5.5	2878	<i>E. coli</i>
29	GAD-beta	13 (17)	31.0	52669/5.3	5.943e+08	<i>E. coli</i>
30	ADP-heptose synthase	9 (13)	27.0	51051/5.3	1.493e+06	<i>E. coli</i>
31	Aminoacyl-histidine dipeptidase	7 (10)	21.0	52916/5.2	3.195e+04	<i>E. coli</i>
32	GAD-beta	12 (23)	27.0	52669/5.3	1.586e+08	<i>E. coli</i>
37	Serine hydroxymethyltransferase	16 (22)	42.0	45317/6.0	7.196e+09	<i>E. coli</i>
38	TolB protein precursor	6 (10)	16.0	45956/7.0	4.165e+04	<i>E. coli</i>
45	Maltose-binding periplasmic protein precursor	13 (22)	44.0	43388/5.5	1.910e+08	<i>E. coli</i>
46	Phosphoglucomutase	4 (5)	15.0	58361/5.4	2907	<i>E. coli</i>
74	Alkyl hydroperoxide reductase C22 protein	8 (20)	52.0	20762/5.0	2.992e+05	<i>E. coli</i>
80	Outer-membrane protein yhbX precursor	4 (5)	8.0	60640/6.4	142	<i>E. coli</i> 57

## H) O26

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pi	MOWSE score	Species
2	Elongation factor G	22 (34)	39.0	77582/5.2	2.071e+15	<i>E. coli</i>
3	Elongation factor G	21 (30)	40.0	77582/5.2	9.162e+15	<i>E. coli</i>
4	Fumarate reductase flavoprotein subunit	11 (19)	23.0	65972/5.9	2.256e+06	<i>E. coli</i>
9	Prolyl-tRNA synthetase	9 (16)	9 (16)	63693/5.1	4.045e+04	<i>E. coli</i>
10	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	7 (13)	18.0	59644/5.5	3.113e+04	<i>E. coli</i>
11	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	14 (22)	40.0	59644/5.5	2.215e+09	<i>E. coli</i>
13	60 kDa chaperonin	11 (20)	25.0	57329/4.8	6.777e+05	<i>E. coli</i>
14	Phosphoglyceromutase	9 (16)	28.0	56110/5.2	2.930e+06	<i>E. coli</i> <i>coli57</i>
15	Aspartate ammonia-lyase	6 (11)	16.0	52357/5.2	6141	<i>E. coli</i>
21	Phosphoglucomutase	17.0	17.0	58361/5.4	3636	<i>E. coli</i>
25	Pyruvate kinase I (PK-1)	15 (23)	42.0	50730/5.8	3.067e+08	<i>E. coli</i>
26	ATP synthase alpha chain	10 (18)	22.0	55223/5.8	7.102e+04	<i>E. coli</i>
27	Dihydrolipoamide dehydrogenase	8 (13)	22.0	50689/5.8	8.472e+04	<i>E. coli</i>
28	ATP synthase alpha chain	13 (19)	28.0	55223/5.8	1.213e+09	<i>E. coli</i>
29	Glucans biosynthesis protein G precursor	7 (12)	19.0	57883/6.7	2.426e+04	<i>E. coli</i>
30	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	11 (20)	33.0	36512/5.0	1.031e+06	<i>E. coli</i>
31	Phosphopentomutase	8 (12)	29.0	44370/5.1	3.829e+04	<i>E. coli</i>
32	Phosphopentomutase	18 (37)	47.0	47208/5.2	1.602e+12	<i>E. coli</i>
33	6-phosphogluconate decarboxylating dehydrogenase,	17 (27)	42.0	51482/5.1	8.819e+09	<i>E. coli</i>
34	Thymidine phosphorylase	18 (37)	47.0	47208/5.2	1.602e+12	<i>E. coli</i>
35	Isocitrate dehydrogenase	17 (25)	44.0	45757/5.2	7.312e+08	<i>E. coli</i>
36	Enolase	6 (9)	20.0	45655/5.3	3.381e+04	<i>E. coli</i>
37	Enolase	9 (15)	31.0	45655/5.3	6.399e+06	<i>E. coli</i>
41	KAS II	8 (12)	32.0	43046/5.7	9.292e+05	<i>E. coli</i>
45	Transcription termination factor rho	11 (17)	31.0	47005/6.8	2.711e+06	<i>E. coli</i>
47	Maltose-binding periplasmic protein precursor	16 (32)	52.0	43388/5.5	5.933e+10	<i>E. coli</i>
51	Fructose-bisphosphate aldolase class II	7 (9)	23.0	82657/6.4	2.202e+05	<i>E. coli</i>
53	TolB protein precursor	9 (14)	26.0	45956/7.0	1.827e+06	<i>E. coli</i>
55	KAS III	7 (14)	34.0	33515/5.1	5.696e+05	<i>E. coli</i>
57	Elongation factor Ts (EF-Ts)	12 (20)	45.0	30423/5.2	1.405e+08	<i>E. coli</i>
60	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	7 (12)	37.0	30951/6.8	3.081e+04	<i>E. coli</i>
62	Unknown protein from 2D-page	7 (12)	22.0	32666/5.9	1.480e+04	<i>E. coli</i>
64	GAPDH-A	5 (8)	19.0	35533/6.6	4317	<i>E. coli</i>

Cont. of H)

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Protein MW/pi	MOWSE score	Species
68	Aspartate aminotransferase	8 (11)	29.0	43574/5.5	5.322e+05	<i>E. coli</i>
70	EIII-Man	13 (19)	35.0	35048/5.7	1.329e+09	<i>E. coli</i>
72	Phosphoglyceromutase	5 (10)	20.0	28557/5.8	1467	<i>E. coli</i>
78	EIII-GLC	5 (8)	30.0	18251/4.7	1.048e+04	<i>E. coli</i>
80	Ferric uptake regulation protein	5 (10)	40.0	16795/5.7	5.087e+04	<i>E. coli</i>
83	Heat shock protein F21.5	5 (8)	32.0	23187/5.5	3.349e+04	<i>E. coli</i>
84	Ecotin precursor	4 (6)	8.0	18165/6.6	507	<i>E. coli</i>

### 3. Strain specific 항혈청을 이용한 *E. coli* strain 간의 항원성 단백질 비교

#### 가. 서론

대장균은 사람 및 동물의 대장 내에서 분포되어 있는 균으로서 식품 등에 대장균이 검출되었다면 이는 사람이나 동물의 대변에 오염되었다는 사실을 간접적으로 시사한다. 이들 대장균이 가진 항원은 균체(O), 엽막(K) 및 편모(H)항원 등 3종류로 분류되고 다시 혈청항원에 따라 여러 종류로 나누어지며 현재까지 O항원은 180종, K항원은 100여종, H항원은 56여종인 것으로 알려져 있다 (D'Souza 등, 2002).

자돈의 이유 후 설사병은 주로 병원성 대장균 감염에 의해 일어나는데 특히 장독소 분비형 대장균이 소장을 침범하여 장벽에 부착함으로써 병을 일으킨다. 대장균의 부착인자 (Pili) 에는 K88, K99, 987P, F41등의 4가지가 가장 흔하다. 병원성 대장균의 혈청형은 O138, O139, O141, O149등이 여러가지가 알려져 있으며, 이유후 돼지에서는 용혈성 대장균이 주된 병원체로 작용 한다. 대장균이 설사를 일으키는 기전은 먼저 대장균이 장상피에 일단 부착하게 되면 대장균은 빠르게 증식하여 장독소를 생산하여 장 상피세포에 손상을 주고 이후 자돈은 장용모로부터의 수분흡수가 불량하게 되어 체액에 손실을 가져오며, 영양분의 흡수를 방해됨으로써 설사를 하게 된다(Wong 등, 2002).

본 연구에서는 5종류의 strain (K88, K99, O148, O26 그리고 O157:H7)에 대한 항혈청을 이용해 각각의 대응되는 strain과 immunoblot하여 그 반응상을 살펴보았다. 이러한 결과로 숙주와 병원체간의 면역원성의 차이에 대해 알아볼 수 있을 것이며 더 나아가 백신개발이나 진단 마커의 개발에 이용될 수 있을 것이다. 아울러 특히 항원성 단백질은 병원체에 대한 역학조사에도 사용되어 질 수 있을 것이다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 공시균주

본 연구에서는 사람과 동물로 부터 유래된 병원성 *E. coli* strain들을 사용 하였다. 이들 중 *E. coli* strain K88, O26, K99 그리고 O148은 경상대학교 병원 미생물학교실로부터 분양받아 사용하였고, strains ACH5, O59, C2 그리고 O157:H7은 경상대학교 수의과대학 수의미생물학교실에서 분양 중이던 것을 사용하였다. 사용된 균주는 table 1.에 설명하였다.

**Table 1.** List of bacterial isolates used.

<i>E. coli</i> strains	Origin	Mode of Pathogenicity
K88	human	ETEC
K99	human	ETEC
ACH5	human	ETEC
O148	human	ETEC
O59	human	ETEC
O157:H7	cattle	EHEC
C2	cattle	EHEC
O26	swine	EPEC

### 2) 균 배양 및 2-DE sample 준비

모든 *E. coli* strain들은 Luria Bretani (LB) broth (Oxoid, Oxford, UK)를 이용하여 배양하였다. 모든 strain들은 동시에 220g의 continuous shaking rotor를 이용해 37°C에서 6시간동안 배양되어졌다. 배양 후 배양액이 610 nm에서 흡광도치가 1.0이 되도록 조정 한 뒤 원심분리기를 이용해 균체를 수거하고 곧 이어 세척과정 PBS를 이용하여 3회 연속으로 실시하였다. 세척 후 균체는 6M urea, 2M thiourea, 40mM Tris 그리고 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)가 함유된 lysis buffer로 재 부유 한 뒤 13,000 × g의 4°C에서 1시간 동안 원침 시켰다. 원심분리 후 상층액을 회수하여 일부는 BCA protein assay kit (Pierce Chemical Co. Rockford, IL, USA)를 이용해 단백질의 정량을 하고 나머지는 실험에 공시되기 전까지 -70°C에서 보관 하였다.

### 3) 2-DE와 immunoblot analysis

이차원전기영동을 하기 위해 먼저 준비된 sample을 9M urea, 4% CHAPS, 0.4% dithiothreitol (DTT), 0.5% IPG buffer (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) 그리고 0.002% bromophenol blue가 함유된 rehydration buffer를 넣고 녹인 후 등전점 분리를 수행 하였다.

등전점분리 (Isoelectric focusing; IEF)는 Gorg 등 (2000)의 방법을 준용하여 IPGphor System (Amersham Biosciences)과 IPG strip (Immobiline Dry Strip, pH4-7, 13 cm from Amersham Biosciences)을 이용하여 수행하였다. 준비된 sample은 자동 program mode를 이용하여 20°C에서 최종 85,760 Vhr가 될 때까지 전개 시켰다. 이렇나 일차원 전기영동과정 이 끝난 후에는 IPG gel strip을 1% DTT가 함유된 equilibration buffer (6M urea, 2% SDS, 30% glycerol, 50mM Tris-HCl, pH 8.8)와 15분간 반응 시키고 다시 추가로 15분을 DTT대신에 2.5% iodoacetamide가 첨가

된 equilibration buffer를 이용해 반응 시킨 후 12.5% SDS-PAGE slab gel을 이용해 단백질을 전개시켰다. 이차원 단계는 phenol red 염색액이 gel의 바닥에 닿을 때까지 유지 시켰다.

Immunoblotting을 위해 2-DE gel속의 전개된 단백질 spot들은 PVDF membrane (Immobilon-PTM, 0.45 mm; Millipore, Billerica, USA)으로 이동 시켰다. 이 membrane은 0.05% Tween-20이 함유된 PBS (PBS-T; pH 7.4)에 5% skim milk가 함유된 blocking buffer를 이용해 1시간 동안 실온에서 또는 4°C에서 밤새도록 반응 시켰다. 이후 PBS-T로 세척과정을 거친 후 5 종류의 상업용으로 시판되고 있는 *E. coli* 항혈청을 감작시켰다. 사용된 항혈청은 *E. coli* K88, K99, O148 그리고 O26 (Denka Seiken Co., Ltd, Chuo-ko, Tokyo, Japan) 와 O157:H7 (Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA) strain에 대한 항혈청 이었다. 이들 항혈청은 1:500으로 희석 하여 각각의 strain 에 대한 blotting 된 PVDF membrane과 실온에서 1시간 동안 감작 시켰다. 반응 후 재차 세척과정을 거치고 이번에는 goat anti-rabbit IgG conjugated HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)를 1:2000으로 희석해 1시간 반응 시킨 후 반응의 결과는 Enhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences)용액을 이용해 알아보았다.

#### 4) Image 분석

염색된 이차원전기영동 gel과 immunoblotted spot들은 Agfa Arcus 1200™ image scanner (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgium)를 이용해 디지털화 하였고 측정된 image는 Phoretix™ 2D software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)를 이용해서 분석하였다. Gel의 spot 위치를 분석하기 위해 2D SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용해서 각각의 spot의 Mr 와 pI를 측정하였다.

#### 5) 질량분석기를 이용한 단백질 동정

관심 있는 단백질 spot들은 염색된 gel로 부터 추출되어 진 후 50% acetonitrile로 세척 한 후 건조하고 다시 10 mM DTT/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해서 실온에서 가수화 시켰다 Gel 조각들은 다시 실온의 암실에서 55 mM iodoacetamide/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해 반응 시킨 후 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>로 세척하고 다시 건조 시켰다. 건조된 gel 조각들은 다시 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해 재수화 한 다음 5 mM CaCl<sub>2</sub> 와 12.5 ng/ul의 sequence-grade의 porcine trypsin (Promega, Madison, USA)을 첨가 하여 ice속에서 45분간 반응 시켰다. 반응 후 여분의 액체는 제거한 후에 37°C에서 밤새 반응 시켰다. 반응 후 5% formic acid 와 acetonitrile이 1:1 (v/v)로 희석된 용액을 넣고 반응을 시킨 후 상층액은 회수하고 이는 다시 vacuum centrifuge를 이용하여 건조 시켰다.

Tryptic digest된 건조된 peptide들은 증류수, acetonitrile 그리고 trifluoroacetic acid

가 각각 93:5:2로 희석된 용액 2  $\mu$ l를 이용해 재부유 시키고 MALDI-TOF mass spectrometry를 위한 target preparation을 위해 solution-phase nitrocellulose 방법을 적용하였다.  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinamic acid (40 mg/ml) 와 nitrocellulose (20 mg/ml)를 각각 acetone에 녹인 것을 isopropanol과 섞었다. 이 용액에 internal standard를 위해 des-Arg-Bradykinin (monoisotopic mass, 904.4681) 과 angiotensin I (1296.6853)을 섞어 trypsin digestion된 peptide에 넣어 이 중 용액 1  $\mu$ l을 target plate의 circle에 점적 한 후 건조시켰다. Target에 있는 sample spot들은 Voyager-DE STR MALDI-TOF MS (PerSeptive Bio-systems, Framingham, USA) 기기를 이용해 peptide mass를 측정하였다. 측정된 data는 MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>) 프로그램과 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 프로그램을 이용해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 protein sequence database를 참조하여 datamining하였다. 이때 mass tolerance는  $\pm 50$  ppm으로 하였고 한개 까지의 missed cleavage site는 인정하였다. 아울러 carbamidomethylation of cysteines 과 oxidation of methionine을 protein modification의 인자로써 감안 하였다.

#### 다. 결과

O157:H7 strain의 경우는 75개의 항원성 spot을 관찰 할 수 있었으며, K88에서는 46개, O26에서는 41개, O148에서는 35개 그리고 K99에서는 31개의 항원성 spot을 관찰 할 수 있었다.

이들 항원성 spot들 중 O157:H7 strain에서는 45개의 specific 항원성 spot을 찾을 수 있었고 이들 중 24개의 단백질을 MALDI-TOF MS 분석을 통해 동정 할 수 있었다. 동정된 단백질들은 HSP70 (spot #2), 30S ribosomal protein S1 (spot #3), Dihydrolipoamide acetyltransferase (spot #4), ProRS (spot #5), Aspartase (spot #8), Peptidase D (spot #10), PEPCK (spot #11), Alkyl hydroperoxide reductase subunit F (spot #12), Glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein precursor (spot #13), Mlc protein (spot #15), Fumarase (spot #17) ATP synthase alpha chain (spot #23), TdRPase (spot #25), NADP (spot #26), Enolase (spots #27,28), EF-Tu (spots #29,30), Phosphoglycerate kinase (spots #36), Protein E (spot #40), Transaldolase A (spot #41), Prophage CP4-57 integrase (spot #47), NADH (spot #52) 그리고 UPF0234 protein yajQ (spot #72)이었다.

K88 strain에서는 15 specific 항원성 spot과 9개의 단백질을 동정 할 수 있었다. 동정된 단백질은 60 kDa chaperonin (spot #8), CTP synthase (spot #12), Prophage CP4-57 integrase (spot #19), Pyruvate kinase I (spot #20), Fumarate hydratase class I (spots #22), KAS I (spot #32), Aspartate ammonia-lyase (spot #33), EF-Tu (spot



#39) 그리고 Ethanolamine utilization protein eutE (spot #42)이었다.

O148 strain에서는 6개의 specific 항원성 spot과 한개의 ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA (spot #14)을 동정 할 수 있었다. K99 과 O26 strain 에서는 3개의 specific 항원성 spot을 찾을 수 있었다. 이들 중에서 K99에서는 HSP70 (spot #1)을 찾을 수 있으나 O26 strain에서는 아무것도 동정 할 수 없었다 (table 1).

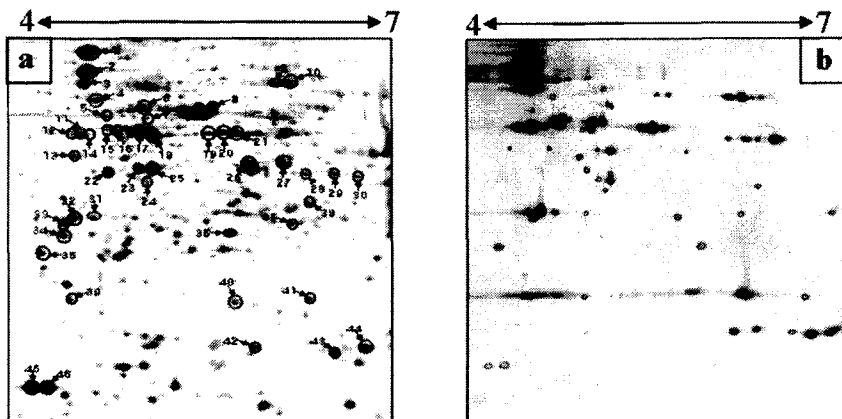


Figure 1.. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* K88. Samples of 60  $\mu$ g of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. Antigenic spots were recognized by K88 antiserum. The pH range is shown on the top of each map.

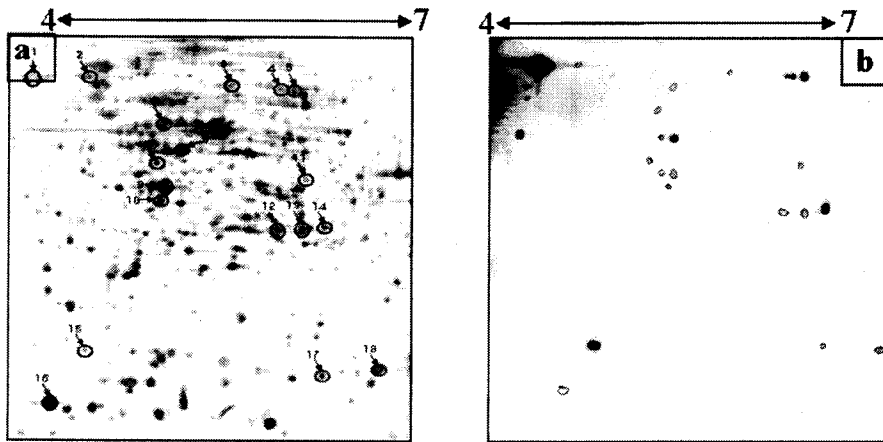


Figure 2.. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* K99. Samples of 60  $\mu$ g of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. Antigenic spots were recognized by K99 antiserum. The pH range is shown on the top of each map.

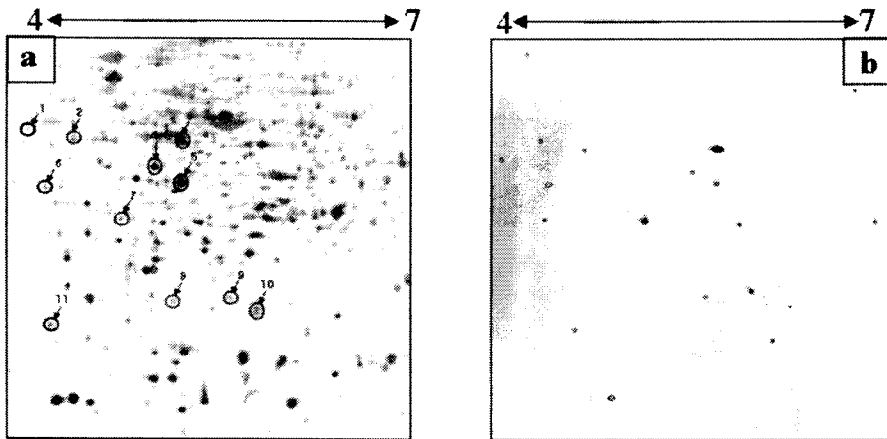


Figure 3 . 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* O148. Samples of 60  $\mu$ g of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. Antigenic spots were recognized by O148 antiserum. The pH range is shown on the top of each map.

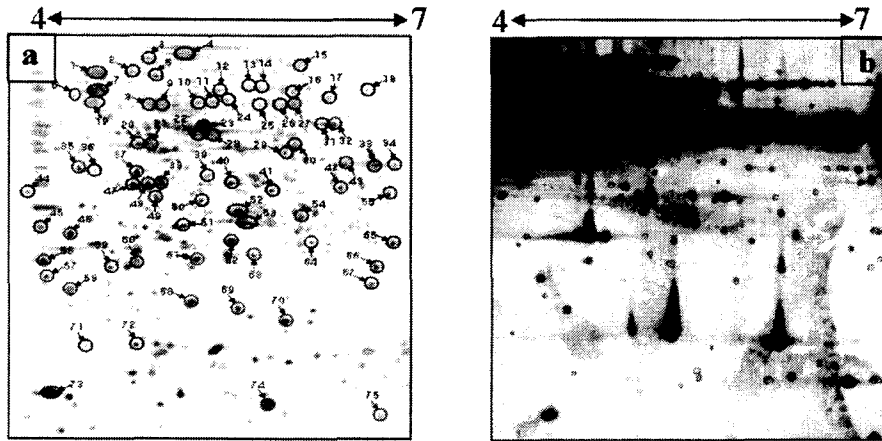


Figure 4. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* O157:H7. Samples of 60  $\mu$ g of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were restained with silver nitrate. Antigenic spots were recognized by O157:H7 antiserum. The pH range is shown on the top of each map.

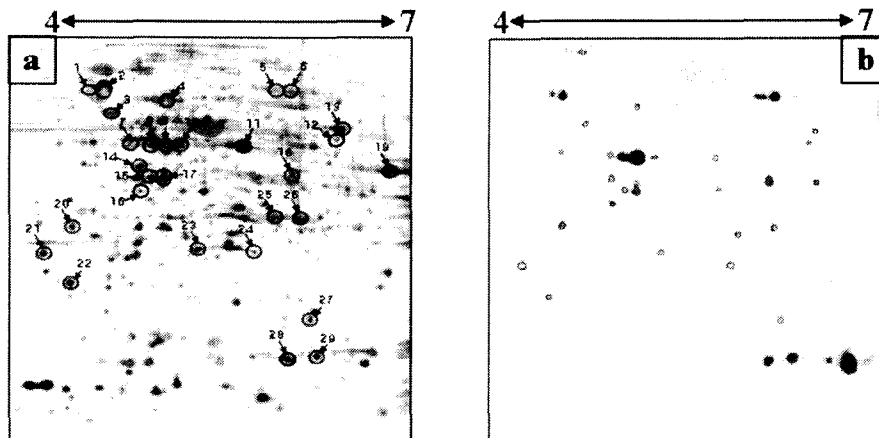


Figure 5. 2-DE map (a) and immunoblot profile (b) of *E. coli* O26. Samples of 60  $\mu$ g of proteins were loaded on the 2-DE gel and proteins were stained with silver nitrate. Antigenic spots were recognized by O26 antiserum. The pH range is shown on the top of each map.

Table 1. Specific antigenic spots of pathogenic *E. coli* serogroups recognized by its respective strain specific antiserum.

K88	K99	O148	O157:H7	O26
5	1	1	2	30
7	6	3	3	31
8	11	7	4	34
12		11	5	36
14		14	8	39
19		15	9	40
20			10	41
22			11	44
26			12	45
32			13	47
33			14	50
38			15	51
39			16	52
42			17	53
45			18	59
			22	60
			23	65
			24	66
			25	67
			26	71
			27	72
			28	75
			29	

Table 2. Common antigenic proteins of pathogenic *E. coli* serogroups by PMF and reacted with its respective strain specific antise

Protein name	K88	K99	O148	O157:H7	O26
Alkyl hydroperoxide RSF	X	X	X	●	X
Aspartase	X	X	X	●	X
Aspartate ammonia-lyase	●	X	X	X	X
ATP-dependent Clp protease	X	X	●	X	X
ATP synthase alpha chain	X	X	X	●	X
CTP synthase	●	X	X	X	X
Dihydrolipoamide dehydrogenase	X	X	X	●	X
Elongation factor Tu (EF-Tu)	●	X	X	●	X
Enolase	X	X	X	●	X
Ethanolamine ammonia-lyase	●	X	X	X	X
Fumarate hydratase class I	●	X	X	●	X
Glycerol metabolism operon	X	X	X	X	X
Glyceol-3-PBPP	X	X	X	●	X
HSP70	X	●	X	●	X
KAS I	●	X	X	X	X
Mlc protein	X	X	X	●	X
NADP	X	X	X	●	X
NADH	X	X	X	●	X
PEPCK	X	X	X	●	X
Peptidase D	X	X	X	●	X
Prophage CP4-57 integrase	X	X	X	●	X
ProRs	X	X	X	●	X
Protein E	X	X	X	●	X
Pyruvate kinase I (PK-I)	●	X	X	●	X
TdRPase	X	X	X	●	X
UPF0234	X	X	X	●	X
30S ribosomal protein S1	X	X	X	●	X
60 kDa chaperonin	●	X	X	●	X

## 2절 *Neospora caninum*의 프로테옴 연구

### 1. *N. caninum* 표준 reference map 제작

#### 가. 서론

*Neospora caninum* (*N. caninum*)은 편성세포내 기생 원충류이다 (Dubey, 1996 및 1999). 이 원충은 1980년대 까지 *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)와 혼동되어 진단되어 왔었는데 그 이유는 그들간의 형태학적, 생리학적 상동성에 기인하였다. 그러나 *N. caninum*의 특이한 조직학적 tissue cyst formation과 항원성 차이에 의해 *T. gondii*와 구분 할 수 있었다 (Bjerkas 와 Presthus, 1988; Dubey 등, 1988).

최근 국내외의 유우 및 육우 사육농가에서는 *N. caninum*이 유산과 사산의 중요한 원인체 임이 속속 보고되고 있다 (Anderson 등, 1991; Dubey, 1999; Hur 등 1998; Kasari 등 1999; Kim 등, 2002). 지금까지 *N. caninum*에 의한 축산업계의 경제적인 손실에 대해 많은 연구가 되어왔으나 *N. caninum*의 전체 단백질에 대한 연구는 전무한 실정이다. *N. caninum* 단백질 발현의 총체적인 연구는 이 원충의 생물학적인 역동성 즉, 발달, 증식, 그리고 병원성을 연구하는데 많은 지식을 제공하여 준다 (Jungblut 등, 1999; Pennington 등, 1997).

이차원 전기영동법 (2-DE)은 세포, 조직, 또는 다른 여러 생물학적 시료들같은 단백질을 복합물을 효과적이고 광범위하게 분석 할 수 있는 신기술이다. 이 기술은 Klose (1975) 와 O'Farrell (1975)에 의해 개발되었는데 이것은 단백질 고유의 등전점(pI)과 분자량(MW)에 따라 단백질을 분리하는 방식으로써 이 방법을 통해 시료 속에 포함되어있는 단백질을 가시화하고 분석할 수 있게 되었다. 이 기술은 *T. gondii* (Cohen 등, 2002; Dlugonska 등, 2001; Geiber 등, 1999), *Fasciola hepatica* (Jefferies 등, 2000), *Schistosoma japonicum* (Kirinoki 등, 1998), *Ascaris suum* (Kasuga-aoki 등, 2000)같은 기생충들의 단백질의 연구에 많이 이용되어오고 있다.

본 연구에서는 2-DE를 이용하여 *N. caninum* 및 *T. gondii* tachyzoite의 단백질을 분석하기위해 적절한 sample 제조방법을 확립하고 2-DE 수행조건을 확립하고자 한다. 아울러 토끼 *N. caninum* tachyzoites (KBA-2) 항혈청을 이용하여 immunoblot profile도 확인하고자 한다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 공시 원충주

실험에 사용된 *N. caninum* (KBA-2) 및 *T. gondii* (RH strain)은 서울대학교 수의과대학 병리학교실로부터 분양 받아 사용하였다.

## 2) 실험실내 배양조건 및 tachyzoites의 순수 분리

원충은 Africa green monkey kidney cell(Vero cell:CRL6318, ATCC, MD)에서 3-5일 간격으로 계대 유지되었으며, 배지로는 Minimum Essential Medium(a-MEM, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) medium supplemented with 10% Horse serum, MEM vitamin solution, MEM essential amino acid solution, MEM non-essential amino acid solution, 100unit/ml penicillin G, 100ul/ml streptomycin, 0.25µg/ml amphotericin B(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), 7.5% sodium bicarbonate를 첨가하여 사용하였다. 배양 조건은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 유지하였다.

원충의 증식은 175cm<sup>2</sup> cell culture flask에 vero cell이 70-80% 세포단층을 형성하면 1:5 분량으로 계대 접종 하였으며, 원충이 증식하여 40-50%가 세포 밖으로 유출시 배양세포와 tachyzoites를 scraping하여 원심관에 수거하고, 23-gauge와 27-gauge 주사기로 back and forth하여 세포를 파괴시켜 세포내 존재하는 원충을 유리시켰다. 이를 4°C, 200 x g로 5분 원심분리 한 다음 tachyzoites가 포함된 상층액을 원심 침전시켜 상층액을 제거한 다음 배양배지로 재 부유 하였다. 재 부유된 침전액은 80%, 50%, 30% osmotic percoll solution 위에 중층하고, 2000 x g 에서 30분간 원심하였다. osmotic percoll solution 80% 와 50% 의 경계면에서 순수 분리된 tachyzoites 들은 pasture pipet을 이용하여 회수하고 PBS로 1500 x g 에서 5분간 3회 세척하고, 원충수를 계측한 다음 사용 전까지 -70 °C에 보관하였다.

## 3) SDS-PAGE 및 Western blot

5 x 10<sup>7</sup>/ml의 tachyzoites를 sonicator로 10% power에서 1분간 파쇄한 다음 SDS-PAGE sample buffer (Bio-Rad)를 혼합하고 100°C에서 5분간 가열하였다. 변성된 단백질은 12% SDS-polyacrylamide gel에 well 당 20µl를 loading 하였으며, Laemmli의 방법에 따라 SDS-PAGE를 수행하였으며, Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250으로 염색한 후 탈색시켜 단백질 분획을 확인하였다.

SDS-PAGE한 gel에서 항원 단백질 분획을 검출하기 위하여 PVDF membrane (Immobilon-P, 0.45 mm; Millipore, Billerica, USA.) 에 전사시킨 후, 5% skim milk를 가하여 실온에서 1시간 동안 blocking을 하였다. 1:100으로 희석한 토끼 면역 혈청을 가하여 1시간동안 가볍게 진탕하면서 반응을 시킨 다음 1:1,000으로 희석된 Anti rabbit-HRP conjugated IgG를 가한 후 1시간 동안 가볍게 진탕하면서 반응을 시키고, 세척한 다음 ECL kit를 이용하여 항원을 검출하였다.

## 4) 이차원 전기영동을 위한 시료 준비

이차원 전기영동을 위한 *N. caninum* 및 *T. gondii* 의 단백질 추출은 O' Farrell의 방법을 준용하였으며, 준비된 시료에 100µl의 40mM Tris-HCl를 첨가하고 액체질소와 60°C 항온수조를 이용하여 급속 동결 용해 과정을 3회 반복한 다음 sonicator로

10% power에서 1분간 파쇄하였다. 500 $\mu$ l의 lysis buffer(7M urea/2M thiourea, 4% CHAPS, 65mM DTT, 40mM Tris-HCl, 0.5% IPG buffer)를 첨가하여 얼음에서 1시간 반응시킨 다음 16,000 x g 에서 30분간 원심시켜 상층액을 회수하고, 회수된 상층액은 Bradford 법을 준용하여 단백질을 정량하였다.

## 5) 이차원 전기영동

### 가) First-dimension Isoelectric focusing(IEF)

IPGphor system을 이용하여 IEF를 수행하였다. Rrehydration buffer(6M urea/2M thiourea, 4% CHAPS, 65mM DTT, 40mM Tris-HCl, 0.5% IPG buffer, bromophenol blue)에 정량한 시료 단백질의 함량이 8 $\mu$ g되게 조제한 다음 IPGphore strip holder에 100 $\mu$ l를 로딩한 후 7cm immobilized pH Gradient (IPG) strip을 잘 올려놓고, 시료가 건조되지 않도록 cover fluid oil을 가하였다.

IEF 조건은 전류가 IPG strip당 50 $\mu$ A가 넘지 않도록 하였으며, 20 $^{\circ}$ C의 온도조건에서 14시간 rehydration 후 500V에서 30분, 1,000V 30분, 4,500V에서 10시간 통전하여 최종 45,750Vhs까지 IEF를 실시 하였다. IEF가 끝난 IPG strip은 2차원 SDS-PAGE를 수행하였다.

### 나) Second dimension SDS-PAGE

IEF가 끝난 IPG strip은 1%(w/v) DTT를 첨가한 equilibration buffer (1.5M Tris-HCl, pH8.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue)에 15분간 반응시키고 다시 4%(w/v)의 iodoacetamide를 첨가한 equilibration buffer에 15분간 반응시킨 다음 IPG strip을 12% acrylamide gel의 상단부에 loading 시키고 빈 공간은 low melting agarose gel을 분주하였다. 15mA의 조건으로 5분 전개한 후 30mA로 변환시켜 bromophenol이 gel의 하단부에 도달할 때까지 전개하였다.

## 6) IEF 조건의 수정

수정된 IEF 조건은 전류가 IPG strip당 50 $\mu$ A가 넘지 않도록 하였으며, 20 $^{\circ}$ C의 온도 조건에서 7시간 rehydration 후 30V에서 7시간, 200V에서 2시간, 500V에서 1시간, 1,000V에서 1시간, 2,000V에서 2시간, 4,500V에서 10시간 통전하여 최종 56,000Vhs까지 IEF를 실시 하였다.

## 7) 도은염색

2차원 SDS-PAGE를 마친 gel에서 단백질 spot을 검출하기 위하여 도은염색을 하였다. Gel 을 고정액 (50% MeOH, 12% AcOH, 37% HCOH)으로 한시간 이상 고정한 다음 50% EtOH으로 30분간 2회 반복 세척하고, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-5HO 로 1분간 전처리 하였다. 전처리 한 Gel을 3차 증류수로 20초간 3번 세척하고 AgNO<sub>3</sub>와 37% HCOH로 30



분간 반응시킨 다음  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 와 37%  $\text{HCOH}$ 로 발색시켰다. 단백질 Spot을 확인 한 후 stop solution (50% MeOH, 12% AcOH)으로 발색을 중지하였다.

#### 8) 이미지분석

도은염색한 결과는 scanning 한 후 전용 이미지 분석 프로그램인 Phoretix 2D program (Ver. 5.01) 을 이용하여 분석하였다.

#### 9) In-gel digestion

도은염색처리한 gel의 단백질 spot에 대한 peptide 분석을 위해 다음과 같은 방법으로 in-gel digestion을 실시 하였다. 먼저 gel의 spot pattern과 immunoblot spot pattern을 상호 비교한 후 gel을 증류수로 10분간 2회 세척하고 micropipette tip을 이용하여 관심있는 단백질 spot에 대해 직경 1mm의 gel 조각을 채취해 내고 1.5ml의 micro centrifuge tube에 옮긴다. 채취된 gel 조각은 다시 증류수로 15분간 2회 그리고 50%(v/v) acetonitrile로 15분간 2번 세척해 준다. 세척후 여분의 액체는 모두 제거해 주고 gel 위에 acetonitril를 넣고 10분간 정치하여 탈수화과정을 거친다. 탈수화 과정 후 동결진공원심기를 5분간 이용하여 수분을 제거해 준다. 건조된 gel조각은 10mM DTT/100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  를 첨가하여 45분간 정치하여 peptide가 reduce되도록 처리한다. 이후 액체는 제거하고 55mM iodoacetamide/100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 를 30분간 암실에서 처리하여 peptide가 S-alkylate 되도록 처리한다. 그런다음 gel 조각은 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 로 10분간 세척하고 acetonitril로 10분간 탈수시키며 이러한 과정을 1번 더 거친후 동결진공원심기로 탈수시킨다. 탈수된 gel 조각은 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ,5mM  $\text{CaCl}_2$  그리고 12.5ng/ul의 trypsin 이 들어있는 digestion buffer로 45분간 얼음안에서 처리를 한다. gel이외의 여분의 액체는 제거한 후 trypsin이 없는 digestion buffer 10ul를 첨가한 후 37℃ 배양기안에서 16시간동안 반응시킨다. 배양기에서 반응이 끝난 gel 조각은 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 를 첨가한 후 15분간 정치시킨다. 이후 acetonitril을 tube 속에 넣고 15분간 더 정치를 시킨 후 peptide가 함유되어 있는 상층액을 수거한다. 한번 더 peptide를 용출시키기 위해 5% formic acid와 acetonitril이 1:1(v/v)로 희석된 용액을 넣어 상층액을 수거한다. 수거된 상층액은 모아서 동결진공원심기를 이용하여 건조시킨다.

#### 10) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS)를 위한 시료준비

trypsin으로 분절된 건조된 peptide를 pure water, acetonitril 그리고 trifluoroacetic acid가 93:5:2의 비율로 혼합된 액을 2ul를 이용해 녹이고 5분간 수조안에서 초음파파쇄 한 후 다음과 같은 Solution-phase nitrocellulose target 법을 이용하여 시료를 준비하였다. 요약하면, matrix제조를 위해  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinamic acid (HCCA; 40

mg/ml)와 Nitrocellulose (20 mg/ml)를 각각 acetone에 녹인 후 isopropanol과 함께 각각 2:1:1의 비율로 섞은 용액에 Internal calibrants인 des-Arg-Bradykinin과 angiotensin I을 혼합물에 함께 섞었다. 이렇게 만들어진 matrix 용액은 시료와 함께 1:1의 비율로 섞어 1ul 를 MALDI-TOF MS target plate에 점적한 후 건조시킨다. 건조시킨 시료는 5% formic acid 와 pure water를 이용하여 각각 세척후 건조한 다음 MALDI-TOF mass spectrometry 분석을 실시 하였다.

#### 11) MALDI-TOF MS 와 database 검색

건조된 시료는 337 nm N<sub>2</sub> UV laser가 장착된 Voyager-DE STR MALDI-TOF mass spectrometer (PerSeptive Bio-systems, Framingham, NA, USA)를 이용하여 분석하였다. Parent ion mass는 positive ion mode와 20 kV의 acceleration voltage, 76%의 grid voltage, 0.01%의 quide wire voltage 그리고 150ns의 delay time으로 조정된 reflectron/delayed extraction mode로 분석하였다. TOF analyzer의 pressure는 대략 2e-07 ton이었다. Mass spectra 는 128회의 laser pulses로 targeting된 ion signals의 총합을 계산하여 획득하였다 획득된 parent mass spectra는 미리 첨가해 둔 2개의 internal calibration인 des-Arg-Bradykinin peak (m/z 904.4681)와 angiotensin I peak (m/z 1296.6853)를 이용하여 mass spectra를 보정해 주고, Monoisotopic peptide masses는 800-2,500 Da의 mass 범위에서만 획득하고 database 분석을 하였다. 단백질의 peptide mass fingerprinting을 위해 search program인 MS-FIT (<http://prospedor.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)를 이용하여 분석하였다. 분석에 필요한 기준으로 protein sequence database로 NCBI database를 사용하였으며 molecular mass의 검색범위는 1 에서 100 kDa으로 정하였으며 모든 isoelectric points를 사용하였다 mass tolerance는 ± 50 ppm 그리고 한개의 missed cleavage site는 허용하였다. cysteines 은 carbamidomethylation 하였으며 예상되는 modifications은 oxidation of methionine 과 acrylamide-modified cysteine의 경우를 참조하였다.

#### 다. 결과

##### 1) *N. caninum* tachyzoite 항원 분석 결과

*Neospora caninum* tachyzoite의 항원을 검출하기 위하여 SDS-PAGE후 immuno blot을 수행한 결과 80 kDa에서 12kDa 범위에서 9개의 주항원 분획을 검출하였다 검출된 주항원 분획은 80, 65, 48, 43, 38, 29, 25, 21-19, 17-12 kDa 이었다.

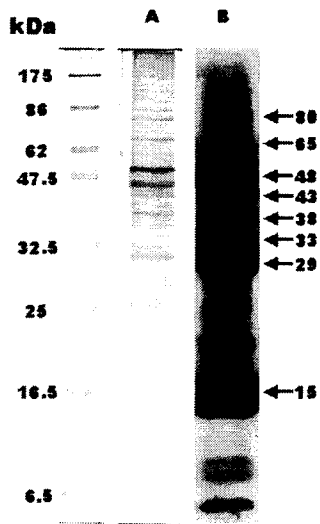


Figure 1. SDS-PAGE (A) and its immunoblotting (B) profile of *N. caninum* tachizoites. *N. caninum* was cultivated with Vero cells and then purified using Percoll gradient, and separated by SDS-PAGE, on the other hand, the separated proteins transferred to nitrocellulose paper were incubated with rabbit antiserum specific for *N. caninum*.

2) IEF 조건에 따른 2-DE 유형

*N. caninum* 2-DE map 작성을 위한 최적의 IEF 조건을 구하기 위하여 이차원 전기영동시 IEF의 조건을 45,750 Vhr 조건과 56,000 kVh 조건으로 수정하여 이차원 전기영동을 수행한 결과 56,000 Vhr 조건에서 더 많은 단백질 spot을 검출할 수 있었다.

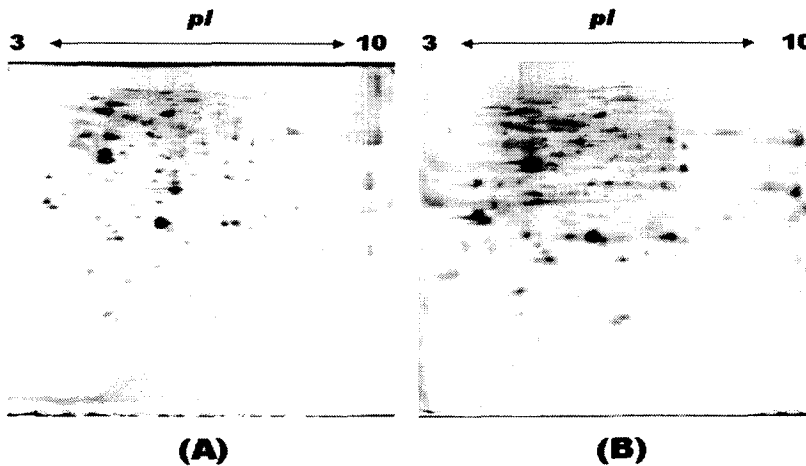


Figure 2. Comparison of different IEF conditions for *N. caninum* ; (A) A total of 144 spots were detected on 2-DE image by 45,750 Vhrs condition and (B) A total of 177 spots were detected on 2-DE image by 57,000 Vhrs condition. Gels were stained with silver nitrate, and spots were detected using Phoretix 2D software

3) 이차원 전기영동용 시료 제조 방법에 따른 2-DE 유형

*N. caninum* tachyzoite에 대한 2-DE map을 작성하기 위하여 3가지 방법으로 시료를 제조하여 이차원 전기영동을 실시한 결과 초음파 파쇄기를 이용하여 원충을 파쇄한 다음 7M urea/2M thio urea가 함유된 lysis buffer로 제조한 시료에서 가장 많은 단백질 spot을 검출할 수 있었다.

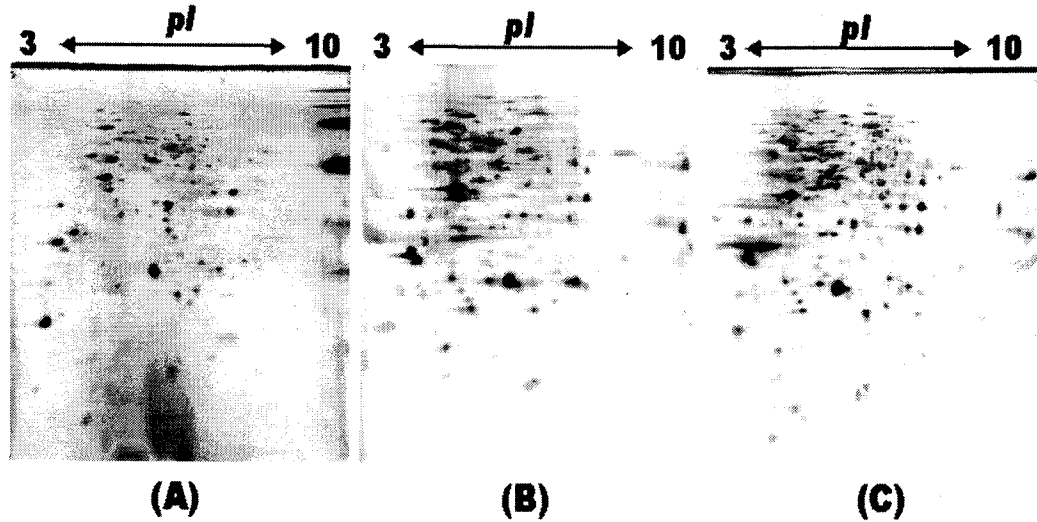


Figure 3. 2-DE image of *N. caninum* ; (A) A total of 172 spots were detected on 2-DE image by freezing and thawing and 9.5M lysis buffer. (B) A total of 194 spots were detected by sonication and 9.5M urea lysis buffer. (C) A total of 251 spots were detected by sonication and 7M urea/2M thiourea lysis buffer. Gels were stained with silver nitrate, and spots were detected using Phoretix 2D software

**Table 1. Comparison of 2-DE sample preparation methods on the basis of spot numbers observed on silver stained gels. The number of spots was computerized with Phoretix™ 2D software.**

sample preparation methods	Freezing & thawing		Sonication & 9.5M Urea		Sonication & 2M Thiourea plus 7M Urea	
	pH3-10	pH4-7	pH3-10	pH4-7	pH3-10	pH4-7
Spot No	172	243±2	194	256±4	251±7	332±3

4) *Neospora caninum*에 대한 antigen map의 작성

그림 3에서 보는 바와 같이 전반적인 antigen spot은 36 kDa 보다 높은 곳에 분포

하고 있었으며 (spot 57까지), 동일한 분자량을 가지더라도 각기 다른 pI 값을 나타내었다.

pI 4-7 사이의 항원분포의 특징을 살펴보면, spot 16-19(pI 5.2-5.3)는 65 kDa antigen spot으로 연쇄상을 나타내었다. Spot 27-35 역시 63-61 kDa 사이에, 그리고 pI 4.6-5.7에 걸쳐 연쇄상을 나타내는 특징을 가지고 있었다.

도염색한 겔에서 큰 spot으로 나타난 spot 61은 2-DE immuno blotting image 상에서 rabbit immune serum에 강한 항원반응을 보였으며, 역시 강한 항원 반응을 보인 spot은 16, 17, 19, 42, 54, 61, 64 이었다.

1-DE immuno blotting image(Fig. 1)에서 확인한 antigen bands와 동일한 분자량을 가지는 antigen spots은 spot 9(80 kDa), spot 15, 16, 17, 18, 19 (65 kDa), spot 37 (55 kDa), spot 43 (48 kDa), spot 48 (43 kDa), spot 50 (40 kDa), spot 53, 54 (38 kDa), spot 59 (33 kDa), spot 60, 61, 62 (29 kDa), spot 64 (15 kDa) 이었으며, spot 42 (51 kDa)는 2-DE immuno blotting image 에서는 강한 항원반응을 보였으나 1-DE immuno blotting image에서 확인 할 수 없었다.

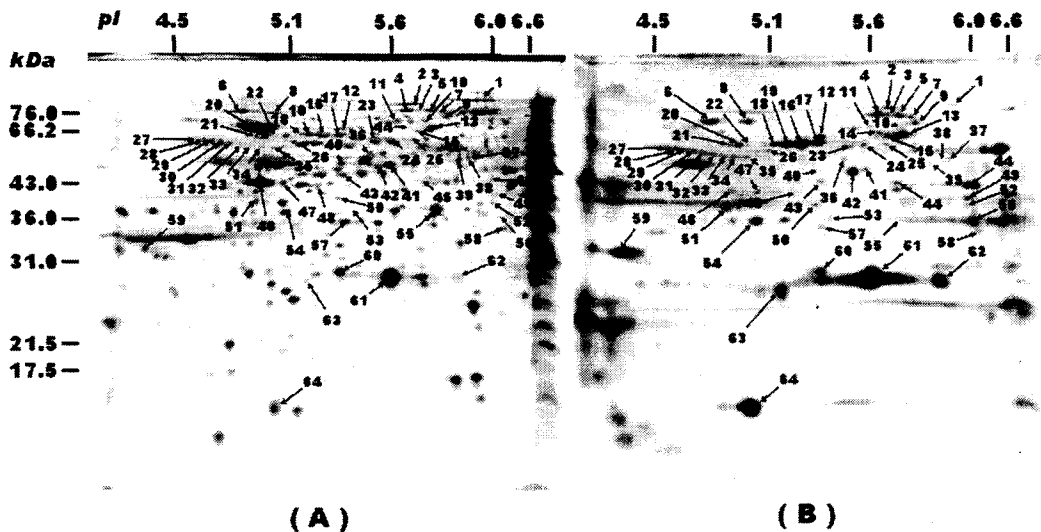


Figure. 4. 2-DE image (A) and its immunoblotting image (B) of *N. caninum*. A total of 335 spots were detected on 2-DE image but 64 of 335 were identified as antigenic spots on ECL image using rabbit antiserum specific for *N. caninum*. A number of large antigenic spots (61 and 64) were observed, at the same time, a series of antigenic spots having similar molecular weight (65 kDa) but different pI values (spot 16-19) were also found on the immunoblotting image.

5) *Neospora caninum* tachyzoite에 대한 단백질 동정

pH 4-7 IPG strips (13cm)를 이용해 분획한 이차원 전기영동 젤 중 100개의 단백질 spot에 대해서 peptide 분석을 위해 in-gel digestion한후 MALDI-TOF MS하여 peptide mass fingerprinting를 실시하였다. 총 39개의 단백질 spot중 21개의 서로다른 단백질 동정을 하였다. 단백질 spot 에 대한 gel상의 위치와 목록은 그림 5. 그리고 표 2.와 같다.

pH 3-10 IPG strips (13cm)를 이용해 pH 4-7 IPG strips (13cm)에는 없는 25개의 단백질 spot을 분석하여 4개의 spot을 동정하였고 이들에 대한 결과는 그림 6.과 표2.과 같다.

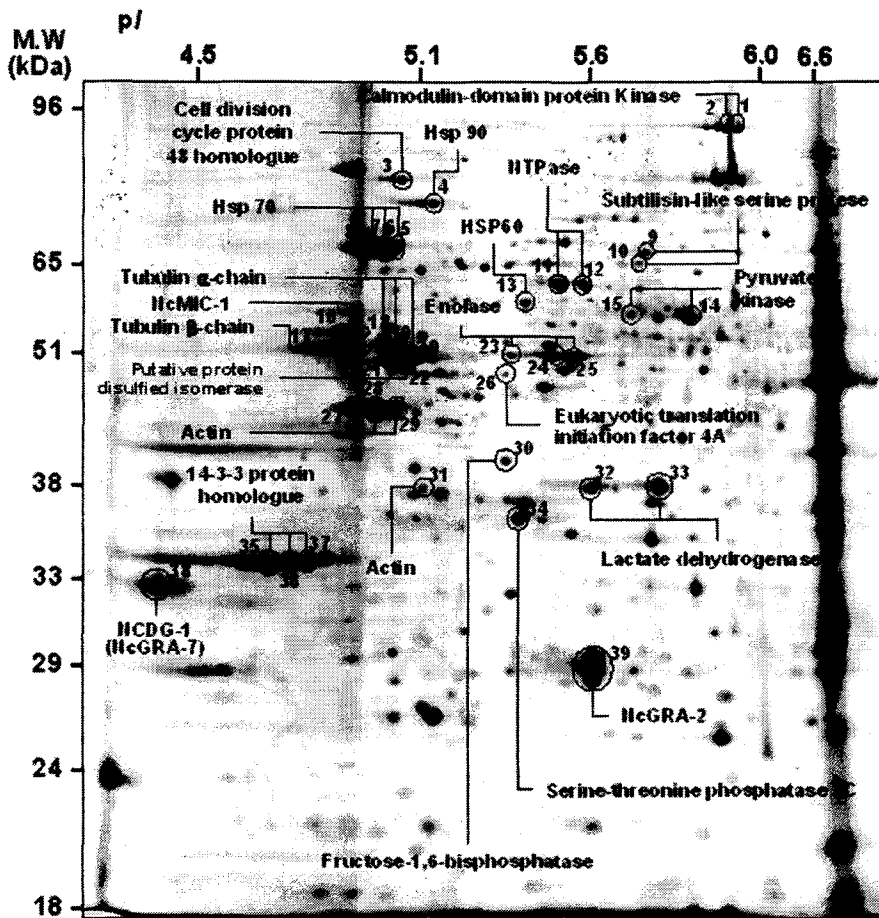


Figure .5. Identification of some proteins from *N. caninum* with MALDI-TOF MS after 2-DE using pH 4-7 IPG strips, gel were stained with CBB G-250

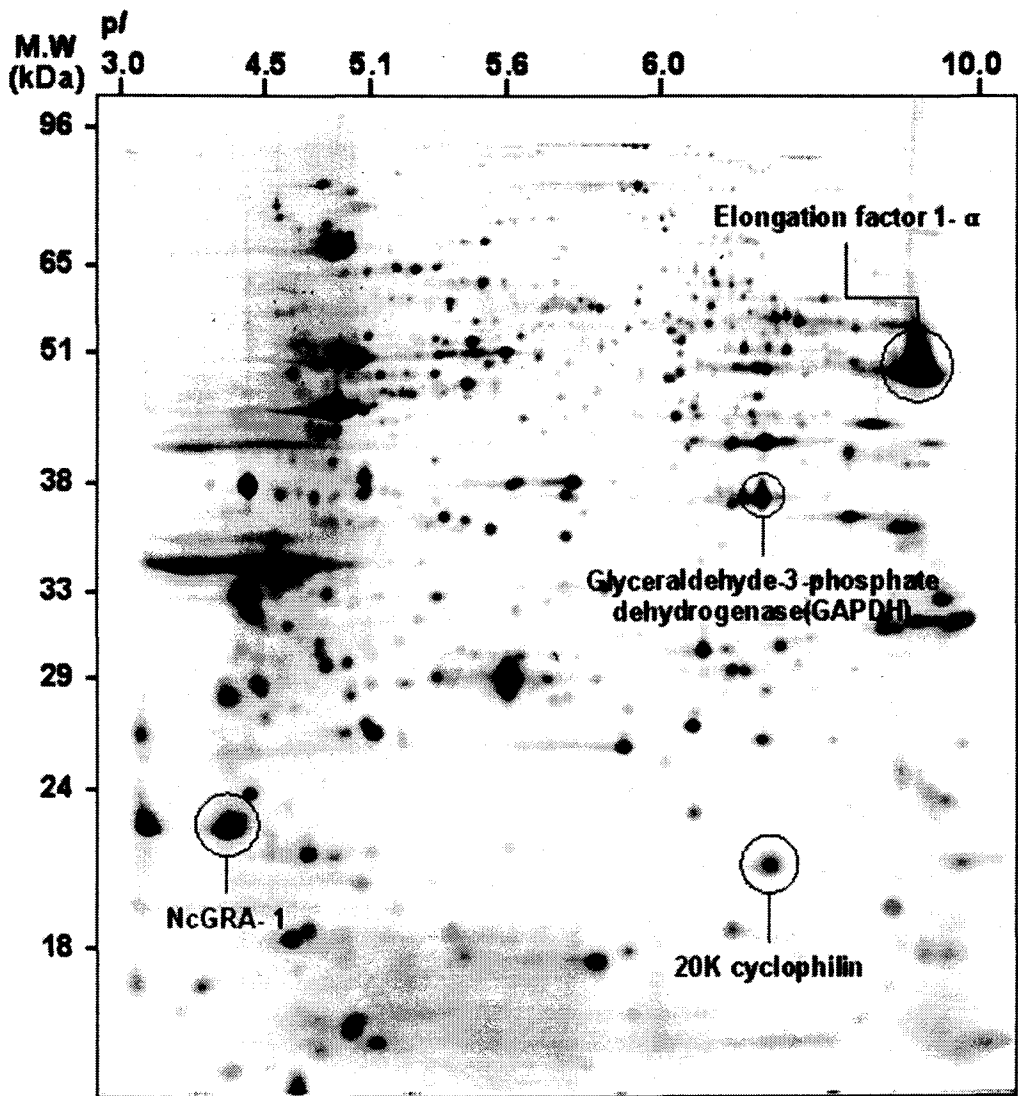


Figure. 6. Identification of some proteins from *N. caninum* with MALDI-TOF MS after 2-DE using pH 3-10 IPG strips, gel were stained with silver nitrate

Table 2. List of identified proteins of *N. caninum*

Spot No.	Protein name	No. of match	Seq. Cov. (%)	Mr(Da) /pI a)	Mr(Da) /pI	MOWSE Score	Species
1	Calmodulin-domain protein kinase 2	4	12	58301/6.2	96505/5.93	122	<i>T. gondii</i>
2	Calmodulin-domain protein kinase	5	10	55250/5.7	96354/5.90	33.7	<i>E. tenella</i> <sup>a)</sup>
3	Cell division cycle protein 48 homologue	13	17	90872/4.9	84594/5.02	3.944e+006	<i>P. yoelii</i> <sup>b)</sup>
4	Heat shock protein 90	7	12	89194/5.0	79015/5.12	88.9	<i>C. parvum</i> <sup>c)</sup>
5	Heat shock protein 70	5	10	70627/5.2	69366/5.01	320	<i>T. gondii</i>
6	Heat shock protein 70	13	22	70627/5.2	68612/4.97	6.520e+004	<i>T. gondii</i>
7	Heat shock protein 70	12	23	70627/5.2	67105/4.91	2.054e+005	<i>T. gondii</i>
8	Heat shock protein 70	11	23	70627/5.2	68009/4.88	1.371e+005	<i>T. gondii</i>
9	Subtilisin-like serin protease	4	7	93195/5.4	68009/5.74	152	<i>N. caninum</i>
10	Subtilisin-like serin protease	5	9	93195/5.4	65641/5.73	606	<i>N. caninum</i>
11	NTPase	13	23	68688/5.4	62636/5.51	1.169e+007	<i>N. caninum</i>
12	NTPase	13	20	68688/5.4	62496/5.58	1.208e+007	<i>N. caninum</i>
13	Heat shock protein 60	15	30	61014/5.8	60330/5.39	1.766e+006	<i>T. gondii</i>
14	Pyruvate kinase	9	19	57530/6.0	58723/5.84	9.919e+005	<i>T. gondii</i>
15	Pyruvate kinase	7	22	57530/6.0	58304/5.77	8.102e+004	<i>T. gondii</i>
16	NcMIC-1(microneme associated protein)	13	31	49159/4.8	55089/4.76	1.342e+007	<i>N. caninum</i>
17	Tubulin -chain	20	32	50060/4.7	53412/4.72	2.031e+010	<i>T. gondii</i>
18	Tubulin -chain	9	25	50114/5.0	53761/4.97	2.209e+004	<i>T. gondii</i>
19	Tubulin -chain	10	27	50114/5.0	52923/4.99	1.002e+006	<i>T. gondii</i>
20	Tubulin -chain	13	29	50114/5.0	52504/5.06	1.229e+006	<i>T. gondii</i>
21	Putative protein disulfide isomerase	6	17	52802/5.1	52224/5.00	772	<i>T. gondii</i>
22	Putative protein disulfide isomerase	9	27	52802/5.1	52224/5.04	5630	<i>T. gondii</i>
23	Enolase	7	20	48291/5.7	52504/5.36	8888	<i>T. gondii</i>
24	Enolase	7	24	48291/5.7	52154/5.49	5.611e+004	<i>T. gondii</i>
25	Enolase	7	19	48291/5.7	51945/5.59	4.096e+004	<i>T. gondii</i>
26	Eukaryotic translation inhibition factor 4A	6	17	46674/5.4	49988/5.4	704	<i>T. gondii</i>
27	Actin	4	13	41908/5.0	44398/4.88	135	<i>T. gondii</i>
28	Actin	9	33	41908/5.0	44328/4.94	7.122e+004	<i>T. gondii</i>
29	Actin	12	34	41908/5.0	44467/4.99	1.891e+007	<i>T. gondii</i>
30	Fructose-1,6-bisphosphatase	8	23	42398.6.1	43699/5.30	1.820e+004	<i>T. gondii</i>
31	Actin	9	29	41908/5.0	37759/5.09	1.250e+005	<i>T. gondii</i>
32	Lactate dehydrogenase	4	24	35549/6.0	37938/5.61	952	<i>T. gondii</i>
33	Lactate dehydrogenase	13	51	35549/6.0	38010/5.77	1.250e+005	<i>T. gondii</i>
34	Serine-threonine phosphatase	6	16	36817/5.4	35958/5.37	754	<i>T. gondii</i>
35	14-3-3 protein homologue	7	26	30698/4.7	33771/4.51	405	<i>T. gondii</i>
36	14-3-3 protein homologue	9	34	30650/4.8	33604/4.55	1318	<i>N. caninum</i>
37	14-3-3 protein homologue	11	32	30650/4.8	33688/4.59	5896	<i>N. caninum</i>
38	NCDG1(Antigen NC4.1)	6	33	22495/4.6	32583/4.36	1.055e+004	<i>N. caninum</i>
39	GRA2 protein	8	36	22418/8.6	28689/5.60	3.095e+004	<i>N. caninum</i>
40	GRA1	6	40	17797/4.6	23047/4.33	1.365e+004	<i>N. caninum</i>
41	ELONGATION FACTOR 1-ALPHA	6	14	48162/8.9	NT	1081	<i>C. parvum</i>
42	Glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase	7	26	36629/6.8	NT	2.255e+004	<i>T. gondii</i>
43	20k cyclophilin	8	20	38125/9.0	NT	955	<i>T. gondii</i>

a) *Eimeria tenella*; b) *plasmodium yoelii*; c) *Cryptosporidium parvum*



6) *T. gondii* tachyzoite에 대한 단백질 동정

pH 4-7 IPG strips (13cm)를 이용해 분획한 이차원 전기영동 젤 중 48개의 단백질 spot에 대해서 peptide 분석을 위해 in-gel digestion한 후 MALDI-TOF MS하여 peptide mass fingerprinting를 실시하였다. 총 8개의 서로 다른 단백질로 구성된 9개의 spot에 대해 동정을 하였다 (Fig. 6 과 Table 3).

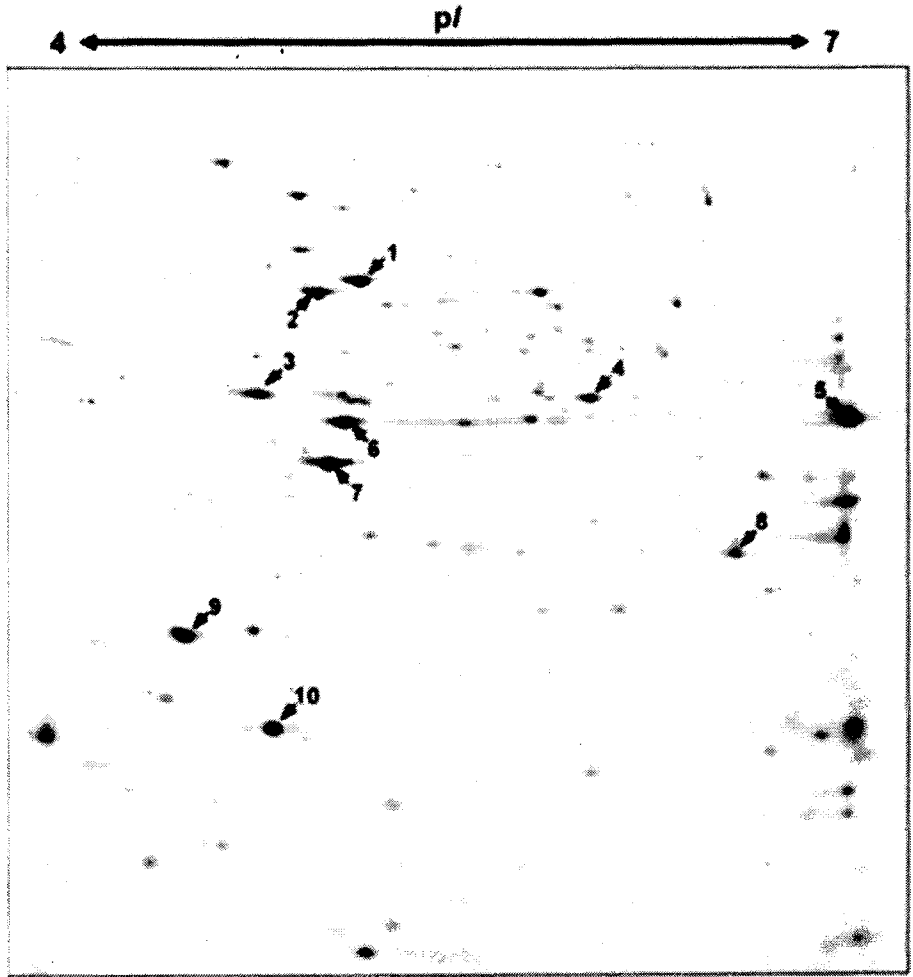


Figure 3. Identification of 9 protein spots equivalent to 8 proteins of *T. gondii* tachyzoites after 2-DE followed by PMF with MALDI-TOF MS.

Table 4. List of proteins identified on the 2-DE map of *T. gondii* tachyzoites after 2-DE and MALDI-TOF MS analysis

Protein name	Spot no.	No. of match peptides	Sequence coverage (%)	Theoretical Mr(Da)/pI	MOWSE score	Accession number	Species <sup>a)</sup>
Heat shock protein 70 precursor	1	10	21	73254/5.2	2.485e+003	6682359	<i>T. gondii</i>
Heat shock protein 70	2	12	25	72293/5.1	3.255e+006	3850197M	<i>T. gondii</i>
Tubulin beta chain <sup>b)</sup>	3	12	28	50060/4.7	7.228e+005	135499M	<i>T. gondii</i>
		11	27	49954/4.8	1.464e+005	21542248M	<i>E. tenella</i>
Enolase	4	12	32	48291/5.7	1.600e+007	12619316	<i>T. gondii</i>
Putative protein disulfide isomerase	6	10	24	52802/5.1	1.987e+004	14494995M	<i>T. gondii</i>
Actin	7	9	32	41908/5.0	5.966e+003	1703160M	<i>T. gondii</i>
Lactate dehydrogenase	8	9	46	35549/6.0	3.080e+005	1695772	<i>T. gondii</i>
		7	23	30650/4.8	822	3023191M	<i>N. caninum</i>
Dense granule protein 7 precursor (Protein GRA 7)	10	6	26	25858/5.1	1.208e+004	3023908M	<i>T. gondii</i>

a) *T. gondii*: *Toxoplasma gondii* *E. tenella*: *Eimeria tenella* *N. caninum*: *Neospora caninum*

b) The protein was identified as the same protein from different species database by PMF.

## 2. *N. caninum* 항원성 단백질 규명

### 가. 서론

네오스포라병의 진단과 예후를 알기 위한 방법은 효과적인 치료제나 예방약이 아직 개발되어 있지 않은 상황이므로(Dubey, 1999; Andrianarivo 등., 2000; Kritzner 등., 2002) 축산업같이 대단위 집단사육현장에서 보다 더 절실하게 요구되어오고 있다(Atkinson 등., 2000). 많은 종류의 혈청학적 진단법이 네오스포라병을 위해 소개되어 오고 있다(Bjorkman 과 Uggla, 1999; Atkinson 등., 2000; Jenkins 등., 2002). 이들 접근법은 단지 *N. caninum* 의 감염 여부만을 알려주는데 그쳐 소 *N. caninum* 감염의 정도, 감염의 기간에 대한 중요한 정보는 아직까지는 급성과 만성 감염의 정도만을 알려주는 IgG avidity ELISA를 제외하고는 없는 실정이다(Bjorkman 등., 1999; Schares 등., 2002; Bjorkman, 2003; Sager H, 2003).

현재까지 *N. caninum* 감염에 대한 숙주의 체액성 면역에 대한 연구는 전무한 상태이다. 그러나 *N. caninum*와 같은 침복포자충문의 *T. gondii* 에 대한 체액성 면역의 보고는 비교적 잘 되어있는 편이다. 일반적으로 감염이 일어나면 체내 항체매개 방어 기전은 IgG를 최고의 혈중 농도로 나타내게 한다(Tizard, 1996). 주로 질병 특이 IgG는 보통 감염후 1-2 weeks내에 나타나게 되고 이후 1-2달 내에 최고혈중농도를 나타내게 된 후 감소하게 되며 평생 혈중 내에 미량이나마 존재하게 된다(Thulliez 등., 1986; Verhofstede 등., 1988). IgM은 IgG와 비교하여 감염후 좀 일찍 혈중에 나타나고 이후 곧 사라지는게 보통이다(Montoya, 2002). 급성 *T. gondii* 감염시에는 특이 IgM band가 초기 급성감염의 중요 marker 가 될 수 있다고 알려져 있다(Decoster 등., 1988). 그러나 몇몇 증례에서는 양성 *T. gondii* 특이 IgM 역가가 만성감염기에도 관찰 되는 보고가 있기도 한다(Liesenfeld 등., 1997). 예를 들어 IgM 이 최고 급성감염 후 12년 까지 지속적으로 관찰 된 경우도 있다(Bobic 등., 1991). IgA는 *T. gondii* 의 성인의 급성감염과 유아의 체대감염(Stepick-Biek 등., 1990; Takahashi 과 Rossi, 1994)시 잘 관찰되며 감염후 6개월 이상 존재한다고 한다(Francis 과 Joynson, 1993; Gorgievski-Hrisoho 등., 1996). 혈중 IgE의 검출은 성인의 초기감염시기, 체대감염된 유아 그리고 선천적인 특수포자충성 만성각막염에 걸린 어린이로부터 관찰된다(Pinon 등., 1990; Wong 등., 1993). 아울러 IgE는 진행성 cervical adenopathies 환자에게서도 관찰된다. 그럼에도 불구하고 IgE의 IgA 와 IgM과 비교한 짧은 반감기로 인하여 보다 정확한 감염시간의 indicator로 간주된다(Villena 등., 1999). 위와같은 선행 연구자료들은 면역글로불린 class별 검사는 진단의 특이성을 향상시키는 물론이고 네오스포라병의 병인론을 알아보는 데도 많은 도움이 있음을 시사해 주고 있다(Ashburn 등., 1998).

*N. caninum*의 항원성 단백질에 대한 연구는 몇몇 연구자들에 의해서 보고되어오고 있다. 그러나 이들 결과는 1-DE immunoblot profile에 대한 보고 뿐이거나(Barta 과

Dubey, 1992; Bjerks 등., 1994; Harkins D, 등., 1998) 설령 2-DE를 사용하더라도 반추수의 항혈청을 사용하지는 않았었다 (Heckerth 등., 2000 Lee 등., 2003). 나아가 지금까지는 소 *N. caninum* 항혈청을 이용한 각 면역글로불린 class별 연구는 아직 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 proteomics를 이용하여 소 IgM, IgE, IgA 그리고 IgG에 인식되어지는 *N. caninum* 항원성 단백질을 규명하고 이들의 소 면역체계에 의한 면역 반응의 정도를 살펴보고야 총괄적인 소 체내에서의 *N. caninum*에 대한 체액성 면역방어기전을 알아보고자 하였다.

## 나. 재료 및 방법

### 1) 공시 원충주

공시 원충주는 KBA2-strain을 이용하여 조직배양, tachyzoite 순수 분리 그리고 conventional SDS-PAGE (1-DE)와 2-DE를 위한 sample 제조는 앞서 설명한 부분과 동일하게 수행되어졌다.

### 2) 항혈청 생산

Holstein종 유우 1두를 이용하였으며 원충은  $1 \times 10^8$  개의 *N. caninum* tachyzoite를 정맥주사 하여 인공감염시켰으며 감염 13주째에 혈청을 채취하여 실험에 공시 하였다. 가검혈청의 *N. caninum* 역가는 간접형광항체법 (IFAT)을 이용하여 수행하였다. 채취된 혈청은 그 역가를 측정한 다음 사용 전까지  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

### 3) 1-DE 및 2-DE

1-DE는 10% SDS-PAGE gel을 이용하였고, 2-DE는 pH 4-7 IPG strip (Immobiline DryStrip,  $0.5 \times 3 \times 130\text{mm}$ ; Amersham Bioscience)을 이용하여 앞서 설명한 방식대로 수행되어 졌다.

### 3) Immunoblot 분석

Immunoblot은 앞서 설명한 방식에 약간의 변화를 주어 실시하였다. 인공감염시킨 소 *N. caninum* 항혈청을 반응시킨 다음 각각의 소 면역글로불린별로 특이성을 지닌 HRP가 conjugation된 anti-bovine IgG, IgM, 과 IgA (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA,)를 1:2,000으로 희석시켜 1시간 동안 반응 시켰다. IgE specific 항원성 단백질을 확인하기 위해서는 1:40 희석된 mouse anti-bovine IgE monoclonal antibody (Thatcher 와 Gershwin, 1988)를 이용해서 1시간 반응시킨 후 TBS-T buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% v/v Tween 20, pH 7.4)를 이용해 3회 세척한 후 다시 1:2,000 희석한 HRP가 conjugation된 goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 이용해 1시간 동안 re-incubation 하였다.

Probe된 PVDF membrane은 ECL™ kit (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)을 이용해 visualization하였다.

#### 4) Image 분석

염색된 이차원전기영동 gel과 immunoblotted spot들은 Agfa Arcus 1200™ image scanner (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgium)를 이용해 디지털화 하였고 측정된 image는 Phoretix™ 2D software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)를 이용해서 분석하였다. Gel의 spot 위치를 분석하기 위해 2D SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용해서 각각의 spot의 Mr 와 pI를 측정하였다.

#### 5) 질량분석기를 이용한 단백질 동정

관심 있는 단백질 spot들은 염색된 gel로 부터 추출되어 진 후 50% acetonitrile로 세척 한 후 건조하고 다시 10 mM DTT/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해서 실온에서 가수화 시켰다. Gel 조각들은 다시 실온의 암실에서 55 mM iodoacetamide/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해 반응 시킨 후 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>로 세척하고 다시 건조 시켰다. 건조된 gel 조각들은 다시 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해 재수화 한 다음 5 mM CaCl<sub>2</sub> 와 12.5 ng/ul의 sequence-grade의 porcine trypsin (Promega, Madison, USA)을 첨가하여 ice속에서 45분간 반응 시켰다. 반응 후 여분의 액체는 제거한 후에 37°C에서 밤새 반응 시켰다. 반응 후 5% formic acid 와 acetonitrile이 1:1 (v/v)로 희석된 용액을 넣고 반응을 시킨 후 상층액은 회수하고 이는 다시 vacuum centrifuge를 이용하여 건조 시켰다.

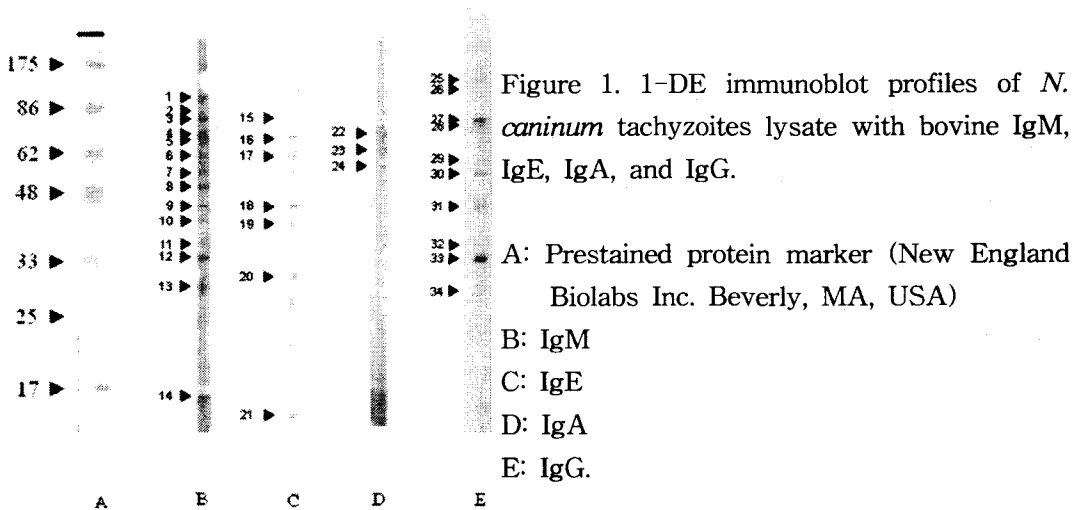
Tryptic digest된 건조된 peptide들은 증류수, acetonitrile 그리고 trifluoroacetic acid 가 각각 93:5:2로 희석된 용액 2 μl를 이용해 재부유 시키고 MALDI-TOF mass spectrometry를 위한 target preparation을 위해 solution-phase nitrocellulose 방법을 적용하였다. α-cyano-4-hydroxycinamic acid (40 mg/ml) 와 nitrocellulose (20 mg/ml)를 각각 acetone에 녹인 것을 isopropanol과 섞었다. 이 용액에 internal standard를 위해 des-Arg-Bradykinin (monoisotopic mass, 904.4681) 과 angiotensin I (1296.6853)을 섞어 trypsin digestion된 peptide에 넣어 이 중 용액 1 μl을 target plate의 circle에 점적 한 후 건조시켰다. Target에 있는 sample spot들은 Voyager-DE STR MALDI-TOF MS (PerSeptive Bio-systems, Framingham, USA) 기기를 이용해 peptide mass를 측정하였다. 측정된 data는 MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>) 프로그램과 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 프로그램을 이용해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 protein sequence database를 참조하여 datamining하였다. 이때 mass tolerance는 ±50 ppm으로 하였고 한개 까지의 missed cleavage site는 인정하였다. 아울러 carbamidomethylation of cysteines 과 oxidation of methionine을 protein modification

의 인자로써 감안 하였다.

다. 결과

1) 1-DE immunoblot 결과

*N. caninum* tachyzoites lysate를 이용한 1-DE immunoblot 결과 총 14, 10, 3 그리고 7개의 항원성 band들을 각각 bovine IgM, IgE, IgA 그리고 IgG immunoblot profile별로 관찰 할 수 있었다. (Fig. 1). 79 와 46 kDa band들은 bovine IgM (band 3, 9), IgE (band 15, 18) 그리고 IgG (band 27, 31) profile에서 공통적으로 관찰 할 수 있었다. 69, 61 그리고 41 kDa band들은 bovine IgM (band 5, 6, 10) 과 IgE (band 16, 17, 19) profile에서 동시에 관찰 되었으며, 55, 37, 33 그리고 29 kDa band 들을 bovine IgM (band 7, 11, 12, 13) 및 IgG (band 30, 32, 33, 34) profile에서 동시에 관찰 되었다. 72 kDa band는 IgM (band 4) 과 IgA (band 22) profile에서 동시에 관찰 되었다. 15 (band 14), 49 (band 8), 82 (band 2) 그리고 103 kDa (band 1)와 같은 4개의 band들은 오직 bovine IgM 만 그리고 12 (band 21) 및 30 kDa (band 20) 는 오직 IgE profile에서만 발견 할 수 있었다. 아울러, 57 (band 24) 과 63 kDa (band 23) band는 유일하게 IgA profile에서만 그리고 60 (band 29), 75 (band 28), 123 (band 26) 및 144 kDa (band 25) band는 IgG profile에서만 관찰 할 수 있었다.



2) 2-DE immunoblot 결과

Bovine IgM을 이용해 probe된 2-DE *N. caninum* immunoblot profile에서는 (Fig. 2), 총 132개의 spot들을 항원성 spot으로 관찰 할 수 있었으며 이들 중 26 spot들로 구성된 16개의 서로 다른 단백질을 MALDI-TOF MS analysis를 이용해 동정 할 수 있었다. 동정된 단백질은 HSP 70 (spot A; 69.2 kDa / pI 4.87, 69.2 kDa / pI 4.94, 69.1 kDa / pI 4.97), NTPase (spot B; 64.1 kDa / pI 5.51, 63.8 kDa / pI 5.62), HSP 60 (spot C;

61.5 kDa / pI 5.35), Pyruvate kinase (spot D; 61.3 kDa / pI 6.09, 61.2 kDa / pI 5.92), Tubulin  $\alpha$ -chain (spot E; 56.2 kDa / pI 5.04), Tubulin  $\beta$ -chain (spot F; 54.3 kDa / pI 4.75), Putative protein disulfide isomerase (spot G; 53.7 kDa / pI 4.97, 53.7 kDa / pI 4.94), Enolase (spot H; 53.7 kDa / pI 5.61, 51.8 kDa / pI 5.53), Actin (spot J; 45.9 kDa / pI 4.96, 45.7 kDa / pI 4.92, 45.7 kDa / pI 4.89), Fructose-1,6-bisphosphatase (spot K; 41.47 kDa / pI 5.06), Putative ribosomal protein S2 (spot L; 41.27 kDa / pI 4.89), Lactate dehydrogenase (spot N; 40.4 kDa / pI 5.84), Serine-threonine phosphatase (spot O; 37.9 kDa / pI 5.31), 14-3-3 protein homologue (spot P; 35.3 kDa / pI 4.63), NCDG-1 (spot Q; 33.4 kDa / pI 4.36) 그리고 GRA2 protein (spot R; 26.8 kDa / pI 6.04) 이었다. 이들 동정된 단백질들 중 HSP70, HSP60, Enolase, Actin 그리고 Putative ribosomal protein S2 은 bovine IgM과 아주 강하게 반응함을 알 수 있었다.

Bovine IgE 에서는 (Fig. 3), 총 22 spot들로 구성된 14개의 단백질을 총 84개의 spot 들로부터 검출 할 수 있었다. 검출된 단백질들은 HSP70 (spot A; 69.3 kDa / pI 4.87, 69.1 kDa / pI 4.90, 68.9 kDa / pI 4.96, 68.2 kDa / pI 5.07), NTPase (spot B; 64.4 kDa / pI 5.60), HSP60 (spot C; 61.5 kDa / pI 5.40), Pyruvate kinase (spot D; 61.1 kDa / pI 5.94, 60.3 kDa / pI 5.77), Tubulin  $\beta$ -chain (spot F; 54.5 kDa / pI 4.74), Putative protein disulfide isomerase (spot G; 53.5 kDa / pI 5.04), Enolase (spot H; 53.3 kDa / pI 5.55, 52.9 kDa / pI 5.67), Actin (spot J; 45.7 kDa / pI 5.01, 45.7 kDa / pI 4.94, 45.7 kDa / pI 4.9), Actin (spot M; 40.7 kDa / pI 5.04), Lactate dehydrogenase (spot N; 39.1 kDa / pI 5.87), Serine-threonine phosphatase (spot O; 36.7 kDa / pI 5.35), 14-3-3 protein homologue (spot P; 35.1 kDa / pI 4.69), NCDG-1 (spot Q; NCDG-1; 33.2 kDa / pI 4.4, 33.1 kDa / pI 4.35) 그리고 GRA2 protein (spot R; 26.7 kDa / pI 6.03)이었다. 이들 항원성 단백질들 중 HSP70, NTPase, HSP60, Enolase 그리고 Actin은 IgE profile에서 아주 진하게 발색 되었다.

Bovine IgG를 이용한 immunoblot profile에서는 (Fig. 5), 총 40개의 spot을 관찰 할 수 있었는데 이들 중 11 spot으로 구성된 6개의 서로 다른 단백질을 동정할 수 있었다. 이들은 HSP70 (spot A; 69.2 kDa / pI 4.86, 69.1 kDa / pI 4.9), Pyruvate kinase (spot D; 61.3 kDa / pI 6.07), Tubulin  $\alpha$ -chain (spot E 56.1 kDa / pI 4.97), Actin (spot J; 45.6 kDa / pI 4.93, 45.5 kDa / pI 4.9, 45.5 kDa / pI 4.84), Putative ribosomal protein S2 (spot L; 40.9 kDa / pI 4.89) 그리고 NCDG-1 (spot Q; 33.1 kDa / pI 4.4, 32.9 kDa / pI 4.35, 32.9 kDa / pI 4.3)이었다. IgG profile에서는 Actin 과 NCDG-1이 강하게 인식되어 졌다.

Bovine IgA의 경우에는 (Fig. 4), 4개의 spot이 검출 되었고 이들 중 단지 HSP70( spot A 68.9 kDa / pI 4.95)만이 그 이름을 동정 할 수 있었다.

동정된 단백질 spot들 중, HSP70 (spot A) 은 bovine IgM, IgE, IgA 그리고 IgG와 공

통으로 반응하는 항원성 단백질로 밝혀졌고, Pyruvate kinase (spot D), Actin (spot J) 그리고 NCDG-1 (spot Q)은 bovine IgM, IgE 그리고 IgG를 이용한 2-DE immunoblot profile에서 공통적으로 관찰 할 수 있었다. NTPase (spot B), HSP60 (spot C), Tubulin  $\beta$ -chain (spot F), Putative protein disulfide isomerase (spot G), Enolase (spot H), Lactate dehydrogenase (spot N), Serine-threonine phosphatase (spot O), 14-3-3 protein homologue (spot P) 그리고 GRA2 protein (spot R)은 주로 bovine IgM 과 IgE 에서 동시에 인식되어지며, Tubulin  $\alpha$ -chain (spot E) 과 Putative ribosomal protein S2 (spot L) 은 bovine IgM 및 IgG에서 동시에 관찰 할 수 있었다. 그러나 Actin (spot M) 과 Fructose-1,6-bisphosphatase (spot K) 은 bovine IgE 와 IgM에서만 각각 관찰 할 수 있었다. 이들 이름이 동정된 공통 항원성 spot들은 각각의 면역글로블린 class에 따라 정리하여 Table 1.에 수록하였다.

소 면역글로블린별로 공통점을 찾을 수는 있지만 그 이름이 동정되지 못한 spot 47개 중 46개의 spot은 모두 bovine IgM profile에서 찾을 수 있었다. 이들 중 2개의 spot은 bovine IgM, IgE 그리고 IgA 또는 IgM, IgE 그리고 IgG profile에서 같은 location(pI 와 MW)을 가지고 있었다. 19개, 22개 그리고 1개의 spot이 bovine IgM 과 IgE; IgM 과 IgG; 그리고 IgM 과 IgA 사이의 공통 항원으로 생각되어 진다. IgM profile에서는 spot No. 4, 6, 26, 28, 29, 34, 36, 40-42, 45 그리고 46 같은 몇몇 spot들은 강하게 인식됨을 알 수 있었다. 아울러 spot No. 36 은 IgE에서 그리고 spot No. 28 과 46은 IgG profile에서 강하게 발현 되었다. 각각의 공통 항원성 spot들에 대한 pI 와 MW는 Table 2에 정리하였다.





Figure 2. 2-DE immunoblot profile of *N. caninum* tachyzoites lysate with bovine IgM. A total of 132 antigenic spots were detected and 26 spots corresponding to 16 different proteins were successfully identified with their respective protein name by MALDI-TOF MS analysis. For instance, HSP70 (A), NTPase (B), HSP60 (C), Pyruvate kinase (D), Tubulin  $\alpha$ -chain (E), Tubulin  $\beta$ -chain (F), Putative protein disulfide isomerase (G), Enolase (H), Actin (J), Fructose-1,6-bisphosphatase (K), Putative ribosomal protein S2 (L), Lactate dehydrogenase (N), Serine-threonine phosphatase (O), 14-3-3 protein homologue (P), NCDG-1 (Q), and GRA2 protein (R).

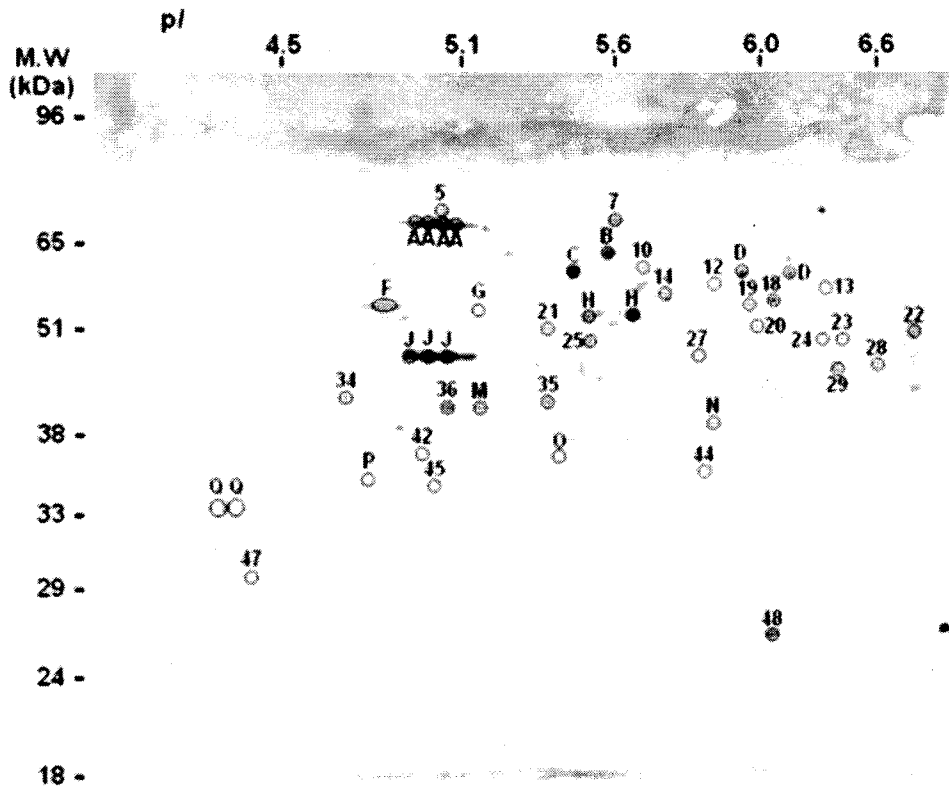


Figure 3. 2-DE immunoblot profile of *N. caninum* tachyzoites lysate with bovine IgE. Twenty two spots corresponding to 14 different proteins out of 84 detected were identified from database search after PMF, such as HSP70 (A), NTPase (B), HSP60 (C), Pyruvate kinase (D), Tubulin  $\beta$ -chain (F), Putative protein disulfide isomerase (G), Enolase (H), Actin (J and M), Lactate dehydrogenase (N), Serine-threonine phosphatase (O), 14-3-3 protein homologue (P), NCDG-1 (Q), and GRA2 protein (R).

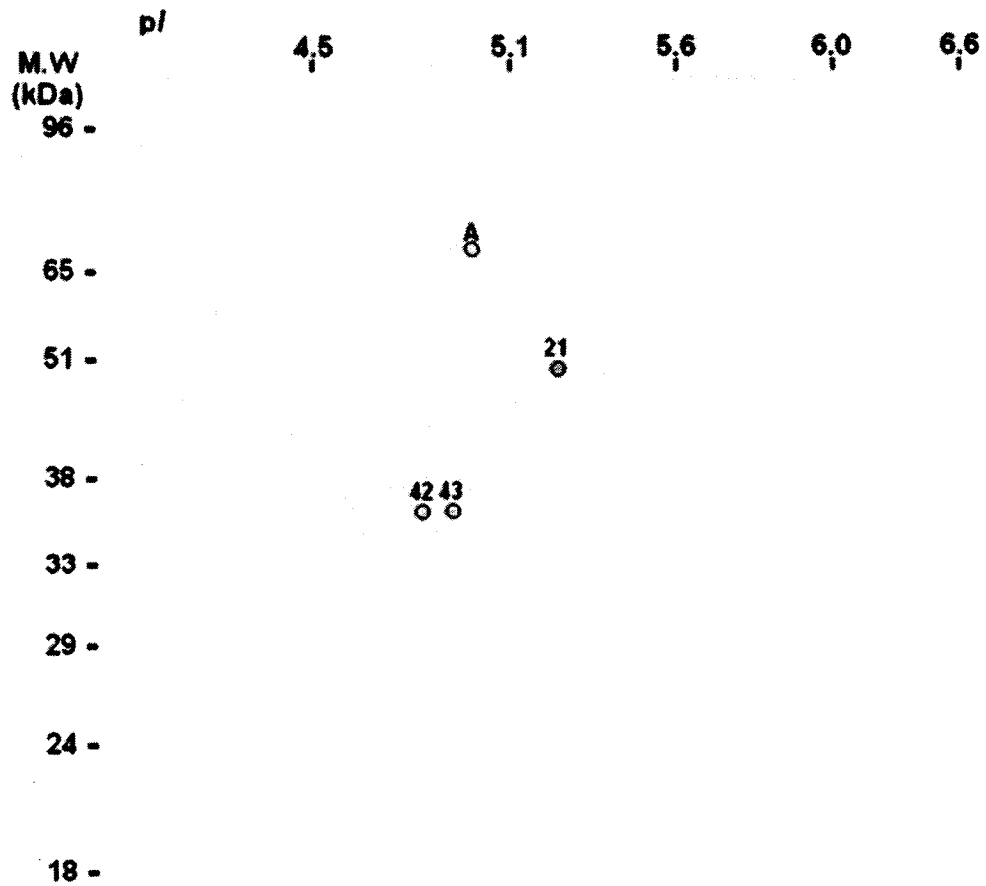


Figure 4. 2-DE immunoblot profile of *N. caninum* tachyzoites lysate with bovine IgA. A total of 4 antigenic spots were detected and only spot A, identified as HSP70 was recognized by PMF analysis.

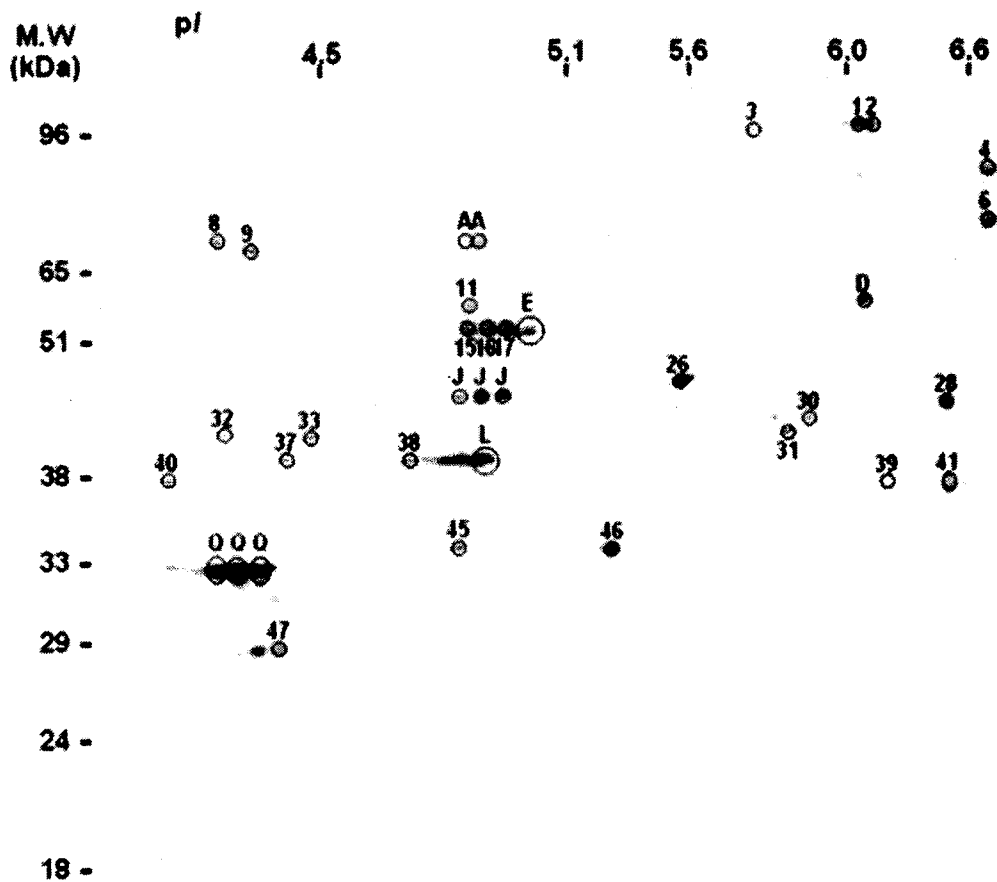


Figure 5. 2-DE immunoblot profile of *N. caninum* tachyzoites lysate with bovine IgG. Eleven spots corresponding to 6 different proteins out of 40 detected were identified. These were HSP70 (A), Pyruvate kinase (D), Tubulin  $\alpha$ -chain (E), Actin (J), Putative ribosomal protein S2 (L), and NCDG-1 (Q).

Table 1. Antigenic proteins identified on 2-DE *N. caninum* immunoblot profiles against bovine IgM, IgE, IgA, and IgG

Protein name	Spot	IgM	IgE	IgA	IgG
HSP70	A	★	★	○	○
NTPase	B	○	★		
HSP60	C	★	★		
Pyruvate kinase	D	○	★		○
Tubulin $\alpha$ -chain	E	○			○
Tubulin $\beta$ -chain	F	○	○		
Putative protein disulfide isomerase	G	○	○		
Enolase	H	★	★		
Actin	J	★	★		★
Fructose-1,6-bisphosphatase	K	○			
Putative ribosomal protein S2	L	★			○
Actin	M		○		
Lactate dehydrogenase	N	○	○		
Serine-threonine phosphatase	O	○	○		
14-3-3 protein homologue	P	○	○		
NCDG-1	Q	○	○		★
GRA2 protein	R	○			

○: detected but weakly reacted antigenic protein

★: detected and strongly reacted antigenic protein.

Table 2. Molecular weights and isoelectric points of common antigenic spots unidentified on Fig. 2, 3, 4, and 5

Fig. 2			Fig. 3			Fig. 4			Fig. 5					
Spot No.	pI <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup>	Spot No.	pI	MW	Spot No.	pI	MW	Spot No.	pI	MW	Spot No.	pI	MW
1	6.08	79.09	26	5.6	48.28	5	4.93	71.37	21	5.29	49.99	1	6.05	79
2	6.1	78.97	27	5.8	46.78	7	5.63	69.61	42	4.83	37.51	2	6.09	79.03
3	5.79	78.58	28	6.51	45.17	10	5.7	62.07	43	4.9	37.48	3	5.7	78.51
4	6.73	75.19	29	6.32	44.71	12	5.87	58.8				4	6.73	75.05
5	4.84	71.35	30	5.92	43.8	13	6.31	58.2				6	6.72	70.61
6	6.72	70.64	31	5.88	43.09	13	6.28	57.2				8	4.29	68.8
7	5.53	69.18	32	4.2	42.86	14	5.75	57				9	4.37	67.3
8	4.17	69.09	33	4.5	42.66	18	6.04	55.53				11	4.88	60.3
9	4.29	67.87	34	4.65	42.28	19	5.95	54.67				15	4.87	56.7
10	5.64	62.13	35	5.26	42.08	20	5.98	50.83				16	4.91	56.4
11	4.91	60.3	36	4.91	41.14	21	5.31	50.55				17	4.94	56.3
12	5.85	59.8	37	4.41	41.04	22	6.8	49.9				26	5.56	47.4
13	6.27	58.54	38	4.75	41.01	23	6.41	48.52				28	6.5	45.04
14	5.72	57.04	39	6.18	39.47	24	6.3	48.3				30	5.89	43.91
15	4.9	56.66	40	4.01	39.47	25	5.49	48.36				31	5.82	42.94
16	4.93	56.47	41	6.53	39.24	27	5.84	45.78				32	4.31	42.78
17	4.97	56.35	42	4.86	37.72	28	6.6	44.83				33	4.49	42.55
18	6.06	56.22	43	4.92	37.77	29	6.37	44.34				37	4.44	40.94

Table 2. Continued

Fig. 2			Fig. 3			Fig. 4			Fig. 5					
Spot No.	pI	MW	Spot No.	pI	MW	Spot No.	pI	MW	Spot No.	pI	MW	Spot No.	pI	MW
19	6	54.71	44	5.8	36.7	34	4.64	41.67	38	4.7	40.91			
20	5.99	52.11	45	4.89	34.82	35	5.31	41.24	39	6.16	39.4			
21	5.26	51.01	46	5.34	34.72	36	4.94	40.72	40	4.17	39.35			
22	6.74	50.25				42	4.88	36.92	41	6.51	39.17			
23	6.36	49.73				44	5.85	35.69	45	4.85	34.64			
24	6.26	49.44				45	4.91	34.72	46	5.24	34.56			
25	5.43	49.33				47	4.42	29.6	47	4.43	28.34			

a: Isoelectric point (pI)

b: Molecular weight (MW: kDa).

### 3. *Neospora caninum* 과 *Toxoplasma gondii* tachyzoite의 proteome 비교

#### 가. 서론

*Neospora caninum* (*N. caninum*)과 *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)은 편성 세포내 기생성 침복포자충문의 기생충이다. *N. caninum*은 1980년대 중반까지 *T. gondii* 로 오인되어 알려지다가 최근에 tachyzoites, bradyzoites 그리고 tissue cysts의 전자현미경적 차이에 의해 *N. caninum*가 *T. gondii* 로부터 분리되어 인식되기 시작한 원충이다. 이들은 형태학적 차이는 rhoptries, micronemes, dense granules 그리고 micropore 들에 대한 개수, 발현양상 그리고 위치가 서로 다르다. 특히 tissue cyst의 형태는 서로 간에 확연히 차이 나는 점이다 (Bjerks 와 Presthus, 1988; Dubey 등, 1988; Lindsay 등, 1993; Speer 등, 1999).

Small subunit ribosomal RNA (18S rRNA) sequence를 기초로 한 분자생물학적 분류에서는 *N. caninum*가 침복포자충문안에서 *T. gondii*와 사촌지간이라고 알려져 있다 (Ellis 등, 1994). Nuclear small subunit ribosomal RNA비교분석에서는 (Marsh 등, 1995), internal transcribed spacer 1 (Holmdahl 과 Mattsson, 1996) 과 large subunit ribosomal RNA gene (Mugridge 등, 1999)역시 *N. caninum* 과 *T. gondii* 사이에는 일치하진 않지만 아주 근접한 sequencing 결과를 나타낸다. 병원체의 단백질 표현형을 분석하는 일은 생물학적 진행과정 즉, 발달, 분화 그리고 병원성에 대한 비교학적인 이해를 가지는데 많은 도움이 된다. Proteomics는 단백질 수준에서의 gene expression의 총괄적인 이해를 제공하여 준다 (Sperling, 2001). 획기적인 image분석기술과 생물학적 질량분석법이 접목된 이차원전기영동법(2-DE)은 cells, tissues 또는 여타 생물학적 sample들의 복합적인 단백질 구조물을 손쉽게 분석하게 해준다 (Pennington 등, 1997; Gorg 등, 2000). 이러한 proteomics기법은 *T. gondii*의 proteome 분석하고 (Cohen 등, 2002) 2-DE에 특이 항혈청을 이용한 immunoblotting assay를 접목한 방식으로 *T. gondii* 의 항원성 단백질을 연구하는데도 사용되어졌다 (Geiler 등, 1999; Dlugonska 등, 2001). 예전에도 *N. caninum* 과 *T. gondii*에 대한 2-DE antigen profile의 비교는 있었다. 그러나 항원성 spot 에 대한 단백질 동정은 수행되지 못했다

본 연구에서는 *T. gondii*와 *N. caninum*의 항원성 단백질의 비교를 위해 한국과 일본유래 *N. caninum* strain (KBA-2 와 JPA1)과 *T. gondii* RH strain을 이용하여 proteomics를 이용해 분석하고자 한다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 시약



Percoll™, urea, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), dithiothreitol (DTT), immobilized pH gradient (IPG) strip (Immobiline DryStrip, pH 4-7 linear, 13 cm), IPG-buffer (pH 3-10 와 pH 4-7) 그리고 ECL™ detection reagent 는 Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden)로부터 구입하였고, Aceton, acetonitril, 2-propanol, trifluoroacetic acid (TFA) 그리고 Coomassie brilliant blue G-250 는 Merck(Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 그 외의 모든 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

## 2) 공시 원충주

Kim등 (2001)의 방법에 따라 *N. caninum* KBA-2주 와 JPA1주 그리고 *T. gondii* RH주를 Vero cell monolayer (CRL6318, ATCC, Rockville, USA)를 이용해 조직배양 하였다.

*N. caninum* 과 *T. gondii* tachyzoite들은 감염된 Vero cell monolayers를 scraper를 이용해 긁은 후, 원충이 감염된 vero cell 현탁액을 30%, 50% 그리고 80% (v/v)로 구분되어 만들어진 osmotic Percoll™ 용액위에 올려 놓은 뒤 2,000 × g에서 30분간 원심시켰다. 원심분리 후 원충 tachyzoite들은 50% 와 80%의 osmotic Percoll™ gradient용액위에 위치하게 되며, 이것을 조심스럽게 채취하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)을 이용해 3회 세척시키 후 약  $1 \times 10^8$ 개의 tachyzoite를 순수분리 하여 실험에 사용되기 전까지 70°C에서 보관 하였다.

## 3) *N. caninum* KBA-2 tachyzoites에 대한 토끼 항혈청 생산

항 *N. caninum* 다클론성 항체를 만들기 위해 New Zealand White종 토끼를 이용해 항혈청을 만들었다. 실험에 들어가기 전 숙주토끼는 간접형광항체법(IFAT)를 이용해 *N. caninum*과 *T. gondii*에 노출이 안된 것을 확인 하였다. 인공감염을 위해 토끼 1두 당  $1 \times 10^7$ 개의 live tachyzoites (KBA-2)를 Freund's adjuvants와 혼합하여 2주간격으로 3회 접종한 후 마지막 booster를 위해 실험 1주일 전에 마지막 면역을 시켰다. 항혈청은 마지막 면역이 끝난 1주일 후에 채취하였고 이때의 IFAT역가는 1:6,400 이었다.

## 4) 이차원 전기영동

순수분리된 tachyzoite들은 40 mM Tris-base에 재부유 시킨 뒤 액체질소를 이용해 3회 냉동 및 해동을 반복하였고 이후 완전한 파쇄를 위해 초음파파쇄기(XL-2020, Misonix Inc. Farmingdale, USA)를 이용해 5.5 watt의 power로 2분간 (5 초 pulse/10 초 rest) 파쇄 하였다. 파쇄된 tachyzoite들은 7 M urea, 2 M thiourea, 40 mM Tris-base, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) DTT, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 그리고 0.5% (v/v) IPG buffer (pH 3-10)로 구성된 lysis buffer를

첨가하고 얼음물속에서 1시간 정도 정치 시켰다. 정치 후 4°C, 16,000 × g에서 30분간 원심분리 후 상층액만 취하여 보관하였다. 아울러 보관되는 상층액은 Bradford method를 이용하여 단백질 정량을 실시 하였다.

등전점분리(Isoelectric focusing; IEF)는 IPGphor™ system을 이용해 수행 하였다. lysis된 tachyzoite sample들은 6 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 0.4% (w/v) DTT, 0.5% IPG buffer 그리고 0.002% (w/v)bromophenol blue가 함유된 rehydration buffer와 섞어준 뒤 IPG strips (pH 4-7)위에다 분주하여 rehydration 과정을 거친 후 총 86.1 kWh의 power로 등전점 분리를 하였다. 이후 등전점 분리된 IPG strip들은 10% SDS-polyacrylamide gels (160×160×1 mm)을 이용해 단백질의 분자량에 따라 분획 하였고 분획된 단백질은 gel들을 silver nitrate 또는 colloidal Coomassie blue G-250를 이용해 가시화하였다.

#### 5) Immunoblotting과 image 분석

이차원 전기영동 후 gel은 가도화 *N. caninum*과 반응시키기 위해 immunoblotting polyvinylidene fluoride membrane (PVDF membrane; Immobilon™-P, Millipore, Bedford, USA)로 전이시킨다. 전이된 membrane 은 blocking buffer (5% (w/v) skim milk가 함유된 TBS-T buffer [20 mM Tris-HCl, 500 mMNaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.4])에 담귀 4°C에서 밤새도록 반응 시켰다. 이후 membrane은 토끼 *N. caninum* KBA-2 항혈청을 1:200로 희석시킨 blocking buffer에 2시간동안 감작 시킨 후 1:2,000으로 희석 된 horseradish peroxidase가 conjugate된 goat anti-rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)를 1시간동안 재차 감작 시켰다. 변역반응이 일어난 spot들은 ECL™ detection kit을 이용해 반응을 측정 하였다.

염색된 이차원전기영동 gel과 immunoblotted spot들은 Agfa Arcus 1200™ image scanner (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgium)를 이용해 디지털화 하였고 측정된 image 는 Phoretix™ 2D software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)를 이용해서 분석하였다. Gel의 spot 위치를 분석하기위해 2D SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용해서 각각의 spot의 Mr 와 pI를 측정하였다.

#### 6) 질량분석기를 이용한 단백질 동정

관심 있는 단백질 spot들은 염색된 gel로 부터 추출되어 진 후 50% acetonitrile로 세척 한 후 건조하고 다시 10 mM DTT/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해서 실온에서 가수화 시켰다. Gel 조각들은 다시 실온의 암실에서 55 mM iodoacetamide/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해 반응 시킨 후 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>로 세척하고 다시 건조 시켰다. 건조된 gel 조각들은 다시 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용해 재수화 한 다음 5 mM CaCl<sub>2</sub> 와 12.5 ng/ul의 sequence-grade의 porcine trypsin (Promega, Madison, USA)을 첨가

하여 ice속에서 45분간 반응 시켰다. 반응 후 여분의 액체는 제거한 후에 37°C에서 밤새 반응 시켰다. 반응 후 5% formic acid 와 acetonitrile이 1:1 (v/v)로 희석된 용액을 넣고 반응을 시킨 후 상층액은 회수하고 이는 다시 vacuum centrifuge를 이용하여 건조 시켰다.

Tryptic digest된 건조된 peptide들은 증류수, acetonitrile 그리고 trifluoroacetic acid가 각각 93:5:2로 희석된 용액 2  $\mu$ l를 이용해 재부유 시키고 MALDI-TOF mass spectrometry를 위한 target preparation을 위해 solution-phase nitrocellulose 방법을 적용하였다.  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinamic acid (40 mg/ml) 와 nitrocellulose (20 mg/ml)를 각각 acetone에 녹인 것을 isopropanol과 섞었다. 이 용액에 internal standard를 위해 des-Arg-Bradykinin (monoisotopic mass, 904.4681) 과 angiotensin I (1296.6853)을 섞어 trypsin digestion된 peptide에 넣어 이 중 용액 1  $\mu$ l을 target plate의 circle에 점적 한 후 건조시켰다. Target에 있는 sample spot들은 Voyager-DE STR MALDI-TOF MS (PerSeptive Bio-systems, Framingham, USA) 기기를 이용해 peptide mass를 측정하였다. 측정된 data는 MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>) 프로그램과 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 프로그램을 이용해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 protein sequence database를 참조하여 datamining하였다. 이때 mass tolerance는  $\pm 50$  ppm으로 하였고 한개까지의 missed cleavage site는 인정하였다. 아올러 carbamidomethylation of cysteines 과 oxidation of methionine을 protein modification의 인자로써 감안 하였다.

## 다. 결과

### 1) *N. caninum* 과 *T. gondii*의 이차원 전기영동지도와 immunoblot profile

*N. caninum* 의 KBA-2주 와 JPA-1주의 이차원 전기영동 후 도은 염색한 결과 각각 약 516 과 573의 단백질 spot들을 관찰 할 수 있었다. 서로간의 gel을 비교한 결과 이들 중 78% (403/516 spots)의 단백질 spot들이 동일한 pI 와 Mr 값을 나타내었다 (Figs. 1A 와 C). 그리고 토끼 *N. caninum* KBA-2 항혈청을 이용한 immunoblot 비교 결과 94 및 91개의 항원성 spot들이 각각 KBA-2 와 JPA1에서 관찰 되었다(Figs 1B 와 D). 반면에 *T. gondii* RH주에서는 총 419개의 단백질 spot들을 관찰 할 수 있었고 이들 중 30개의 항원성 spot들을 토끼 *N. caninum* KBA-2 항 혈청을 이용한 immunoblot 결과에서 찾을 수 있었다(Figs. 1E 와 F).

### 2) *N. caninum* 과 *T. gondii*에 대한 단백질 동정

앞서 동정된 *N. caninum*의 2-DE map을 기준으로 *T. gondii*에 대한 단백질 동정을 할 수 있었다. 이번 실험에서는 Subtilisin-like serine protease (NcSUB1, spot 21),

Lactate dehydrogenase (spot 43) 그리고 Serine-threonine phosphatase 2C (spot 45) 와 같은 3개의 단백질에 대한 동정을 *N. caninum* 2-DE map으로부터 새롭게 할 수 있었으며 *T. gondii*의 2-DE map의 경우는 9개의 단백질로 구성된 11개의 단백질 spot들을 역시 PMF analysis를 통하여 동정 할 수 있었다. 새롭게 발견된 단백질들은 table 1에 정리하였다.

### 3) *N. caninum* 과 *T. gondii* 의 단백질 spot 비교

*N. caninum* (KBA-2 와 JPA1) 과 *T. gondii*의 단백질 spot비교를 위해 각각의 원충주에 대한 2-DE map들을 7개의 서로 다른 부분으로 나누어 관찰 하였다. Fig. 2는 protein profile의 part 1을 보여주는데 이곳에서는 heat shock protein 70 (HSP 70 N-2 와 T-2), tubulin  $\beta$ -chain (N-7 과 T-5), putative protein disulfide isomerase (N-9 과 T-7) 그리고 actin (N-10 과 T-8)과 같은 단백질들이 *N. caninum* 과 *T. gondii*의 pH 4.7 에서 5.1, 그리고 MW 41 에서 76 kDa사이에서 같은 위치에 있음을 보여주고 있다. 비록 *T. gondii*의 T-6는 그 이름이 동정되지 못하였지만 *N. caninum* 의 tubulin  $\alpha$ -chain (N-8)과 비슷한 위치에 위치하고 있었다.

Fig. 3 (part 2의 protein profile)에서 보이는 것과 같이, 몇몇 단백질 spot 들은 *N. caninum* 과 *T. gondii*에서 동일한 발현양상을 보이고 있었다. *N. caninum*의 N-1, N-3 그리고 N-5 spot은 *T. gondii*의 T-1, T-3 그리고 T-4 과 같은 pH 범위 4.8 에서 5.4 사이 그리고 MW 52 에서 76 kDa.사이에 위치하였다. 이들 spot들은 동정된 못하였지만 *T. gondii*의 T-1, T-3 그리고 T-4 spot은 토끼 *N. caninum* KBA-2 항혈청과 반응 하였다. Spot 232 (69.4 kDa/pI 5.36), 245 (65.0 kDa/pI 5.34) 그리고 248 (64.1 kDa/pI 4.97)은 *N. caninum* KBA-2 과 JPA1의 2-DE map에서 같은 위치에 위치하고 있었다.

2-DE map의 part 3에서는 *N. caninum*의 Enolase (spot 34, 35 및 spot 36)가 *T. gondii*의 spot T-101 (unidentified), 515 (enolase) 그리고 spot 514 (enolase)과 같은 pH 범위 5.3 에서 5.7 사이 그리고 MW 42 에서 57 kDa사이에 위치하고 있었다. Spot 516 (enolase)과 spot 101e호 비슷한 위치에서 찾을 수 있었다. *N. caninum*의 Spots 269 과 270 그리고 *T. gondii*의 T-102 과 T-103는 토끼 *N. caninum* KBA-2 항혈청과 아주 강한 면역원성을 나타내었으나 이것들의 MW는 비슷하였으나 pI값은 서로 달랐다 (Fig. 4).

Protein profile의 part 4부분인 Fig. 5에서는 14-3-3 protein homologue (N-12 및 T-10) 과 N-11 및 T-9가 *N. caninum* 과 *T. gondii*의 profile에서 pH범위 4.3 과 4.7 사이 그리고 MW 31 에서 40 kDa 사이에서 동일한 위치에서 관찰 되었다. *N. caninum* 특이항원인 NCDG1 (spot 49)이 위 범위 부근에서 발견되었다. 이 단백질은 *N. caninum* 과 *T. gondii*.를 구분 지을 수 있는 중요한 단백질로 생각되어 진다.

2-DE map의 part 5에서는 Fructose-1,6-bisphosphatase (spot 41 및 522),

Serine-threonine phosphatase 2C (spot 45 및 523) 그리고 Lactate dehydrogenase (spot 43, 44, 524 및 525)가 *T. gondii* database에서 동정 되었다. 그러나, 이들 spot 들은 *N. caninum* 과 *T. gondii*의 2-DE profile에서 pH 범위 5.1 에서 6.6 그리고 MW 32 과 51 kDa사이에서 서로 다른 위치를 나타내었다. 아울러 spot 41, 44 그리고 45은 *N. caninum*의 immunoblot profile에서는 관찰 할 수 있었으나 *T. gondii* 에서는 그러하지 못했다 (Fig. 6).

Part 6의 2-DE profile에서는 3개의 spot과 NcSUB1 (spot 21)으로 구성된 N-4 구역이 있는데 이 구역은 *T. gondii*의 pH 범위 5.2-6.4 그리고 MW 52 에서 70 kDa사이에서는 관찰되지 않기 때문에 *N. caninum*을 구분 짓는 marker로 생각된다. *N. caninum*의 NTPase (spot 22 및 23)는 항원성 spot으로 인식 되었으나 *T. gondii*의 NTPase II (spot 507) 과 NTPase I (spot 508)은 토끼 *N. caninum* KBA-2항혈청을 이용한 immunoblot profile에서는 관찰 할 수 없었다. Pyruvate kinase (spot 27 와 511) 그리고 Heat shock protein 60 (spot 24 과 510)는 2-DE profile에서 동일한 위치에서 관찰 되었다 (Fig. 7).

pH 범위 4.9 에서 5.9 그리고 MW 26 에서 33 kDa에서는 NcGRA-2 (spot 50) 과 spot 88 (미동정)이 *N. caninum*의 항원성 spot으로 관찰되었으나 *T. gondii*에서는 이들 spot을 관찰 할 수 없었다(Fig. 8).

Table 1 List of proteins identified on the 2-DE map of *N. caninum* and *T. gondii* tachyzoites after 2-DE followed by MALDI-TOF MS analysis

Spot No.	Protein	No. of matched peptid	Sequence coverage (%)	Theoretical Mr(Da)/p	Accession numb	Species
21	Subtilisin-like serine protease	9	13	93650/5.4	6119851	<i>N. caninum</i>
43	Lactate dehydrogenase	4	24	35549/6.0	1695772	<i>T. gondii</i>
45	Serine-threonine phosphatase 2C	9	26	36817/5.4	18076806	<i>T. gondii</i>
501	Heat shock protein 70	7	15	68530/5.2	5738969	<i>T. gondii</i>
503	Heat shock protein 70	13	24	73254/5.2	6682359	<i>T. gondii</i>
507	Nucleoside-triphosphatase II	19	36	69586/5.7	2499221	<i>T. gondii</i>
508	Nucleoside-triphosphatase I	7	14	69160/6.0	2499220	<i>T. gondii</i>
510	Heat shock protein 60	7	22	61014/5.8	5052052	<i>T. gondii</i>
511	Pyruvate kinase	7	21	57530/6.0	13928580	<i>T. gondii</i>
515	Enolase	6	24	48219/5.7	12619316	<i>T. gondii</i>
516	Enolase	10	26	48219/5.7	12619316	<i>T. gondii</i>
522	Fructose-1,6-bisphosphatase	11	35	42398/6.1	21715907	<i>T. gondii</i>
523	Serine-threonine phosphatase 2C	8	25	36817/5.4	18076806	<i>T. gondii</i>
524	Lactate dehydrogenase	4	24	35549/6.0	1695772	<i>T. gondii</i>

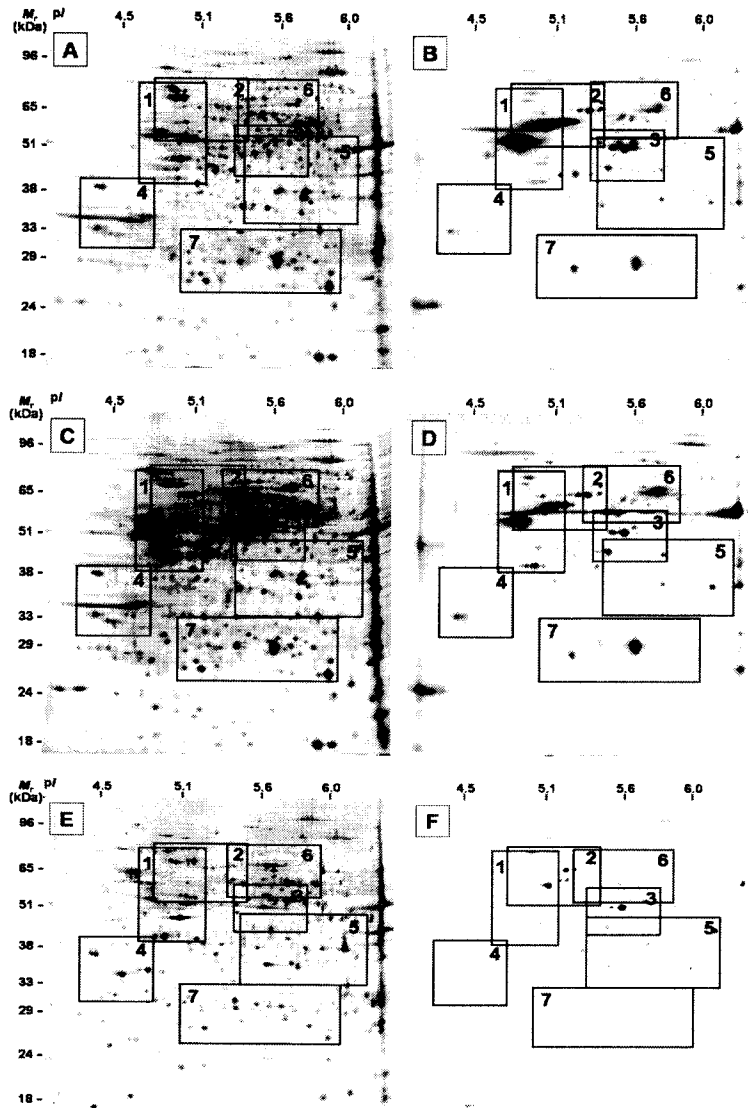


Figure 1. 2-DE and its immunoblot profiles of *N. caninum* KBA-2 (panel A and B), JPA1 (C and D), and *T. gondii* (E and F). A total of 516 (A), 573 (C), and 419 (E) protein spots were detected on the 2-DE profiles, respectively. Of these, 94 (B), 91 (D), and 30 (F) spots were identified as antigenic spots on 2-DE immunoblot profiles using rabbit antiserum against *N. caninum* KBA-2. IEF was performed for a total of 86.1 kVh using pH 4-7 IPG strips (13 cm). SDS-PAGE was performed on a 12% gel which was then stained with silver nitrate. Separated proteins on the other gel were transferred to PVDF membrane and antigen spots were visualized using an ECL detection reagent. 2-DE profiles were divided into 7 parts for comparative analysis.

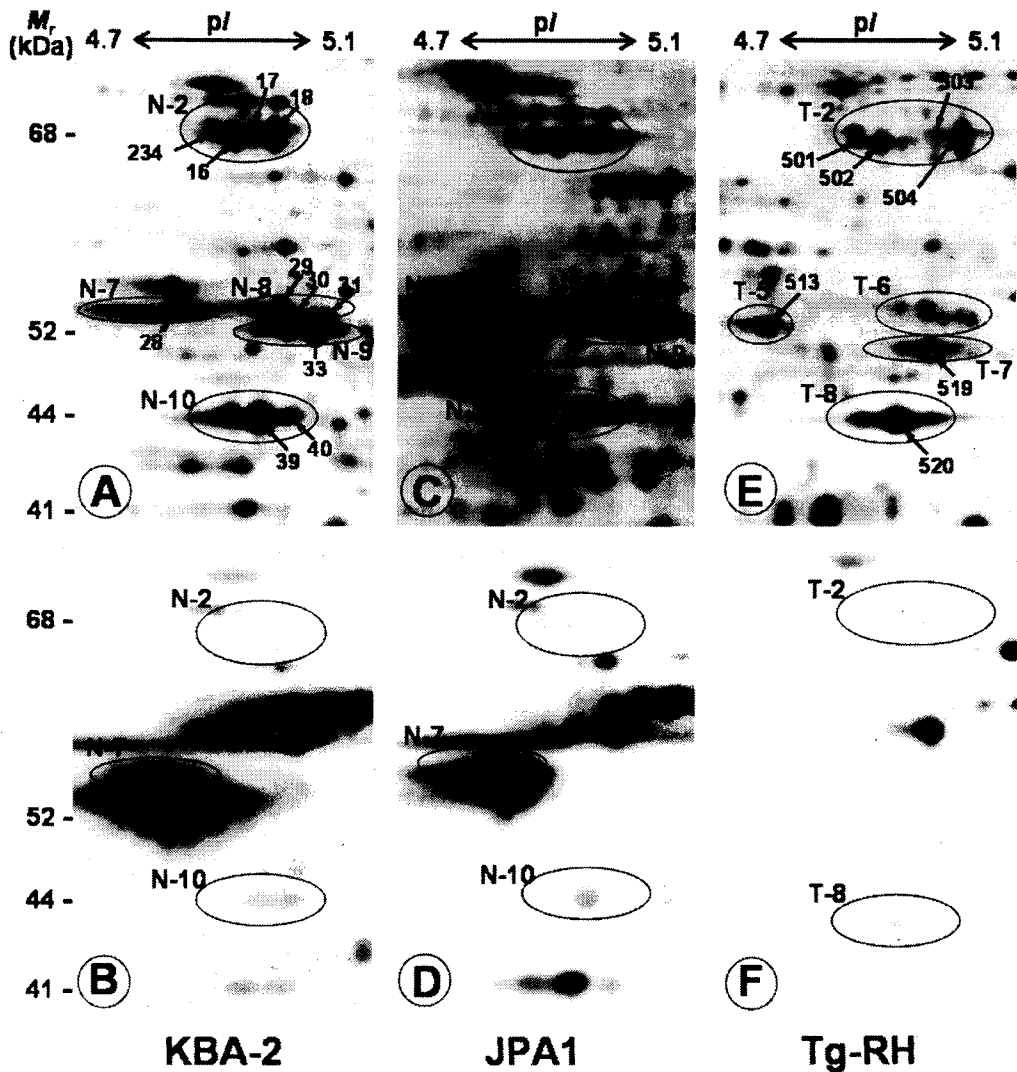


Figure 2. Comparison of protein (A, C, E) and antigen (B, D, F) profiles of part 1 on 2-DE maps at the range of pH 4.7-5.1 and molecular weight 41-76 kDa. 2-DE profiles of part 1 were showed similar protein spot patterns between *N. caninum* and *T. gondii* in terms of pI and Mr which were N-2 and T-2, N-7 and T-5, N-8 and T-6, N-9 and T-7, N-10 and T-8, respectively. Protein spots identified were HSP 70 (spot 16, 17, 18, 501, 502, 503 and 504), tubulin  $\alpha$ -chain (spot 28 and 513), tubulin  $\beta$ -chain (spot 29, 30 and 31), putative protein disulfide isomerase (spot 33 and 519) and actin (spot 39, 40 and 520) using PMF analysis.

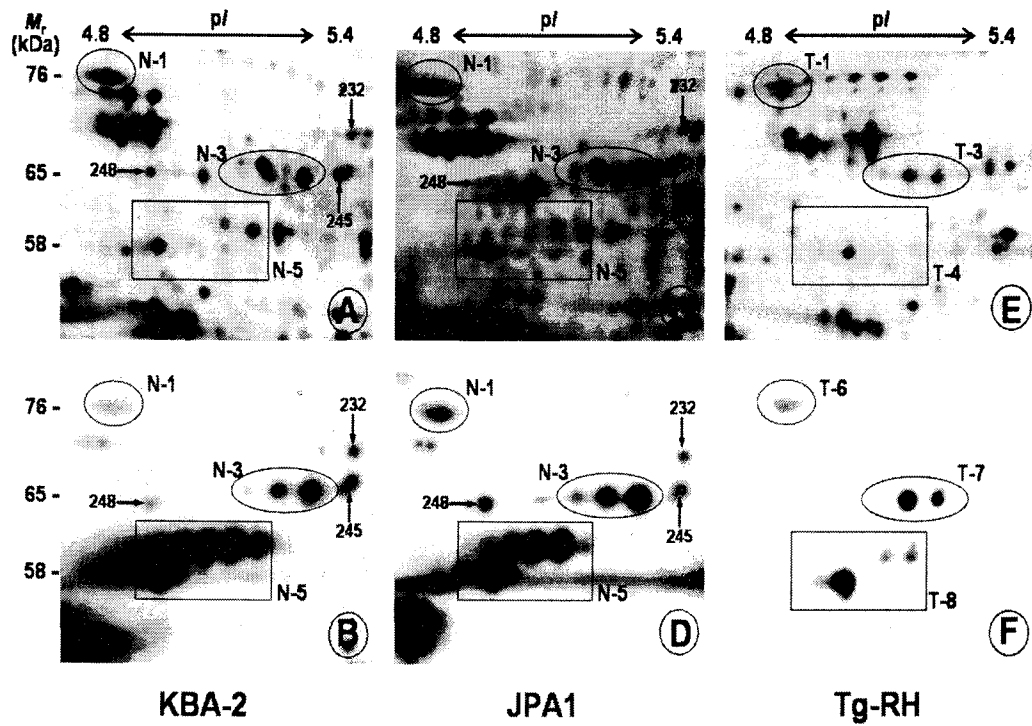


Figure 3. Comparison of protein (A, C, E) and antigen (B, D, F) profiles of part 2 on 2-DE maps at the range of pH 4.8-5.4 and molecular weight 52-76 kDa. 2-DE profiles of part 2 were showed similar protein and antigen spot patterns between *N. csninum* and *T. gondii* which were circle N-1 and T-1, N-3 and T-3 and box N-5 and T-4, respectively.



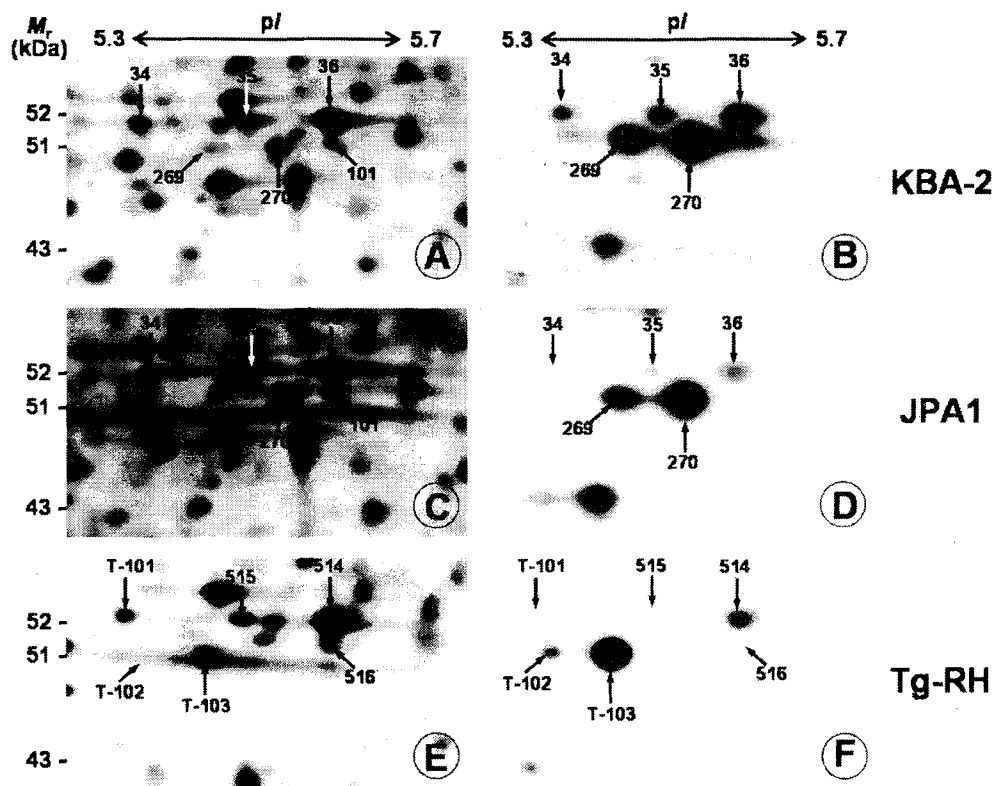


Figure 4. Comparison of protein (A, C, E) and antigen (B, D, F) profiles of part 3 on 2-DE maps at the range of pH 5.3-5.7 and molecular weight 42-57 kDa. 2-DE profiles of part 3 were showed similar protein and antigen spot patterns which were spot 34 and T-101, spot 35 and 515, spot 36 and 514 between *N. caninum* and *T. gondii*, respectively. Spot 269 and 270 of *N. caninum* and spot T-102 and T-103 of *T. gondii* on 2-DE profiles were showed antigenic response by rabbit-antiserum against *N. caninum* KBA-2 but they were located different pI and Mr. Spot 34, 35, 36, 514, 515 and 516 were identified as enolase using PMF.

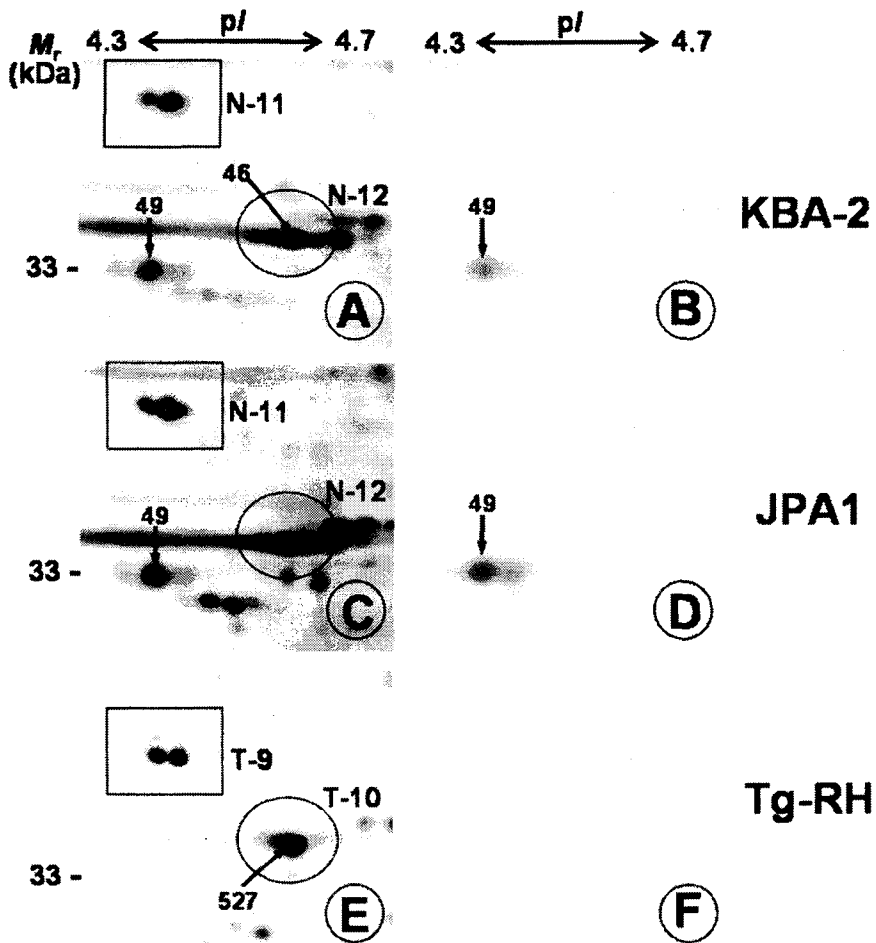


Figure 5. Comparison of protein (A, C, E) and antigen (B, D, F) profiles of part 4 on 2-DE maps at the range of pH 4.3-4.7 and molecular weight 31-40 kDa. Box N-11 and T-9 and 14-3-3 protein homologue (spot 46 and 527) were observed identical location but NCDG1 (spot 49), specific antigen of *N. caninum*, was exhibited only on 2-DE profiles of *N. caninum*.

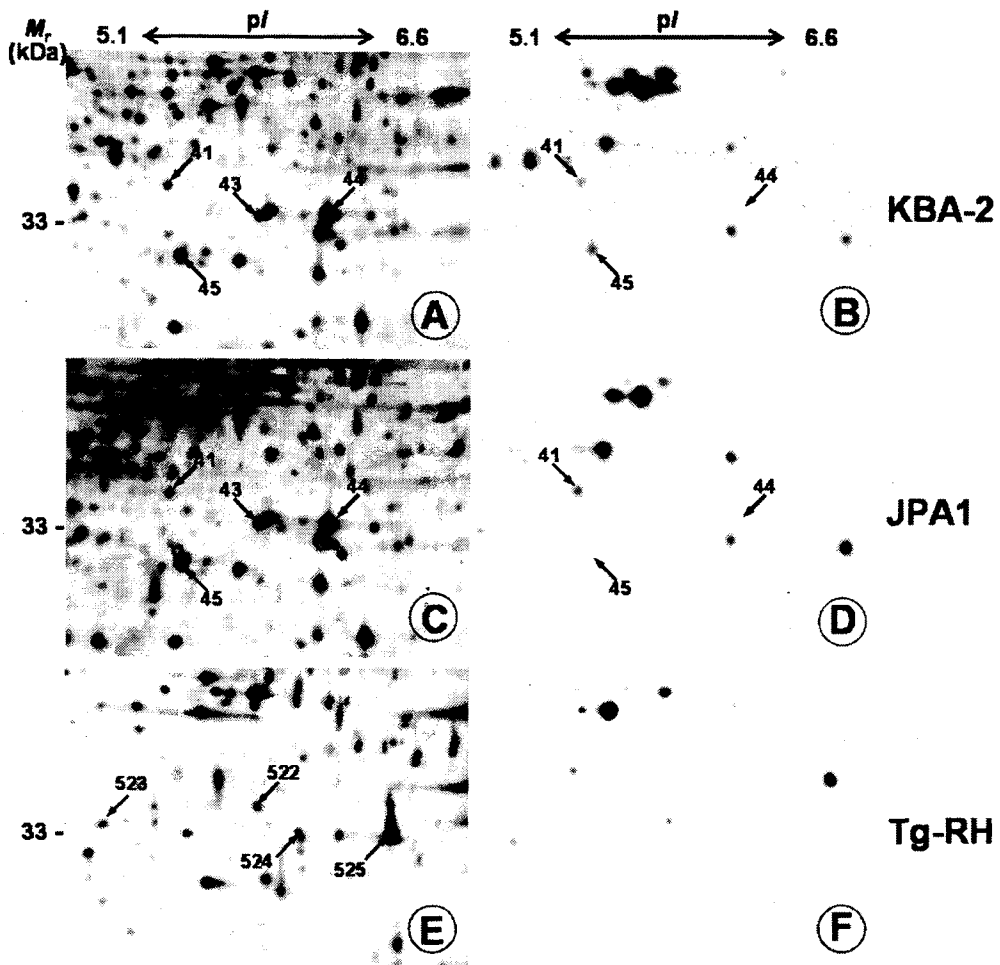


Figure 6. Comparison of protein (A, C, E) and antigen (B, D, F) profiles of part 5 on 2-DE maps at the range of pH 5.1-6.6 and molecular weight 32-51 kDa. Fructose-1,6-bisphosphatase (spot 41 and 522), serine-threonine phosphatase 2C (spot 45 and 523), and lactate dehydrogenase (spot 43, 44, 524 and 525) were identified with *T. gondii* database using PMF but different antigenic response by rabbit-antiserum against *N. caninum* KBA-2.

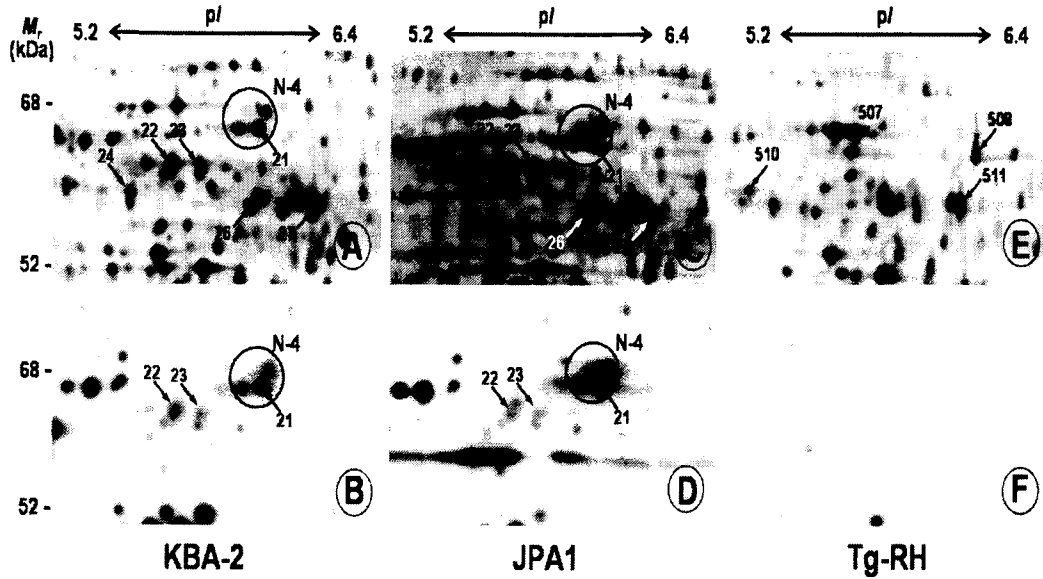


Figure 7. Comparison of protein (A, C, E) and antigen (B, D, F) profiles of part 6 on 2-DE maps at the range of pH 5.2-6.4 and molecular weight 52-70 kDa. Circle N-4 consist of 3 protein spots which were containing subtilisin-like serin protease (spot 21) was showed different protein profiles between *N. caninum* and *T. gondii* since these spots were not observed on 2-DE profiles of *T. gondii*. NTPase (spot 22 and 23) of *N. caninum* were antigen spots but NTPase (spot 507 and 508) of *T. gondii* were not. Pyruvate kinase (spot 27 and 511) and HSP 60 (spot 24 and 510) were located similar positions on 2-DE profiles.

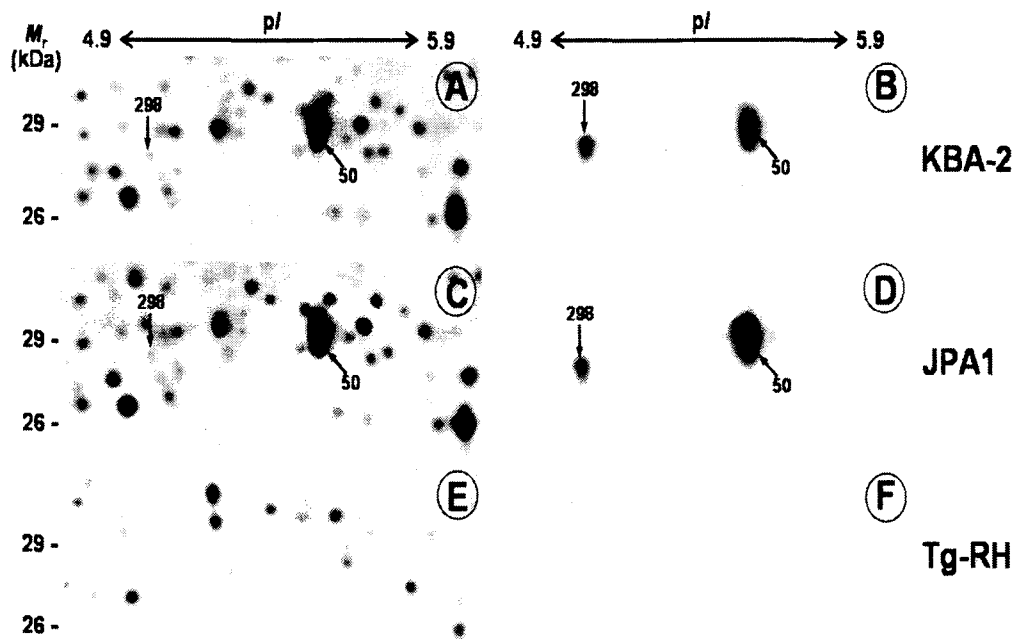


Figure 8. Comparison of protein (A, C, E) and antigen (B, D, F) profiles of part 7 on 2-DE maps at the range of pH 4.9-5.9 and molecular weight 26-33 kDa. NcGRA-2 (spot 50) and spot 298 (unidentified) were showed different protein profiles between *N. caninum* and *T. gondii*.

### 3절 *Salmonella enteritidis*의 프로테오믹스 연구

#### 1. Proteomics 기법을 이용한 *Salmonella enteritidis*의 항원단백질 분석

##### 가. 서론

*Salmonella* spp.는 *Enterobacteriaceae* 과에 속하는 gram 음성의 lactose 비분해 균종 중 대표적인 병원균(Murray 등, 1999; Ward 등, 1987)으로 자연계에 널리 편재하고 거의 모든 척추동물 및 계란 어류 그리고 일부 채소류 등 (Davis 등, 1990) 자연계의 광범위한 숙주영역에서 생존할 수 있는 것으로 알려져 있다. 1980년대 초까지만 하더라도 *S. typhimurium*이 식중독의 가장 주된 병원체로 알려져 왔으나 특이하게도 1980년대 중반부터 세계적인 경향으로 *S. enteritidis*에 의한 폭발적인 증가 (Jean, 2001; Molbak 등, 2002), 현상이 보고됨에 따라 이에 관련된 연구가 집중적으로 진행되어왔다 (Lee 등, 2001; Poppe 등, 1993; Su 등, 2001). 특히, *S. enteritidis* 와 *S. typhimurium* 의 경우 사람과 동물에 대해서 특이적으로 적응능을 획득한 *S. typhi* (사람), *S. dublin* (소), *S. choleraesuis* (돼지), *S. gallinarum* 및 *S. pullorum* (가금) 과는 달리 사람을 비롯한 모든 동물에 감염하여 장염과 패혈증을 일으킬 수 있으며 특히 닭에서 파라티푸스를 일으키는 비숙주 적응성의 대표적인 혈청형으로 (Minor, 1984; Snoeyenbos 등, 1991) 공중보건학상 더욱 중요하게 취급되고 있다.

최근 인간을 비롯한 수많은 미생물과 하등동물, 식물 유전체의 정보가 하루가 늘어감에 따라 그 염기 서열 자체가 아닌 염기의 기능, 특히 세포 내에서의 유전자 발현의 산물인 단백질의 기능을 밝히려는 학문이자 테크닉으로서 생물학 연구에 있어서 새로운 paradigm으로 그 중요도가 세계적으로 증가하고 있다. 이러한 접근은 게놈(Genome)의 상대어로서 <PROTEin expressed by a genOME> 의 합성어인 프로테오믹스(Proteome)이라는 말로 널리 인식되고 있다 (Wasinger 등, 1995). 이러한 프로테오믹스를 연구하는 학문인 프로테오믹스(Proteomics)는 (1) 기능을 갖는 단백질의 발현을 종합적이고 정량적으로 측정하고 (2) 생물학적인 동요(perturbation)에 의해 변하는 단백질들의 발현양상의 변화를 정확하게 관찰 하며, (3) in vivo에서 유전자 발현의 궁극적인 양상을 규명하여, (4) 유전자, 단백질 및 질병간의 연결고리를 제공하는데 그 목적이 있다. 특히 이차원전기영동(Two-dimensional electrophoresis; 2-DE)은 가장 보편적으로 사용되는 proteomic의 기법으로 단백질의 pH 등전점 (pI)으로 나타내는 net charge 에 따라 단백질을 제 1차 나열을 한 후, 이어서 분자량에 따라 분리하는 방법으로, sample 속에 포함된 수백, 수천 가지의 단백질을 동시에 나열하여 특정 생리 조건 등에 따라 다르게 나타나는 단백질의 양적인 비교를 통하여 특정 단백질을 질량분석기로 분석하여 아미노산 서열을 결정하고 이를 바탕으로 단백질이나 genome data base를 bioinformatics tool로 찾아 단백질의 정체를 확인하는 연속적인 과정이다 (Rabilloud, 2002).

본 연구에서는 *S. enteritidis*를 2-DE map 에 전개시킨 다음 immunoproteomics 분석 기법 (Klade 등, 2002)으로 immunoblotting map 과 비교하여 MALDI-TOF MS 를 이용하여 항원 단백질을 동정하였다.

## 나. 재료 및 방법

### 1) 공시 균주

실험에 사용된 균주는 경남 보건 환경 연구원에서 분양 받은 *Salmomella enteritidis* (ATCC 13076)를 공시하였다.

### 2) 배양조건 및 이차원 전기영동용 시료

*S. enteritidis* 12시간 예비 배양한 후 100 $\mu$ l를 15ml의 LB borth 에 접종하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 shaking incubator 에서 220 rpm으로 진탕하면서 24시간 배양 하였다. 세균 배양액은 4 $^{\circ}$ C에서 6000rpm 원심 침전시키고, 침전된 균괴는 40mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 4 $^{\circ}$ C에서 6000rpm으로 10분간 3회 세척한 다음 흡광도 1.0( $\lambda$ = 610nm) 수준으로 희석하였다. 희석된 세균액은 각각 4ml, 8ml으로 분주하고, 다시 원심 침전 시켜 이차원 전기영동용 시료로 사용하였다

### 3) 이차원 전기영동을 위한 시료 준비

이차원 전기영동을 위한 *S. enteritidis*의 단백질 추출은 O' Farrell 의 방법을 준용 하였으며, 준비된 시료에 500 $\mu$ l의 lysis buffer (9M urea, 4% CHAPS, 40mM Tris-HCl)를 첨가하여 얼음에서 1시간 반응시킨 다음 13,000 x g 에서 1시간 원심시켜 상층액을 회수하고, 회수된 상층액은 Bradford 법을 준용하여 단백질을 정량하였다.

### 4) 이차원 전기영동

#### 가) First-dimension Isoelectric focusing(IEF)

IPGphor system을 이용하여 IEF를 수행하였다 rehydration buffer(9M urea, 4% CHAPS, 40mM Tris-HCl, 65mM DTT, 및 0.5% IPG buffer, bromophenol blue)에 정량한 시료 단백질을 일정량 혼합하여 IPGphore strip holder에 250 $\mu$ l를 로딩한 후 13cm immobilized pH Gradient (IPG) strip을 잘 올려놓고, 시료가 건조되지 않도록 cover fluid oil을 가하였다.

#### 나) Second dimension SDS-PAGE

IEF가 끝난IPG strip은 1%(w/v) DTT를 첨가한 equilibration buffer (1.5M

Tris-HCl, pH8.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue)에 15분간 반응시키고 다시 1.25%(w/v)의 iodoacetamide를 첨가한 equilibration buffer에 15분간 반응시킨 다음 IPG strip을 12.5% acrylamide gel의 상단부에 loading 시키고 빈 공간은 low melting agarose gel을 분주하였다. 15mA의 조건으로 5분 전개한 후 30mA로 변환시켜 bromophenol이 gel의 하단부에 도달할 때까지 전개하였다.

#### 5) 도은염색

2차원 SDS-PAGE를 마친 gel에서 단백질 spot을 검출하기 위하여 도은염색을 하였다. Gel을 고정액 (50% metanol, 12% acetic acid, 37% formic acid)으로 한 시간 이상 고정한 다음 50% etanol로 30분간 2회 반복 세척하고, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-5H<sub>2</sub>O 로 1분간 전처리 하였다. 전처리 한 Gel을 3차 증류수로 20초간 3번 세척하고 AgNO<sub>3</sub>와 37% HCOH로 30분간 반응시킨 다음 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>와 37% formic acid로 발색시켰다. 단백질 Spot을 확인 한 후 stop solution (50% metanol, 12% acetic acid)으로 발색을 중지 하였다.

#### 6) Immunoblotting

2-DE 한 gel에서 항원spot을 검출하기 위하여 nitrocellulose (NC) membrane 으로 60 Volt에서 70분 동안 transfer 후 membrane은 5% skim milk로 37°C에서 1시간 동안 blocking한 다음 TBS-T (10 mM Tris buffer solution 그리고 0.01% Tween-20)로 10분간 세번 세척하였으며 *S. enteritidis*에 대한 rabbit anti-serum 을 TBS-T에 1:200으로 희석하여 membrane에 가한 후 2시간동안 가볍게 진탕하면서 반응을 시킨 다음 세척은 앞의 과정과 동일하게 하였다. Anti-rabbit horseradish conjugated IgG는 TBS-T에 1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 가볍게 진탕하면서 반응을 시켜 세척한 다음 ECL kit (Amersham Bioscience)를 이용하여 항원을 검출하였다.

#### 7). Image분석

도은염색한 결과는 scanning 한 후 전용 이미지 분석 프로그램인 Phoretix 2D program (Ver. 5.01) 을 이용하여 분석하였다.

#### 8) MALDI- TOF MS 를 위한 sample 준비

##### 가) Spot excising

Phoretix 2D program을 통해 분석된 2-D gel을 분석한 후, 관심 있는 단백질의 identification을 위해 관련 spot을 피펫 tip을 이용하여 1mm 크기로 잘라내었다.

##### 나) Destaining and Washing

잘라낸 spot은 도은 염색 상태이므로 30mM potassium ferricyanide 와 100mM



sodium thiosulfate를 1:1로 혼합한 용액에 넣어 5분 동안 반응시켜 탈염색하였고, 탈 염색되어진 gel은 pure water를 이용하여 5분 동안 3-4회 세척하였다. gel 내부의 수분을 제거 시켜주기 위해 acetonitrile을 넣어 15분 동안 반응시킨 후 gel이 하얀색으로 탈수상태가 된 것을 확인한 후 acetonitrile을 제거시켜주고 gel은 vacuum centrifuge를 이용하여 완전 건조하였다.

#### 다) In-gel Reduction and Alkylation

건조된 gel에 10mM DTT가 함유된 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 넣어 30분간 반응시킨 후 다시 55mM iodoacetamide가 함유된 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 넣어 암실에서 30분간 다시 반응시켰다. 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용하여 한번 더 세척한 후 acetonitrile을 이용하여 gel을 탈수시켰다.

#### 라) In-gel Digestion

건조된 gel에 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>와 5mM CaCl<sub>2</sub>의 digestion buffer를 넣어 녹인 12.5ng/ $\mu$ l의 trypsin을 15 $\mu$ l를 넣어 45분동안 ice에서 정치시키고 흡수되지 않고 남은 용액은 모두 제거한 후 20 $\mu$ l의 trypsin이 포함되지 않은 digestion buffer를 넣어 37°C에서 16시간 정도 digest를 시행하였다.

#### 마) Extraction of Peptides

15 $\mu$ l의 pure water를 넣어 30분간 vortex 시킨 후 20 $\mu$ l의 acetonitrile을 넣어 다시 30분간 vortex 시킨 후 상층액만 수거, vacuum centrifuge를 이용하여 dry 하였다.

#### 9) On Target sample preparation (Dried-Droplet Method)

Matrix solution으로 40mg의 HCCA( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 50% acetonitrile과 0.3%TFA 1ml에 녹인 상층액에 적당량의 calibrant(Bradykinin, Angiotensin)를 섞어 dry된 sample과 mix 한 후 MALDI target에 2 $\mu$ l targetting 한 후 dry 시켜 MALDI-TOF를 시행하였다[4].

#### 10) Data analysis

얻어진 peptide의 mass는 Protein Prospector(<http://prospector.ucsf.edu>)에 있는 MS-Fit program을 이용하여 NCBI database에 접속하여 protein을 동정하였다. 이때 mass tolerance 는 50ppm 이내로 하였고 최소 4개 이상의 peptide가 matching 되어진 protein만을 선택하였다.

다. 결과

### 1) *S. enteritidis* 에 대한 이차원 전기영동 결과

본 실험에서는 *S. enteritidis* 의 soluble protein 만을 이용하여 protein map을 작성하였다.

pH 3-10으로 실험한 결과 pH 4 이하의 부위와 7이상의 부분에서는 protein 이 거의 발견되지 않았으므로(data not shown) pH 4-7사이에 있는 protein에 중점을 두었다.

Fig. 1은 도은염색한 pH 4-7의 *S. enteritidis* 의 soluble protein 의 reference map이다. IEF 에서 loading 되는 protein 의 양과 SDS-PAGE 당시 진행시킨 위치에 따라 spot 수와 위치의 다양성을 보이긴 했지만 비교적 높은 재현성을 보였으며, Phoretix 2D Advanced program 을 이용하여 pH 4-7 범위 13cm silver stained gel 에서 788개의 spot 들을 count 할 수 있었고(Fig. 1), 이들을 분자량에 따라 번호를 지정하였다.

### 2) *S. enteritidis* 에 대한 2-DE immunoblotting 결과

*S. enteritidis* 에 대해 2-DE 후 균을 접종시켜 면역시킨 *S. enteritidis* 특이 rabbit antisera를 이용하여 immunoblotting을 시행한 결과 100개의 항원성 spot을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또 이들 spot들은 Phoretix 2D Advanced program을 이용하여 matching 시킨 후 도은염색한 gel(Fig. 1) 에서의 spot 번호를 같이 적용하였다.

### 3) Mass spectrometry

Rabbit anti-sera specific *S. enteritidis* 에 대해 양성반응을 보인 단백질을 도은염색한 gel과 match 하여 그 단백질을 gel에서 잘라내어 in gel digestion 한 후 MALDI-TOF를 시행하였다.

*S. enteritidis* 특이 rabbit antisera 대해 반응을 보인 89개의 단백질 중 35개의 단백질을 분석할 수 있었다(Table 1).

동정된 단백질을 그 기능으로 분류해보면(Table 2) heat shock protein 인 DnaK (spot No. 107), GroEL (spot No. 154, 155, 156) 등과 단백질 생합성의 transcription 에 관련된 elongation factor G, Tu, Ts (spot No. 38, 284, 438), translation 에 관련된 30S ribosomal protein S1 (spot No. 111), 50S ribosomal subunit protein L21 (spot No. 746), 그리고 대다수의 에너지 대사에 관련된 단백질들을 확인할 수 있었다. 그리고 동정되어진 대부분의 단백질들은 *S. enteritidis* 특이 rabbit antisera에 대해 특히 강한 양성 반응을 보인 것으로 나타났다.

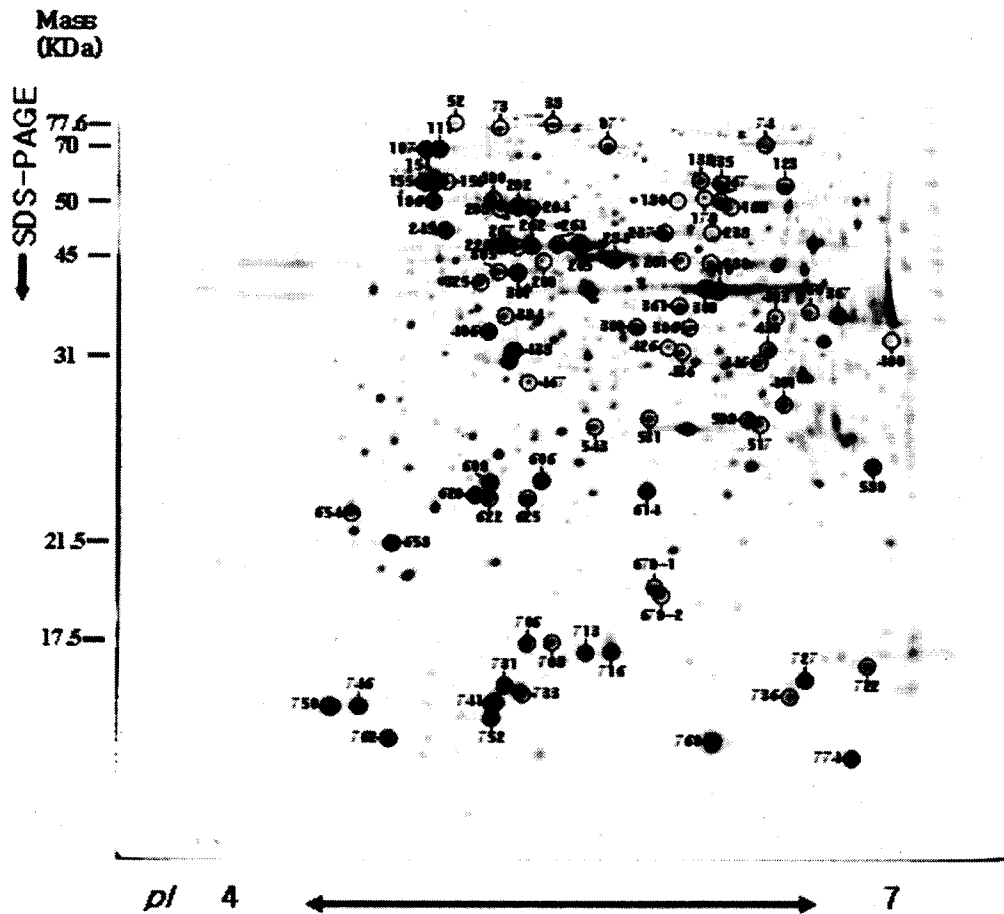


Fig. 1. 2-DE map of protein from *S. enteritidis*. Proteins were separated by 2-DE and visualized by silver staining. Approximate molecular weights are shown on the left and pIs are shown along the bottom. Circled spots are specific matched with immunoblotting image (Fig. 2) spots. The proteins identified are designated with their spot number

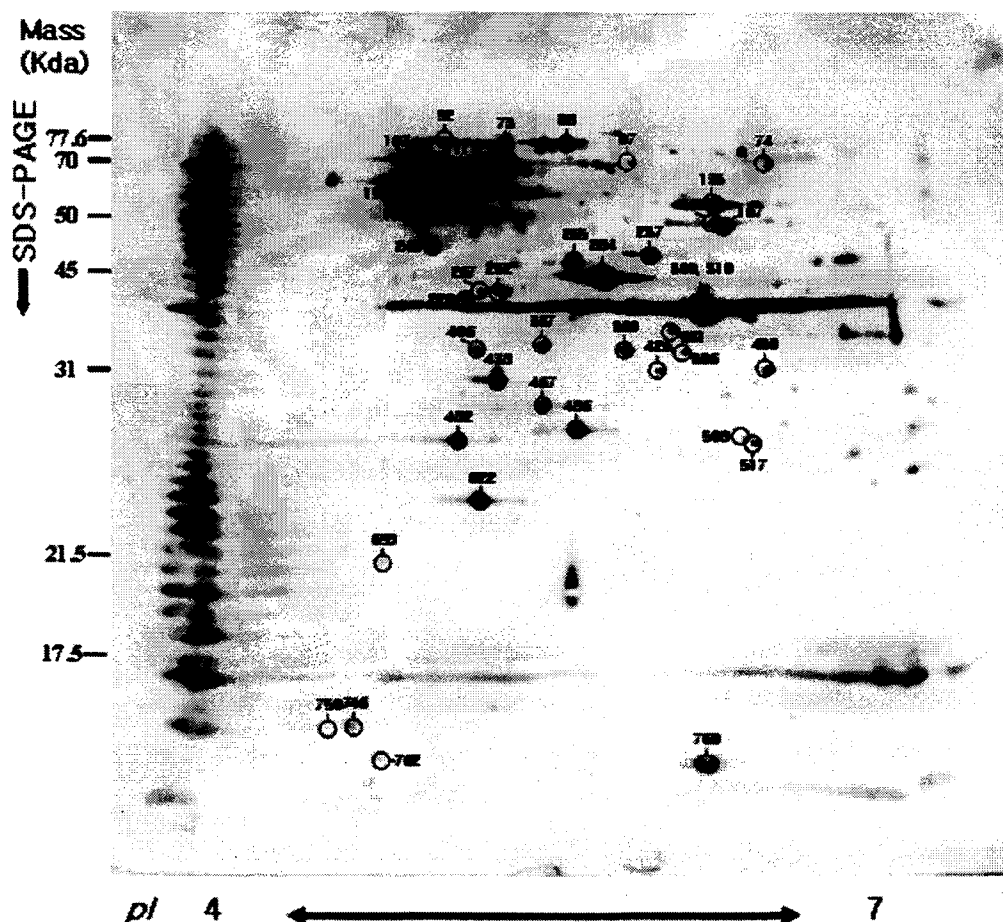


Fig. 2. 2-DE map of antigens from *S. enteritidis* (ATCC13076). Immunoblotting by PVDF membrane. Isoelectrofocusing(IEF) was performed using pI4-7 and separation in the second dimension was performed using 12.5% polyacrylamide gel. Approximate molecular weights are shown on the left and pIs are shown along the bottom. The proteins identified are designated with their silver stained spot number. The protein names are listed in Table1.

Table.1. Identified antigen proteins of *Salmonella enteritidis*.

spot No.	Accession #	MOWSE score	Protein Name	Protein MW (Da)/pI	No. of peptides matched	% Coverage
38	16762837 M	6.424E+03	elongation factor G	77600/5.2	7 (14)	15
52	16762214 M	1.213E+04	outer membrane protein precursor	89467/4.9	7 (13)	12
73	16762231 M	6.339E+05	polynucleotide phosphorylase, member of mRNA degradosome	77039/5.1	11 (24)	17
74	16763105 M	2.345E+07	fumarate reductase, flavoprotein subunit	65493/6.0	12 (42)	25
107	16759005 M	2.330E+04	DnaK protein (heat shock protein 70)	69232/4.8	11 (28)	23
111	16759531 M	3.720E+04	30S ribosomal protein S1	61174/4.9	17 (43)	32
135	16765909 M	5.856E+06	ABC superfamily (periplasm), oligopeptide transport protein with chaperone properties	65569/6.3	14 (40)	35
154	16763152 M	2.826E+05	GroEL protein	57266/4.8	13 (17)	28
155	16763152 M	6.963E+03	GroEL protein	57266/4.8	7 (11)	21
156	16763152 M	3.405E+04	GroEL protein	57266/4.8	11 (26)	21
167	16762459 M	2.381E+08	ATP synthase alpha subunit	55113/5.7	15 (26)	39
190	16762416 M	5.910E+06	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	55555/5.0	10 (14)	27
196	59189 M	2.304E+03	phase-1 flagellin	51794/5.0	6 (20)	14
202	16763147 M	1.559E+05	aspartate ammonia-lyase	52287/5.1	9 (17)	19
220	16761974 M	4.316E+05	ADP-heptose synthase	51125/5.1	12 (35)	30
237	16762712 M	1.882E+05	putative arginine deiminase	45562/5.5	10 (38)	26
245	16762461 M	6.787E+09	ATP synthase beta subunit	50284/4.9	15 (36)	43
262	16761909 M	5.972E+04	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I	42373/5.1	7 (27)	26
265	16761724 M	1.499E+06	enolase	45599/5.3	12 (54)	40
267	16762230 M	2.369E+03	pyruvate kinase II, glucose stimulated	51388/6.1	8 (18)	19
284	96716	1.882E+11	translation elongation factor EF-Tu.A	43252/5.3	19 (31)	58
309	16762910 M	2.643E+06	periplasmic maltose-binding protein	43153/6.3	14 (54)	40
310	16761850 M	1.534E+05	fructose 1,6-bisphosphate aldolase	39157/5.7	11 (46)	32
361	16762972 M	5.618E+06	6-phosphofructokinase	34915/5.6	15 (38)	51
361	16762719 M	1.250E+02	putative carbamate kinase	33351/5.4	5 (17)	18
390	16762711 M	5.878E+04	putative carbamate kinase	33351/5.4	10 (12)	26
396	62519 M	4.350E+01	threonine dehydratase (EC 4.2.1.16), biosynthetic	56277/5.7	4 (20)	9
406	16759060 M	1.341E+06	transaldolase B	35171/5.1	12 (20)	52
430	16763640 M	4.235E+04	putative enzymes related to aldose 1-epimerase	32560/5.7	8 (18)	24
438	16762077 M	8.009E+05	elongation factor Ts	30358/5.1	11 (31)	34
508	16763637 M	9.420E+02	phosphoglycerate mutase 1	28494/5.8	5 (13)	20
517	16763352 M	1.854E+05	putative oxidoreductase	27043/5.8	8 (16)	35
620	16763334 M	1.817E+03	inorganic pyrophosphatase	19677/5.0	6 (28)	33
658	16761452 M	2.247E+03	pts system, glucose-specific IIA component	18247/4.7	5 (33)	38
746	1589128 M	1.106E+03	50S ribosomal subunit protein L21	11584/9.8	5 (35)	35
769	AA21562	2.800E+02	100 pct identical to gp:AB021078.3(YcgC of plasmid Colib-F9)~93 pct identical to gp:AF00342_35(YgA of plasmid R100)	15767/4.5	5 (33)	18

Table. 2. Identified antigen proteins of functional grouping

<b>Functional Categories</b>	<b>spot No.</b>
<b>Heat shock Protein</b>	
DnaK protein	107
GroEL protein	154
GroEL protein	155
GroEL protein	156
<b>Intermediate and entry metabolism</b>	
polynucleotide phosphorylase, member of mRNA degradosome	73
fumarate reductase, flavoprotein subunit	74
ATP synthase alpha subunit	167
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	190
aspartate ammonia-lyase	202
putative arginine deiminase	237
ATP synthase beta subunit	245
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I	262
enolase	265
pyruvate kinase II, glucose stimulated	267
periplasmic maltose-binding protein	309
fructose 1,6-bisphosphate aldolase	310
6-phosphofructokinase	361
putative carbamate kinase	390
transaldolase B	406
putative enzymes related to aldose 1-epimerase	430
phosphoglycerate mutase 1	508
putative oxidoreductase	517
pts system, glucose-specific IIA component	658
<b>Transcription</b>	
elongation factor G	38
translation elongation factor EF-Tu,A	284
elongation factor Ts	438
<b>Translation</b>	
30S ribosomal protein S1	111
50S ribosomal subunit protein L21	746
<b>7IE protein synthesis</b>	
outer membrane protein precursor	52
phase-1 flagellin	196
ADP-heptose synthase	220

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

### 제 1 절 연구평가의 착안점

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안 사항	척도 (점수)
1차 년도 (2001)	○병원성 세균 및 원충의 표준주 및 야외주를 수집과 배양 ( <i>E. coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Neospora caninum</i> )	50
	○각 병원체에 대한 2-Dimensional Gel Electrophoresis을 위한 샘플 조제방법 확립	50
2차 년도 (2002)	○ 2-Dimensional Gel Electrophoresis된 단백질 맵간의 비교	50
	○ MALDI-TOF-MS에 의한 단백질 sequencing 방법 확립	50
3차 년도 (2003)	○ 각 개체간 2-Dimensional Gel Electrophoresis된 단백질 맵의 비교	35
	○ MALDI-TOF-MS에 의한 각개체간 단백질 sequencing 방법 확립	15
	○프로테오믹 데이터 베이스 구축	35
	○진단 및 예방을 위한 후보단백질 개발	15
최종 평가	○자돈하리 원인 대장균의 프로테오믹 분석을 통한 데이터베이스 구축	25
	○ <i>Neospora caninum</i> 의 프로테오믹 분석을 통한 데이터베이스 구축	25
	○ <i>Salmonella</i> 속균의 프로테오믹 분석을 통한 데이터베이스 구축	25
	○각 개체간 항원성 단백질 프로테오믹 데이터베이스 구축	25

## 제 2 절 연구개발목표달성도

세부과제명	연구개발 내용	진척도 (%)
자돈 하리 원인 대장 균의 프로 테옴 연구	-병원성 대장균에 대한 2-DE Map 완성을 통한 균주간 비교	***** 100
	-병원성 대장균 특이 항원 spot에 대한 단백질 동 정 및 단백질 서열 분석을 통한 프로테옴 데이터 베이스 확립	***** 100
<i>Neospora caninum</i> 의 프로테옴 연구	-국내 분리 <i>N. caninum</i> 주에 대한 2-DE Map을 완성	***** 100
	- <i>N. caninum</i> 과 <i>T. gondii</i> 의 proteome 비교	***** 100
	- <i>N. caninum</i> 의 특이 항원 Spot에 대한 단백질 동 정 및 단백질 서열 분석을 통한 프로테옴 데이 터베이스 확립	***** 100
<i>Salmonella enteritidis</i> 의 프로테 옴 연구	-IPG gel을 이용한 2-DE 위한 Sample조제 방법 을 개발	***** 100
	-2-DE된 분리주간의 비교 및 특이 단백질 선발	***** 100
	- <i>Salmonella enteritidis</i> 의 특이 항원 Spot의 아미 노산 및 펩타이드 시퀀싱	***** 100



### 제 3 절 관련분야의 기술발전의 기여도

1. Proteomics는 생물의학, 농업, 축산, 수산, 환경 등 생명공학 전 분야에 응용 가능한 기반 기술이다. 따라서 proteomics의 테크닉은 앞으로 다른 질병의 연구에 있어서도 기반이 된다
2. Proteomics를 통한 한 단계 진보한 진단방법은 신속·정확한 진단을 통하여 공중 위생학적인 측면에서도 문제시되는 병원체의 검출에 이용 할 수 있다. 이러한 진단 방법은 축산물의 안정적 생산과 나아가서는 국민보건에 이바지 할 수 있다.
3. Proteome 연구를 통한 database의 구축의 효과는 단기적으로는 특이 진단 Marker의 개발에 응용가능하며, 장기적으로는 가축질병을 효과적으로 예방하는데 이용 가능하다.
4. 가축질병을 유발하는 병원체간 차이점을 단백질 수준에서 알 수 있음으로서 병원체간 (약독주와 강독주)의 차이점을 보다 쉽게 파악된다.
5. 병원체간의 분별 진단을 통한 보다 정밀한 역학 조사가 가능하다.
6. 국내 유행하는 병원체와 국외 유행하는 병원체의 감별진단도 쉽게 가능하다.
7. 병원체간의 차이를 총체적으로 나타냄으로서 백신개발에 응용이 용이하다.
8. Proteome 연구의 기술은 질병연구 뿐만 아니라 다른 생물공학의 기초가 된다
9. 동물 proteome에 대한 연구는 의학의 발전에도 크게 이바지할 수 있다.
10. 단백질에 대한 연구는 생명공학 기초연구로서 생명현상의 규명, 신약 개발등 고부가가치를 창출 할 수 있는 산물을 개발 할 수 있다.

## 제 5 장 연구개발의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

3년간의 연구로 *E.coli*, *N. caninum* 그리고 *S. enteritidis*에 대한 proteome 연구를 수행하였다. 앞으로 이번 연구의 결과를 각 병원균에 대한 신속하고 정확한 진단법 개발에 대한 연구를 계속 할 예정이다.

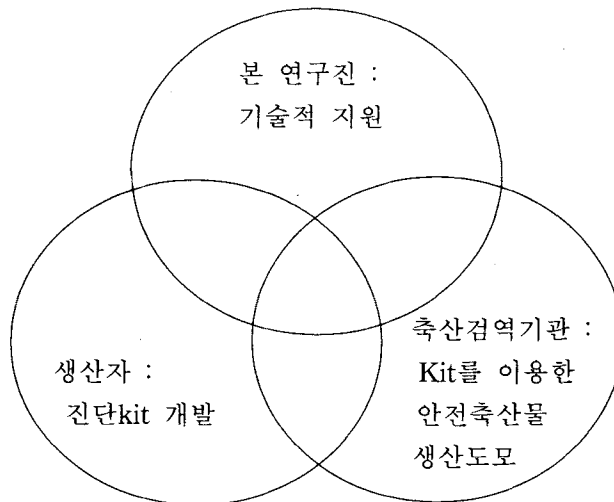
### 제 2 절 타 연구에의 응용

이번 연구에 사용되었던 기술은 타 축종 및 타 질환의 원인체 분석에도 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 제 3 절 기업화 추진방안

본 연구로 얻은 결과를 토대로 질병진단 marker를 개발을 위한 Lab-Venture를 추진할 계획이다. 본 연구진은 지속적인 연구로 기술적인 면을 생산자 측에서 진단 kit를 축산검역현장에서는 kit를 이용한 안전축산물 생산 기반을 조성하는 3각 belt를 형성할 예정이다.

<기업화 추진 안>



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

근래 Post-genomic era가 도래하면서 proteomics가 아주 중요한 연구 분야의 하나로 각광받고 있다 (Liebler, 2002). Proteomics는 gene 과 protein의 기능을 규명할 수 있고, protein molecule들 사이의 기능적 연결고리를 이해 할 수 있을 뿐만 아니라 체내 생물학적 기능의 변화를 추적 분석하는데 아주 좋은 방법으로 인식되고 있다 (Zhu 등., 2003 Jungblut 등, 1999). 이 매력적인 기법은 2가지 중요한 핵심기술이 필요로 한데 하나는 분석수준의 단백질 분리기술이고 다른 하나는 단백질의 동정기술이다.

Proteomics에는 몇몇 단백질 분리기술이 이용되어오고 있다. 이들 중 이차원 전기영동법 (Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)이 가장 강력하고 널리 사용되는 방식이다. 이 기술은 단백질을 그들 고유의 두 가지 특성에 따라 두 가지 특징적인 단계에 따라 분리를 한다. 첫 번째 단계는 등전점분리 (isoelectric focusing; IEF)이다. 이것은 단백질을 그자신의 고유의 등전점 (isoelectric points; pI)에 따라 분리하는 것이다. 그다음은 분리된 단백질을 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통하여 고유의 분자량 (molecular weights; MW)에 따라 분리하는 방법이다. 이외의 다른 단백질 분리방법에는 conventional SDS-PAGE (1-DE), high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) 그리고 affinity chromatography 가 proteomics 에 이용되고 있다 (Liebler, 2002 Patterson 과 Aebersold, 2003).

Protein 동정을 위해서는 3가지 중요한 과정들이 수반된다. 먼저 2-DE gel로 부터 target protein을 추출해야 한다. 그다음 electrospray 또는 matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)방법을 이용해서 특이 peptide mass finger printing을 획득고 마지막으로 질량분석기의 결과를 protein sequence database와 대조하면서 올바른 protein name을 찾는 과정으로 구성된다 (Henzel 등., 2003).

Proteomics는 병원체의 병원성 연구를 위해 제작되어진 genomic sequence data를 기반으로 수행되어 진다. 병원체연구에서 genomics, proteomics 그리고 bioinformatics의 삼위일체는 multiple gene set의 복잡한 현상을 연구하는데 많은 정보를 제공하여 준다(Cash, 2003). 예를 들어 최근에 완성되어진 malaria (*Plasmodium falciparum*)의 genome database로부터 말라리아의 효과적인 신약 및 백신후보물질 개발과 진단법 확립을 위한 비교 proteomics가 활발히 연구 될 수 있게 되었다 (Lasonder 등., 2002, Florens 등., 2002).

병원체에 대한 protein expression profiling은 병원체가 조직이나 세포에서의 상태 (즉, 발달, 분화 또는 질병의 발현 등) 또는 약제, 화학물질, 또는 생리활성물질에 대한 반응을 알 수 있는 특징적인 sample들에 대한 protein 동정을 위해 많이 이용되고 있다. 이들 결과물들은 질병의 병인론적 이해나 진단과 예후의 판단을 위한 새로운 biomarker를 제공 할 수 있을 것이다 (Hanash, 2003). 최근에 proteomic에 명역학적방

법을 접목시킨 immunoproteomics가 *Helicobacter pylori* (Haas 등, 2002; Thompson 과 de Reuse, 2002)을 비롯한 여러 병원체에 대한 항원성 단백질 규명에 이용 되어오고 있어 질병에 대한 병인론적 연구에 새로운 지평을 열어가고 있다.

## 제 7 장 참고문헌

Ahn HJ, Kim S, Kim DY, Nam HW. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *Korean J Parasitol*. 2003 Sep;41(3):175-7.

Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2000 Jul 2;60-61:417-31.

Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, et al. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J Am Vet Med Assoc*. 1995 Nov 1;207(9):1206-10.

Andrianarivo AG, Rowe JD, Barr BC, Anderson ML, Packham AE, Sverlow KW, Choromanski L, Loui C, Grace A, Conrad PA. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int J Parasitol*. 2000 Aug;30(9):985-90.

Asai T, Howe DK, Nakajima K, Nozaki T, Takeuchi T, Sibley LD. *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase. *Exp Parasitol*. 1998 Nov;90(3):277-85.

Ashburn D, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen DO. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *J Clin Pathol*. 1998 Apr;51(4):312-5.

Atkinson R, Harper PA, Reichel MP, Ellis JT. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol Today*. 2000 Mar;16(3):110-4.

Augustine PC, Jenkins MC, Dubey JP. Effect of polyclonal antisera developed against dense granule-associated *Neospora caninum* proteins on cell invasion and development in vitro by *N. caninum* tachyzoites. *Parasitology*. 1999 Nov;119 ( Pt 5):441-5.

Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson ML, Reynolds J, Chauvet AE, Dubey JP, Ardans AA. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases

(1990-1992). J Am Vet Med Assoc. 1993 Jan 1;202(1):113-7.

Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG. Experimental fetal and transplacental Neospora infection in the nonhuman primate. Lab Invest. 1994 Aug;71(2):236-42.

Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, BonDurant RH, Ardans AA, Oliver MN, Conrad PA. Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolate. J Vet Diagn Invest. 1994 Apr;6(2):207-15.

Barrett J, Jefferies JR, Brophy PM. Parasite proteomics. Parasitol Today. 2000 Sep;16(9):400-3.

Barta JR, Dubey JP. Characterization of anti-Neospora caninum hyperimmune rabbit serum by western blot analysis and immunoelectron microscopy. Parasitol Res. 1992;78(8):689-94.

Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, Dubey JP. First isolation of Neospora caninum from the feces of a naturally infected dog. J Parasitol. 2001 Jun;87(3):612-8.

Baszler TV, Knowles DP, Dubey JP, Gay JM, Mathison BA, McElwain TF. Serological diagnosis of bovine neosporosis by Neospora caninum monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1996 Jun;34(6):1423-8.

Berkelman T, Stenstedt T (1998) Handbook: 2-D electrophoresis. pp27-55, Amersham biosciences, Uppsala, Sweden.

Bizhanov G, Vyshniauskis G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. Vet Res Commun. 2000 Mar;24(2):103-13.

Bjerkas I, Jenkins MC, Dubey JP. Identification and characterization of Neospora caninum tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1994 Mar;1(2):214-21.

Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd. 1984;70(2):271-4.

Bjerkas I, Presthus J. Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated withencephalomyelitis and myositis in dogs. *APMIS*. 1988 May;96(5):445-54.

Bjorkman C, Holmdahl OJ, Uggla A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet Parasitol*. 1997 Feb;68(3):251-60.

Bjorkman C, Lunden A, Holmdahl J, Barber J, Trees AJ, Uggla A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol*. 1994 Dec;16(12):643-8.

Bjorkman C, McAllister MM, Frossling J, Naslund K, Leung F, Uggla A. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. *J Vet Diagn Invest*. 2003 Jan;15(1):3-7.

Bjorkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol*. 1999 Oct;29(10):1497-507.

Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 1997 Sep 5;277(5331):1453-74.

Blomberg L, Gustafsson L, Cohen PS, Conway PL, Blomberg A. Growth of *Escherichia coli* K88 in piglet ileal mucus: protein expression as an indicator of type of metabolism. *J Bacteriol*. 1995 Dec;177(23):6695-703.

Bobic B, Sibalic D, Djurkovic-Djakovic O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol Obstet Invest*. 1991;31(3):182-4.

Bollag DM, Rozycki MD, Edelman SJ (1996) *Protein methods*. 2nd ed. pp62-67, Wiley-Liss, New York, USA

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Buxton D, Maley SW, Pastoret PP, Brochier B, Innes EA. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet Rec.* 1997 Sep 20;141(12):308-9.

Buxton D, Maley SW, Thomson KM, Trees AJ, Innes EA. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J Comp Pathol.* 1997 Jul;117(1):1-16.

Buxton D, Maley SW, Wright S, Thomson KM, Rae AG, Innes EA. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J Comp Pathol.* 1998 May;118(4):267-79.

Campbell M K, Farrell SO (2003)Protein synthesis: Translation of the genetic message. In *Biochemistry.* 4th ed. pp342, Thomson Learning, Stamford, USA.

Carucci DJ, Yates JR 3rd, Florens L. Exploring the proteome of *Plasmodium*. *Int J Parasitol.* 2002 Dec 4;32(13):1539-42.

Cash P. Proteomics of bacterial pathogens. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2003;83:93-115.

Champion KM, Nishihara JC, Joly JC, Arnott D. Similarity of the *Escherichia coli* proteome upon completion of different biopharmaceutical fermentation processes. *Proteomics.* 2001 Sep;1(9):1133-48.

Chang J, Van Remmen H, Cornell J, Richardson A, Ward WF. Comparative proteomics: characterization of a two-dimensional gel electrophoresis system to study the effect of aging on mitochondrial proteins. *Mech Ageing Dev.* 2003 Jan;124(1):33-41.

Choi C, Ham HJ, Kwon D, Kim J, Cheon DS, Min K, Cho WS, Chung HK, Jung T, Jung K, Chae C. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea. *J Vet Med Sci.* 2002 Jan;64(1):71-3.

Cohen AM, Rumpel K, Coombs GH, Wastling JM.Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2002 Jan;32(1):39-51.

Cohen SL, Chait BT. Mass spectrometry of whole proteins eluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels.*Anal Biochem.* 1997 May



1;247(2):257-67.

Cole RA, Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J Parasitol*. 1995 Oct;81(5):730-2.

Cole RA, Lindsay DS, Blagburn BL, Sorjonen DC, Dubey JP. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Parasitol*. 1995 Apr;81(2):208-11.

Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Ardans A, et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn Invest*. 1993 Oct;5(4):572-8.

Crowther JR (1995) Stages in ELISA. In *ELISA: theory and practice*, pp63-98, Humana press, New Jersey, USA.

D'Souza JM, Wang L, Reeves P. Sequence of the *Escherichia coli* O26 O antigen gene cluster and identification of O26 specific genes. *Gene*. 2002 Sep 4;297(1-2):123-7.

Decoster A, Darcy F, Capron A. Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. *Clin Exp Immunol*. 1988 Sep;73(3):376-82.

Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wouda W, Barkema HW. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol*. 2001 Jun;31(8):747-52.

Dlugonska H, Dytynska K, Reichmann G, Stachelhaus S, Fischer HG. Towards the *Toxoplasma gondii* proteome: position of 13 parasite excretory antigens on a standardized map of two-dimensionally separated tachyzoite proteins. *Parasitol Res*. 2001 Aug;87(8):634-7.

Dobbin CA, Smith NC, Johnson AM. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine toxoplasma infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide. *J Immunol*. 2002 Jul 15;169(2):958-65.

Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered

by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):933-9.

Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkas I, Bjorkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJ, Lindsay DS. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol*. 2002 Jul;32(8):929-46.

Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1988 May 1;192(9):1269-85.

Dubey JP, Jenkins MC, Adams DS, McAllister MM, Anderson-Sprecher R, Baszler TV, Kwok OC, Lally NC, Bjorkman C, Uggla A. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J Parasitol*. 1997 Dec;83(6):1063-9.

Dubey JP, Lindsay DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, Thulliez P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am J Vet Res*. 1996 Mar;57(3):329-36.

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1992 Sep 1;201(5):709-13.

Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol*. 1996 Dec 2;67(1-2):1-59.

Dubey JP, Lindsay DS. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J Vet Diagn Invest*. 1990 Jul;2(3):230-3.

Dubey JP, Lindsay DS. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J Parasitol*. 1989 Oct;75(5):765-71.

Dubey JP, Lindsay DS. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am J Vet Res*. 1989 Sep;50(9):1578-9.

Dubey JP, Romand S, Hilali M, Kwok OC, Thulliez P. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*)

- from Egypt. *Int J Parasitol.* 1998 Mar;28(3):527-9.
- Dubey JP. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J Am Vet Med Assoc.* 1999 Apr 15;214(8):1160-3.
- Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol.* 2003 Mar;41(1):1-16.
- Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol.* 1998 Jul;28(7):1007-13.
- Ellis JT, Ryce C, Atkinson R, Balu S, Jones P, Harper PA. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. *Parasitology.* 2000 Apr;120 ( Pt 4):383-90.
- Evans DJ Jr, Evans DG, Opekun AR, Graham DY. Immunoprotective oral whole cell vaccine for enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea prepared by in situ destruction of chromosomal and plasmid DNA with colicin E2. *FEMS Microbiol Immunol* 1988 Jan;1(1):9-18.
- Feng L, Tao J, Guo H, Xu J, Li Y, Rezwan F, Reeves P, Wang L. Structure of the *Shigella dysenteriae* 7 O antigen gene cluster and identification of its antigen specific genes. *Microb Pathog.* 2004 Feb;36(2):109-15.
- Fleckenstein JM, Kopecko DJ, Warren RL, Elsinghorst EA. Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1996 Jun;64(6):2256-65.
- Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, Moch JK, Muster N, Sacci JB, Tabb DL, Witney AA, Wolters D, Wu Y, Gardner MJ, Holder AA, Sinden RE, Yates JR, Carucci DJ. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature.* 2002 Oct 3;419(6906):520-6.
- Fountoulakis M, Langen H. Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem.* 1997 Aug 1;250(2):153-6
- Francis JM, Joynson DH. Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and

immunosorbent agglutination assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993 Jul;12(7):556-9

Gassmann M, Thommes P, Weiser T, Hubscher U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 1990 May;4(8):2528-32.

Gastens MH, Fischer HG. *Toxoplasma gondii* eukaryotic translation initiation factor 4A associated with tachyzoite virulence is down-regulated in the bradyzoite stage. *Int J Parasitol.* 2002 Sep;32(10):1225-34.

Geissler S, Sokolowska-Kohler W, Bollmann R, Jungblut PR, Presber W. *Toxoplasma gondii* infection: analysis of serological response by 2-DE immunoblotting. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999 Aug 15;25(3):299-311.

Gondim LF, Gao L, McAllister MM. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J Parasitol.* 2002 Dec;88(6):1159-63.

Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 2000 Apr;21(6):1037-53.

Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 1996 Jun;34(6):1506-11.

Gottstein B, Eperon S, Dai WJ, Cannas A, Hemphill A, Greif G. Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol Res.* 2001 Jan;87(1):43-8.

Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev.* 1991;13:60-98.

Gustafsson E, Thoren K, Larsson T, Davidsson P, Karlsson KA, Nilsson CL. Identification of proteins from *Escherichia coli* using two-dimensional semi-preparative electrophoresis and mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2001;15(6):428-32.

Haarmann C, Karch H, Frosch M, Schmidt H. A 3.3-kb plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is closely related to the core region of the *Salmonella typhimurium* antibiotic resistance plasmid NTP16. *Plasmid*. 1998;39(2):134-40.

Haas G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, Diescher S, Goebel UB, Vogt K, Roznowski AB, Wiedenmann BJ, Meyer TF, Aebischer T, Jungblut PR. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics*. 2002 Mar;2(3):313-24.

Hanash S. Disease proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):226-32.

Harkins D, Clements DN, Maley S, Marks J, Wright S, Esteban I, Innes EA, Buxton D. Western blot analysis of the IgG responses of ruminants infected with *Neospora caninum* and with *Toxoplasma gondii*. *J Comp Pathol*. 1998 Jul;119(1):45-55.

Heckerroth AR, Tenter AM, Hemphill A, et al. (2000) Evaluation of cross-reactivity between tachyzoites of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by two-dimensional gel electrophoresis. In Hemphill A, Gottstein B; A European perspective on *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 30: 877-924.

Hemphill A, Gajendran N, Sonda S, Fuchs N, Gottstein B, Hentrich B, Jenkins M. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol*. 1998 Mar;28(3):429-38.

Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2003 Sep;14(9):931-42.

Hilali M, Romand S, Thulliez P, Kwok OC, Dubey JP. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. *Vet Parasitol*. 1998 Feb 28;75(2-3):269-71.

Holmdahl OJ, Mattsson JG. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology*. 1996 Feb;112 ( Pt 2):177-82.

Howe DK, Sibley LD. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 1999 Oct;29(10):1489-96.

Howe DK, Tang K, Conrad PA, Sverlow K, Dubey JP, Sibley LD. Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 May;9(3):611-5.

Hur K, Kim JH, Hwang WS, et al. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in Korea dairy cattle by indirect immunofluorescent antibody assay. *Korean J Vet Res*. 1998 38: 859-866.

Hwang EK (2003) Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native cattle raised in Kangwon province. *Korean J Vet Res*. 2003;43: 283-288.

Jacobs D, Dubremetz JF, Loyens A, Bosman F, Saman E. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Mar 15;91(2):237-49.

Jardine JE. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet Parasitol*. 1996 Apr;62(3-4):231-40.

Jenkins M, Baszler T, Bjorkman C, Schares G, Williams D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int J Parasitol*. 2002 May;32(5):631-6.

Jensen L, Jensen TK, Lind P, Henriksen SA, Uggla A, Bille-Hansen V. Experimental porcine neosporosis. *APMIS*. 1998 Apr;106(4):475-82.

Jensen ON, Vorm O, Mann M. Sequence patterns produced by incomplete enzymatic digestion or one-step Edman degradation of peptide mixtures as probes for protein database searches. *Electrophoresis*. 1996 May;17(5):938-44

Jungblut P, Thiede B. Protein identification from 2-DE gels by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 1997 May-Jun;16(3):145-62.

Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Muller EC, Sokolowska-Kohler W, Grabher G, Stoffler G. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis*. 1999 Jul;20(10):2100-10.

Karas M, Gluckmann M, Schafer J. Ionization in matrix-assisted laser

desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom.* 2000 Jan;35(1):1-12. Kim JH, Lee JK, Lee BC, Park BK, Yoo HS, Hwang WS, Shin NR, Kang MS, Jean YH, Yoon HJ, Kang SK, Kim DY. Diagnostic survey of bovine abortion in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*. *J Vet Med Sci.* 2002 Dec;64(12):1123-7.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988 Oct 15;60(20):2299-301.

Kim JH, Sohn HJ, Hwang WS, Hwang EK, Jean YH, Yamane I, Kim DY. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Vet Parasitol.* 2000 Jun 10;90(1-2):147-54.

Kim JT, Park JY, Seo HS, Oh HG, Noh JW, Kim JH, Kim DY, Youn HJ. In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 2002 Jan 3;103(1-2):53-63.

Klade CS, Voss T, Krystek E, Ahorn H, Zatloukal K, Pummer K, Adolf GR. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics.* 2001 Jul;1(7):890-8.

Klade CS. Proteomics approaches towards antigen discovery and vaccine development. *Curr Opin Mol Ther.* 2002 Jun;4(3):216-23.

Krause E, Wenschuh H, Jungblut PR. The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Anal Chem.* 1999 Oct 1;71(19):4160-5.

Lally NC, Jenkins MC, Dubey JP. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996 May;3(3):275-9.

Landry F, Lombardo CR, Smith JW. A method for application of samples to matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight targets that enhances peptide detection. *Anal Biochem.* 2000 Mar 1;279(1):1-8.

Lawrence JG, Ochman H, Hartl DL. Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria. *J Gen Microbiol.* 1991 Aug;137 ( Pt 8):1911-21.

Lee EG, Kim JH, Shin YS, Shin GW, Suh MD, Kim DY, Kim YH, Kim GS, Jung

TS. Establishment of a two-dimensional electrophoresis map for *Neospora caninum* tachyzoites by proteomics. *Proteomics*. 2003 Dec;3(12):2339-50.

Lee KH, Bae DW, Lim DB. Evaluation of parameters in peptide mass fingerprinting for protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mol Cell*. 2002 13: 175-184.

Lee PS, Lee KH. *Escherichia coli*--a model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics. *Biotechnol Bioeng*. 2003 Dec 30;84(7):801-14.

Lee YJ, Kang MS, Woo YK, Mo IP, Tak RB. Competitive exclusion against *Salmonella gallinarum* of *Salmonella enteritidis* infected chickens. *J Vet Sci*. 2001 Apr;2(1):33-6.

Liddell S, Jenkins MC, Collica CM, Dubey JP. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *J Parasitol*. 1999 Dec;85(6):1072-5.

Liebler DC (2002) Introduction to proteomics: tools for the new biology. pp3-13, Humana press Inc, New Jersey, USA.

Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, Remington JS. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the *Platelia Toxo IgM* test. *J Clin Microbiol*. 1997 Jan;35(1):174-8.

Lior, H. (1996). Classification of *Escherichia coli*. In C. L. Gyles (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Cab International Wallingford, United Kingdom pp 31-72.

Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:437-73.

McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. *Nature*. 2001 Oct 25;413(6858):852-6.



Minor, L.L., Salmonella. In; Bergey's Manual of systematic bacteriology 1st ed, Krig, NR, Holt JG eds, Williams & Wilkins, Baltimore, 1984, 427-458

Molbak K, Gerner-Smidt P, Wegener HC. Increasing quinolone resistance in Salmonella enterica serotype Enteritidis. Emerg Infect Dis. 2002 May;8(5):514-5.

Montoya JG. Laboratory diagnosis of Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis. J Infect Dis. 2002 Feb 15;185 Suppl 1:S73-82.

Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Gorg A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. Proteomics. 2001 Nov;1(11):1359-63.

Murray P.R., Telford I.M., Tenover F.C., et al. Annual of Clinical Microbiology 7th ed. ASM press, Washington DC; 1999, 467-471

Natsume T, Taoka M, Manki H, Kume S, Isobe T, Mikoshiba K. Rapid analysis of protein interactions: On-chip micropurification of recombinant protein expressed in Escherichia coli. Proteomics. 2002 Sep;2(9):1247-53.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis. 1988 Jun;9(6):255-62.

Nordhoff E, Egelhofer V, Giavalisco P, Eickhoff H, Horn M, Przewieslik T, Theiss D, Schneider U, Lehrach H, Gobom J. Large-gel two-dimensional electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry: an analytical challenge for studying complex protein mixtures. Electrophoresis. 2001 Aug;22(14):2844-55.

Nystrom T. The glucose-starvation stimulon of Escherichia coli: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival. Mol Microbiol. 1994 Jun;12(5):833-43.

O'Brien AD, Tesh VL, Donohue-Rolfe A, Jackson MP, Olsnes S, Sandvig K, Lindberg AA, Keusch GT. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. Curr Top Microbiol Immunol. 1992;180:65-94.

- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975 May 25;250(10):4007-21.
- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 2000 Jun 15;405(6788):837-46.
- Pare J, Thurmond MC, Hietala SK. Neospora caninum antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol.* 1997 Feb;83(1):82-7.
- Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jul;11(3):450-79.
- Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:311-23.
- Pinon JM, Toubas D, Marx C, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A, Villaume M, Foudrinier F, Lèpan H. Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1990 Aug;28(8):1739-43.
- Pupo GM, Karaolis DK, Lan R, Reeves PR. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect Immun.* 1997 Jul;65(7):2685-92.
- Rios M, Prado V, Trucksis M, Arellano C, Borie C, Alexandre M, Fica A, Levine MM. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J Clin Microbiol.* 1999 Mar;37(3):778-81.
- Sager H, Gloor M, Bjorkman C, Kritznner S, Gottstein B. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. *Vet Parasitol* 2003 Feb 28;112(1-2):1-10.
- Seliger B, Kellner R. Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics.* 2002 Dec;2(12):1641-51.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996 Mar 1;68(5):850-8.

Smith, J. F. (2004). *E. coli* O157:H7 infection. Smith Medical Library. The Thompson Corporation.

Snoeyenbos GH, Williams JE, Pomeroy BS I. Salmonellosis, in ; Disease of poultry 9th ed. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CQ, et al eds. Iowa State University Press. Ames Iowa, 1991, 72-130.

Sowers EG, Wells JG, Strockbine NA. Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1996 May;34(5):1286-9.

Sperling K. From proteomics to genomics. *Electrophoresis.* 2001 Aug;22(14):2835-7.

Su C, Brandt LJ. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med.* 1995 Nov 1;123(9):698-714.

Thatcher EF, Gershwin LJ. Generation and characterization of murine monoclonal antibodies specific for bovine immunoglobulin E. *Vet Immunol Immunopathol.* 1988 Feb;18(1):53-66

Thompson LJ, de Reuse H. Genomics of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2002;7 Suppl 1:1-7.

Tizard IR (1996) *Veterinary immunology.* 5th ed. pp5-7, W.B. Saunders, Philadelphia, USA.

Todar, K (2002). *Pathogenic E. coli.* Bacteriology. Univ. of Wisconsin-Madison. 330.

Tonella L, Hoogland C, Binz PA, Appel RD, Hochstrasser DF, Sanchez JC. New perspectives in the *Escherichia coli* proteome investigation. *Proteomics.* 2001 Mar;1(3):409-23.

Towbin H, Ozbey O, Zingel O. An immunoblotting method for high-resolution isoelectric focusing of protein isoforms on immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2001 Jun;22(10):1887-93.

Villena I, Aubert D, Brodard V, Quereux C, Leroux B, Dupouy D, Remy G, Foudrinier F, Chemla C, Gomez-Marin JE, Pinon JM. Detection of specific immunoglobulin E during maternal, fetal, and congenital toxoplasmosis. *J Clin*

Microbiol. 1999 Nov;37(11):3487-90.

Ward LR, de Sa JD, Rowe B. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol Infect.* 1987 Oct;99(2):291-4.

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 1995 Jul;16(7):1090-4.

Westermeier R, Naven T (2002) Expression proteomics. In *Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis*. p97, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Zhu H, Bilgin M, Snyder M. Proteomics. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:783-81