GOVP1200103174

최 종
연구보고서

분자생물학적 기술을 응용한 닭 살모넬라균 감염증의 진단과 예방기술 개발

Development of the Measures for Diagnosis and Prevention of Avian Salmonellosis Using Molecular Techiques

제1세부과제 : 닭 살모넬라균증에 대한 분자생물학적 진단법 개발 및 국내분리 살모넬라균의 핵염기 구조 분석

제2세부과제 : 살모넬라균의 방어항원 유전자 클론닝과 재조합 subunit protein의 발현 및 성상시험

제3세부과제 : 살모넬라균 유전자 재조합 변이주(mutants) 생균백신 개발

제4세부과제 : 살모넬라균 재조합 항원단백 정제, 생화학적 성상시험 및 재조합 변이주의 대량 생산 체계 구축

협동연구과제 : 분자생물학적 기술로 개발된 백신의 안전성 및 효능시험

연 구 기 관

충 남 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “분자생물학적 기술을 응용한 닭 살모넬라균 감염증의 진단과 예방기술 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 10월 일

주관연구기관명 : 충남대학교
총괄연구책임자 : 전 무 형
1 세부연구책임자 : 전 무 형
2 세부연구책임자 : 김 철 중
3 세부연구책임자 : 김 현 수
4 세부연구책임자 : 송 경 빈
협동연구기관명 : 녹십자수의약품주식회사
협동연구책임자 : 이 상 선

요 약 문

Ⅰ. 제 목

분자생물학적 기술을 응용한 닭 살모넬라균 감염증의 진단과 예방기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

국내 양계산업에서 만성적 피해요인으로 간주되고 있는 추백리와 닭티푸스를 포함한 닭의 살모넬라균 감염증의 진단과 예방법을 분자유전학적 기법을 이용하여 개발함으로써 현재 사용되고 있는 진단법보다 더욱 간편한고 신속·정확한 기법을 고안하고, 또한 부가가치가 높은 첨단기법을 이용하여 유전자재조합 생균변이주(mutants) 백신 또는 subunit vaccine을 개발하여 산업화시킬 수 있는 기초를 확립하고자 한다.

2. 연구개발의 중요성

국내 양계농장의 사육형태로는 최첨단 자동기계시설을 갖춘 농장에서부터 비닐하우스 사육형태 등 다양하며 이로 인해 발생되는 전염병의 유형도 매우 다양하다. 이런 전염병 가운데 *Salmonella* 속균에 의해 발병되는 추백리와 닭티푸스는 장염과 패혈증을 주로 일으키고 수평전파 뿐만 아니라 난계대에 의한 수직전염을 하기 때문에 근대적 양계산업이 발족된 이래 지난 30년간 고질적인 피해요인으로 작용하고 있으며, 특히 최근에는 이로 인한 피해가 급증하여 양계농가에 많은 손실을 주고 있다. 이 중 추백리는 제 1 종 법정전염병으로 규정하여 국가차원에서 지속적인 방역대책을 강구하고 있음에도 불구하고 감염농장의 수는 증가추세에 있으며, 닭티프스에 의한 폐사율은 중추와 성계에서 50 60%에 달하는 농장도 있으며 이들 살모넬라감염증으로 인해 농장이 폐업하고 문을 닫는 예가 많다. 이외에 주요한 닭의 *Salmonella*균 감염증으로는 *S. typhimurium*, *S.*

*enteritidis*에 의한 전염병 등이 있으며 닭에서 장염과 패혈증을 유발하고 사람에서 식중독을 일으켜서 피해를 주고 있다. 그러므로 본 병을 근절시키기 위한 기술개발이 절실히 요구된다.

*Salmonella*속균의 진단법으로 일반적으로 이용되고 있는 세균배양 동정 방법은 증균배양, 선택배양과 생화학적 성상 검사 등으로 노력과 시간이 많이 소요되며 이런한 방법은 극소량의 균감염이나 활력이 저하된 균이 존재할 때는 검출이 곤란하다는 단점이 있다. 또한 면역학적 검사법으로는 전혈 급속 응집반응, 시험관 응집반응 등이 있으나 다른 균속과 교차반응이 일어나는 비특이 양성반응이 문제가 되고있다. 최근 일부 연구자들에 의해 닭유래 *Salmonella*속균의 신속한 검출을 위해 PCR기법을 응용하여 보고한 바 있으나 미진한 실정이다. 따라서 국내 양계농장에서 지속적으로 문제가 되고있는 추백리, 닭티푸스를 포함한 살모넬라 감염증의 신속·정확하고 간편한 검출을 위해 효소면역시험법 및 유전공학기법을 이용한 간편하고 신속•정확한 진단법의 개발이 절실히 요구된다.

또한 살모넬라 감염증 가운데 국내에서는 유일하게 닭티푸스에 대한 예방약이 사균백신 형태로 개발되어 공급되고 있으나 면역원성의 부족으로 인한 불완전한 방어효과, 균체독소에 의한 접종스트레스 및 부작용 등이 문제되고 있다. 본 병에 대해 외국에서는 Live vaccine이 활용되고 있으나 야외 또는 생체조건에서 백신균주의 병원성 회귀능에 대한 불확실성, 접종스트레스, 생균의 난소감염과 수직전파 등이 문제되며 또한 *S. gallinarum* 청정계균에 생균백신을 사용할 때 *Salmonella*균 free flock를 확립하는데 저해요인으로 지목되고 있다. 추백리에 대한 백신은 항원변이성, 병인기전의 특이성과 방역상의 문제점으로 인해 국내외에서 아직 개발되지 않고 있으며, *S. typhimurium* 및 *S. enteritidis* 감염증에 대한 예방백신은 외국에서 사균 또는 생균백신으로 개발하여 일부 사용되고 있으나 위에서 언급한 제반문제가 해결되지 않고 있다.

따라서 본 연구과제를 통해 면역효소시험법과 polymerase chain reaction(PCR) 기법을 이용한 살모넬라균 진단기술을 개발하고, 살모넬라균의 방어항원 유전자에 대한 DNA 염기서열을 분석하고, 재조합기법을 이용한 subunit protein 과 비병원성 변이주(mutants)를 작제하여 백신 개발을 위한 기초를 확립하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 우리나라 양계농장에서 장염과 패혈증 등을 유발하고 양계장의 사양위생관리와 방역 관리 차원에 많은 문제점과 경제적 손실을 일으키고 있는 추백리와 닭티푸스를 포함한 살모넬라균 감염증의 근절대책을 확립하기 위해 분자유전학적 기술을 응용하여 진단과 예방대책을 확립하기 위한 일련의 연구를 3년간에 걸쳐 수행하였다. 제 1 세부과제는 " 닭 살모넬라균증에 대한 분자생물학적 진단법 개발 및 국내분리 살모넬라균의 핵염기구조 분석", 제 2 세부과제는 "살모넬라균의 방어항원 유전자 클론닝과 재조합 subunit protein의 발현 및 성상시험", 제 3 세부과제는 "살모넬라균 유전자 재조합 변이주(mutants) 생균백신 개발", 제 4 세부과제는 "살모넬라균 재조합 항원단백 정제, 생화학적 성상시험 및 재조합 변이주의 대량 생산 체계 구축" 그리고 협동과제에서는 "분자생물학적 기술로 개발된 백신의 안전성 및 효능시험" 에 대해 각각 연구를 수행하였다.

이와같은 연구를 통하여 추백리, 닭티푸스 등 살모넬라균 감염증에 대한 분자역학적 기초자료를 획득하고, 살모넬라균을 분자수준에서 검색하고 조기진단함으로써 살모넬균 감염증의 근절대책을 확립하는데 유용한 자료를 확보하였으며, 또한 변이주(mutants) 작제에 의한 살모넬라 생균백신 개발과 subunit vaccine 개발의 기초를 확립하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

국내 양계산업에서 만성적 피해요인으로 간주되고 있는 추백리와 닭티푸스를 포함한 닭의 살모넬라균 감염증의 진단과 예방법을 분자유전학적 기법을 이용하여 개발함으로써 현재 사용되고 있는 진단법보다 더욱 간편한고 신속·정확한 기법을 고안하고, 또한 부가가치가 높은 첨단기법을 이용하여 유전자재조합 생균변이주(mutants) 백신 또는 subunit vaccine을 개발하여 산업화시킬 수 있는 기초를 확립하고자 일련의 시험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 균 배양법과 자동미생물검출기를 이용하여 양계장과 도계장에서 채취한 가검물에 대해 살모넬라균 분리시험을 실시한 바, *S. typhimurium*의 분리 빈도가 가장 높았다. 또한 표준 *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium* 및 *S. enteritidis*에 대한 단클론성 항체를 생산하고 이것을 응용하여 Sandwich ELISA법을 확립하였다.

Salmonella serogroup D1에 속하는 *S. pullorum*, *S. gallinarum* 및 *S. enteritidis*를 신속하고 특이적으로 검출하기 위해 *sef*A 유전자를 증폭하는 PCR기법을 확립하기 위해 시험을 수행하였다. *sef*A gene 증폭을 위해 제조된 Sf I과 Sef I primers를 이용한 PCR에서 513bp 및 488bp 크기의 DNA 분절이 각각 관찰되었다. Sf I primer를 이용하여 확립된 PCR의 감수성을 시험한 바 1*pg*의 *S. enteritidis* DNA에서도 *sef*A gene이 증폭되었으며, 증폭된 PCR products를 *Bam*HI과 *Hae*III로 처리하여 *sef*A gene임을 확인하였다. 확립된 PCR기법으로 *Salmonella* 표준균주 및 야외분리균주, *E. coli*, *Yersinia spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* 등 모두 28균종의 73균주에 대해 시험한 바, 본 PCR법은 *Salmonella* serogroup D1에 대해 특이하게 양성반응을 나타내었다. 본 시험에서 응용한 집락채취법과 rapid boiled-lysate기법을 이용한 PCR은 *Salmonella* serogroup D1 검출에서 신속하고 특이성이 높았다. 또한 *S. enteritidis agfA* gene을 PMAL-CR1 vector에서 발현하고 amylose resin 으로 정제한 *Salmonella* fimbrae subunit protein AgfA을 이용하여 radial immunodiffusion enzyme assay(RIDEA)을 확립하고 살모넬라균 감염 닭 검출시험을 수행하였다. *S. pullorum*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* 및 *E. coli*를 감염시킨 토끼와 닭을 이용하여 RIDEA-*agf*A, RIDEA-OMP 및 ELISA-OMP의 감수성과 특이성을 비교시험하고 야외 가검물에 대한 응용시험을 수행하였다. RIDEA-*agfA*는 RIDEA-OMP와 ELISA-OMP에 비해 살모넬라균에 감염된 닭을 검출하는데 특이성이 높았다.

2) *S. enteritidis*는 다양한 종류의 강력한 부착성을 가지는 fimbriae type이 있 다. 그중 대표적인 것으로 *fim*A (type 1/SEF21 fimbriae), *agf*A (thin aggregative fimbriae/SEF17 fimbriae), *sef*A (SEF14 fimbriae) 그리고 *sef*D (SEF18 fimbriae) 등이 있다. 이 중 최근 밝혀진 SEF17 operon은 세가지 연속된 유전자인 *agf*BAC로 구성되는 것으로 알려졌다. SEF17 fimbrin의 구조유전

자인 *agf*A와 fimbrin like protein precusor인 *agf*B를 각각의 *Salmonella* 균속으로부터 PCR을 이용하여 증폭한 다음 pQE9, pGEX-2T 및 pMAL-cri 백터를 이용하여 클로닝하였고, 세포질내에서 maltose binding fusion protein으로 발현되는 시스템을 이용하여, *E. coli*에서 대량으로 발현하였다. 재조합된 AgfA와 AgfB protein은 약 56kDa 정도의 molecular size를 가지며, 대량 발현한 protein을 amylose resin을 이용하여 정제하였다. 또한 살모넬라균체로부터 SEF17 fimbriae를 추출 정제하였다. 한편 *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*의 *agf* 유전자 염기서열을 비교 분석하여 균종간 homology를 비교한 바, *agf*A의 경우 98%, *agf*B의 경우 99%의 homology를 보였다. 정제된 MBP-fused AgfA protein을 BALB/c 마우스, SPF 병아리와 토끼에 접종하여 면역반응을 유도하였으며, Western blot으로 항체형성을 확인하였다. ELISA기법을 확립하고 SPF 병아리에 대한 항체역가를 측정하였던 바, 4주째에 agfA 50μg/head 및 100μg/head 접종군에서 높은 ELISA치가 관찰되었으며, 접종후 4주 및 6주째에 채취한 혈청샘풀의 ELISA치에는 유의한 변화가 없었다. 접종후 7주째에 wild type *S. typhimurium*을 공격하고 9주째에 측정하였던 바 ELISA치는 다소 하강했으며, 항원 접종군은 공격에 대해 방어능을 나타내었다.

3) *Salmonella* 병원성 유전자 조작에 의한 유전자 재조합 변이 생균백신 주를 개발하기 위하여 시험을 수행하였다. 병원성 유전자의 염기서열 분석 및 위치확인을 위하여 *S. typhimurium*, *S. enteritidis* *S. gallinarum*, 및 *S. pullorum*의 병원성 인자의 발현에 중요한 regulatory factor로 작용하는 *rpo*S gene의 위치, 염기서열, strain간의 nucleotide sequence variation 등 을 비교 분석한 결과, 이들 serogroup간의 *rpo*S gene의 size가 1155bp로 모두 동일하였으며, chromosomal DNA 상에서 동일한 위치에 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 nucleotide homology가 strain간에 99.3 99.7%로 거의 동일하였다. *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*는 P22 bacteriophage 에 대하여 감수성이 있기 때문에 *rpo*S mutant gene을 포함하는 P22를 이용하여 homologous recombination법에 의하여 live mutant을 작제 할 수 있었으며 P22에 대한 감수성이 없는 *S. gallinarum*에 대한 mutant 작제는 Tn 10에서 유래된 transposase와 *rpo*S gene이 삽입된 pBR322을 이용한 electroporation에 의하여

*rpo*S null mutant를 작제하였다. 이들 live mutant는 bubble test 와 ATR test에 의하여 비 병원성임이 증명하였다.

작제된 mutants에 대한 마우스에 대한 병원성시험에서 BALB/c 마우스에 대한 병원성이 강한 *S. typhimurium*의 mutant는 wild type에 비해 병원성이 현저히 감소되었음을 증명할 수 있었다. 그러나 ICR 마우스를 이용한 *S. enteritidis*는 wild type와 mutant의 병원성시험에서는 두 strain 모두 ICR 마우스에 대해 병원성이 인정되지 않았다. 또한 *S. gallinarum* mutant는 5주령의 병아리에서 병원성을 나타내지 않았다. 4주령 SPF 백색레그혼 닭에 대한 *S. typhimurium* mutant의 안전성 및 면역원성시험에서 mutant 접종군은 특이한 임상증상이 실험기간동안 관찰되지 않았으며, Wild type *S. typhimurium*을 이용한 공격접종 후 대조군에서 가벼운 설사 및 식욕부진이 관찰되었으나 mutant접종군에서는 임상증상이 발견되지 않았다. 또한 mutants 접종군의 살모넬라 특이 항체가(geometric mean titer)는 접종 후 4주, 6주 및 9중에서 각각 2.09±0.56, 1.85±0.43 및 2.07±0.56이었으며, 대조군에서는 공격접종 후 2주에서 2.56±0.40이었다.

결론적으로 본 연구에서 개발된 *Salmonella* mutant는 wild type *Salmonella*와 비교할 때 실험동물 및 목적동물에 대하여 병원성이 현저히 저하된 것으로 나타났으며, mutant 접종군은 병원성 균주의 공격을 방어하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 mutant *Salmonella*는 안전성과 면역원성이 있는 것으로 생각되며, 작제된 *Salmonella* 변이 생균주는 vaccine candidate로 개발될 수 있을 것으로 생각된다.

4) *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*의 outer membrane protein(OMP)를 Sarkosyl과 β-octyl-glucoside로 용해하여 분자량 등 그 생화학적 특성을 조사하였고, 제2세부과제에서 제조한 pQE9 vector에 *S. typhimurium agf*B와 *S. gallinarum agf*A, B를 cloning한 균을 받아 발현실험을 하였으며, *S. pullorum agf*A, B와 *S. enteritidis agf*A를 pGEX-2T vector에 GST fusion protein으로 발현하였다.

S. pullorum, *S. gallinarum*과 *S. enteritidis*의 *agfA* gene을 pMAL-CR1에 cloning하여 MBP-AgfA fused protein을 각각 제조하고 성상을 시험하였다. 발현된 *S. enteritidis agfA*는 amylose resin에 3시간 동안 binding(4℃)하여

column buffer로 3 4회 세척하여 10mM maltose(in column buffer)로 elution 하여 MBP-fusion AgfA protein을 정제할 수 있었다. 그러나 *S. pullorum*과 *S. gallinarum*은 MBP가 MBP-fusion AgfA protein과 함께 elution이 되었기 때문에 MBP-fusion AgfA protein만을 분리하고자 하였다. 따라서 FPLC를 이용하여 gel permeation chromatography로 sephacryl S-200HR column을 사용하였고, ion exchange chromatography로는 anion exchanger인 MonoQ column을 사용하였다.

재조합단백 항원의 대량 생산체제 확립을 위해 *S. enteritidis*의 cloned cell을 대량 발현하여 *S. enteritidis* MBP-fusion AgfA protein을 대량 제조하였으며, SDS-PAGE를 이용하여 그 중에 순도가 높은 것만을 골라서 토끼에게 접종한 후 western blot으로 항체형성을 확인하였다. 야외분리주와 변이주의 생화학적 성상 비교를 위하여 제 3 세부과제에서 재조한 *S. typhimurium* mutant OMP의 생화학적 성상 시험을 하였다. 야외분리주와 변이주를 같은 조건에서 배양하였으며, 변이주의 경우는 LB 배지에 카나마이신을 첨가하였다. 초원심분리기(30,000rpm, 4℃, 1hr)와 2% Sarkosyl 을 이용하여 분리한 OMP를 SDS-PAGE에서 비교한 결과, 야외분리주와 변이주의 차이점은 없었다. 또한 *S. typhimurium*의 야외 분리주와 변이주를 같은 조건에서 10회 계대배양하고 OMP를 정제하여 SDS-PAGE로 확인한 결과, 변이주는 계대배양에서도 항원단백이 안정하다는 것을 알 수 있었다. 또한 계대하지 않은 것과 계대한 것의 야외분리주와 변이주의 항원을 비교한 바 차이가 없었다.

5) 작제된 *S. typhimurium* mutants(KM resistant)를 Fermenter(한국발효기 주식회사, model 300L)를 이용하여 대량 배양할 때 최적의 발육조건을 규명하기 위하여 공기(산소)공급량, 배양온도, pH, enrichments 및 antifoam의 종류에 따른 균증식능을 시험하였다. 그 결과 온도는 37℃, 공기공급량은 50 ℓ/min, 그리고 pH 7.0에서 증식능이 높았다. 공시한 enrichments와 antifoam은 dextran+iron과 AF289가 각각 가장 높은 증식성을 보였다. 고농도 균액의 *S. typhimurium* mutants를 마우스에 접종한 바 안전하였고 병원성 균주 공격에 대해 높은 방어효능을 나타냈다. 또한 mutants를 기니픽에 접종하고 안전성과 면역원성을 시험한 바 높은 안전성과 응집항체역가가 인정되었다. *S. enteritidis agfA* subunit protein을 마우스와 기니픽에 각각 접종한 바, 마우스

에서 높은 안전성과 병원성균주의 공격에 대한 방어효능이 관찰되었다. 기니픽에서는 안전성과 ELISA시험에서 높은 항체역가가 관찰되었다.

2. 활용에 대한 건의

1) 본 연구를 통하여 얻어진 살모넬라균 검출을 위한 효소면역시험 및 PCR 진단 기법 등은 닭질병 방역에 연관된 연구소, 시험소, 대단위 양계농장 부설 실험실, 대학실험실, 양계농장, 동물병원 등에 홍보하고 RIDEA진단법은 야외적용에 관한 보완시험을 거쳐 특허 출원 및 산업체에 기술이전하여 활용할 수 있도록 한다.
2) 본 연구를 통하여 얻어진 재조합 유전자 변이주(mutants) 생균백신과 subunit protein 생산과 관련된 결과를 특허출원하고 기술과 노하우를 협동연구 산업체에 기술전수하고 야외응용시험 등의 보완시험을 거친 후 백신을 생산할 수 있도록 적극 추진한다.
3) 시험기간 중 국내분리 살모넬라균의 유전자 분석에서 얻어진 정보는 국내 미생물 유전자원 확보 및 응용에 활용될 것임.
4) 얻어진 결과를 국내 및 국외 학술대회에 발표하고 학회지에 게재함으로써 이 분야 연구에 기초자료로 활용할 수 있게 한다.
5) 얻어진 결과는 닭 살모넬라 감염증의 진단과 예방뿐만 아니라 소, 돼지에서 문제되는 살모넬라증, 사람의 살모넬라성 식중독 그리고 환경미생물학적 연구에 직접 활용될 것으로 예상된다.

SUMMARY

Project Title: Development of the Measures for Diagnosis and Prevention of Avian Salmonellosis Using Molecular Techniques

Avian salmonellosis including pullorum disease and fowl typhoid has been recognized an important scourge factor, causing heavy economic losses in the poultry industry in Korea. To develope more advanced measures for diagnosis and prevention of avian salmonellosis using up-to-date molecular biotechnology, this project was designed and carried out in the aspects of molecular diagnosis, genetically engineered *Salmonella* vaccines including subunit vaccine and mutants vaccine, and biochemical characteristics of the recombinant proteins, in cooperation with a veterinary pharmaceutical company. The results obtained during three years are as follows:

1. By the culture methods and the automatic microbial identification system, the specimens from poultry farms and poultry-processing factory were examined. *S. typhimurium* showed the highest frequency of isolation. The monoclonal antibodies against the reference strains of *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium and S. enteritidis* were produced and using these antibodies a Sandwich ELISA was established to detect *Salmonella* infections. To develop the rapid and specific detection methods for *Salmonella* serogroup D1, a PCR technique for the amplification of *sef*A gene was established. The bacterial genomic DNA was extracted by colony-picking and rapid boiled-lysate technique. The established PCR was as sensitive as to detect 1*pg* of *S. enteritidis* DNA. When 73 strains in 28 genera including the reference strains and the field isolates of various *Salmonella* serotypes, *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *E. coli*,

Listeria spp., Micrococcus luteus, Rhodococcus equi, Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Vibrio parahemolyticus, Yersinia spp. etc. were studied. The established PCR yielded specifically positive results with only *Salmonella* serogroup D1. The PCR for *sef*A gene could be a potential candidate for the specific detection method for *Salmonella* serogroup D1.

A radial immunodiffusion enzyme assay(RIDEA) using *Salmonella* fimbriae subunit protein *agf*A was designed and evaluated. The antigen was prepared by expression of *agf*A gene from *S. enteritidis* in PMAL-CR1 vector, and the maltose-binding fusion protein was purified by amylose resin. Antisera to three *Salmonella serovars* including *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. enteritidis* and two strains of *E. coli* were raised in rabbits and chickens, and the reactivity was tested by RIDEA with *agf*A and OMP from *S. enteritidis*. RIDEA with *agf*A showed the higher sensitivity and the lower cross reactivity in comparision with RIDEA with OMP. Serum samples obtained from five chicken flocks with prevalent outbreak of salmonellosis were tested by agglutination, ELISA(OMP) and RIDEA(*agf*A and OMP). Based on the agglutination test, RIDEA with *agf*A revealed the higher specificity than the assays with OMP antigens. The results suggested that RIDEA with *agf*A could be a potential candidate for detection of *Salmonella* infection in chicken.

2. *S. enteritidis* enteropathogens produce a variety of potentially adherent fimbrial types including *fim*A(type-1/SEF21 fimbriae), *agf*A(thin aggregative fimbriae/SEF17 fimbriae), *sef*A(SEF14 fimbriae) and *sef*D(SEF18 fimbriae). The SEF17 operon has recently been characterized and comprises three contiguous genes, *agf*BAC. The structural genes for the SEF17 fimbrin, *agf*A, and fimbrin like protein precusor, *agf*B, isolated from *Salmonella* spp. were amplified by the polymerase chain reaction, cloned using pQE9, pGEX-2T and pMAL-cri vectors, sequenced and expressed as a fusion protein with Maltose-binding protein(MBP) in *E. coli*. Expression of AgfA

and AgfB in *E. coli* yields a cytoplasmic protein with molecular mass of 56kDa, as determined by SDS-PAGE. The fusion proteins were purified by amylose resin. The SEF17 protein from *Salmonella* also purified by unconventional method. The nucleotide sequences of *agf* of *S. enteritidis* were compared with the corresponding sequences in *S. pullorum*, *S. gallinarum* and *S. typhimurium*. The homology was considerably high as 98% for *agf*A and 99% for *agf*B. Purified MBP-fused AgfA protein was inoculated into one-month-old NewZealand white rabbit, BALB/c mouse and SPF chicken. The specific antibody was detected with Western blotting. The antibody titer of SPF chicken was measured by the standardized ELISA. Serum samples were collected from the chicken at the 4th, 6th and 9th weeks post inoculation. The high ELISA values were observed in the chickens injected with the subunit protein of 50㎍/head or 100㎍/head at the 4th to 6th weeks post inoculation. No significant differences were observed between the values of the 4th and the 6th weeks. Following challenging of wild type *S. typhimurium* at the 7th weeks post inoculation, ELISA values were slightly decreased at the 9th weeks post inoculation, but protectivity of the immunized chickens were recognized.

3. This study was conducted to develope *salmonella* live mutant strain for live mutant vaccine. The *rpo*S gene, which has been known to be a major virulence factor that plays an important role in manifestation of pathogenicity. The size, location and nucleotide sequence of 4 *rpo*S genes from *S. typhimurium*, *S. entertidis*, *S. gallinarum* and *S. pullorum* were analyzed. The size *rpo*S genes of 4 *Salmonella* strains was same indicating 1155bp long. The nucleotide homologies between 4 *Salmonella* strains was 99.3 to 99.7%. The *rpo*S gene mutants of *S. typhimurium* and *S. enteritidis* was produced by using P22 bacteriophage containing *rpoS* mutant gene. The *rpo*S mutant of *S. gallinarum* was generated by

eletroporation using transposase which was originated from Tn 10 and pBR322 which have insert DNA of *rpo*S gene. All three live *Salmonella* mutants were confirmed as to be non-pathogenic by the bubble test and ATR test.

The pathogenicity of *S. typhimurium rpo*S mutant to BALB/c mouse was decreased when it compared with that of wild type *S. typhimurium*. However, there was no difference in pathogenicity to ICR mouse between *S. enteritidis rpo*S mutant and wild type *S. enteritidis*. No perceivable clinical signs was observed in chicken inoculated with *S. gallinarum* or *S. gallinarum rpo*S mutant. In the safety and immunogenecity of *S. typhimurium rpo*S mutant to 4-week old SPF chicken, chicken inoculated with mutant produced *Salmonella* specific antibody . The geometric mean antibody titers at 4, 6, and 9 weeks post-inoculation were 2.09±0.56, 1.85± 0.43 and 2.07±0.45, respectively. In the challenge experiment with wild type *S. typhimurium*, chicken in the control group show mild diarrhea and inappetence, but there was no perceivable clinical signs in the principal group. The geometric mean antibody titer of control group at 2 weeks post-challenge was 2.56±0.40.

In conclusion, the *Salmonella rpo*S mutants studied in this project could be developed further as a live mutant vaccine strain in term of low pathogenicity, high safety and excellent immunogenicity to target animal and laboratory animals.

4. To examine the antigenic properties of *S. enteritidis*, its OMP was purified and characterized using sarkosyl and β-octyl-glucoside. SDS-PAGE study showed that OMP consisted mainly of 40 kDa, 39 kDa, and 36 kDa and sarkosyl was better in terms of solubilization of OMP.

To study the characteristics of recombinant thin aggregative fimbriae of *Salmonella* and to develop a vaccine for *Salmonella* infections, *agfA* gene was isolated from *S. entiritidis* using PCR. MBP-AgfA fusion protein was

overproduced in *E. coli* and purified using amylose resin. The purified MBP-AgfA subunit fusion protein had a molecular mass of 60 kDa with more than 95% purity on SDS-PAGE. The fusion protein was used for the preparation of antibody. The immunogenicity in the rabbits was examined using Western blot. This result indicates the possible use of MBP-AgfA in development of a novel vaccine and rapid detection of Salmonella infections of poultry.

To examine the molecular properties of AgfA, circular dichroism study was performed. The secondary structure of AgfA was elucidated from difference CD spectra. The estimation of secondary structure shows that the protein mainly consists of β-sheet structure. To compare the biochemical characteristics of wild type and mutated strain, OMP extracted from both strains were compared by SDS-PAGE. No distinct difference was observed in the protein patterns between two strains. The OMP of the mutated strain was quite stable even with continued culture, indicating the stability of the antigenic protein.

5. To optimize a bacterial mass culture system, *S. typhimurium* mutants was tested under various culture conditions such as temperature, pH, amount of air flow, enrichments and antifoams using a fermenter with 300L volume. The mutants showed the highest yields at 37℃, pH 7.0 and 50 ℓ/㎖ of air-flow. Dextran plus iron as enrichments and AF289 as antifoam resulted in the highest growth of the mutants. The mutants yielded by the mass culture system was found quite safe and highly immunogenic in mice, and protected effectively the mice against the challenge of wild type bacteria. In the guinea pig system, the mutants was quite safe and induced a substantial levels of the agglutinating antibody. The safety and immunogenicity of *S. enteritidis agfA* subunit protein were tested in the mice and guinea pigs. The subunit protein was safe and immunogenic, and protected effectively the mice against the challenge of the virulent strain. In the guinea pig, the high titers of antibody was detected in ELISA.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

국내 양계농장의 사육형태로는 최첨단 자동기계시설을 갖춘 농장에서부터 비닐하우스 사육형태 등 다양하며 이로 인해 발생되는 전염병의 유형도 매우 다양하다. 이런 전염병 가운데 *Salmonella* 속균에 의해 발병되는 추백리와 닭티푸스는 장염과 패혈증을 주로 일으키고 수평전파 뿐만 아니라 난계대에 의한 수직전염을 하기 때문에 근대적 양계산업이 발족된 이래 지난 30년간 고질적인 피해요인으로 작용하고 있으며, 특히 최근에는 이로 인한 피해가 급증하여 양계농가에 많은 손실을 주고 있다. 이 중 추백리는 제 1 종 법정전염병으로 규정하여 국가차원에서 지속적인 방역대책을 강구하고 있음에도 불구하고 감염농장의 수는 증가추세에 있으며, 닭티프스에 의한 폐사율은 중추와 성계에서 50 60%에 달하는 농장도 있으며 이들 살모넬라감염증으로 인해 농장이 폐업하고 문을 닫는 예가 많다. 이외에 주요한 닭의 *Salmonella*균 감염증으로는 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*에 의한 전염병 등이 있으며 닭에서 장염과 패혈증을 유발하고 사람에서 식중독을 일으켜서 피해를 주고 있다. 그러므로 본 병을 근절시키기 위한 기술개발이 절실히 요구된다.

일반적으로 응용하고 있는 *Salmonella*속균의 진단법으로는 세균배양 동정 방법에 의한 것으로 증균배양, 선택배양과 생화학적 성상 검사 등으로 노력과 시간이 많이 소요되며 이런한 방법은 극소량의 균감염이나 활력이 저하된 균이 존재할 때는 검출이 곤란하다는 단점이 있다. 또한 면역학적 검사법으로는 전혈 급속응집반응, 시험관 응집반응 등이 있으나 다른 균속과 교차반응이 일어나는 비특이 양성반응이 문제가 되고있다. 최근 국내 일부 연구자들에 의해 닭유래 *Salmonella*속균의 신속한 검출을 위해 PCR기법을 응용하여 보고한 바 있으나 기존 검사기법과의 상대적 효능에 대한 검증이 미진한 실정이다. 따라서 국내 양계농장에서 지속적으로 문제가 되고있는 추백리, 닭티푸스를 포함한 살모넬라 감염증의 신속·정확하고 간편한 검출을 위해 정제항원을 이용한 효소면역시험법 및 유전공학기법을 이용한 간편하고 정확·신속한 진단법의 개발이 절실히 요구된다.

또한 살모넬라 감염증 가운데 국내에서는 유일하게 닭티푸스에 대한 예방약이 사균백신 형태로 개발되어 공급되고 있으나 면역원성의 부족으로 인한 불완전한 방어효과, 균체독소에 의한 접종스트레스 및 부작용 등이 문제되고 있다. 본 병에 대해 외국에서는 Live vaccine이 활용되고 있으나 야외 또는 생체조건에서 백신균주의 병원성 회귀능에 대한 불확실성, 접종스트레스, 생균의 난소감염과 수직전파 등이 문제되며 또한 *Sal. gallinarum* 청정계균에 생균백신을 사용할 때 *Salmonella*균 free flock를 확립하는데 저해요인으로 지목되고 있다. 추백리에 대한 백신은 *S. pullorum*의 항원변이성, 병인기전의 특이성과 방역상의 문제점으로 인해 국내외에서 아직 개발되지 않고 있으며, *S. typhimurium* 및 *S. enteritidis* 감염증에 대한 예방백신은 외국에서 사균 또는 생균백신으로 개발하여 일부 사용되고 있으나 위에서 언급한 제반문제가 해결되지 않고 있다.

그러므로 최근에는 분자유전학적 기법을 이용하여 유전자 조작에 의해 작제된 살모넬라 변이균주를 이용한 생균백신의 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 방어유전자 클론닝과 expression에 의해 작제된 재조합 subunit protein을 이용한 항원개발 연구도 다각도로 진행되고 있다.

따라서 본 연구과제를 통해 보다 정제된 항원 또는 항체를 이용한 면역효소시험법과 polymerase chain reaction(PCR) 기법을 이용한 살모넬라균 진단기술을 개발하고, 국내분리 살모넬라균의 방어항원 유전자에 대한 DNA 염기서열을 분석하고자 한다. 또한 유전자재조합기법을 이용한 비병원성 변이주(mutants)작제에 의한 생균백신 개발과 방어항원 유전자의 클론닝과 재조합 subunit protein의 발현기법을 이용한 유전자재조합 백신을 개발하기 위한 기초를 확립하고자 한다.

제 2 장 연구수행 방법

1. 제 1 세부과제 : 닭 살모넬라균증에 대한 분자생물학적 진단법 개발 및 국내분리 살모넬라균의 핵염기 구조분석

1) 균분리 및 동정

대전지역 근교에 위치한 양계장 및 도계장, 충남 및 충북지역에 위치한 양계장을 대상으로 가검물을 정기적으로 채취하였다. 분변과 조직가검물중의 살모넬라균속 분리 및 동정과 serotyping은 일반법에 따라 실시하였다. 자동미생물검출장치(MIS)는 당분해능 등 생화학적 반응에 의한 enzyme-based system에 기초를 둔 Vitek system(USA), 미생물의 탄소이용능을 측정하는 Biolog system 및 지방산의 gas chromatography 분석 원리를 둔 G/C Midi(USA)를 공시하였으며, 본 시험에서는 G/C Midi(Sherlock, USA)를 제조회사의 operation manual에 따라 사용하였다.

2) 단클론성 항체 생산

표준주 *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium* 및 *S. enteritidis*를 공시하였다. Freund's complete adjuvants을 동량 혼합한 항원을 BALB/c 마우스의 복강내에 주입하였고 3주후에 formaline 처리된 균액(1×106 CFU/㎖)을 incomplete Freund's adjuvants에 혼합하여 복강내로 재주입한 후 추가로 booster 접종하였다. 비장임파구와 SP2/0 mouse myeloma cell을 50% polyethylene glycon(MW.4000)을 매체로 하여 융합시켰으며 융합된 hybridoma는 HAT배지를 이용하여 선별하였고 간접형광항체시험, 응집반응시험 및 ELISA법으로 스크리닝하고 한계희석법으로 2회 클로닝한 다음 대량증식하여 액체질소탱크에 보관하여 사용하였다.

3) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

항원을 coating buffer(Na2CO3 1.59g, NaHCO3 2.93g, D.W 1ℓ, pH 9.6, 4℃ 보관,)에 100 200배 희석하여 각 Well에 100㎕씩 분주 후 4℃에서 overnight 하였으며 양성 및 음성 표준혈청을 공시하여 cut-off를 설정하였다. Conjugate는 goat anti-rabbit 또는 goat anti-chicken IgG peroxidase를 PBS용액에 적당량에 희석후 각 well에 100㎕씩 분주후 37℃에서 1시간 반응하였으며 washing buffer로 4회 연속 세척한 다음 substrate(OPD)를 각 well에 100㎕씩 분주하였으며 10분후 stopping solution(3M sodium hydroxide) 50㎕을 각 well에 분주후 ELISA reader(OD;490㎚)를 이용하여 항체가를 측정하였다.

4) Sandwich ELISA 시험

MAb(30 35㎎/㎖)를 황산암모니움 처리하고 Ig fraction을 정제한 다음 periodate 방법으로 Horseradish peroxidase를 conjugate하였으며 -20℃에 보관하고 1:200 1:400으로 희석하여 사용하였다. 본 시험은 flat-bottomed polystyrene microplate(96wells)에 MAb를 100㎕(5 10㎍/well)를 가하여 coating한 다음 3.0% gelatin에 1시간 blocking하여 후 PBST로 3회 세척하였다. 세균배양 가검물 200㎕를 각 well에 가하고 37℃에서 1시간 감작하고 세척한 다음 100㎕의 MAb-HRP conjugate를 가하고 37℃에서 1시간 반응시킨 후 100㎕의 substrate를 가하고 실온에서 20분간 반응한 후 0.1M citric acid를 가하여 반응을 정지시킨 다음 자동 ELISA reader로 판독하였다.

5) PCR(polymerase chain reaction)

Medline의 GenBank DNA sequences 및 출판된 자료연구를 통하여 *Salmonella*균의 chromosome DNA replication에 관여하는 *ori*C, phosphate-limitation inducible outer membrane protein 발현에 관여하는 *pho*E 그리고 *pho*P와 *pho*Q, lipopolysaccharide의 polysaccharide 형성에 관여하는 *rfb* 유전자 cluster중 guanosine diphosphomannose pyrophosphotylase 합성 유전자인

*rbf*M, *Sal. enteritidis*를 위시한 *Salmonella* D group에 속하는 혈청형에서 주로 나타나는 fimbrial antigen 관련 *agf*A, *sef*A, *sef*B, *sef*C 및 *sef*14, *sef*17, *sef*18, *sef*21 유전자 cluster, PSLT-borne *spv*A 유전자 그리고 *Sal. typhimurium* 등 병원성 *Salmonella*에서 O항원의 acetylation에 관여하는 *agf*A, 그리고 *cch, eut, inv, rops, fim* 유전자 cluster에 대한 각종 유전자의 기능에 대해 분석하였다. 이런 결과를 토대로 *Sal. enteritidis* fimbrial antigen 발현에 관여한 *Salmonella* serogroup D에 특이성을 나타내는 *sef*A 유전자에 대한 PCR를 수행하였다.

*sef*A 유전자의 primer를 Table A와 같이 작제하였다. *sef*A 유전자의 증폭 패턴을 분석하기 위해서는 Sf1와 Sef1 primers를 사용하였으며, *sef*A 유전자의 subcloning을 위해서는 *Bam*HI site를 첨가한 Sf1 primers를 사용하였다.

Table A. nucleotide sequence of PCR primers for amplification of *Salmonella sef*A gene

Priemrs	Necleotide sequence 5′ to 3′	Nucleotide position	Expected product size
Sf1(AS)	CGC*GAATTC* GTTTTGATACTGCTGAACGTA	472 495	513bp
Sf1(S)	CGC*GAATTC* ATGCGTAAATCAGCATCTGCA	1 24	
Sef1(AS)	GATACTGCTGAACGTAGAAGG	470 490	488bp
Sef1(S)	GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	3 26	

* *Eco*RI site added to *sef*A gene for subcolonig

PCR은 추출한 DNA 10㎕에 10× reaction buffer【100mM Tris-HCl (pH8.3), 500mM KCl, 0.1% gelatin(w/v)】5㎕, 25mM MgCl2 10㎕, 2.5mM dNTPs 8㎕, sense와 antisense primer를 각 1㎕, *Taq* polymerae(Takara) 1㎕ (3units)와 멸균증류수 14㎕를 첨가하여 Automated thermal cycler(DNA thermal cycler 2400, Perkin Elmer Cetus Co.)로 94℃에서 10초, 55℃에서 10초, 72℃에서 30초 동안 반응하는 일련의 과정을 30회 반복하면서 annealing time과 extention time을 매 cycle마다 2초와 5초씩 추가하였으며 마지막으로 72℃에서 7분간 반응시켰다. 전기영동분석은 주로 1% ethidium bromide agarose gel을 이용하였고 image analyzer (Pharmacia)로 판독 분석하였다.

6) OMP의 추출정제

Tryptic Soy Broth 배지 300ml에 *Salmonella*균을 접종후 37℃ incubater에 18 48시간 배양하여 OMP 추출에 사용하였다. 세포침전물을 20ml 10mM HEPES Buffer(pH7.4)에 부유시킨후 고속초음파장치로 3초간격 20분동안 초음파분쇄하였다. 세포부유액을 500×g에서 20분간 원심하고 다시 1,000×g에서 30분간 원심하여 잔여 침전물를 제거한 후 상층액을 15,000×g에서 30분간 2회 원심하여 침전물을 얻었다. 얻어진 침전물을 10mM HEPES Buffer 1㎖에 부유시키고 1% sarcosyl을 첨가하여 shaking incubator(실온)에서 30분간 반응하였다가 처리된 부유액을 15000×g에서 20분간 2회 원심하여 OMP를 회수하였다. 회수된 OMP를 10mM HEPES나 TE buffer 500㎕에 부유하여 Burett법으로 정량한 후 냉동(-20℃)보관 하였다.

7) *Sef*A gene cloning

가) PCR products의 정제

겔에서 잘라낸 PCR products를 1.5㎖ 시험관에 넣고 gene clean II kit를 이용하여 용출하여 UV spectrophotometer로 260㎚에서 측정하여 정량하였다.

나) Vector, insert DNA, competent cell 준비

pGEX-2T plasmid를 대량생산하여 정제한 후 *Eco*RI으로 소화시켜 linear vector로 만들었으며 일반법에 준하여 insert DNA를 준비하였다. Competent

cell, DH5α cell은 CaCl2 용액 처리방법으로 작제하였으며, LB agar plate에 펴고 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 후 2 3mm 크기의 집락 10 12개 정도를 250㎖ SOB 배지에 접종하고 UV spectrophotometer(흡광도 590㎚)에서 0.375가 될 때까지 37℃에서 강하게 교반(200 250rpm)하며 배양하였다.

다) Transformation 및 Plasmid DNA 추출

Sambrook 등이 기술한 일반법에 따라 실시하였다.

8) Nucleotide sequence analysis

염기서열 분석은 Dye terminator cycle sequencing법으로 실시하였다. Sequence data는 ABI prism 310 genetic analyzer로 수집한 후 collection, analysis, 및 SeqED soft ware(Perkin-Elmer, USA)가 설치된 Macintosh로 분석하였으며, raw sequencing data는 collection soft ware로 수집하였으며 analysis soft ware로 nucleotide sequences로 전환하였다. 그리고 SeqED software를 이용하여 핵염기서열로부터 아미노산서열을 결정하였다.

9) Dot blot hybridization

DIG (Digoxigenin) DNA labeling and detection kit (Boerhinger Mannheim Biochemica)를 제조회사의 추천술식을 응용하여 사용하였으며, DNA labeling, Dot blot 및 Capillary transfer, Hybridization은 Birren등의 방법을 응용하여 수행하였다.

10) Radial immunodiffusion enzyme assay(RIDEA)

OMP 및 제 2 세부과제에서 작제하여 공시한 *S. enteritidis* fimriae protein인 *agf*A subunit 항원을 0.06M carbonate 완충액에 적정농도로 희석하여 polystyrene petri dishes(60㎜ in diameter)에 5㎖씩 분주하고 37℃에서 18시간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 2% bovine serum albumin으로 blocking하고 다시 PBS로 3회 세척한 다음 1% purified agar를 5㎖씩 분주 도포하여 응고시켰다. 여기에 한천펀치셋트로 3㎜ 크기의 구멍을 일정한 간격을 두고 만든 가검혈청 10㎕를 각각 주입하고 37℃에서 5시간 반응시킨 다음 agar층을

제거하고 0.05% Tweeen PBS로 3회 세척하고 conjugates(goat anti-rabbit or goat anti-chicken IgG peroxidase)를 가하고 37℃에서 1시간 반응하고 3회 세척하였다. 그후 substrate(0.08% 5-aminosalicylic acid & 0.005% H_2O_2)를 1% agar에 첨가하여 3㎖씩을 분주한 후 실온에서 30분간 반응한 후 반응환의 직경을 측정하였다.

2. 제 2 세부과제 : 살모넬라균의 방어항원 유전자 클론닝과 재조합 subunit protein의 발현 및 성상시험

(협동연구과제: 분자생물학적 기술로 개발된 백신의 안전성 및 효능시험)

1) 균주와 plasmid

AgfB와 AgfA protein의 발현을 위하여 pQE9(Qiagen), pGEX-2T (Pharmacia), pMAL-cri(NEB) 등의 벡터가 사용되었다. 그리고 *E. coli* M15, *E. coli* JM109, *E. coli* XL1-blue MRF 등이 각각 recombinant host로 사용되었다.

2) 배양조건

*Salmonella*는 tryptic soy broth(TSB)를 사용하여 배양하였고, *E. coli*는 Luria-Bertani broth(LB broth)를 사용하였으며, *Salmonella*의 fimbriae를 정제하는데는 colonization factor antigen(CFA) agar를 사용하여 37℃에서 배양하였다.

3) Chromosomal DNA 분리

각 균주 (*Sal. enteritidis*, *Sal. typhimurium*, *Sal. pullorum*, *Sal. gallinarum*) 별로 chromosomal DNA를 분리하였다. *Salmonella*를 18시간 배양하고 원침하여 pellet을 만든뒤 567㎕의 TE buffer(pH 8.0)로 반복적인 피펫팅으로 세포를 부유시킨다. 세포를 부유시킨 다음 30㎕의 10% SDS와 5㎕의 proteinase K(20 ㎎/㎖), 5㎕의 RNase(10㎎/㎖)를 완전하게 섞어준 뒤, 37℃에서 1시간 동안 배양한다. 배양 후 100㎕의 5M NaCl을 가하여 완전히 섞어주고, 80㎕의 CTAB/NaCl solution(10% CTAB [hexadecyl- trimethylammonium bromide], 0.7M NaCl)을 가하여 혼합한 후 65℃에 10분간 처리하였다. 이때 대부분의 polysaccharides와 macromolecule은 제거된다. 또한 CTAB solution을 사용하기 전에 60℃ 정도로 미리 데워주었다. 그런 다음 chloroform/isoamyl alcohol(24:1)을 800㎕ 넣고 섞어준 후 15,000g에서 5분간 원심 한 후, 상층액을 분리하고 다시 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)을 더하고 섞어준 다음 15,000g에서 5분간 원심침전하였다. 이렇게 회수된 상층액에 0.6

volume(~500㎕)의 isopropanol을 더하고, 부드럽게 섞어주면 DNA가 생성되는 것을 관찰하고, 양이 적을 때는 원심 처리하였다. 이렇게 추출된 DNA를 70% ethanol로 세척한 후 5분간 원침하였다. 이 다음 상층액을 버리고, vacfuge에 말린 다음 적당량의 TE buffer나 DW에 녹여서 보관한다.

4) 방어항원유전자 클론닝

분리된 chromosomal DNA를 template로 *agf*B와 *agf*A 유전자를 각 균주별로 PCR로 증폭하였다. PCR에 사용된 primer는 *Salmonella enteritidis*의 sequence에 기초하여 제작하였고, cloning을 용이하게 하기위해 *Bam*HI과 *Pst*I cleavage site를 첨가하였다. *agf*B forward primer는 5'-CGCGGATCCATGTTGACAATACTGGGT-3', *agf*A forward primer는 5'-CGCGGATCCATGAAGCTTTTAAAGGTG-3', *agf*B reverse primer는 5'-CCCCTGCAGTTAGCGTTGGTTGACGCGAATAGC-3', *agf*A reverse primer는 5'-CCCCTGCAGTTAATACTGGTTAGCCGTGGCGTTGTTGCC-3'을 각각 사용하였다. PCR은 95℃ denature 1분, 60℃ annealing 1분 30초, elongation 30초로 35 cycle로 수행하였다. 각 PCR fragment는 *Bam*HI과 *Pst*I으로 처리한 후 pQE9과 pMAL-cri 벡터의 *Bam*HI과 *Pst*I site에 클로닝하였다. 그리고, PCR fragment를 *Pst*I으로 cleave 한 후 Klenow 처리를 하여 blunt end를 만들고, 다시 *Bam*HI 처리를 하여 pGEX-2T 벡터에 *Bam*HI과 *Sma*I site에 cloning 하였다.

또한 *agf*A의 경우 signal peptide인 앞쪽 20개 아미노산을 제거한 새로운 *agf*A-new primer(5'-AAAGGATCCGGCGTCGTTCCACAA-3')를 작성하여 PCR로 증폭한 뒤 pMAL-cri 벡터에 위와 동일한 방법으로 cloning 하였다.

5) 염기서열 분석

pQE9 벡터에 cloning 된 *agf*B와 *agf*A를 각각 pQE sequencing primer(forward; 5'-CGGATAACAATTTCACACAG-3', reverse; 5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3')를 이용하여 각각의 sequence를 비교하였다. Dye-labelled terminator를 이용한 cycle sequencing이 ABI prism™ 310 genetic analyser를 이용하여 수행되었다. Sequence data는 SeqEd program을 사용하여 비교 분석하였다.

6) *E. coli*에서의 protein 발현

이러한 protein의 발현을 위해 cloned plasmid를 함유한 single colony를 ampicillin(100㎍/㎖)을 함유한 LB(Luria-Bertani) 배지에 37℃에서 overnight culture 한 후, 새 배지에 1%로 접종하여 600㎚에서 0.5 0.7의 absorbance를 얻을 때까지 배양한 뒤 0.1 1mM IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside)로 induction 하였다. Induction 후 30℃에서 5시간 배양후 4,000g에서 15분간 원침하여 얻은 cell pellet을 -70℃에 보관하였다.

MBP fusion protein의 발현시에는 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl에 0.2% glucose를 첨가한 배지를 사용하였다. 이는 glucose가 *E. coli*의 chromosome 상에 있는 maltose gene을 억제하여 효율적으로 maltose binding protein을 발현하도록 하는 역할을 하기 때문이다.

7) SDS-PAGE와 Western blotting

SDS-PAGE는 Lammlie의 방법을 기초하여 수행되었다. pQE9 벡터를 사용한 경우, 8M urea(pH8.0)를 이용하여 융해시켰다. 이 융해물에 SDS sample buffer를 섞어서 13.5%의 SDS-PAGE에 electrophoresis한 후 Coomassie brilliant blue로 염색하여 발현된 protein band를 확인하였고, PVDF membrane으로 이전한 후 5% skim milk로 blocking하고, histidine antibody를 이용하여 immunoblot 하였다. pGEX-2T 벡터를 사용한 경우에도 8M urea로 융해하여 12% SDS-PAGE로 electrophoresis하고, PVDF membrane으로 전이하여 GST antibody로 검출하였다. 그리고, pMAL-cri 벡터를 이용하여 expression한 경우는 10% SDS-PAGE로 electrophoresis하여 protein을 확인하였다.

8) MBP fused AgfA protein의 정제

Expression된 MBP fused AgfA protein을 amylose resin을 이용하여 정제를 실시하였다. 원심하여 expression하여 모아둔 cell pellet을 PBS에 부유하여 sonication 하여 융해시켰다. Sonication 후 1,500rpm에서 15분간 원심하여융해물을 얻었다. 또한 maltose-binding protein과 binding하는 amylose resin(New England Biolab.)을 잘 교반하여 1㎖을 취하여 1500rpm에서 2분간 원심한 뒤,

상층액을 제거하고, column wash buffer(20mM Tris-Cl, 200mM NaCl, 1mM EDTA)를 8×volume을 넣고 pre-equilibration을 한다. 이렇게 준비된 resin에 cell lysate를 넣고, 실온에서 2시간동안 protein을 결합시켰다. 이렇게 protein을 binding 한 후에 column wash buffer를 12×volume으로 3회 세척하고 Elution buffer(10mM maltose in column buffer 1㎖로 5회 elution하여 -20℃에 보관한다.

9) Aggregative fimbriae의 분리 정제

*S. enteritidis*와 *S. typhimurium* 각각으로부터 thin aggregative fimbriae를 분리하였다. 이는 Collinson등이 1991년에 발표(*J Bacteriol.* 173;4773-4781)한 방법에 따라서 수행되었다.

우선 10 plate의 CFA agar(*Infect. Immun.* 18;330-337)에서 *Salmonella*를 scrape하여 10mM Tris buffer(pH8.0)에 suspension시킨 후 ㎖당 0.1㎎의 RNase A와 0.1㎎의 DNase를 각각 첨가하여 초음파 처리하였다. 여기에 MgCl2를 1mM로 가하여 37℃에서 20분간 배양한 다음 lysozyme을 1㎎/㎖로 가하고, 37℃에서 교반하면서 40분간 더 배양하였다. 그리고 나서 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 1%가 되게 첨가하여 37℃에서 30분간 배양하였다. 그리하여 남은 insoluble material을 12,100g, 25℃, 15분간 원침하였다. 이를 다시 10㎖의 Tris에 녹여서 남은 아가 성분을 제거하기 위해 100℃에서 5분간 가열한다. 그런 뒤 다시 위에서 수행한 방법을 반복한 뒤 2㎖의 SDS-PAGE sample bufer(10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5mM TrisHCl [pH6.8])를 섞어준다. 이 것을 100℃에서 15분간 가열한 뒤 12% polyacrylamide gel (3% stacking gel)에 20㎃로 5시간 동안 running하였다. 이중에서 stacking gel에 들어가지 않고 남은 시료를 회수하여 distilled deionized H2O로 세 번 세척하고, 95% ethanol로 두 번 처리하여 동결건조하였다. 이렇게 처리한 건조 시료를 dDW로 다시 용해하여 초음파처리로 큰 조각을 깨고 비용해성 물질을 다시 0.2M glycine (pH1.5)으로 처리하여 dDW로 다섯 번 세척하고 동결건조하여 -20℃에 저장하였다.

10) Electrophoresis

위에서 정제한 thin aggregative fimbriae는 기존의 방식으로는 SDS-PAGE 상에서 band를 관찰할 수가 없다. 그래서 insoluble fimbriae를 90% formic acid로 수초간 처리하고 즉시 얼린 다음 45℃에서 한시간 동안 Vacfuge로 말린다. 이렇게 산처리를 한 sample에 SDS-PAGE sample buffer를 섞고 polyacrylamide gel에 running하였다.

11) Purified fimbriae의 정량

Bradford method를 이용하여 purify한 fimbriae의 양을 측정하였다.

12) 동물접종시험

한달령의 New Zealand white rabbit에 400μg의 AgfA protein을 complete Freund's adjuvant를 동량으로 섞어서 피하에 주사하였다. 3주와 5주 후에 동량의 AgfA protein을 incomplete Freund's adjuvant를 섞어서 booster를 실시하고, 그로부터 2주 후에 혈청을 채취하여 antibody를 확인하였다.

BALB/c 마우스(♀)를 두 군으로 나누어 50μg과 100μg씩을 complete Freund's adjuvant를 섞어서 근육으로 주사하였다. 2주후에 동량의 protein을 각각 incomplete Freund's adjuvant를 섞어서 booster 한뒤, 그로부터 2주후 혈청을 채취하여 antibody를 확인하였다.

또한 SPF 병아리를 네 군으로 나누어 실험하였다. 두 군은 subunit protein을 50μg과 100μg으로 ISU 75를 adjuvant로 사용하여 근육에 주사하였고, 2주 후에 booster 하였다. 그리고 한 군은 *S. typhimurium rpo*S mutant를 경구로 투여한 후 subunit protein을 50μg씩 근육으로 주사하였고, 마지막 한 군은 *S. typhimurium rpo*S mutant만을 경구로 투여하고, 2주 후에 booster 하였다. booster 후 2주와 4주 후에 혈청을 채취하여 antibody titer를 측정하였으며, 그 후 1주일 후에 live *S. typhimurium*을 경구로 challenge를 실시하였다. Challenge 2주 후에 혈청을 채취하여 이 역시 antibody titer를 측정하였다.

13) ELISA

정제된 AgfA antigen을 0.1M bicarbonate buffer(pH9.6)에 희석하여 microtiter plate (Maxisorb, Nunc)에 4℃에서 overnight하여 코팅하였다. Antigen이 coating 된 plate를 1% gelatin(in PBS)으로 free binding site를 blocking 한다. 1시간 후 PBST(PBS with 0.1% BSA, 0.05% Tween 20)로 5회 세척하여, 1차 항체와 37℃에서 1시간 반응한다. 매 단계별로 세척을 5회씩 실시한다. 1차 항체 반응 후 peroxidase가 conjugate 되어있는 goat anti-chicken antibody로 1시간 반응 후, o-phenylenediamine dihydrochloride로 발색한다. o-phenylenediamine dihydrochloride는 phosphate citrate buffer(pH5.0) 25㎖에 1 tablet을 녹여서 30㎕의 H2O2를 섞어준 뒤 사용한다. 발색은 13분간 지속하며, 반응은 3N HCl로 정지시키고, 405㎚에서 optical density를 측정한다.

3. 제 3 세부과제 : 살모넬라균 유전자 재조합 변이주(mutants) 생균백신 개발

(협동연구과제: 분자생물학적 기술로 개발된 백신의 안전성 및 효능시험)

3-1. 병원성 유전자(*rpo*S gene) 분석 및 위치확인

1) Chromosomal DNA의 분리

*S. enteritidis, S. gallinarum, S. pullorum, S. typhimurium*을 대상으로 tryptic soy broth에서 균주를 배양한 후 15,000×g에서 5분간 원심 분리한 후 567㎕의 TE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)에 혼합 후 30㎕의 10% SDS, 5㎕의 proteinase K(20㎎/㎖), 5㎕의 RNase(10㎎/㎖)을 섞은 후 37℃에서 incubation하였다. 그 후 100㎕의 5M NaCl을 혼합한 후 80㎕의 CTAB/NaCl 용액(10% CTAB/0.7M NaCl)을 첨가한 후 65℃에서 10분간 반응 후 동일용량의 chlorform/isoamyl alcohol(24:1)을 혼합하였다. 15,000×g에서 5분간 원심분리 후 상층액을 취하여 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)을 첨가하여 혼합한 후 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 500㎕의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하였다. 100㎕ TE buffer에 녹인 후 spectrophotometer로 농도를 측정한 후 PCR에 사용하였다.

2) *rpo*S gene의 증폭

분리한 DNA를 template로 하여 *rpo*S gene을 증폭하기 위해 PCR을 수행하였다. 각 균주의 *rpo*S-gene sequencing을 위해 각각 3 부위(**H**ead, **M**iddle, **T**ail)로 나누어 PCR을 수행하였다. 각각에 사용된 primer는 Table B.와 같다.

Table B. Primers for amplification of *rpo*S gene.

Head	forward primer	5'-TT**GAATTC**TGACTTGCTAGTTCCGTCAA
	reverse primer	5'-TT**GGATCC**AGCTCTTTAACAATGTGAAT
Middle	forward primer	5'-TT**GAATTC**GGGCGATCATGAACCAAACC
	reverse primer	5'-TT**GGATCC**TCAACCTGAATCTGACGAACA
Tail	forward primer	5'-TT**GAATTC**TCGGTCTGCTCCCATATGAAG
	reverse primer	5'-TT**AAGCTT**AACCGATGATTTGTCCACG

PCR reaction mixture의 조성과 PCR condition은 다음과 같다.

Composition of reaction mixture : DW 67㎕, 10×buffer 10㎕, forward primer 5㎕(10pmol), reverse primer 5㎕ (10pmol), dNTP 8㎕(2.5mM), Taq polymerase 1㎕(5unit/1㎕), template 2㎕ ⇒ total 100㎕

- PCR condition : 95℃ 7min, 94℃ 1min / 43℃ 2min / 72℃ 2min ┐ 39 cycle, 72℃ 7min

3) *rpo*S gene의 cloning

증폭된 PCR products를 1.2% agarose gel 상에서 전기영동하여 PCR product가 포함된 부위를 절단하여 elution한 후 pTZ18R vector에 각각 cloning하였다. Restriction enzyme은 Head와 Middle부위는 *Eco*RI(GAATTC)와 *Bam*HI(GGATCC)이고 Tail 부위는 *Eco*RI과 *Hind*III (AAGCTT)를 사용하여 cloning site에 맞도록 처리한 후 cloning 하였다.

E. coli DH5α를 host cell로 사용하여 ligation한 유전자를 transformation한 후, ampicillin이 함유된 LB agar에서의 overnight culture하여 colony를 취하여 ampicillin을 함유한 LB broth에 overnight culture 한 다음 miniprep 기법으로 DNA를 분리하고 이를 restriction enzyme으로 처리하여 insert DNA의 존재유무를 확인하였다. Head와 Middle부위의 clone은 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 double cutting 하였고, Tail 부위는 *Eco*RI과 *Hind*III로 double cutting 하여 clone을 확인하였다.

4) *rpo*S gene의 염기서열 및 분석

4가지 *Salmonella* 균주 각각의 3개씩의 clone, 즉 12개의 clone을 sequencing 하였다. Template는 clone을 함유한 *E. coli* DHα를 LB broth에 over night culture 후 QIAGEN-miniprep kit를 이용해 얻었다.

Sequencing primer는 forward pUC/M13 primer와 reverse pUC/M13 primer를 각각 사용했고 Big Dye terminator ready reaction mix를 이용해 sequencing reaction을 실시하였다. reaction mixture의 조성과 조건은 다음과 같다.

- 조성 : 8㎕의 Big Dye terminator ready reaction mix, 2㎕의 template, 6.8 ㎕의 DW, 3.2p㏖의 pUC/M13 forward primer 또는 3.2p㏖의 pUC/M13 reverse primer를 PCR tube 혼합 후 실험했다.
- 조건 : 96℃에서 10 초, 50℃에서 5초, 60℃에서 4분을 25 cycles 반복하였다.

Sequencing reaction products는 ethanol precipitation으로 잔류하는 Big Dye terminator를 제거 후 25㎕의 template suppression reagent에 resuspend 하고 95℃에서 2분간 denature를 실시한 후 sequencing에 사용되었다. Sequencing은 ABI prism 310 genetic analyzer를 사용하였고 Collection, Analysis, SeqEd software를 사용하여 염기서열을 비교분석 하였다.

3-2. *Salmonella* live mutant 작제

1) 사용균주 및 세균 배양 배지

본 실험에 사용된 세균은 다음의 Table C와 같으며 세균 배양을 위한 증균배지는 Luria Bertani(LB)를 사용하였으며, phage의 민감도를 조사하기 위해 green indicator plate, 즉 40% glucose, 2.5% alizarin yellow zz, 2% aniline blue 가 첨가된 최소 배지를 사용하였으며 그리고 항생제 저항능을 소유한 균주들은 ampicillin(50㎍/㎖), kanamycin(50㎍/㎖), tetracycline(20㎍/㎖)등을 각각 함유한 배지에서 증균시켰다. 또한 변이주의 제작을 위해서 MudJ(km, lacZ) 형질 도입을 수행하였다.

Table C. *Salmonella* strains used in this experiment

STRAIN	SOURCE	RELEVANT GENOTYPE
JF2938	UK1	rpos:: MudJ
SF464	SF1	pNK972 transposase(Apr)
JF2933	UK1	rpos clone(Apr)
JF2690	UK1	rpos:: AP
S. typhimurium	CHICKEN	virulent
S. enteritidis	CHICKEN	virulent
Sal. gallinarum	CHICKEN	virulent

2) S. *typhimurium* 및 *S. enteritidis* mutant 작제

가) Phage의 작제와 계대

실험에 사용된 Phage는 P22와 H5(P22의 변형 Phage)를 각각 사용했으며 phage는 우선 *S. typhimurium* 및 *S. enteritidis*를 LB배지에서 seed culture 하고 50㎕를 LB 5㎖에 P22 phage 5㎕넣고 16 시간 이상을 배양한 후 원액에 chloroform 500㎕를 넣고 vortex 시킨뒤 20-30분정도 방치 시킨 후 2500rpm에서 30분 centrifuge 시킨 뒤 screw cap tube에 상층액 만을 따서 넣은 뒤 chloroform 200㎕를 넣고 vortex 시킨 뒤 24시간 뒤에 사용하였다. H5의경우도 위와 동일한 방법을 이용하였다.

나) Phage titer test

이는 균주가 phage에 infection이 되는지의 여부와 그 역가를 알기 위한 실험으로 우선 *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*를 배양한 뒤 이를 각각 LB 배지에다 1/100로 dilution시킨 후 OD600=0.1이 될 때까지 배양한 후 0.75% soft agar와 1.5:1의 비율로 섞은 뒤 이를 굳기 전에 LB plate에 분주하였다. 표면이 굳은 뒤 phage를 10-1 10-6까지 희석하여 이를 한 방울씩 각각 plate에 떨어뜨린 후 배양하여 적하 부분에 flock의 형성을 확인하였다.

다) 변이주의 작제

변이주의 제작을 위해 P22 HT 105/1-int를 이용한 Holly와 Foster 그리고 Aliabadi등의 방법을 사용하였으며 균주의 homologous site 간의 recombination 성질을 이용하였다. Phage titer test에서 *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*가 infection 되는 것이 확인되었으므로 이를 각각 JF2938과 JF2690을 culture하여 여기에 P22 phage를 이용하여 JF2938과 JF2690 phage를 만든 뒤 각각 *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*배양액 100㎕와 JF2938과 JF2690 phage 100㎕를 항생제가 첨가된 LB plate에 cross 시켰다.

위의 시험을 단계별로 설명하면 아래와 같다.

① JF 2938의 *rpo*S gene mutation site를 이용하기 위해 이를 P22로 package 한 뒤 *S. typhimurium*과 *S. enteritides* 에 cross 시키고 kanamycin이 포함된 증균 배지에서 선택 배양하였다.

② 위의 ①에서 얻어진 변이주를 green indicator plate에서 H5 test를 통해 nonlysogen과 H2O2 test를 통해 비병원성 균주인 non bubbler를 선별, 이

를 다시 배양하여 P22 phage로 package 한 뒤 변이주의 안정화를 위하여 이를 다시 wild type 에 back cross 시켰다.

라) H5 test

위의 각각의 plate에서 나온 변이주(*Salmonella typhimurium* ×JF2938⦸, *Salmonella enteritidis* ×JF2690⦸)의 non-lysogen을 찾기 위하여 실행하는 실험으로 green indicater plate(40% glucose, 2.5% allizalin yellowZZ, 2% anilline blue)에 H5 phage를 유리막대를 이용하여 plate의 중앙에 streak한뒤 이것이 마르면 tooth pick를 이용하여 변이균주 one colony를 따서 streak한뒤 배양하여 infection이 된 것을 non-lysogen으로 분류하였다.

마) Bubble test

non-lysogen으로 분류된 colony를 다시 항생제가 첨가된 plate에 restreak하여 각각의 colony를 따서 30%H2O2 시약을 직접 plate에 dropping 시켜 non-bubbler colony를 screening하여 *rpo*S gene의 knock-out을 확인하였다.

바) ATR(acid tolerance response)test

*rpo*S gene의 knock-out을 확인하기 위한 방법으로 다음의 최소 배지를 이용하여 다른 auxotropic colony를 배제시켰다.

50E salt solution(MgSO4•7H2O, Citric acid, K2HPO4, NaH(NH4)PO4 •4H2O)+40% glucose를 첨가한 SG broth를 이용하여 위에서 screening한 colony를 96 well에 culture 한뒤 SG broth를 HCl을 이용하여 pH3.0으로 조정한 broth를 다른 96 well에 넣은뒤 replica tool을 이용하여 위의 96 well을 찍어 pH3.0의 well에 찍는다. 이를 시간대 별로 측정하여 replica tool을 이용하여 plate에 찍고 over night culture하여 knock-out되는 colony를 선별하였다.

2) *S. gallinarum* mutant 작제

S. gallinarum 균주의 경우 *Salmonella*에 특이적으로 infection되는 P22 phage가 infection되지 않기 때문에 Tn10에서 유래된 transposase를 이용하여 homologous recombination을 유도 하였다.

가) transposase의 추출

LT2/pNK972에 삽입된 transposase를 QIAGEN midi prep을 이용하여 다량 추출하였다.

나) *S. gallinarum*의 transfomation

균주를 SOB배지에서 culture하여 다시 1/100로 희석하여 OD540=0.29까지 키운 뒤 이를 ice에서 2분간 chilled시킨 뒤 4oC, 6,000rpm에서 10분간 원심 시킨 뒤 이를 0.1M MgCl2 25㎖에 resuspend 시킨 뒤 위의 방법으로 5분간 원심하고 다시 0.1M CaCl2 12.5㎖에서 resuspend하여 ice에 20분간 방치한다. 이를 5분간 원심하여 1㎖의 0.1M CaCl2에 resuspend 하여 이cell 100㎕에 위의 trasposase를 섞어 41oC의 water bath에 90초 동안 heat shock을 가하여 transformation을 실시하였다.

다) *rpo*S clone의 작제

Homologous recombination을 위해 gene bank에서 sequence를 찾아 상응하는 primer의 5' end에 *Eco*RI과 *Hind*III restriction site를 붙여 PCR기법을 이용하여 증폭 시킨 뒤 이를 pBR322 vector에 삽입하여 drug maker ampicillin을 파괴하고 tetracycline만을 maker로 사용하였다.

라) Electroporation

위의 transformation된 균주를 LB배지(Ap,tet)에서 culture 시킨 후 100㎖의 LB배지에 1/100로 희석하여 37oC 에서 OD600=0.7까지 배양한 후 4oC, 5,500×g에서 15분간 원심 분리하여 pellet을 만든 뒤 상층액을 버리고 이를 다시 동량의 cold distilled water에 resuspend 시키고 위의 방법으로 원심분리하고 다시 500㎖의 cold distilled water에 재부유하고 다시, 원심분리한 다음 이를 10% glycerol-water 2㎖에 재부유하고, 원심분리한 후 다시 200㎕의 20% glycerol-water에 부유하여 60㎕의 cell과 위의 transposase 3㎕를 넣고 1.35V에서 4초간 electroporation 하였다.

마) *rpo*S null mutation의 screening과 plasmid curing

위에서 얻은 colony를 velvet을 이용하여 다른 plate에 replication을 시킨 뒤 위의 방법과 마찬가지로 bubbler test와 ATR test를 이용하여 *rpo*S null mutation colony를 선발한 후 위에서 사용된 transposase plasmid를 제거하기 위하여 chemical agent를 이용하여 plasmid curing을 실시하였다.

바) plasmid curing

위의 *rpo*S null mutation colony를 LB배지에서 배양한 후 이 cell을 103 104정도를 LB배지에 넣은 뒤 여기에 acridine orange(1㎎/㎖)를 각각 다른 농

도로 넣은뒤 ovre night culture하여 turbidity가 증가한 tube를 찾아 이를 약 105 10까지 희석하여 plate에 분주하여 배양한 뒤 여기에서 나온 colony들을 tooth pick를 이용하여 ampicillin이 있는 plate에 긁어 자라지 않는 colony를 screening 한다.

3) 변이균 주의 병원성 시험(virulence test)

가) mouse에 대한 병원성 시험

⑴ *Salmonella enteritidis*

① 접종물(inoculumn)

wild type *S. enteritidis* 및 *S. enteritidis* mutants의 colony를 LB broth에 접종한 후 37℃에서 16시간 배양하였다. 배양균을 1×1010cells/㎖로 조정하여 접종물로 사용하였다.

② 동물접종 및 관찰

*S. enteritidis*의 변이주에 대한 병원성 유무를 평가하기 위하여 ICR mouse(5주령. male) 24수를 8마리씩 3개군(A,B,C)으로 나누고 A, 및 B 군에 대하여 각각 *S. enteritidis* wild type과 mutant를 마리당 200㎕씩 경구 투여하였으며 C군에는 마리당 LB broth 200㎕를 경구투여하여 접종상의 실수 유무를 평가하였다. 투여 후 24일간 임상증상, 폐사 및 간의 조직병리학적인 관찰을 통하여 병원성의 정도를 평가하였다.

⑵ *Salmonella typhimurium*

① 접종물(inoculumn)

wild type *S. typhimurium* 및 *S. typhimurium* mutant의 colony를 LB broth에 접종한 후 37℃에서 16시간 배양였다. 배양균을 1×1010cells/㎖로 조정하여 접종물로 사용하였다.

② 동물접종 및 관찰

*S. typhimurium*의 변이주에 대한 병원성 유무를 평가하기 위하여 BALB/c mouse(5주령. male) 24수를 8마리씩 3개군(A,B,C)으로 나누고 A, 및 B 군에 대하여 각각 *S. typhimurium* wild type과 mutant를 마리당 200㎕씩 경구 투여하였으며 C군에는 마리당 LB broth 200㎕를 경구 투여하여 접종상의 실수 유무를 평가하였다. 투여 후 24일간 임상증상, 폐사 및 간의 조직병리학적인

관찰을 통하여 병원성의 정도를 평가하였다.

③ 간과 비장조직으로부터 잔류 *Salmonella* mutant의 분리

폐사한 mice를 부검하여 간과 비장을 적출, homogenizer로 간의 경우 3㎖의 PBS로, 비장의 경우 2㎖의 PBS로 균질화 하여 *S. typhimurium*, *S. enteritidis* 의 wild type은 LB plate에, 각각의 mutant는 kanamycin이 포함된 LB plate에 각각 150㎕씩 분주한 다음 colony를 확인하였으며 분리균이 mutant주임을 확인하기 위해 H2O2 test를 실시하였다.

나) Chicken 에 대한 병원성 시험

① 접종물(inoculumn)

wild type *S. gallinarum* 및 그의 mutant colony를 LB broth에 접종한 후 37C에서 16시간 배양하였다. 배양균을 1×108cells/㎖로 조정하여 접종물로 사용하였다.

② 동물접종 및 관찰

S. gallinarum 변이주에 대한 병원성 유무를 평가하기 위하여 chicken(5주령) 24수를 8마리씩 3개군(A,B,C군)으로 나누고 A군 과 B군에 대하여 각각 wild type *S. gallinarum*과 *S. gallinarum* mutants를 각각 마리 당 500 ㎕ (1×108cells/㎖)씩 경구 투여하였으며 C군에는 마리당 LB broth 500㎕를 경구 투여 하여 접종상의 실수 유무를 평가하였다. 투여 후 21일간 임상증상, 폐사 등을 관찰하여 병원성의 정도를 평가하였다.

다) *Salmonella mutant*에 대한 안전성시험 및 면역원성 시험

4주령의 백색 레그혼 SPF 30수를 A군(20수)과 B군(10수)으로 나누고 A군에는 *S. typhimurium* mutant 배양액 마리당 500㎕ (1×108cells/㎖)씩 경구 접종하고 2주 후 동량으로 2차(booster) 접종을 실시하였으며 2차접종 후 5주(최초 접종 후 7주)에 A군과 B군 모두에 wild type *S. typhimurium* 배양액 마리당 500㎕ (1×108cells/㎖)씩 경구적으로 공격 접종하여 병원성 *S. typhimurium* 균에 대한 방어능력을 조사하였다. 또한 2차접종 후 2주, 4주 및 7주에 채혈하여 항체생산 정도를 검사하였다. 항체가는 microagglutination test로 측정하였으며 항체가는 geometric mean score로 표시하였다. 실험 종료시 부검을 통하여 병변유무를 조사하고 간조직으로부터 *Salmonella* 균의 분리를 실시하여 *Salmonella* 균의 잔류여부를 검사하였다.

4. 제 4 세부과제 : 살모넬라균 재조합 항원단백 정제, 생화학적 성상시험 및 재조합 변이주의 대량생산 체계구축

1) 균체 항원의 생화학적 특성시험

*S. enteritidis, S. typhimurium, S. pullorum, S. gallinarum*의 균체 항원으로서 Outer membrane protein(OMP)를 detergent로서 Sarkosyl과 β-octyl-glucoside를 각각 사용하여 solubilizing하여 molecular weight profile 등 그 생화학적 특성을 조사하였다. Tryptic soy broth를 사용하여 37℃에서 배양한 후 stationary phase 말기에서 cell을 harvest한 후 cell을 disrupture시키고 원심분리하여 상등액을 취하여 초원심분리한 후 pellet을 non-ionic detergent인 Sarkosyl(2%) in 10mM HEPES과 β-octyl-glucoside(1%) in 10mM HEPES에 resuspending 후 다시 초원심분리하여 생긴 pellet을 10mM Tris-Cl(pH7.2)에 resuspending 한 후 dialysis 하였다. Outer membrane protein(OMP)의 생화학적 성상 변화를 알아 보기 위하여 SDS-PAGE 분석시 sample 처리의 온도와 시간, mercaptoethanol 첨가의 유무에 따른 조건별 처리를 달리 하여 분석하였다.

2) 재조합 단백항원의 생화학적 성상시험

제 2 세부과제에서 마련한 재조합 단백항원의 생화학적 성상시험의 기초 연구를 하기위하여 pQE9 vector에 *S. typhimurium agf*B와 *S. gallinarum agf*A, B를 cloning한 colony를 받아 expression 실험을 하였다. ampicillin을 넣은 LB broth에서 clone된 cell을 OD값이 0.5 0.6이 되도록 배양한 후에 IPTG를 final concentration 1mM이 되게 첨가하여 4시간 동안 induction했다. Induction후에 harvest한 것을 sample buffer에 직접 섞어서 SDS-PAGE 분석을 했고, 또한 harvest한 cell을 lysis buffer(8M urea 포함)로 over night lysis한 후 whole cell lysate, whole cell lysate을 원심분리 후 생긴 supernatant, precipitate 등을 SDS-PAGE로 분석을 했다. Expressed protein이 talon metal affinity resin에 binding 되는지의 여부를 알아보고자 denaturing condition에서 purification을 large scale로 수행하였다. Lysised cell을 talon metal affinity resin에

binding시킨 후 elution buffer를 넣고 실온에서 10분 동안 gently mixing 후 원심분리하여 상등액을 회수하여 정제 과정 중 단계별로 sampling하여 SDS-PAGE를 하였다. 또한 제2세부과제에서 제조한 *S. pullorum agf*A, *agf*B와 *S. enteritidis agf*A를 pGEX-2T vector에 GST fusion protein으로 cloning한 cell을 expression 하였다. ampicillin을 넣은 2× YTA broth에서 cloning된 cell을 배양한 후 OD600 값이 0.6 0.8사이에 이르면 IPTG의 농도가 0.3 mM이 되게 첨가하여 induction했다. 이 때 각 시간별로 sampling을 하여 expression 정도를 SDS-PAGE로 확인을 했다.

3) 재조합 단백항원의 분리 • 정제

제 2세부과제에서 Maltose Binding Protein(MBP) fused protein으로 제조된 cloned cell을 이용하여 expression 정도를 실험하였다. 배지 조성은 ℓ당 tryptone 10g, NaCl 5g, yeast extract 5g, glucose 2g이며, 멸균 후 ampicillin을 첨가했다. Over night culture를 △-flask의 배지에 2% inoculation을 한 후 37℃에서 OD600 값이 0.5 0.6정도가 되게 배양한 후 IPTG 농도가 0.3mM이 되게 첨가하고 이 때 배양 온도를 32℃로 낮추고 네 시간 동안 induction을 하였다. Expressed 된 *S. gallinarum agf*A를 purification을 하고자 amylose resin을 이용하였다. Harvested cell에 column buffer로 resuspending한 후 sonicator를 이용하여 cell을 disrupture 시킨 후 centrifugation을 하여 상등액만을 취하여 amylose resin에 resuspending한 후 실온에서 한 시간 동안 binding을 시켰다. Binding 후에 원심분리하여 상등액을 제거하고 column buffer에 다시 amylose resin을 resuspending하여 washing을 한 후 elution 하였다. 정제가 되었는지를 알아보기 위해서 SDS-PAGE 분석을 하였다.

4) 재조합 단백 항원의 cloning 및 대량생산체계 구축

재조합 단백 항원의 생화학적 성상 비교를 위한 기초연구로서 또한 제2세부과제에서 제조되지 않은 *S. entiritidis agf*A subunit gene을 pMAL-CR1에 cloning 하여 MBP-AgfA fused protein을 제조하였다. *agf*A cloning을 위해 *S. entiritidis*의 chromosomal DNA를 template로 하여 *agf*A subunit의 DNA 단편을 PCR로 증폭하였다. Primer의 염기서열은 5'-GCG**GAATTC**ATG

AAACTTTTAAAAGTGG-3'와 5'-CGC**GTCGAC**ATACTGGTTAGCCGTG GC-3' 이었다. PCR 조건은 94℃ 5 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min로 1 cycle, 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min로 30 cycle, 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min로 1 cycle 였다. 증폭된 *agf*A DNA는 2% agarose gel에서 그 size를 확인하였다. 증폭된 DNA를 정제한 후 *Eco*RⅠ과 *Sal*Ⅰ로 절단하고 Vector pMAL-CR1을 *Eco*RⅠ과 *Sal*Ⅰ로 절단한 후 16℃에서 ligation 시켰다. Ligation mixture를 *E. coli DH5α*에 transfomation한 후 transformant의 plasmid DNA를 추출하고 *Eco*RⅠ과 *Sal*Ⅰ로 digest 하여 *agf*A의 DNA의 cloning을 확인하였다. *agf*A 유전자 cloning이 확인된 transformant에서 MBP-AgfA fused protein의 발현을 조사하였다. Transformant를 ampicillin이 함유된 LB media에서 OD가 0.5까지 배양한 후 최종농도 1 mM IPTG를 첨가하고 5시간 더 배양한 후 harvest 하고 SDS-PAGE로 MBP-AgfA subunit의 생산여부를 조사하였다. MBP-AgfA fused protein으로부터 *agf*A subunit를 분리 정제하기 위해서 harvested cell을 sonication으로 lysis 시켰다. Cell extract를 amylose resin과 4℃에서 2 hr 반응시켜 MBP-AgfA fused protein을 amylose resin에 binding 시킨 후 amylose resin을 buffer로 3회 washing한 후 MBP-AgfA fused protein을 정제하였다. 또한 amylose resin에 factor Xa를 넣고 4℃에서 16 hrs 반응시켜 AgfA가 MBP로부터 분리되도록 한 후 SDS-PAGE를 통해 분리된 AgfA의 존재를 확인했다.

5) 재조합 단백 항원의 생화학적 특성 시험

*S. enteritidis*는 제 4세부과제에서 직접 cloning하여 재조합 단백 항원을 제조하였고, *S. gallinarum*, *S. pullorum*은 제 2세부 과제에서 cloning한 cell을 사용하였다.

Ampicillin을 넣은 LB 배지에 clone된 cell을 OD_{600}에서 0.5가 되도록 배양(30℃)한 후에 IPTG를 1mM이 되게 첨가하여 4시간 동안 induction했다. Cell을 harvest하여 (6,000rpm, 10min, 4℃) column buffer(20mM Tris-Cl pH 7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA)에 suspension한 후 final concentration 1mM이 되게 PMSF를 첨가하고, sonication을 하였다. 12,000rpm에서 30분(4℃) 동안 원심분리를 한 후 crude cell extract를 얻었고, 이 것을 amylose resin에

binding하였다.(4℃, 3시간) Column buffer로 3 4회 resin을 washing한 후 elution buffer(10mM maltose, 20mM Tris-Cl pH 7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA)로 elution 한 것을 SDS-PAGE로 확인 하였다.

Eluted *S. gallinarum* MBP-fusion AgfA protein과 eluted *S. pullorum* MBP-fusion AgfA protein에서 MBP를 분리하고자 FPLC를 이용하여 Gel permeation chromatography와 Ion exchange chromatography를 하였다. 첫 번째로 gel permeation chromatography를 하기 위해서 Sephacryl S-200HR을 사용하였으며, column의 V0=43.43㎖, Height=60㎝, diameter=1.6㎝, column volume은 120.637㎖이며, Eluted *S. gallinarum* MBP-fusion AgfA protein의 농도는 OD280=3.0이였으며 eluted *S. pullorum* MBP-fusion AgfA protein의 농도는 OD280=2.7이였고, 각각 1㎖씩을 loading하였다. 분리된 peak를 각각 SDS-PAGE로 확인하였다. 두 번째로는 Mono Q column을 이용하여 Ion exchange chromatography를 하였다. Column voume =0.982㎖이며, buffer A로는 10mM Tris-Cl pH 8.0을 사용하였고, buffer B로는 1M Nacl in 10mM Tris-Cl pH 8.0을 사용하였으며 buffer B의 농도를 0M에서 1M까지 상승시켰다. 또한 eluted *S. gallinarum* MBP-fusion AgfA protein의 농도는 OD280=1.02였으며, 2㎖을 loading하였다. 분리된 peak를 각각 SDS-PAGE로 확인 하였다.

6) 재조합 단백 항원의 분획·정제 및 대량생산 체제 확립

Expressed cell을 sonication하여 crude cell extract를 얻은 후 amylose resin에 binding하였다.(4℃, 3시간) Column buffer로 3 4회 resin을 washing 한 후 elution buffer(10mM maltose, 20mM Tris-Cl pH 7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA)로 elution 한 것을 SDS-PAGE로 확인 하였다. 이 방법을 반복하여 대량 제조한 *S. enteritidis* MBP-fusion AgfA protein 중에서 가장 purity가 높은 것을 선택한 후 제 2세부 과제와 협동하여 antibody를 제조하였다. 1차로 OD280=3.0이 되는 eluted *S. enteritidis* MBP-fusion AgfA protein 800㎕를 PBS로 희석한 후, incomplete adjuvant 2㎖과 섞어서 토끼 두 마리에 각각 injection하였고, 3주 후에 OD280=0.607이 되는 eluted *S. enteritidis* MBP-fusion AgfA protein 1.5㎖을 소량의 PBS로 희석하고 incomplete adjuvant와 섞은 후 1차 booster injection을 하였고, 4주 째에 2nd injection을

하였다.(OD280=0.78, 1.6㎖) 5주 째에 토끼의 심장에서 채혈을 한 후 serum만을 분리하여 제 4 세부과제로 가져와 antibody의 생성여부를 확인하였다.

SDS-PAGE에 의해 분리된 protein을 Semi-Dry transfer units(Pharmacia Biotech. Co.)로 PVDF(polyvinylidene difluoride, Bio-Rad Co.) membrane에 두시간 동안 transfer하였다. transfer후 blocking buffer(5% skim milk, 0.25M Tris-Cl, pH 8.0)로 한 시간 동안 blocking한 후 1차 antibody를 1:1000으로 희석하여 O/N shaking하였다.(Room Temperature) Washing solution(20mM Tris-Hcl pH 7.5, 500mM NaCl, 0.05% tween-20)으로 15분씩 3회 washing을 한 후 biotinylated anti-rabbit IgG made in goat, secondary antibody를 1:1000으로 희석하여 2.5시간 동안 binding하였다. 다시 10분씩 3회 washing을 한 후 ABsolution(Avidin and biotinylated horseradish peroxidase, Vector Co.)으로 45분 동안 반응시킨 후 10분씩 3회 washing하였다. DAB(diamino-benzidine, Vector Co.) solution으로 수초간 발색시킨 후 물에 넣어 반응을 정지시킨 후 60kDa의 band로 antibody임을 확인 하였다.

7) 야외분리주, 변이주 및 재조합 단백항원의 생화학적 성상 비교

제 3세부 과제에서 마련한 *S. typhimurium*의 mutant로 OMP의 생화학적 성상 시험을 하기 위해서 wild type의 *S. typhimurium* 과 동일한 조건에서 배양하여 그 둘 사이의 차이점을 비교하였다. LB 배지에 야외분리주(wild type)와 변이주(mutant, LB 배지에 kanamycin포함)의 O/N culture를 만들고, inoculation한 후 stationary phase에서 각각을 harvest하였다. PBS로 harvest한 cell을 2번 washing한 후에 다시 PBS에 suspension하여 final concentration 1mM이 되게 PMSF를 넣고, sonication을 한 후 원심분리(6,000rpm, 20min, 4℃)하여 debris는 버리고 , supernatant만을 취하여 초원심분리를 하였다.(30,000rpm, 1hr, 4℃) 초원심분리를 하여 생긴 pellet을 10mM HEPES in 2% Sarkosyl에 suspension하였고, 4℃ O/N inverting하였다. 다시 초원심분리(30,000rpm, 1hr, 4℃)를 하여 생긴 하얀 gelly같은 pellet을 10mM Tris-Cl(pH 7.2) 1㎖에 suspension하였다. 이렇게 해서 얻어진 OMP를 SDS-PAGE로 비교하였다.

8) 변이주의 계대배양에 따른 항원단백의 안정성

*S. typhimurium*의 mutant와 wild type을 똑같은 조건에서 10회 계대 배양을 한 후 7)과 동일한 방법으로 항원 단백(OMP)을 정제하여 wild type과 mutant의 차이점을 SDS-PAGE로 살펴보았고, 계대 배양을 하지 않은 wild type과 계대 배양을 한 wild type을 SDS-PAGE로 비교해 보았으며, 계대 배양을 하지 않은 mutant와 계대 배양을 한 mutant를 SDS-PAGE로 각각 비교하였다.

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

1. 제 1 세부과제 : 닭 살모넬라균증에 대한 분자생물학적 진단법 개발 및 국내분리 살모넬라균의 핵염기 구조분석

1) 가검물채취, 살모넬라균 분리 동정

양계장 15 개소로부터 1,116 건 도계장 2 개소에서 207 건의 가검물을 각각 채취하여 공시하였으며, 주로 추백리, 닭티푸스 및 닭 paratyphoid의 임상증세를 나타내거나 부검시 살모넬라균 감염으로 의심되는 장기병변을 나타내는 개체로부터 간, 담낭, 난소 및 장내용물을 채취하여 공시하였다. Table 1-1에서 요약한 바와 같이 스크리닝검사에서 자동미생물검출기기에 의해 양계장 가검물에서는 201 례(17.9%) 그리고 도계장 가검물에서는 82 례(39.6%)에서 살모넬라균 양성반응이 나타났고 배양법(감별배지상)에서는 양계장 가검물에서 131 례(11.6%), 그리고 도계장 가검물에서는 81례(38.6%)의 양성례가 검출되어 자동미생물검출기기에서 높은 양성율이 인정되었다.

Table 1-1. **가검물채취 및 *Salmonella*균 스크리닝 검사**

구분	지역	개소	가검물채취건수	*Salmonella*균 분리(%)	
				자동미생물검출기	배양법
양계장	대전	3	426	72(16.9)	48(11.0)
	충남	4	271	40(14.8)	24(8.9)
	충북	8	419	89(21.0)	59(14.1)
	소계	15	1,116	201(17.9)	131(11.6)
도계장	대전	1	129	50(38.3)	54(41.0)
	충남	1	78	32(41.0)	27(34.6)
	소계	2	207	82(39.6)	81(38.6)

스크리닝검사에서 양성으로 검출된 분리주를 생화학적 성상 및 serotyping 시험으로 동정한 바 (Table 1-2), *S. typhimurium*의 상대적 분리빈도가 가장 높았으며(14.2%-19.5%) *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium* 및 *S. enteritidis* 가운데 배양법에서 검출된 212 례중 61 례(28.8%) 그리고 자동미생물검출기기에서 검출된 283 례중 126 례(44.5%)가 비살모넬라균으로 판명되어 닭 가검물에서 살모넬라균 분리시 자동미생물검출기의 특이성이 배양법에 비해 낮게 나타났다.

Table 1-2. 생화학적 성상검사 및 serotyping에 의한 살모넬라균 동정

혈청형	배양법 (%)	자동미생물검출기 (%)
S. pullorum	11(5.2)	12 (4.2)
S. gallinarum	24(11.4)	26(14.2)
S. typhimurium	41(19.5)	40(14.2)
S. enteritidis	17(8.1)	17(6.0)
Other *Salmonella* serovars	58(27.6)	62(22.0)
소계	151(71.2)	157(55.5)
non-*Salmonella*	61(28.8)	126(44.3)
계	212(100)	283(100)

2) 단클론성 항체 생산 및 sandwich ELISA 시험

면역된 BALB/c 마우스의 비장세포와 SP2/0 mouse myeloma 세포를 융합하여 특이항체를 생산하는 hybridoma를 1차 스크리닝에서 *S. pullorum* 16주, *S. gallinarum* 12주, *S. typhimurium* 14주 및 *S. enteritidis* 7주를 각각 검출하였고, 최종선별에서 *S. pullorum*에서 3 clones, *S. gallinarum*에서 2 clones, *S. typhimurium*에서 2 clones 및 *S. enteritidis*에서 1 clones을 작제하였다(Table 1-3). Hybridoma 배양액으로 측정한 MAb의 isotypes은 IgGa, IgG3, IgG2a 및 IgG2b로 나타났고, 간접형광항체법으로는 2 8배의 양성, ELISA에서는 8 32배의 양성을 각각 보였으며, AGP에의한 양성율은 낮았다(Table 1-3). ELISA법에 의한 특이성 시험에서 생산된 MAb는 Table 1-4.에서 요약한 바와 같이 homologous antigen에 대해 높은 양성율을 보였으며 heterologous *Salmonella* 균과 *E. coli*균에 대해서도 약간의 교차반응이 인정되었으며, *Streptococcus spp.*에대해서는 모든 MAb가 음성반응을 보였다.

MAb SP-17, SG-6, ST-9 및 SE-14 clones를 이용하여 tryptose soy broth에 배양된 homologous antigen에 대한 Sandwich ELISA를 실시하여 감수성을 시험한 바(Table 1-5), MAb SP-17, SG-6 및 ST-9은 $10^2$5CFU/0.1㎖ 이상 그리고 SE-14는 $10^3$5CFU/0.1㎖이상을 검출할 수 있었다.

Table 1-3. Monoclonal antibody의 성상과 성상시험

Type of Bacteria	Clones	Isotypes	Homologous antigens		
			IFA	AGP	ELISA
S. pullorum	SP-4	IgG1	+(4)	−(0)	+(16)
	SP-16	IgG1	+(4)	+(2)	+(32)
	SP-17	IgG3	+(8)	+(4)	+(16)
S. gallinarum	SG-6	IgG2b	+(2)	−(0)	+(8)
	SG-14	IgG1	+(4)	+(2)	+(32)
S. *typhimurium*	ST-1	IgG2b	+(8)	−(0)	+(16)
	ST-9	IgG2a	+(4)	−(0)	+(16)
S. enteritidis	SE-14	IgG1	+(2)	−(0)	+(16)

( ) : reactive titers of culture fluids

Table 1-4. Monoclonal antibody의 특이성

Antigens tested	Reactivities of MAb by ELISA							
	SP-4	SP-16	SP-17	SG-6	SG14	ST-1	ST-9	SE-14
S. pullorum	+(32)	+(16)	+(64)	±(4)	−	−	−	±(2)
S. gallinarum	±(2)	−	±(2)	+(32)	+(64)	−	±(2)	−
S. typhimurium	−	−	±(4)	−	−	+(64)	+(32)	−
S. enteritidis	−	±(2)	−	−	±(2)	−	−	+(32)
E. coli(3)	−	±(4)	−	−	±(4)	−	−	−
Streptococcus spp(2)	−	−	−	−	−	−	−	−
S*almonella* isolates(5)*	−	−	±(8)	−	−	−	±(4)	−

* *Salmonella* B, D group 이외의 균주

( ): Titers of ELISA for culture fluids

Table 1-5. Sandwich ELISA에 의한 *Salmonella*균 검출시험

Cell conc. of Sal(cfu/0.1ml)	ELISA value* against homologous antigens			
	SP-17	SG-6	ST-9	SE-14
$10^8$5	1.332	1.121	1.627	1.109
$10^7$5	1.119	1.012	1.118	1.010
$10^6$5	0.801	0.799	0.706	0.698
$10^5$5	0.698	0.591	0.495	0.193
$10^4$5	0.187	0.284	0.191	0.099
$10^3$5	0.078	0.083	0.087	0.069
$10^2$5	0.057	0.066	0.059	0.060
$10^1$5	0.045	0.063	0.050	0.058
10^1	0.036	0.045	0.042	0.049
Negative controls	0.034	0.046	0.035	0.051

*OD at 490nm

Underlines = cut-off by mean of negative ± 4SD

3) PCR 시험

*Salmonella*균에서 추출한 DNA를 Sf1 primers 및 Sef1 primers를 공시하여 *sef*A 유전자에 대한 PCR를 수행한 바, Fig. 1-1과 Fig. 1-3와 같이 *S. pullorum*, *S. gallinarum* 및 *S. enteritidis*에 대해 증폭된 488bp와 513bp의 DNA 밴드가 각각 관찰되었으며, *S. typhimurium* 및 다른 *Salmonella spp*와 E. *coli* 및 *Streptococcus spp*에서는 관찰되지 않았다. Sf1 primers를 이용하여 추출된 *Sal enteritidis* DNA를 1μg, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100tg, 10tg으로 단계희석한 다음 반응성을 시험한 바 Fig. 1-2에서 나타낸 바와 같이 100pg 이상에서 양성밴드가 인정되었다. 4개의 fimbrial type(*SEF21*, *SEF18*, *SEF17* 및 *SEF14*)중 *SEF14* thin fimbirae의 strucrural fimbrin subunit를 암호하는 *sefA* 유전자를 이용하여 공시된 D1 group중 *S. enteritidis*, *S. pullorum* 및 *S. gallinarum*를 특이하게 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

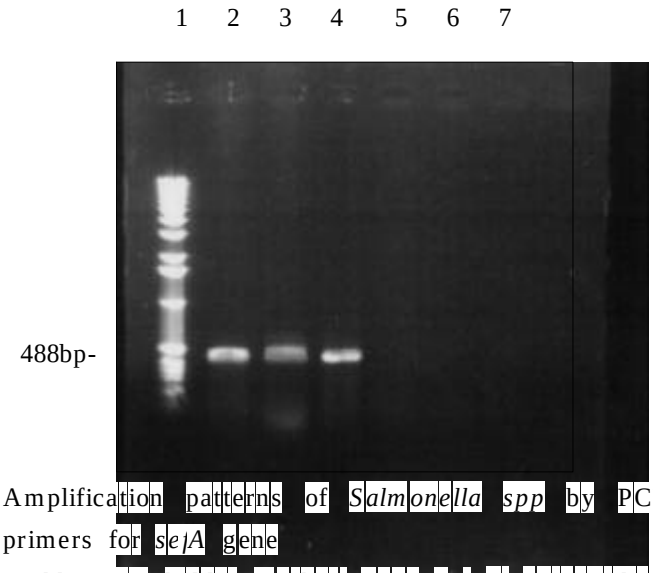

Fig. 1-1. Amplification patterns of *Salmonella spp* by PCR using Sef1 primers for *sejA* gene

Lane 1 : 1kb DNA ladder marker, Lane 2 : *S. enteritidis*, Lane 3 : *S. pullorum*, Lane 4 : *S. gallinarum*, Lane 5 : *S. typhumurium*, Lane 6 : *E. coli*, Lane 7 : *Streptococcus spp*

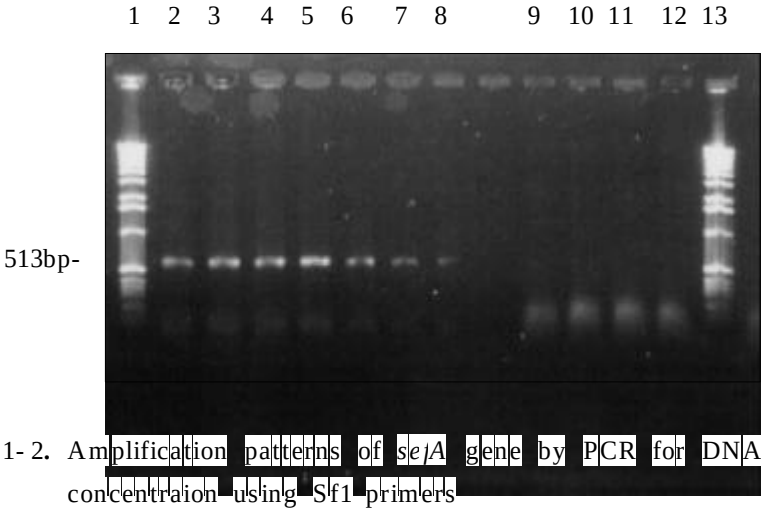

Fig. 1-2. Amplification patterns of *sejA* gene by PCR for DNA at various concentraion using Sf1 primers

Lane 1 : 1kb DNA ladder marker, Lane 2 : 10μg , Lane 3 : 1μgng, Lane 4 : 100ng, Lane 5 : 10ng, Lane 6 :1ng, Lane 7 : 100pg, Lane 8 : 10pg, Lane 9 : 1pg, Lane 10 : 100tg, Lane 11 : 10tg, Lane 12 : 1tg Lane 13 : 1kb DNA ladder marker

Sf I primer를 이용하여 *Salmonella* serogroup D1인 *Sal. enteritidis*, *Sal. pullorum*, *Sal. gallinarum* 표준주를 대상으로 PCR을 실시한 바, 표준주 모두 513bp에서 DNA fragments가 특이하게 증폭되었다(Fig. 1-3). 또한 야외에서 분리된 *Sal. enteritidis* 33주, *Sal. pullorum* 22주, *Sal. gallinarum* 45주를 대상으로 PCR를 수행한 바, *Sal. enteritidis* 33주중 31주에서, *Sal. pullorum* 22주중 19주, *Sal. gallinarum* 45주중 42주에서 513bp의 DNA band를 관찰할 수 있었다(Fig. 1-4). *Sal. enteritidis*, *Sal. pullorum*, *Sal. gallinarum* 및 *Sal. typhimurium* 표준주를 감염시킨 후 증상이 발현된 닭의 가검물을 채취하여 무작위 증균한 후 PCR를 수행한 바, *Sal. enteritidis*, *Sal. pullorum*, *Sal. gallinarum*에 감염되어 증상을 발현한 닭의 가검물에서는 모두 513bp의 DNA 분절을 관찰할 수 있었으나, *Sal. typhimurium*에 감염된 닭의 가검물에서는 관찰할 수 없었다. 또한 Salmonellosis로 추정되는 닭 가검물 174개를 대상으로 무작위 증균하여 PCR를 수행한 바, 36개의 가검물에서 513bp의 DNA 분절을 관찰할 수 있었으며(Fig. 1-5) sefA 유전자가 증폭된 36개의 가검물 배양액을 선택배지로 계대배양하여 성상 및 혈청학 검사을 수행한 바, *Sal. enteritidis* 19주, *Sal. pullorum* 3주, *Sal. gallinarum* 11주 및 *Salmonella* spp 3주로 판명되었다.

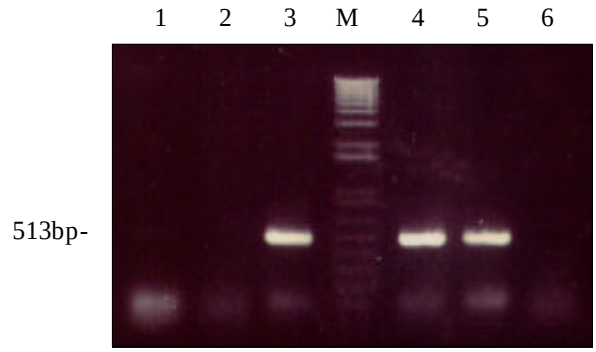

Fig. 1-3. Amplification pattern of *Salmonella* spp. by PCR using Sf I primer for *sef*A gene. Lane 1: *E. coli*, Lane 2: *Sal. typhimurium*, Lane 3: *Sal. enteritidis*, Lane M: 1Kb DNA marker, Lane 4: *Sal. pullorum*, Lane 5: *Sal. gallinarum*, Lane 6: *Streptococcus spp.*

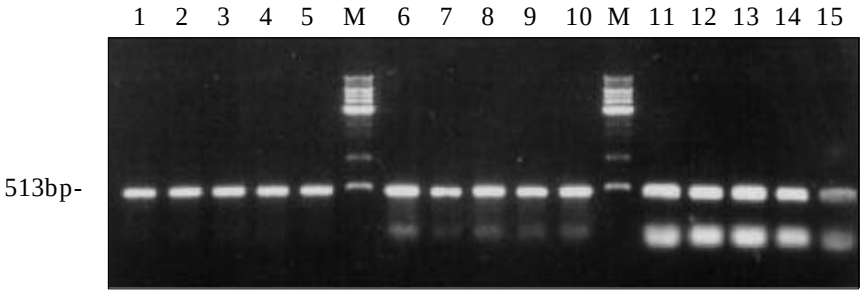

Fig. 1-4. Amplification pattern of *sef*A gene for the field isolates of *Salmonella* D1 serogroup. Lane M: 1Kb DNA marker, Arrows indicate the DNA fragments of 513bp, Lane 1-5: *Sal. enteritidis* isolates, Lane 6-10: *Sal. gallinarum* isolates, Lane 11-12: *Sal. pullorum* isolates.

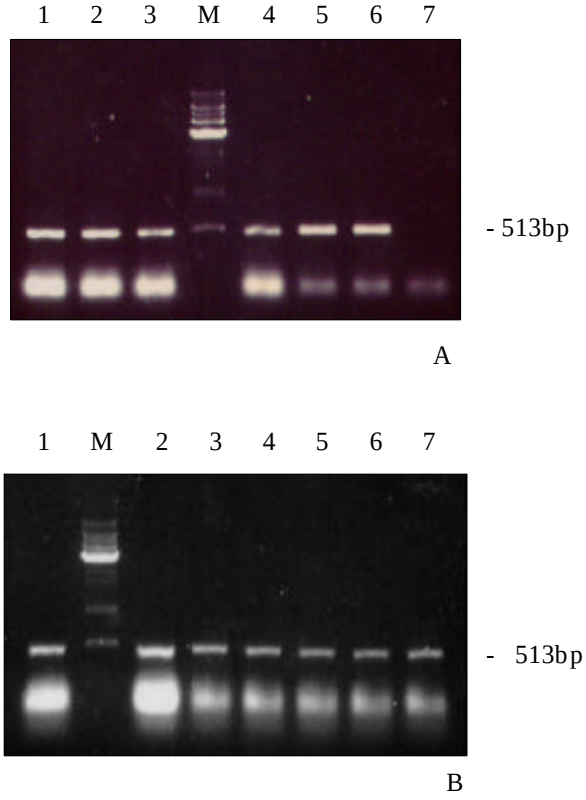

Fig. 1-5. Amplification pattern of *Salmonella* from artificially and naturally contaminated chicken by PCR using Sf I primer for *sef*A gene.

A) Specimens of artificially contaminated chicken. Lane M: 1Kb DNA marker, Arrows indicate the DNA fragments of 513bp, Lane 1-2: *Sal. enteritidis*, Lane 3-4: *Sal. gallinarum*, Lane 5-6: *Sal. pullorum*, Lane 7: *Sal. typhimurium*.

B) Specimens of naturally contaminated chicken. Lane M: 1Kb DNA marker, Arrows indicate the DNA fragments of 513bp, Lane 1-7: *Salmonella spp*.

4) Cleavage Patterns of PCR products

PCR products가 *sef*A gene인지를 확인하기 위한 시험에서 *Sal. enteritidis*, *Sal. pullorum*, *Sal. gallinarum* 및 *Sal. typhi*에서 증폭된 밴드는 모두 *Bam*HI에서는 156bp 및 357bp 그리고 *Hae*III에서는 173bp 및 340bp크기로 절단되었으며, *Bsu*36I, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Not*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I 및 *Xho*I에서는 절단되지 았았다. 이와같은 결과는 기 분석된 *sef*A gene의 제한효소 절단패턴과 일치하였다(Fig. 1-6).

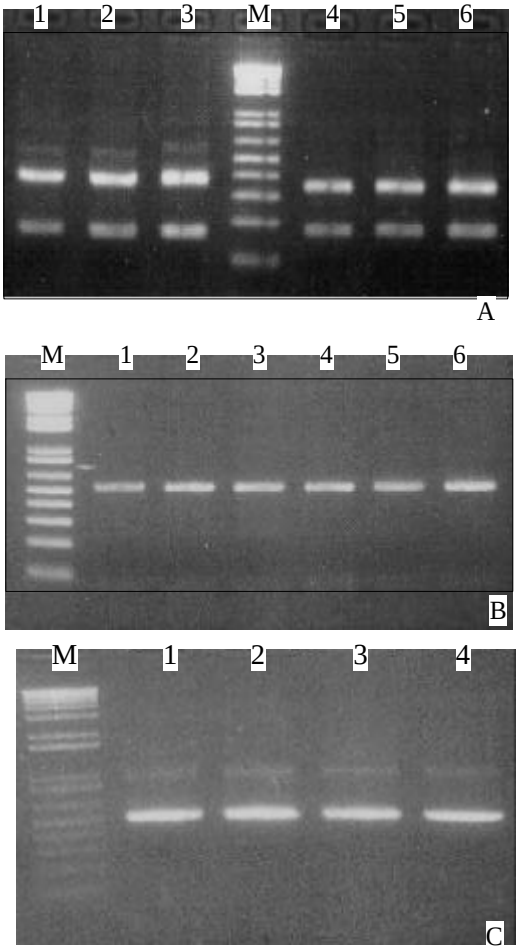

Fig. 1-6. Cleavage pattern of the PCR products amplified with Sf I primer digested with various restriction endonucleases.

A) Lane M: 1Kb DNA marker, Lane 2: *Sal. enteritidis*/*Bam*HI, Lane 3: *Sal. gallinarum*/ *Bam*HI, Lane 4: *Sal. pullorum*/*Bam*HI, Lane 4: *Sal. enteritidis*/*Hae*III, Lane 5: *Sal. gallinarum*/*Hae*III, Lane 6: *Sal. pullorum*/*Hae*III.

B) *sef*A gene of *Sal. enteritidis*. Lane M: 1Kb DNA marker, Lane 1: *Cla*I, Lane 2: *Eco*RI, Lane 3: *Hind*III, Lane 4: *Not*I, Lane 5: *Sal*I, Lane 6: *Sma*I.

C) *sef*A gene of *Sal. enteritidis*. Lane M: 1Kb DNA marker, Lane 1: *Bsu*36I, Lane 2: *Nco*I, Lane 3: *Xba*I, Lane 4: *Xho*I.

5) *sefA* gene 클론닝

Sf1 primer primer를 이용하여 PCR로 증폭된 *sefA* gene을 *Eco*RI으로 처리하여 얻어진 분절과 *Eco*RI으로 처리된 pGEX-2T vector와 융합한 다음(이후 이 plasmid를 pGEX-S14라 칭함), DH5α competent cell에 transformation시키고 앰피실린이 첨가된 LB agar를 이용하여 스크리닝하고, 선택된 집락은 LB broth에 배양하고 miniprep으로 plasmid DNA를 추출한 다음 *Eco*RI으로 처리하고 1.5% agarose gel에 전기영동한 결과, *Eco*RI으로 절단시 0.5kb의 insert DNA와 4.9kb의 vector DNA를 확인할 수 있었다(Fig.1-7). Insert DNA를 확인후 plasmid를 *Xho*I으로 처리하여 linear DNA로 만든후 Centri·spin column(Takara)을 이용하여 정제한 후 DNA 염기분석용 template로 사용하였다.

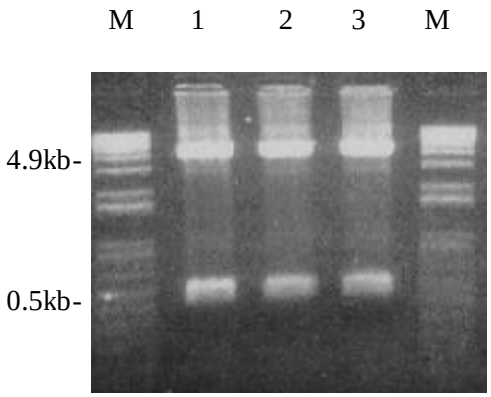

Fig. 1-7. Cleavage patterns of pGEX-S14 digested with *Eco*RI.
Lane 1-3 : pGEX-S14/*Eco*RI, Lane M : 1kb DNA ladder marker.

6) *sef*A 유전자 염기서열 분석

Sal. enteritidis, *Sal. gallinarum* 및 *Sal. pullorum* 표준주 및 국내분리주를 Dye terminator cycle sequencing법에 의해 *sef*A gene의 ATG codon부터 TAA termination codon까지 위치하는 498의 염기서열을 결정하고, 상동성을 비교하였던 바 표준주간에는 100%의 상동성이 관찰되었으며(Fig. 1-8), 분리균주 인 *Sal. enteritidis*와 *Sal. gallinarum*은 99.6%로, *Sal. enteritidis*와 *Sal. pullorum*은 99.8%로, 그리고 *Sal. gallinarum*과 *Sal. pullorum*은 99.8%의 homology를 보였다(Table 1-6). 따라서 *Salmonella* serogroup D에 속하는 *Salmonella spp*는 상호 매우 높은 유사성을 나타내거나 일치하였다. 즉, 염기의 변화는 89와 326bp에서만 발생하였다.

7) SefA protein의 아미노산 서열 비교

*sef*A 유전자 염기서열 분석에서 얻어진 결과를 기초로 하여 SefA protein에 대한 아미노산서열을 추정하였던 바 Fig. 1-9와 같이 165개의 아미노산을 결정하였다. 이 결과를 분리균주 상호간 비교하였던 바, SefA protein의 아미노산은 *Sal. enteritidis*와 *Sal. gallinarum*은 98.8%로, *Sal. enteritidis*와 *Sal. pullorum*은 99.4%로, 그리고 *Sal. gallinarum*과 *Sal. pullorum*은 99.4%의 상동성을 보였다(Table 1-6). 따라서 *Salmonella* serogroup D에 속하는 *Salmonella spp*는 상호 매우 높은 유사성을 나타내었다. 즉, 30과 109 번째의 아미노산이 *Sal. enteritidis*에서는 valine과 isoleucine으로, *Sal. gallinarum*에서는 glutamic acid와 threonine으로, 그리고 *Sal. pullorum*에서는 glutamic acid와 isoleucine으로 변화되어 있었다.

또한 SefA protein에서는 1개의 N-asparagine-linked glycosylation site가 관찰되었으며, 1개의 cysteine 잔기가 인정되었다.

```
S.e.   1 atgcgtaaat cagcatctgc agtagcagtt cttgctttaa ttgcatgtgg cagtgcccac 60
S.g.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.e.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                                       *
S.e.  61 gcagctggct ttgttggtaa caaagcagtg gttcaggcag cggttactat tgcagctcag120
S.g.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.e.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g.i    ---------- ---------- --------a- ---------- ---------- ----------
S.p.i    ---------- ---------- --------a- ---------- ---------- ----------


S.e. 121 aatacaacat cagccaactg gagtcaggat cctggcttta cagggcctgc tgttgctgct180
S.g.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.e.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------


S.e. 181 ggtcagaaag ttggtactct cagcattact gctactggtc cacataactc agtatctatt240
S.g.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.e.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------


S.e. 241 gcaggtaaag gggcttcggt atctggtggt gtagccactg tcccgttcgt tgatggacaa300
S.g.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.e.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

```
                                        *
S.e. 301 ggacagcctg ttttccgtgg gcgtattcag ggagccaata ttaatgacca agcaaatact360
S.g.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.e.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g.i    ---------- ---------- -----c---- ---------- ---------- ----------
S.p.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------


S.e. 361 ggaattgacg ggcttgcagg ttggcgagtt gccagctctc aagaaacgct aaatgtccct420
S.g.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.e.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------


S.e. 421 gtcacaacct ttggtaaatc gaccctgcca gcaggtactt tcactgcgac cttctacgtt480
S.g.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.e.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p.i    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------


S.e. 481 cagcagtatc aaaactaa   498
S.g.     ---------- --------
S.p.     ---------- --------
S.e.i    ---------- --------
S.g.i    ---------- --------
S.p.i    ---------- --------
```

Fig. 1-8. Comparison of the sequence of the *sefA* genes of the standard strains of *Sal. enteritidis*(S.e.), *Sal. gallinarum*(S.g.), *Sal. pullorum*(S.p.), and the isolates of *Sal. enteritidis*(S.e.i), *Sal. gallinarum*(S.g.i) and *Sal. pullorum*(S.p.i). The two positions at which a base changes occurs, 89 and 326bp, are marked by an asterisk(*).

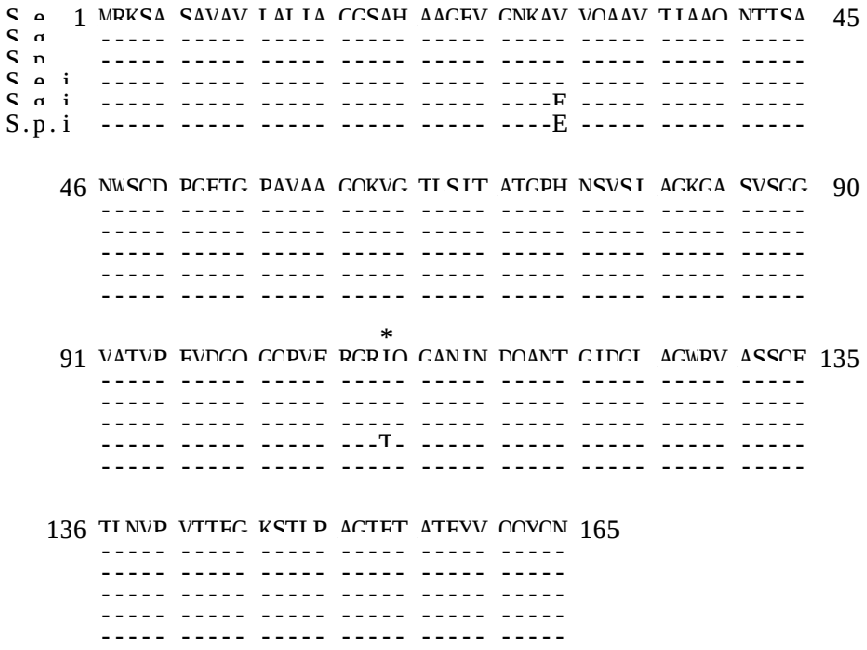

Fig. 1-9. A comparison of the deduced amino acid sequences of the SEF14 protein of the standard strains of *Sal. enteritidis*(S.e.), *Sal. gallinarum*(S.g.), *Sal. pullorum*(S.p.), and the isolates of *Sal. enteritidis*(S.e.i), *Sal. gallinarum*(S.g.i) and *Sal. pullorum*(S.p.i). A dash indicates an identical residue. The deduced N-glycosylation sites were underlined. The two positions at which a base changes occurs, 89 and 326bp, are marked by an asterisk(*).

Table 1-6. Summary of the homology nucleotide and amino acid sequences among isolates of *Salmonella spp*.

***sef*A gene**	**S.e.i/S.g.i**	**S.e.i/S.p.i**	**S.p.i/S.g.i**
Nucleotide sequence homology(%)	496/498 99.6	497/498 99.8	497/498 99.8
Amino acid sequence homology(%)	163/165 98.8	164/165 99.4	164/165 99.4

S.e.i : *Sal. enteritidis* isolate, S.g.i : *Sal. gallinarum* isolate, S.p.i : *Sal. pullorum* isolate

8) Dot blot hybridization

SefA probe를 이용한 Dot blot hybridization에서 *Salmonella* serogroup D1에서 추출된 DNA 및 PCR에서 증폭된 DNA모두 양성반응을 나타내었다 (Fig.1-10). *Salmonella* serogroup D1외의 *Salmonella typhimurium*, *E. coil*, *Streptococcus spp* 및 *Staphylococcus spp*에서는 음성반응을 보였다.

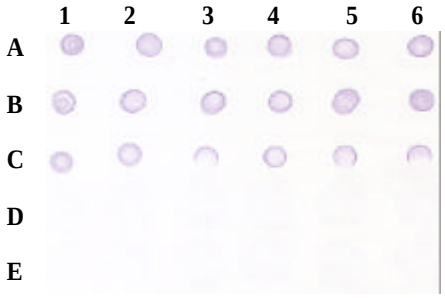

Fig. 1-10. Dot-blot hybridization demonstrating the specificity for *Salmonella* serogroup D1 of the sefA probe.
A) *S. enteritidis*, B) *S. gallinarum*, C) *S. pullorum*, D) 1-3: *S. typhimurium*, 4-6: Other *Salmonella spp*, E) 1-2: *E. coli*, 3-4: *Streptococcus spp*, 5-6: *Staphylococcus spp*. A-C) 1: standard strain, 2-6: isolated strains

9) 항원농도가 RIDEA에 미치는 영향

OMP 및 *agfA*의 농도를 0.5, 1.0 및 2.0 ㎍/㎖로 조정하여 petri dish에 코팅한 다음 *Sal. enteritidis*로 면역된 토끼와 닭의 혈청 그리고 정상 음성 대조혈청을 공시하여 RIDEA를 실시한 바(Table 1-7). OMP 및 *agfA*는 0.5 ㎍/㎖에서는 5.7 5.8mm 및 5.8 6.3㎜, 1.0 ㎍/㎖에서는 8.4 9.8mm 및 7.9 8.3㎜ 그리고 2.0 ㎍/㎖에서는 8.4 9.9mm 및 9.3 9.8㎜ 이었다. 음성 혈청과의 반응에서는 2.0 ㎍/㎖ OMP에서 비특이 반응이 관찰되었다. 적정항원농도는 1.0㎍/㎖으로 정하여 본시험을 수행하였다.

Table 1-7. Effects of Antigen Concentration on RIDEA

Sera	No. of sera	OMP (㎍/ml)			*agfA*(㎍/ml)		
		0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
Positive*							
Rabbit	2	5.7**	9.8	11.8	6.3	8.3	9.8
Chickens	2	5.8	8.4	10.3	5.8	7.9	9.3
Negative+							
Rabbit	3	< 4.0	< 4.0	< 4.0	< 4.0	< 4.0	< 4.0
Chickens	3	< 4.0	< 4.0	4.6	< 4.0	< 4.0	< 4.0

*The sera prepared by immunization of *Sal. enteritidis*.

** The values represent diameter(mm) of RIDEA.

+ The normal healthy rabbits and one day-old chickens.

10) RIDEA-*agfA* or -OMP and ELISA-*agfA* or -OMP의 반응성과 특이성

agfA 와 OMP를 이용한 RIDEA와 ELISA의 감수성과 특이성을 *Salmonella spp* 와 *E. coli*균주로 면역된 토끼와 닭 혈청을 이용하여 시험한 바(Table 1-8), RIDEA-*agfA* 와 RIDEA-OMP는 *Salmonella spp* 에 면역된 토끼 및 닭 혈청과는 강한 양성반응(>7.8mm)을 보였으며, *E. coli*균 면역혈청 과 음성대조혈청에서는 RIDEA-*agfA*는 모두 음성반응(<4.0mm)을 보였으며, RIDEA-OMP는 양성반응(4.8-8.8mm)을 보이는 빈도가 높았다(Fig. 1-11). 또한 ELISA 시스탬에서 비교한 바 ELISA-*agfA* 와 ELISA-OMP는 *Salmonella* spp 에 면역된 토끼 및 닭 혈청에서는 높은 양성반응(OD>0.38)을 보였으며, *E. coli*균 면역혈청 과 음성대조혈청에서는 ELISA-*agfA*는 모두 음성반응(OD<1.5)을 보였으며, ELISA-OMP는 양성반응(OD cut off: 0.15 in rabbit sera; 0.17 in chickensera)을 보이는 빈도가 높았다.

Table 1-8. Sensitivity and specificity of RIDEA-*agf*A/-OMP and ELISA-*agf*A/-OMP

Sera	No. of sera	RIDEA-*agf*A	RIDEA-OMP	ELISA-OMP	ELISA-*agf*A
Rabbit					
Sal. typhimurium	2	9.8-11.7*	9.7-12.7	0.75-0.83	0.66-0.86
Sal. enteritidis	2	8.1-9.4	8.5-11.4	0.65-1.18	0.54-0.97
Sal. pullorum	2	7.8-9.6	8.8-11.6	0.55-0.90	0.38-0.88
E. coli(O:111)	1	< 4.0	6.5-8.8	0.41-0.57	0.13-0.17
E. coli(O:157)	1	< 4.0-4.8	4.8-7.4	0.14-0.25	0.13-0.16
Negative sera	3	< 4.0	< 4.0-5.0	0.09-0.33	0.08-0.12
Chicken					
Sal. typhimurium	2	8.6-9.8	7.6-12.8	0.53-0.98	0.69-0.78
Sal. enteritidis	2	8.1-10.7	8.1-10.7	0.49-0.84	0.54-0.87
Sal. pullorum	2	8.9-9.7	8.9-9.7	0.60-0.91	0.44-0.59
E. coli(O:111)	1	< 4.0-4.5	6.5-8.5	0.24-0.37	0.12-0.20
E. coli(O:157)	1	< 4.0	5.8-8.0	0.14-0.25	0.13-0.15
Negative sera	3	< 4.0	< 4.0-4.8	0.12-0.24	0.09-0.13

* The values represent the range of diameter(mm) in RIDEA. Each samples were tested by triplicate.

The data in ELISA represent the range of OD values at 490㎚. P/N cut-off points = 4 × sd of the mean of negative sera : 0.15 in rabbit sera and 0.17 in chicken sera

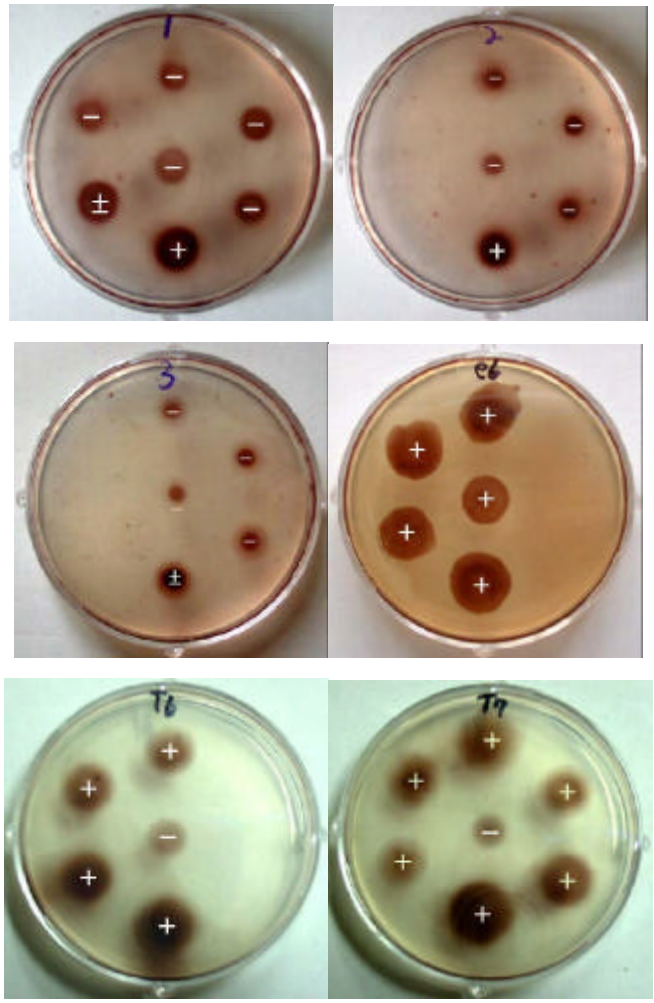

Fig 1-11. Various patterns of RIDEA showing the negative(< 4mm), intermediate(4.0 5.0mm) and positive(> 5.0mm) reaction.

11) RIDEA-*agf*A/ -OMP and ELISA-*agf*A 의 야외가검혈청에 대한 시험

Sal. pullorum-gallinarum 진단용 whole blood plate agglutination test에서 14.2 22.9%의 양성율을 나타내는 살모넬라균 고 감염 양계장 3개소(A, B, C)와 0.8 1.15%의 양성율을 나내는 저감염 양계장 2개소(D, E)에서 얻어진 혈청을 대상으로 RIDEA-*agf*A, RIDEA-OMP 및 ELISA-*agf*A를 이용하여 시험하였다(Table1-9). 그 결과 A, B, C 계군에 대해 RIDEA-*agf*A, RIDEA-OMP 및 ELISA-*agf*A는 24.8%, 36.4% 및 21.5%의 양성율을 나타내었고, D, E 계군에 대해서는 13.8%, 29.4% 및 17.6%의 양성율을 나타내어 RIDEA-*agf*A 와 ELISA-*agf*A에 비해 RIDEA-OMP는 높은 양성율을 보였다. 앞에서 수행된 특이성 및 감수성 시험 결과를 볼 때 RIDEA-OMP는 비특이적 반응빈도가 RIDEA-*agf*A에 비해 높았기 때문이라 생각된다.

이상의 시험 결과를 볼 때 RIDEA-*agf*A는 살모넬라 속균에 감염된 계군을 검색하는데 감수성과 특이성이 높고 간편한 방법으로써 기존의 균분리 동정방법, 핵산 검출시험법 등과 함께 보조진단법으로 활용가치가 높다고 사료된다.

Table 1-9. Field application of the RIDEA-*agf*A in comparison with ELISA-*agf*A and RIDEA-OMP

Poultry Farms	RIDEA-*agf*A	RIDEA-OMP	ELISA-*agf*A
Heavily-infected*			
A	12/44(27.3)	16/44(36.4)	11/44(25.0)
B	6/32(18.8)	11/32(34.4)	5/32(15.6)
C	12/45(26.7)	17/45(37.8)	10/45(22.2)
Subtotal	30/121(24.8)	44/121(36.4)	26/121(21.5)
Lower-infected**			
D	4/27(14.8)	8/27(29.6)	4/27(14.8)
E	3/24(12.5)	7/24(29.2)	5/24(20.8)
Subtotal	7/51(13.8)	15/51(29.4)	9/51(17.6)
Total	37/172(21.5)	59/172(34.3)	35/172(20.3)

Positive rate by whole blood plate agglutination test for *Sal. pullorum-gallinarum*

* 14.2 22.9% ** 0.8 1.15%

2. 제 2 세부과제 : 살모넬라균의 방어항원 유전자 클론닝과 재조합 subunit protein의 발현 및 성상시험

(협동연구과제: 분자생물학적 기술로 개발된 백신의 안전성 및 효능시험)

1) 방어항원 유전자 클로닝

S. enteritidis, S. typhimurium, S. pullorum, S. gallinarum 각각의 균주로부터 CTAB solution을 이용하여 chromosomal DNA를 분리하였다. 분리된 chromosomal DNA를 template로 하여 PCR이 수행되었다.

AgfB와 AgfA 각각의 최적 발현조건을 알아보고, purify를 용이하게 하기 위한 여러 가지 벡터 시스템을 사용하였다. 6× Histidine이 tagging된 pQE9(Qiagen)과, GST (Glutathion S transferase) fusion protein을 발현하는 pGEX-2T(Pharmacia), 그리고 MBP (maltose binding protein) fusion protein을 세포질에 발현하는 pMAL-cri(New England Biolab)등이 본 연구에 사용되었다.

각각의 균주에 대해 *agf*A와 *agf*B gene이 각각 PCR로 증폭되었고, 기대한 크기의 430bp 및 540bp band가 증폭이 되었음을 확인하였다(Fig.2-1). 또한 각각의 벡터에 제대로 insert가 cloning이 되었는지를 확인하기 위해 몇가지 제한효소가 사용되었다. 그 결과는 편의상 *Sal. enteritidis*에 대한 것만을 Fig.2-2.에 제시하였다.

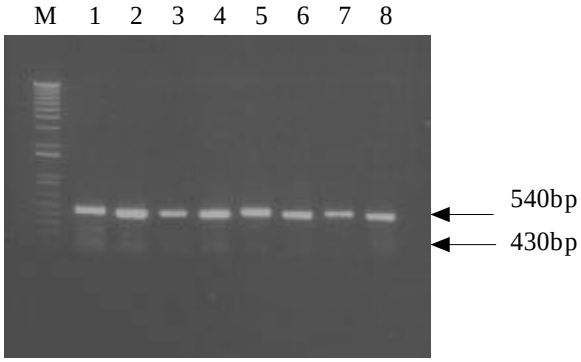

Fig.2-1A. Amplified PCR products of *agf*B and *agf*A genes of *Salmonella* spp. (lane M; 1kb marker, lane 1; Se *agf*A, lane 2; Se *agf*B, lane 3; Sp *agf*A, lane 4; Sp *agf*B, lane 5; Sg *agf*A, lane 6; Sg *agf*B, lane 7; St *agf*A, lane 8; St *agf*B).

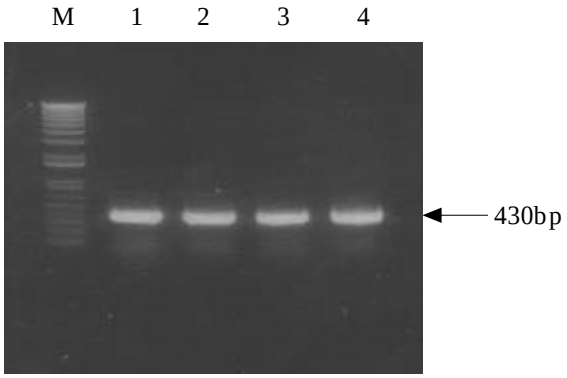

Fig.2-1B. Amplified PCR products of new-*agf*A genes of *Salmonella* spp. (lane M; 1kb marker, lane 1; Se new-*agf*A, lane 2; Sp new-*agf*A, lane 3; Sg new-*agf*A, lane 4; St new-*agf*A).

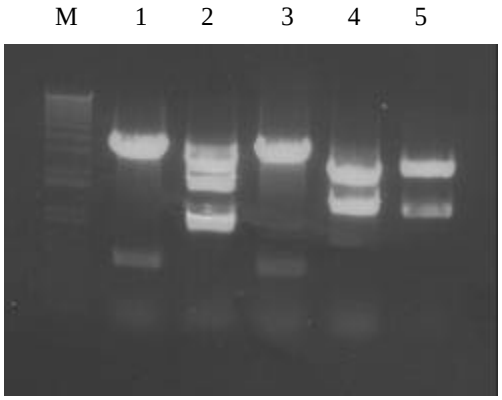

Fig.2-2A. The cleavage patterns of cloned plasmid pQE9/eA and pQE9/eB (lane M; 1kb marker, lane 1; eA *Bam*HI and *Pst*I: 3440 & 456bp, lane 2; eA *Sca*I: 1974, 921 & 849bp, lane 3; eB *Bam*HI and *Pst*I: 3440 & 432bp, lane 4; eB *Acc*I: 2479 & 1377bp, lane 5; eB *Nde*I: 1245 & 2611bp).

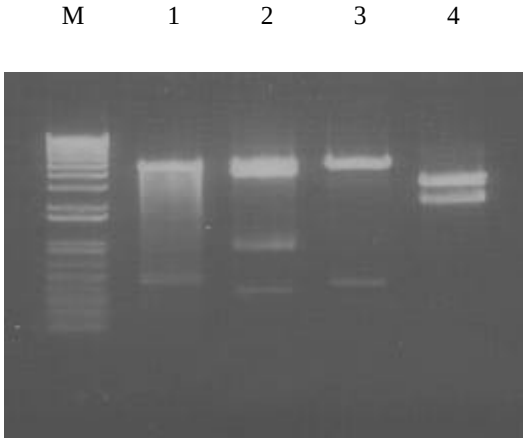

Fig.2-2B. The cleavage patterns of cloned plasmid pGEX-2T/eA and pGEX-2T/eB (lane M; 1kb marker, lane 1; eA *Bam*HI and *Eco*RI: 4948 & 455bp, lane 2; eA *Sca*I: 4117, 917 & 364bp, lane 3; eB *Bam*HI and *Pst*I: 4948 & 432bp, lane 4; eB *Nde*I and *Eco*RV: 3188 & 2186bp).

M 1 2 3 4 5 6

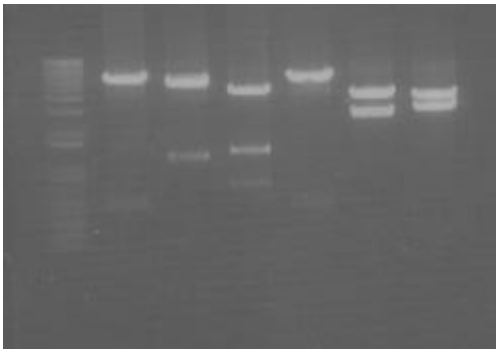

Fig.2-2C. The cleavage patterns of cloned plasmid pMAL-cri/eA and pMAL-cri/eB (lane M; 1kb marker, lane 1; eA *Bam*HI and *Pst*I: 6133 & 455bp, lane 2; eA *Sca*I: 5373 & 1193bp,, lane 3; eA *Dra*I: 4506, 1349 & 692bp, lane 4; eB *Bam*HI and *Pst*I: 6133 & 431bp, lane 5; eB *Nde*I: 3965 & 2577bp, lane 6; eB *Acc*I: 3730 & 2811bp).

M 1 2 3

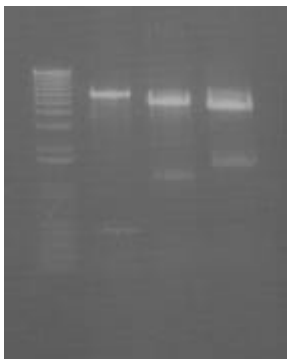

Fig.2-2D. The cleavage patterns of cloned plasmid pMAL-cri/eAN and pMAL-cri/eBN by restriction enzyme (lane M; 1kb marker, lane 1; eAN *Bam*HI and *Pst*I: 6133 & 396bp, lane 2; eAN *Sca*I: 5313 & 1193bp, lane 3; eAN *Nar*I: 4722 & 1785bp).

2) 방어항원유전자 염기서열 분석

pQE9에 클로닝 된 plasmid를 pQE sequencing primer; Type III/IV primer 5'-CGGATAACAATTTCACACAG-3', Reverse Sequencing primer 5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'를 이용하여 forward와 reverse로 sequencing 하였다. *agf*A의 sequence는 각각에 대해 *Sal. enteritidis*, *Sal. pullorum*, *Sal. gallinarum*은 *Sal. enteritidis*의 original sequence와 비교하였고, *Sal. typhimurium*의 경우는 *Sal. typhimurium*의 original sequence와 비교하였다 (Fig.2-3A). 그리고, *agf*A에서 6번째와 15번째의 sequence가 A→G로 변환된 것은 primer의 sequence에서 기인된 것이고, *Sal. typhimurium*의 경우 마지막 부분의 5개 sequence가 original과 차이가 나는 것은 primer 제작시 *Sal. enteritidis*의 sequence를 기초로 하였기 때문에 생긴 것이다. *agf*B sequence의 경우는 *Sal. enteritidis*의 original sequence를 기준으로하여 비교하였다 (Fig.2-3B). 그러나 *Sal. typhimurium*의 *csg*B라고 불리는 gene의 sequence가 *Sal. enteritidis*의 *agf*B gene과 sequence가 동일하여, 발표된 *Sal. typhimurium*의 *agf*B gene의 band가 아닌 *csg*B gene만이 PCR로 증폭되었음을 알 수 있었다.

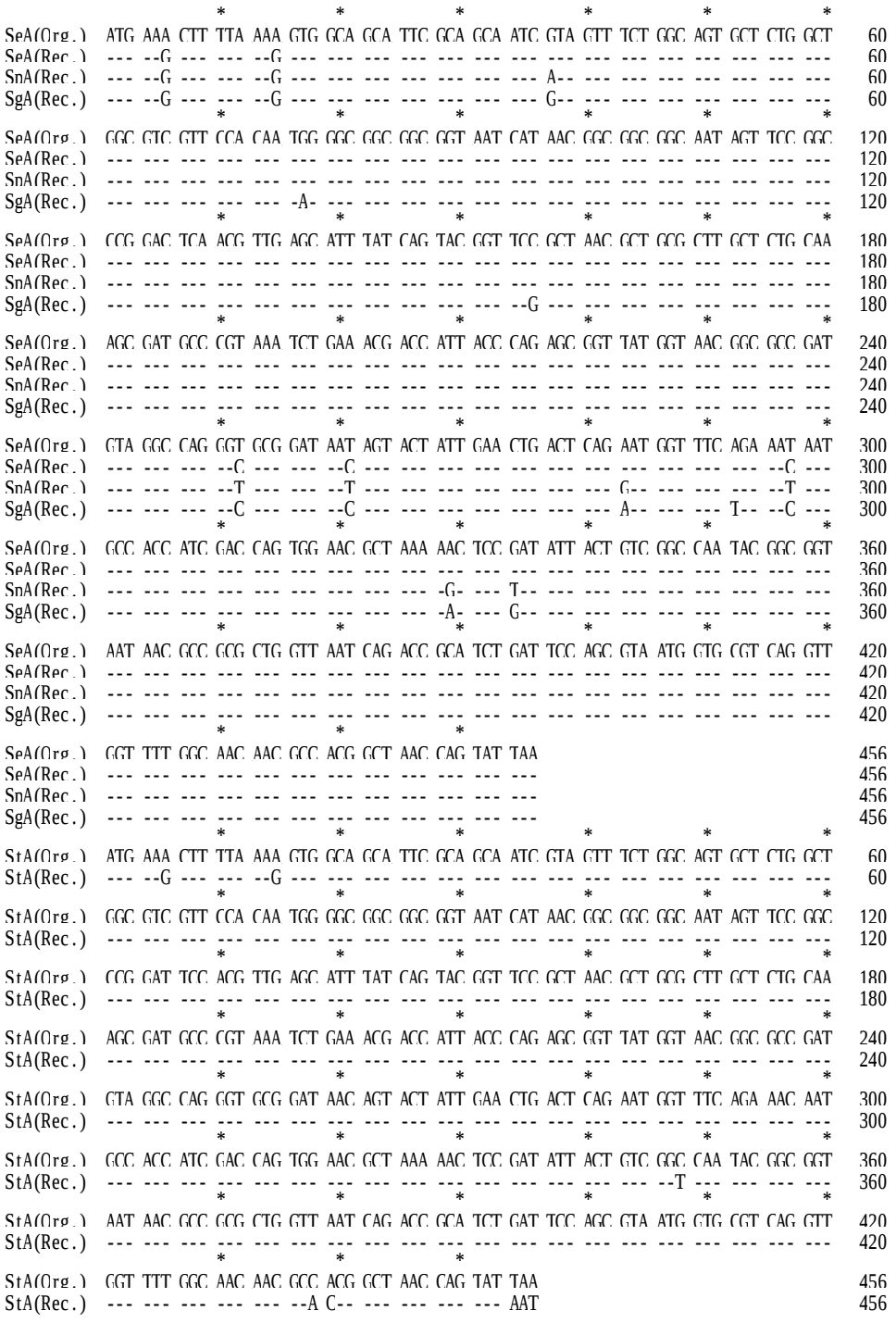

Fig.2-3A. Comparison of nucleotide sequences of *agfA*.

```
                    *           *           *           *           *           *
SeB(Org.)  ATG TTG ACA ATA CTG GGT GCG CCT GGG ATT GCA ACC GCG ACA AAT TAT GAT CTG GCT CGT    60
SeB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---    60
SpB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---    60
SgB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---    60
StB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---    60
                    *           *           *           *           *           *
SeB(Org.)  TCA GAA TAT AAT TTT GCG GTA AAT GAA TTA AGC AAG TCT TCA TTT AAT CAG GCG GCC ATT   120
SeB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   120
SpB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   120
SgB(Rec.)  --- --G --- --- --- --- --- --- --- --G --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   120
StB(Rec.)  --- --G --- --- --- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   120
                    *           *           *           *           *           *
SeB(Org.)  ATT GGT CAA GTC GGC ACG GAT AAT AGT GCC AGA GTA CGC CAG GAA GGA TCA AAA CTA TTG   180
SeB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   180
SpB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   180
SgB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   180
StB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   180
                    *           *           *           *           *           *
SeB(Org.)  TCC GTT ATT TCA CAA GAA GGA GGA AAT AAT CGG GCG AAA GTC GAC CAG GCA GGG AAT TAT   240
SeB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   240
SpB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   240
SgB(Rec.)  --- --- --- --- -G- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   240
StB(Rec.)  --- --- --- --- -A- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   240
                    *           *           *           *           *           *
SeB(Org.)  AAC TTT GCG TAT ATT GAG CAA ACG GGC AAT GCC AAC GAT GCC AGT ATA TCG CAA AGC GCT   300
SeB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   300
SpB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   300
SgB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   300
StB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   300
                    *           *           *           *           *           *
SeB(Org.)  TAC GGT AAT AGT GCA GCT ATT ATC CAG AAA GGT TCT GGA AAT AAG GCC AAT ATT ACC CAG   360
SeB(Rec.)  --- --- --- --- --G --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   360
SpB(Rec.)  --- --- --- --- -TG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   360
SgB(Rec.)  --- --- --- --- -CG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   360
StB(Rec.)  --- --- --- --- -CG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   360
                    *           *           *           *           *           *
SeB(Org.)  TAC GGT ACG CAG AAA ACA GCA GTT GTA GTG CAG AAA CAG TCG CAT ATG GCT ATT CGC GTC   420
SeB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   420
SpB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   420
SgB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   420
StB(Rec.)  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---   420
                    *
SeB(Org.)  ACC CAA CGC TAA                                                              432
SeB(Rec.)  --- --- --- ---                                                              432
SpB(Rec.)  --- --- --- ---                                                              432
SgB(Rec.)  --- --- --- ---                                                              432
StB(Rec.)  --- --- --- ---                                                              432
```

Fig.2-3B. Comparison of nucleotide sequences of *agf*B

3) 최적발현시스템의 확립

가) pQE9에 cloning된 plasmid는 *E.coli* M15를 host로 expression을 하였다. Recombinant single colony를 37℃에서 overnight culture하여 새로운 배지로 1% seeding을 한 다음, 1mM IPTG로 30℃에서 induction하였다. 발현된 protein의 확인을 위해 SDS-PAGE와 histidine antibody를 이용한 Western blotting을 실시하였다(Fig.2-4). Fig.2-4에서 보는바와 같이 pQE system을 이용한 protein의 발현에서는 약 16kDa의 AgfB protein 만이 발현이 되었음을 알 수 있다.

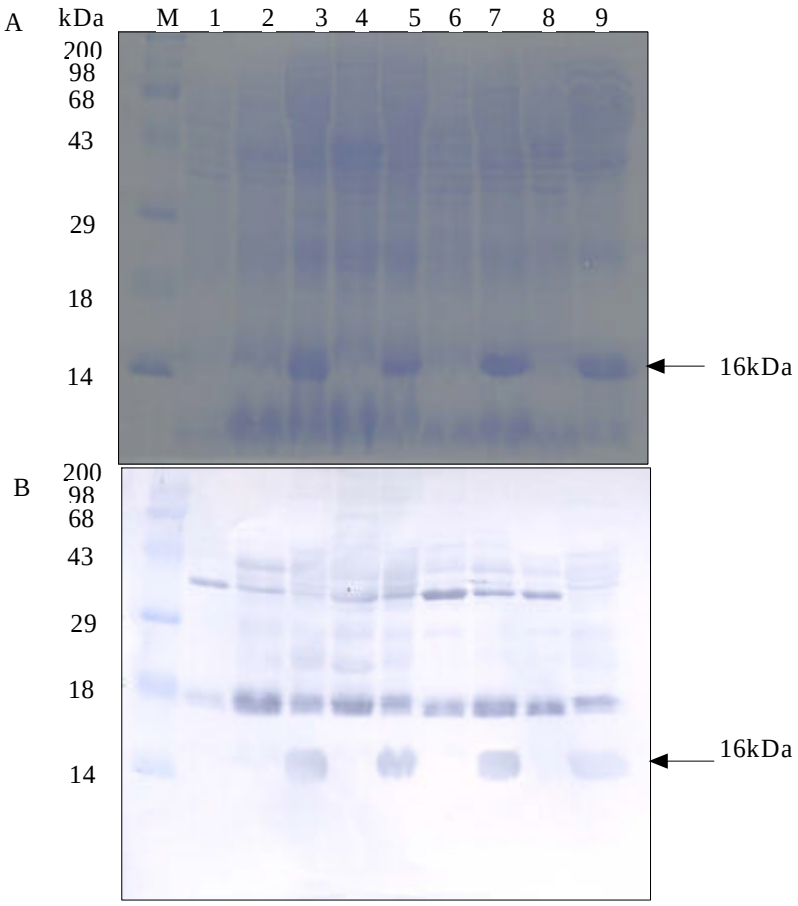

Fig.2-4. SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of *E.coli* M15 harboring plasmid pQE9 (lane M; broad range molecular marker, lane 1; pQE9, lane 2; pQE/eA, lane 3; pQE/eB, lane 4; pQE/pA, lane 5; pQE/pB, lane 6; pQE/gA, lane 7; pQE/gB, lane 8; pQE/tA, lane 9; pQE/tB). The arrow is expressed protein.

나) pGEX-2T에 cloning된 plasmid는 *E.coli* JM109를 host로 expression 하였고, IPTG의 농도는 0.1mM을 사용하여 30℃에서 induction 하였다. 또한 발현된 protein을 확실시 하기위하여 GST antibody로 Western blot을 하여, AgfA와 AgfB protein을 관찰할 수 있었다(Fig.2-5). 결과로 알 수 있는 것은 pGEX-2T를 이용한 protein의 발현에서는 AgfA의 경우는 GST fusion form이 형성이 잘 안되어 fusion size인 약 42kDa의 band는 아주 미약하고, control GST 크기인 26kDa 보다 2 3kDa가 큰 band(약 29kDa)가 주로 발현이 되었음을 알수 있다. 이러한 결과로 볼 때, signal sequence의 영향으로 20개 아미노산을 제외한 부분이 발현시 잘려져 나가는 것이 아닌가 의심해 보았다.

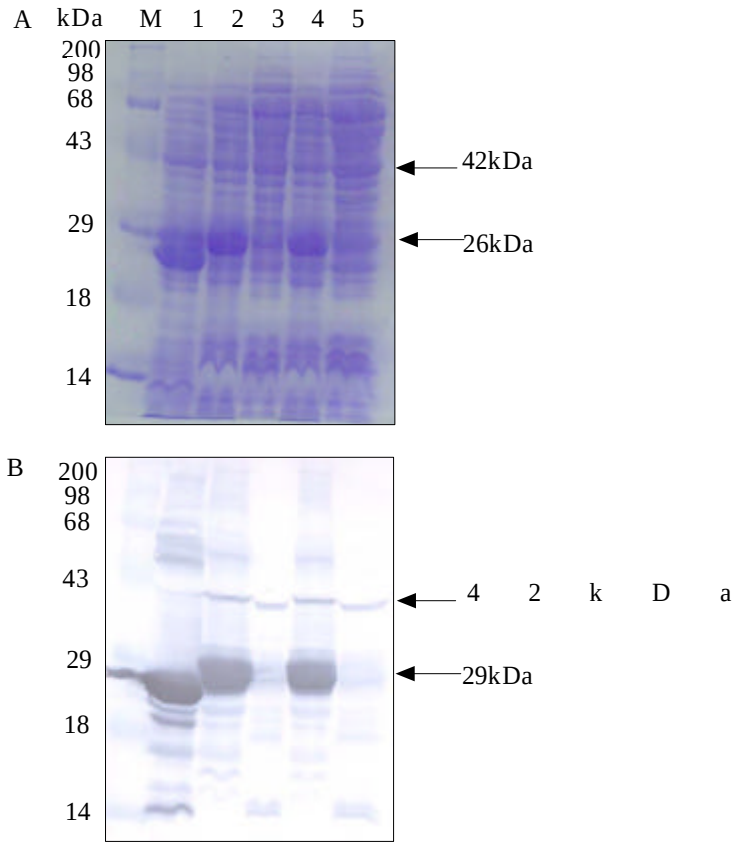

Fig.3-5. SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of *E.coli* JM109 harboring plasmid pGEX-2T (lane M; broad range molecular marker, lane 1; pGEX-2T, lane 2; pGEX/eA, lane 3; pGEX/eB, lane 4; pGEX/pA, lane 5; pGEX/pB). The arrow is the fusion protein.

다) pMAL-cri의 경우는 *E. coli* XL1-blue MRF를 host로 사용하였고, IPTG는 0.5mM을 사용하였으며, 다른 벡터를 이용할 때와는 다르게 배지에 glucose를 첨가하였다. 이는 glucose가 *E. coli*의 chromosome에 있는 maltose의 발현을 억제하여 본래 발현하고자 하는 MBP fusion protein을 효율적으로 발현할 수 있기 때문이다(Fig.2-6). 그림으로 확인되는 것과 같이 다른 벡터를 사용하였을 때보다는 발현율이 좋은 것을 알수 있다. Control MBP size는 42kDa정도이고, fusion된 크기인 약 60kDa의 AgfA band를 육안으로 확인할 수 있었다. 또한 signal sequence를 제외한 new-AgfA의 경우에도 발현이 잘되어 whole AgfA 보다 약간 작은 크기의 band를 확인할 수 있었다(Fig.2-7).

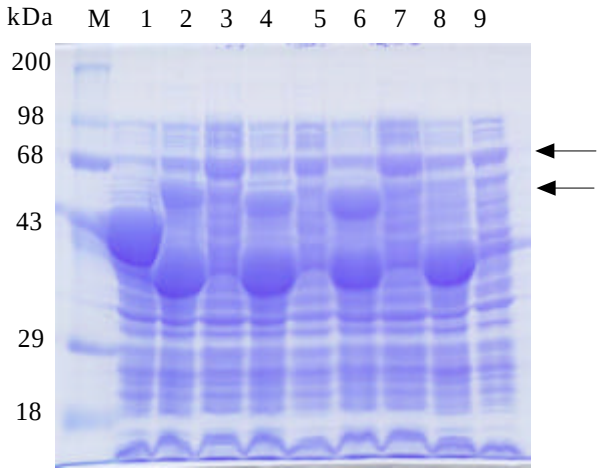

Fig.2-6. SDS-PAGE analysis of *E.coli* XL1-blue MRF harboring plasmid pMAL-cri (lane M; molecular marker, lane 1; pMAL-cri, lane 2; pMAL/eA, lane 3; pMAL/eB, lane 4; pMAL/pA, lane 5; pMAL/pB, lane 6; pMAL/gA, lane 7; pMAL/gB, lane 8; pMAL/tA, lane 9; pMAL/tB). The arrows are the fusion proteins.

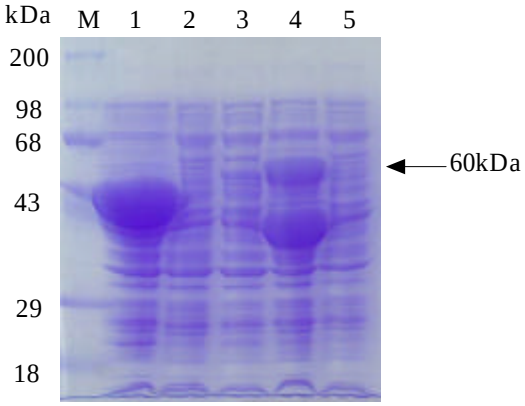

Fig.2-7. SDS-PAGE analysis of *E.coli* XL1-blue MRF harboring plasmid pMAL-cri (lane M; molecular marker, lane 1; pMAL-cri, lane 2; pMAL/eAN, lane 3; pMAL/pAN, lane 4; pMAL/gAN, lane 5; pMAL/tAN). The arrow is the fusion protein.

4) 재조합 subunit protein의 생산

최적의 발현 시스템은 MBP fused AgfA protein으로 이를 expression 한 뒤 amylose resin을 이용하여 purification을 실시하였다(Fig.2-8).

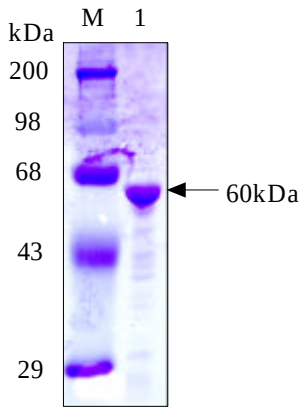

Fig.2-8. SDS-PAGE analysis of purified MBP fusion protein with Amylose resin (lane M; broad range molecular marker, lane 1; MBP fused AgfA).

5) Identification of purified fimbriae

Purify한 insoluble한 thin aggregative fimbriae를 SDS-PAGE 상에서 본 결과는 Fig.2-9에 나타내었다.

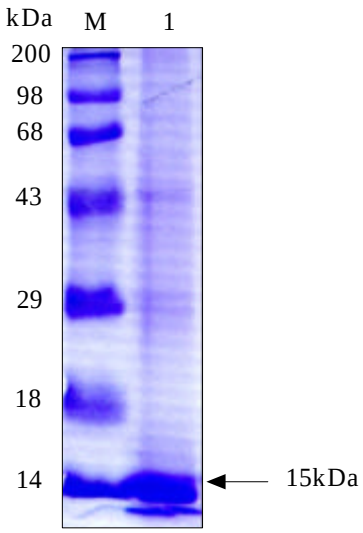

Fig.2-9. SDS-PAGE analysis of purified thin aggregative fimbriae isolated from *Salmonella typhimurium* (lane M; broad range molecular marker, lane 1; St AgfA).

6) 동물접종시험

한달령의 New Zealand white rabbit과 female BALB/c mouse, 그리고 SPF chicken에 각각 AgfA antigen을 투여하여 antibody를 생산하였다. 우선 antibody를 형성하였는지 알아보기 위하여 Western blot을 실시하였다 (Fig.2-10). 그 결과 rabbit(A)과 mouse (B), chicken(C) 모두에서 형성된 antibody를 확인하였다.

또한 SPF chicken은 ELISA를 이용하여 antibody를 titration 하였다. 우선 antibody의 희석배수를 달리하여 최적의 antibody dilution 농도(1:200)를 standardization 하였고(Fig.2-11A), conjugate 농도(1:1000) 역시 standardization을 하였다(Fig.2-11B). 그리고, antigen 농도(1.2μg/well) 역시 희석배수를 다르게 하여 적정치를 정하였다(Fig.2-11C). Booster 2주후 채취한 serum sample과 그로부터 다시 2주후의 serum sample 간의 titer 수치에는 거의 변화가 없었고, 그 1주 후에 live *S. typhimurium*을 challenge 한 뒤 2주후의 serum sample에서는 다소 antibody titer가 떨어지는 것을 볼 수 있었다 (Fig.2-12).

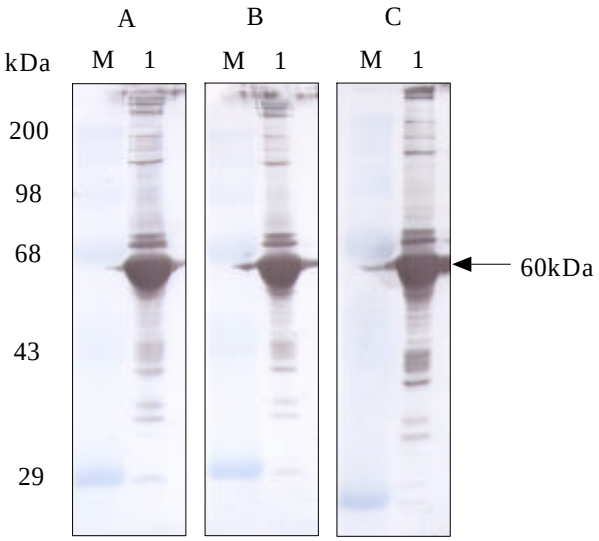

Fig.2-10. Western blot analysis of purified MBP fused AgfA protein (A; anti-rabbit antibody, B; anti-mouse antibody, C; anti-chicken antibody, M; broad range molecular marker, lane 1; MBP fused AgfA).

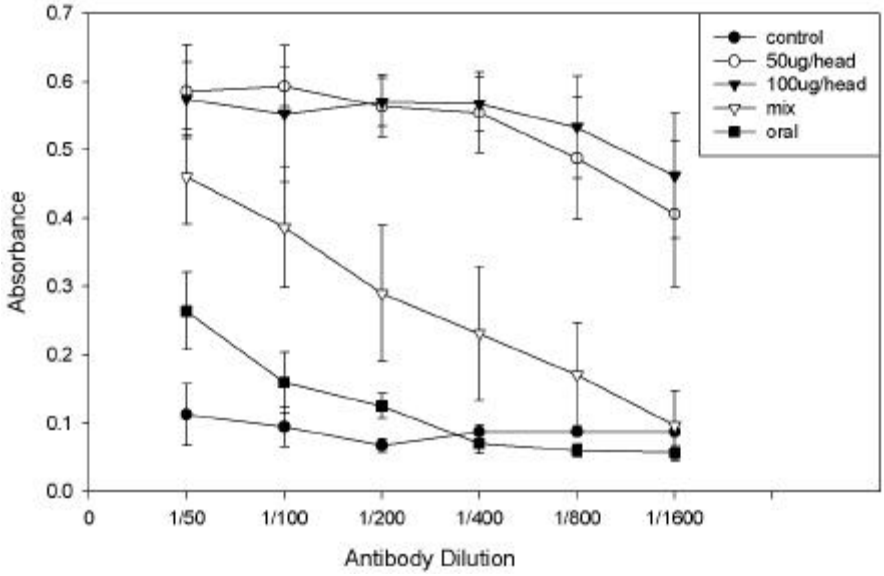

Fig.2-11A. Standardization of antibody dilution with the serum samples from the chickens injected with the various antigens and the control groups. (1.2μg/well antigen dilution, 1:1,000 conjugate dilution).

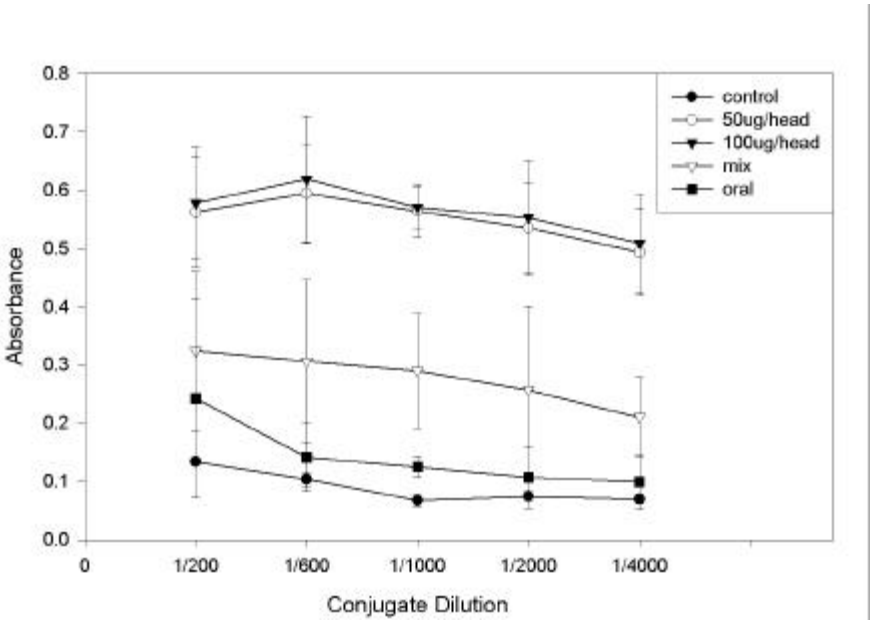

Fig.2-11B. Standardization of conjugate dilution with the serum samples from the chickens injected with the various antigens and the control groups. (1.2μg/well antigen dilution, 1:200 serum dilution).

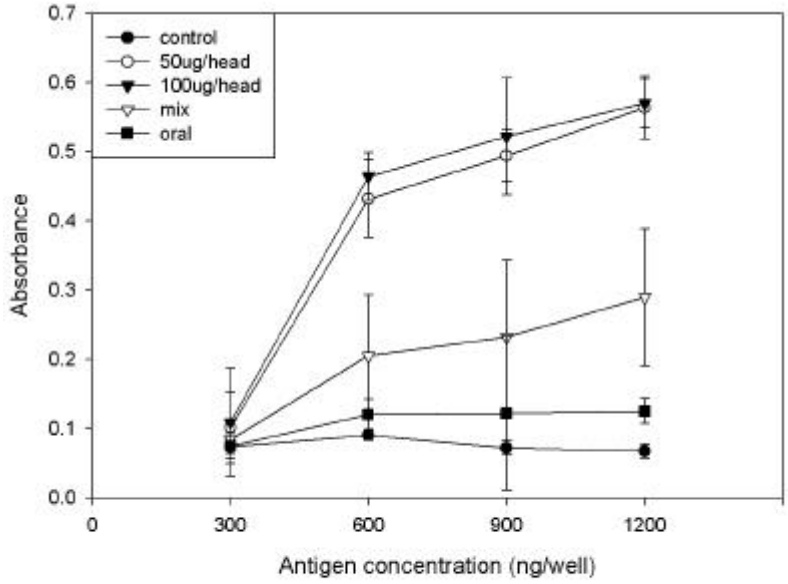

Fig.2- 11C. Standardization of antigen concentrations with the serum samples from the chickens injected with the various antigens and the control groups. (1:200 serum dilution, 1:1,000 conjugate dilution).

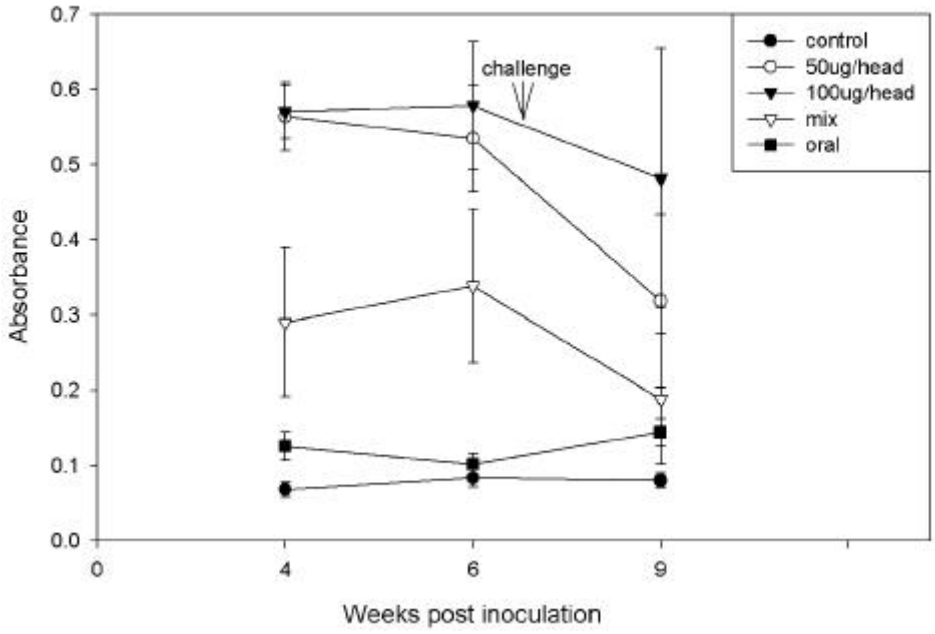

Fig.2-12. Comparison of ELISA results for the serum samples from the chickens injected with various antigens and the control groups. (1.2μg/well antigen dilution, 1:200 serum dilution, 1:1,000 conjugate dilution). The wild type *S. typhimurium* was challenged at the 7th week post inoculation.

3. 제 3 세부과제 : 살모넬라균 유전자 재조합 변이주(mutants) 생균백신 개발

(협동연구과제: 분자생물학적 기술로 개발된 백신의 안전성 및 효능시험)

3-1. 병원성 유전자 분석 및 위치확인

1) Chromosomal DNA 분리 및 PCR amplication.

4가지 *Salmonella* 균주의 *rpo*S-gene을 증폭한 결과는 Fig.3-1과 같다. Flanking sequence를 포함한 약 1.7kb정도의 band를 agarose gel 상에서 확인할 수 있었다. 4가지 *Salmonella* 균주에 대하여 *rpo*S gene을 각각 3부위로 증폭한 결과는 Fig.3-2와 같다. Head부위의 약 600bp 정도의 band와 Middle과 Tail 부위의 약 500bp정도의 band를 확인할 수 있었다. 기대했던 크기의 *rpo*S gene이 증폭되었음을 알 수 있었다.

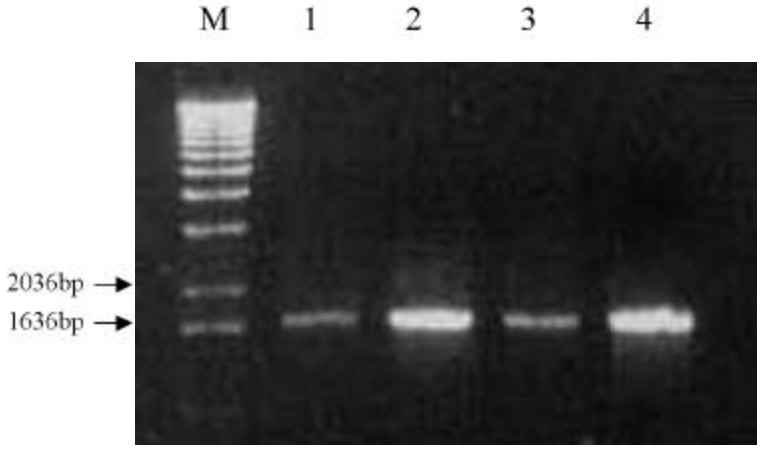

Fig. 3-1. Agarose gel electrophoresis of *rpo*S-gene PCR products. Lane M : DNA ladder, Lane 1,2,3 and 4 represent *rpo*S-gene of *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *Sal. gallinarum* and *S. pullorum*, respectively.

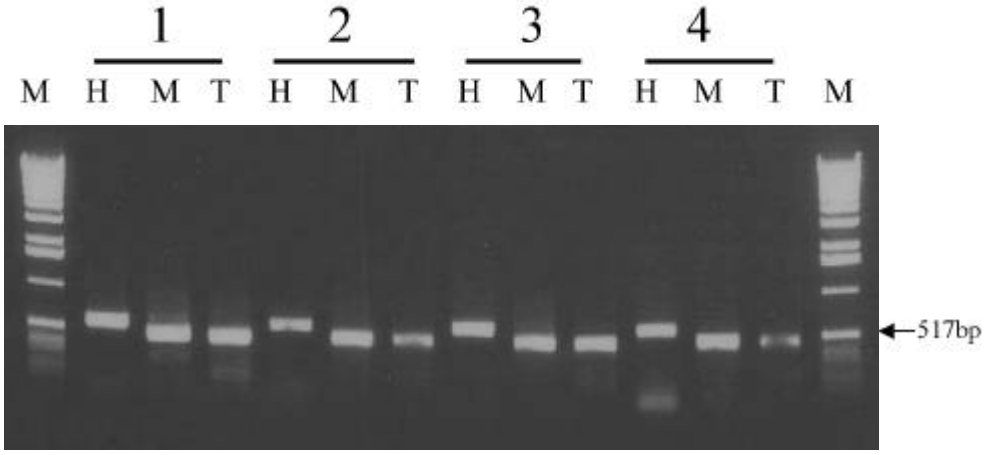

Fig. 3-2. Agarose gel electrophoresis of the *rpo*S gene PCR products. Lane M,1,2,3 and 4 represent DNA ladder, *rpo*S gene of *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* and *S. typhimurium*, respectively. (H : head, M : middle, T : tail)

2) *rpo*S gene의 cloning

Overnight culture cell로 부터 miniprep. 방법으로 plasmid DNA를 분리한 후 insert DNA를 포함 여부를 전기영동법으로 확인하였다(Fig.3-3). 4가지 *Salmonella* 균주 각각의 *rpo*S gene 3부위(H,M,T)의 clone을 확인한 결과는 Fig.3-4에 나타나있다. 약 3kb정도 크기의 vector band와 Head의 568bp의 band, Midde의 457bp의 band, 그리고 Tail의 448bp의 band를 확인함으로 insert DNA가 존재함을 확인하였다.

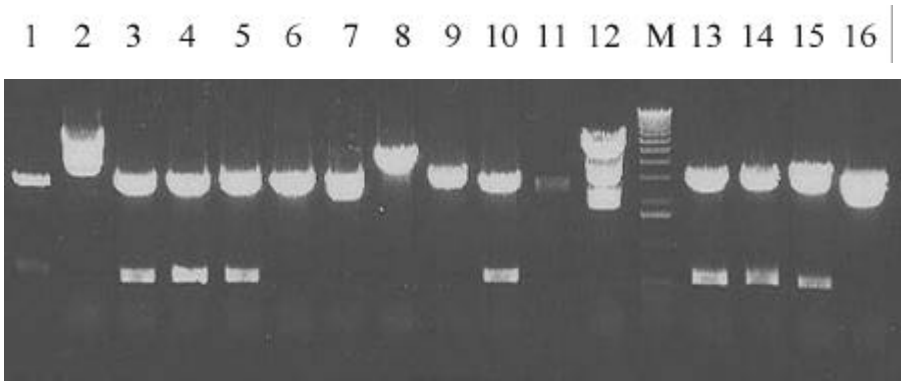

Fig. 3-3. Screening clones for the insert DNA(*rpo*S gene)
Lane M : DNA ladder, lanes 1 to 16 represent colonies 1 to 16, respectively.

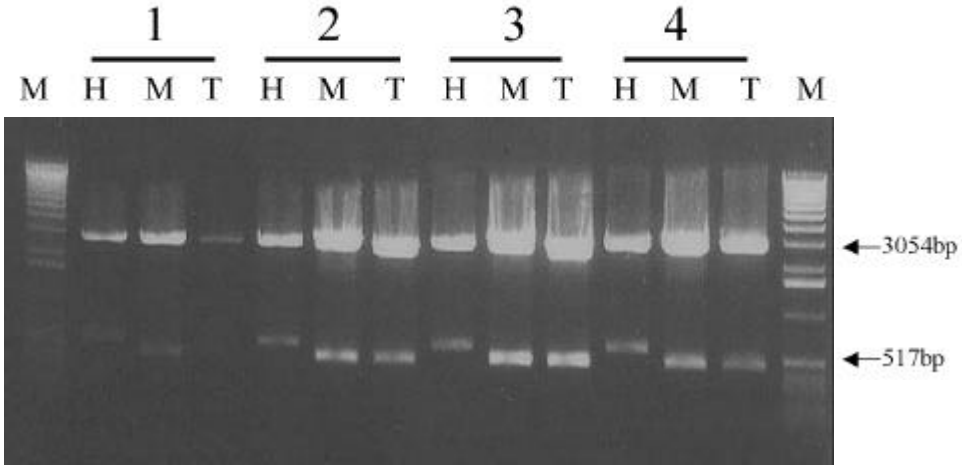

Fig. 3-4. Agarose gel electrophoresis of clones of the insert DNA(*rpo*S-gene)
Lane M,1,2,3 and 4 represent DNA ladder, *rpo*S-gene of *S. enteritidis*, *S.gallinarum*, *S. pullorum* and *S. typhimurium*, respectively. (H : head, M : middle, T : tail)

3) *rpo*S-gene의 염기서열 및 분석

본 시험에 사용된 4가지 *Salmonella* 균주의 *rpo*S gene의 size는 1155bp이었다. 또한 염기서열을 이미 Genbank에 보고된 *Salmonella typhi*(accession number-X81641)의 *rpo*S gene과 비교분석하였으며 결과는 Fig.3-5에 나타나 있다. 공시된 4개의 *Salmonella* 혈청형 간에 99.3% 이상의 sequence homology가 인정되었다. 각각의 sequence간의 homology는 Table 3-1에 나타나 있다.

Table 3-1. Homology of the nucleotide sequence between *Salmonella* strains

	S. enteritidis	*S. gallinarum*	*S. pullorum*	*S. typhimurium*
S. typhi	99.5 %	99.5 %	99.7%	99.5 %
S. enteritidis		99.3%	99.3%	99.3%
S. gallinarum	99.3%		99.7%	99.3%
S. pullorum	99.3%	99.7%		99.3%
S. typhimurium	99.3%	99.3%	99.3%	

```
S. typhi   ATGAGTCAGA ATACGCTGAA AGTTCATGAT TTAAATGAAG ACGCCGAATT TGATGAGAAC    60
 S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- -A-------- ----------
 S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

 S. typhi  GGAGTAGAGG CTTTTGACGA AAAAGCCTTG AGTGAAGAGG AACCCAGTGA TAACGACCTG   120
 S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

 S. typhi  GCTGAAGAAG AGCTGTTATC GCAAGGGGCC ACACAGCGTG TGTTGGACGC GACTCAGCTT   180
 S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.g       ---------- ---------- ---------- --------C- ---------- ----------
 S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

 S. typhi  TACCTTGGTG AGATTGGGTA TTCACCACTG TTAACAGCCG AAGAAGAAGT CTATTTTGCG   240
 S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

 S. typhi  CGTCGCGCAC TGCGTGGAGA TGTCGCTTCT CGCCGTCGCA TGATTGAGAG TAACCTGCGT   300
 S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

 S. typhi  CTGGTGGTAA AAATTGCCCG CCGTTATGGC AATCGTGGAC TGGCGTTGCT GGACCTGATT   360
 S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

 S. typhi  GAAGAGGGCA ACCTGGGGCT TATCCGTGCA GTCGAGAAGT TTGACCCGGA ACGCGGGTTC   420
 S.e       ---------- -T-------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.g       ---------- -T-------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

```
S. typhi  CGCTTCTCAA CATACGCAAC CTGGTGGATT CGCCAGACAA TCGAACGGGC GATTATGAAC   480
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       -------T-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  CAAACCCGTA CGATTCGCTT GCCGATTCAC ATTGTTAAAG AGCTGAACGT ATACCTGCGC   540
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  ACCGCACGTG AGTTGTCGCA TAAACTGGAC CACGAACCGA GTGCGGAAGA AATTGCAGAG   600
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  CAACTGGATA AACCGGTTGA TGACGTCAGC CGTATGCTTC GTCTCAACGA GCGCATTACC   660
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  TCGGTAGACA CCCCGCTGGG CGGTGATTCC GAAAAAGCGT TGCTGGACAT CCTGGCCGAT   720
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       --T------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  GAAAAAGAGA ACGGTCCGGA AGACACCACG CAAGATGACG ATATGAAACA GAGCATCGTC   780
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  AAATGGTTGT TCGAACTGAA CGCCAAACAG CGTGAAGTGC TGGCGCGCCG TTTCGGTCTG   840
S.e       ---------- ---------- ---------- -------G-- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       --G------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

```
S. typhi  CTGGGATATG AAGCTGCGAC ACTGGAAGAT GTAGGCCGTG AAATCGGTCT TACGCGTGAA    900
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------G
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------G
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  CGTGTTCGTC AGATTCAGGT TGAAGGCCTG CGGCCGTCTG CGCGAAATTC TGCAGACGCA    960
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  GGGGCTGAAT ATCGAAGCGC TGTTCCGCGA GTAAGTACCC TTGTCAAAAA AAGGCCAGTC    1020
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  GACAGACTGG CCTTTTTTTT ACCGTTTGTC TTCTGCCAGC AACGGCGGGA TACTCGGCAC    1080
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- -G-------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- -G-------- ----------
S.p       TGTC------ ---------- ---------- ---------- -G-------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- -G-------- ----------


S. typhi  CATTGGCGCG TCATCAATAT CTTTTTGCGT CATGCGAAAC GCTTGTGGAT AGTGTTCGCG    1140
S.e       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.g       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.p       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
S.t       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

S. typhi  GCTGGTACGG CGTAA    1155
S.e       ---------- -----
S.g       ---------- -----
S.p       ---------- -----
S.t       ---------- -----
```

Fig. 3-5. Multialignment of the *rpo*S gene nucleotide sequence of *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *and S. typhimurium*.

3-2. *Salmonella* live mutant 작제

1) P22 phage를 이용한 mutant의 작제

S. typhimurium 과 *S. enteritidis* 에만 *rpo*S mutation gene이 포함된 P22의 infection이 일어났으며, P22 phage의 homologous packaging에 의하여 *rpo*S mutant를 얻을 수 있었으며, 이들 변이주들 가운데 *S. typhimurium*의 경우 two type의 colony중 small colony와 *S. enteritidis*의 경우 large colony에 대한 H2O2 screening에서 비병원성의 성질인 non-bubbler를 확인할 수 있었으며, 또한 operon fusion을 하여 MacConkey 배지상에서 *lac*Z의 발현을 관찰할 수 있었다. 또한 ATR test에서 acid challenge에서 약 8시간 정도 배양한 집락이 knock-out 되어 *rpo*S gene의 기능이 제거된 것을 확인 할 수 있었다.

2) Transposase를 이용한 *S. gallinarum* null mutant의 작제

*S. gallinarum*은 성장 속도가 느리고 P22의 infection이 일어나지 않기 때문에 plasmid의 transposase 와 *rpo*S gene이 cloning된 pBR322를 이용한 electroporation에 의하여 *rpo*S gene의 삭제가 가능하였다. *rpoS* gene의 삭제 여부는 역시 30% H2O2 test를 실시한 결과 비병원성의 성질을 나타내는 non-bubbler를 확인하였으며, 또한 ATR test에서 acid challenge에서 약 8시간정도 culture 한 colony가 knock-out 되어 *rpo*S gene의 function이 제거된 것을 확인 할 수 있었다. 작제된 *rpo*S mutant는 acridine orange를 처리하여 transosase plasmid를 제거할 수 있었다.

3-3. *Salmonella* 변이주의 병원성 시험

1) Mouse에 대한 병원성시험

가) *Salmonella enteritidis* mutant

① 임상증상

접종 후 24일간의 관찰기간 중 접종군(A,B군)과 대조군(C군)에서 뚜렷한 임상적인 증상은 관찰되지 않았으나 wild type 접종군(A군)에서 마우스의 피모가 대조군이나 mutant 접종군(B군)에 비하여 다소 거칠고 광택이 부족한 듯 하였다. 이는 ICR 마우스에 대하여 *S. enteritidis* 가 병원성이 약하기 때문인 것으로 생각된다. 관찰기간 중 접종군 및 대조군에서 mouse 폐사는 관찰되지 않았다.

② 육안적인 부검소견

실험 종료일에 mouse를 부검한 결과 대조군 및 *S. enteritidis*, mutant 접종군에서는 육안적인 부검소견이 관찰되지 않았다. 이는 *S. enteritidis*가 마우스에 대해서 상대적으로 병원성이 약할 뿐만아니라 다소의 병변이 있었을지라도 관찰기간 동안 치유되었을 것으로 생각된다.

③ 병리조직학적인 소견

대조군과 *S. enteritidis* 및 *S. enteritidis* mutant 접종 마우스에서는 병리조직학적인 병변이 관찰되지 않았다(Fig. 3-6,-7,-8). 이는 관찰기간 동안 미세한 병변이 치유되었을 것으로 생각된다.

④ 간과 비장 조직으로부터 wild type *S. enteritidis* 및 mutant은 분리

접종된 간과 비장조직으로부터 실험종료일(접종 24일 째)에 wild type *S. enteritidis* 및 mutant 균이 분리되지 않았다.

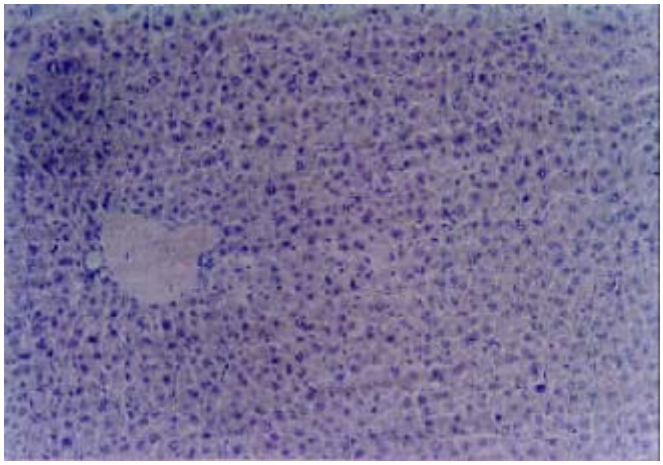

Fig. 3-6. Liver section of control mice. Hepatic focal necrosis was not observed

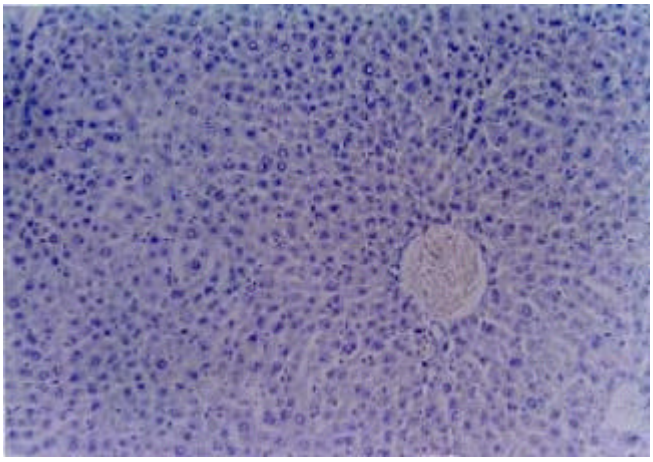

Fig. 3-7. Liver section of mouse inoculated with wild type *S. enteritidis* at 5-week old and euthanized 24 days post-inoculation. Focal hepatic necrosis was not observed.

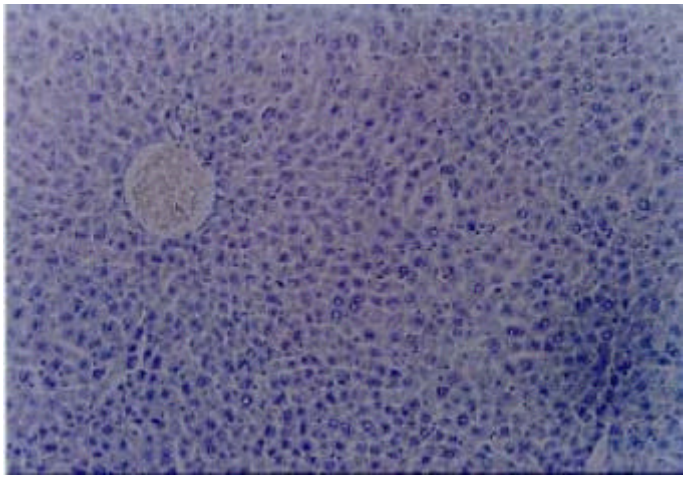

Fig. 3-8. Liver section of mice inoculated with *S. enteritidis* mutant at 5-week old and euthanized 24 days post-inoculation. Focal hepatic necrosis was not observed.

나) *Salmonella typhimurium*

① 임상증상

Wild type *S. typhimurium*를 접종한 BALB/c 마우스군(A군)에서는 체중 감소와 거친 피모 및 운동성 저하 등이 관찰된 반면 mutant가 접종된 마우스 군(B군)과 대조군(C군)에서는 인정할 만한 임상증상이 관찰되지 않았다. 또한 wild type *S. typhimurium*이 접종된 A군에서는 접종 8일, 10일 및 12일에 각각 한 마리씩 폐사한 반면 mutant가 접종된 B 군과 배양액을 투여한 대조군에서는 폐사가 관찰되지 않았다.

② 육안적인 소견

폐사한 마우스를 부검한 결과 간의 표면에 수많은 white necrotic foci(1-3mm in diameter)가 관찰되었으며 간에 심한 범발성 충혈과 종대 및 spleen의 종대가 관찰되었다. 그러나 실험종료일(접종 후 24일째)까지 생존한 모든 마우스(A,B,C군)를 부검한 결과 인정할 만한 어떤 병적인 부검소견도 관찰되지 않았다.

③ 병리조직학적인 소견

폐사한 마우스(A 군)에 대한 간 조직에서는 multiple focal hepatic necrosis가 관찰되었으며 병변부에서 lymphocytes, neutorphils, Kupffer cell 등의 inflammatory cell infiltrantion이 관찰되었다(Fig.3-11,-12,-13) 그러나 실험종료일 까지 생존한 마우스에서는 wild type *S. typhimurium*이 접종된 A 군의 마우스 중 소수에서 mild focal hepatic necrosis (Fig. 3-10) 가 관찰된 경우를 제외하고는 모든 마우스에서 인정할 만한 병변이 관찰되지 않았다(Fig. 3-9). 폐사한 mouse(A군)의 비장조직에서는 white pulp의 소실이 관찰되었으며 그로 인한 임파소절(lymph nodule)의 소실이 관찰되었다(Fig. 3-14)

④ 간과 비장 조직으로부터 wild type *S. enteritidis* 및 mutant 균의 분리

A군의 폐사한 마우스의 간과 비장조직으로부터 wild type *S. typhimurium*이 분리되었으나 실험종료일(접종 24일 째)까지 생존한 마우스에서는 wild type *S. typhimurium* 및 mutant 균이 분리되지 않았다.

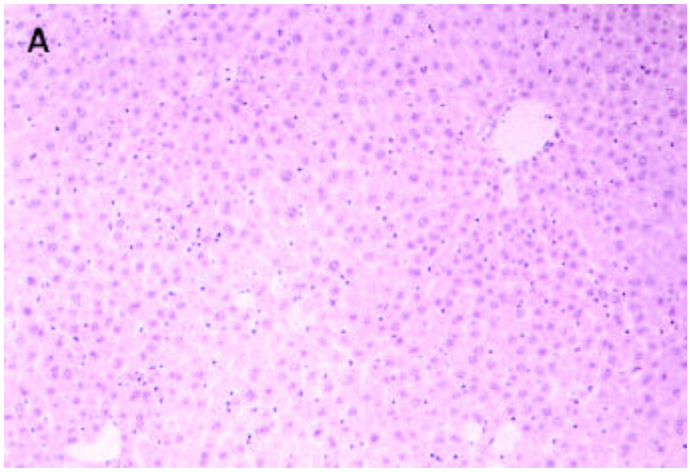

Fig 3-9. Liver section from a mouse administered with *rpoS* mutant *S. typhimurium* and euthanized 24 days post-inoculation The live tissue was histopathologically normal. HE. ×200

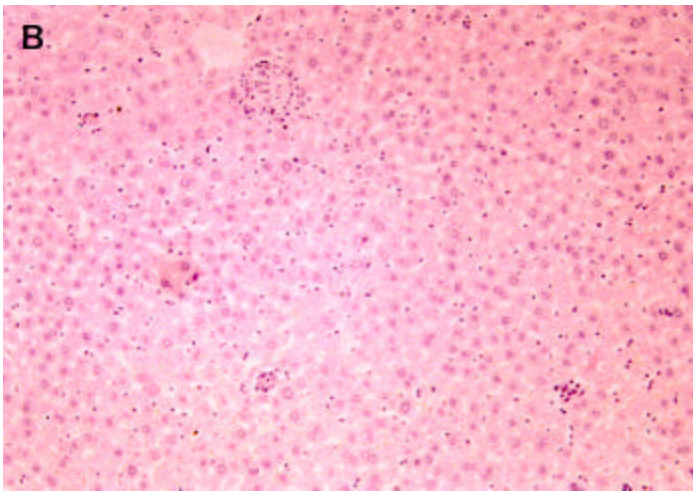

Fig. 3-10. Mild hepatic focal necrosis. Liver section from a mouse administered with wild type *S. typhimurium* and euthanized 24 days post-inoculation. HE. ×200

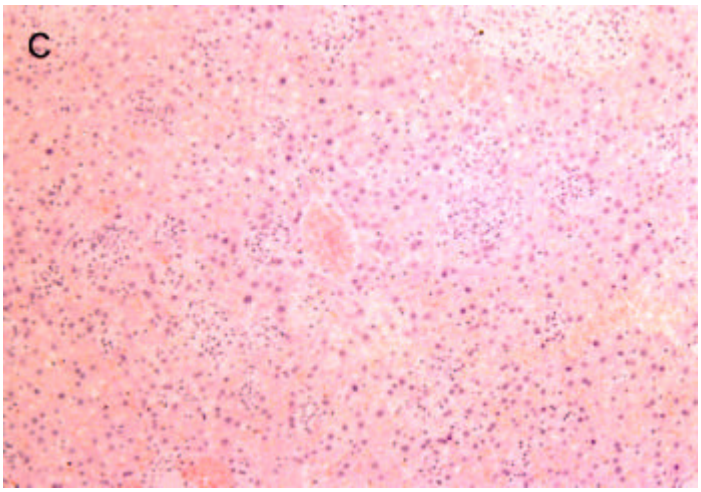

Fig. 3-11. Multifocal hepatic necrosis of liver tissue. Liver section from a mouse administered with wild type *S. typhimurium* and died on day 8 post-inoculation. HE. ×100

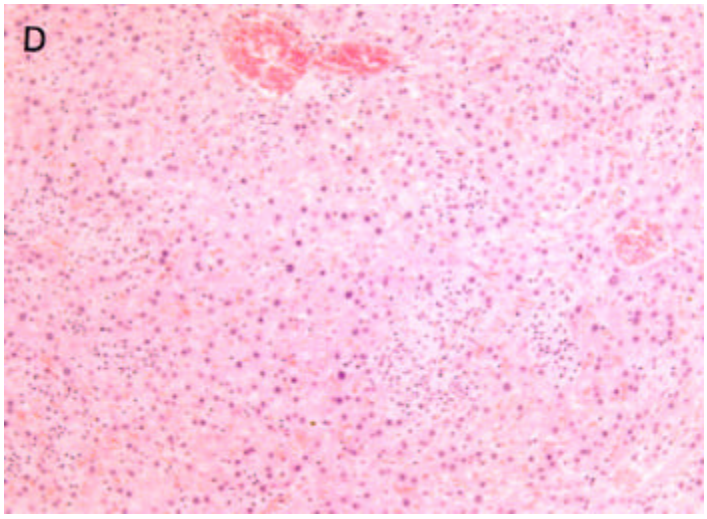

Fig. 3-12. Multifocal hepatic focal necrosis of liver tissue. Liver section from a mouse administered with wild type *S. typhimurium* and died on day 12 post-inoculation. HE. ×100

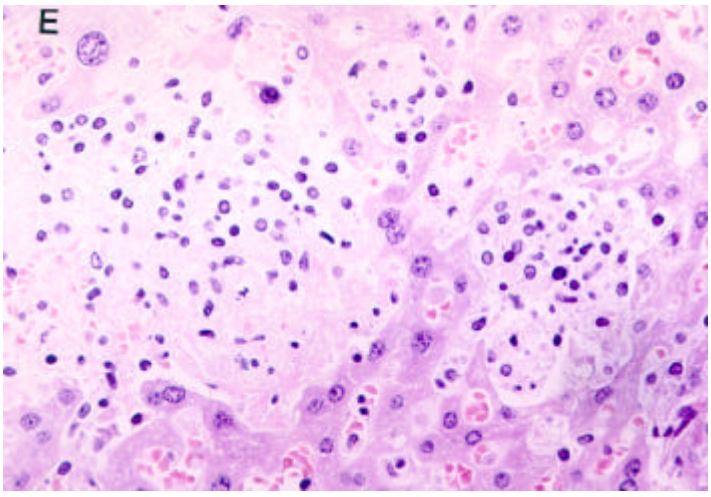

Fig. 3-13. Necrotic lesions with high magnification. Liver section from a mouse administered with wild type *S. typhimurium* and died on day 8 post-inoculation. HE. ×400

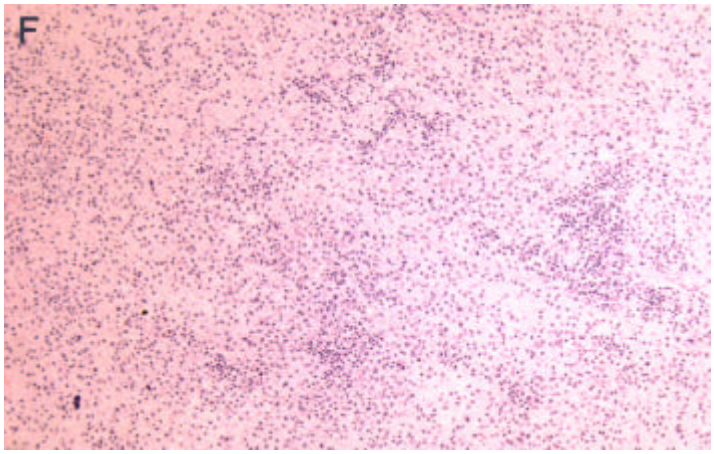

Fig. 3-14. Spleen lesions. Spleen section from a mouse administered with wild type *S. typhimurium* and died on day 8 post-inoculation. Loss of white plup was seen. HE. ×100

2) Chicken에 대한 병원성

Wild type *S. gallinarum*(A군)과 mutant(B군)를 접종한 접종군 사이에 관찰기간(3주)동안 특이한 임상증상은 발견되지 않았다. 이는 본 실험에서 5주령 병아리를 실험동물로 사용하였기 때문에 이미 보고된 바가 있는 *S. gallinarum*의 발병기전 가운데 주요 발병 인자인 산란 stress가 없었기 때문인 것으로 생각되었다.

3) *Salmonella* mutant에 대한 안전성 시험 및 면역원성 시험

실험 기간 중 *S. typhimurium* mutant 접종군(A군)에서 설사증상과 같은 살모넬라 특이적인 임상증상은 관찰되지 않았다. Fig.3-15 에서 보는 바와 같이 mutant 접종군에서의 살모넬라 특이 항체가의 geometric mean titers는 접종 후 4주, 6주 및 9주에서 각각 2.09±0.56, 1.85±043 및 2.07±0.56 이었으며 대조군에서는 공격접종 후 2주에서 2.56±0.40의 항체가를 나타내었다. 공격접종 후 A 군에서는 살모넬라 특이적인 임상증상이 발견되지 않았으나 B군에서는 접종 초기에 가벼운 설사증상과 식욕부진이 관찰되었으나 폐사는 발견되지 않았다.

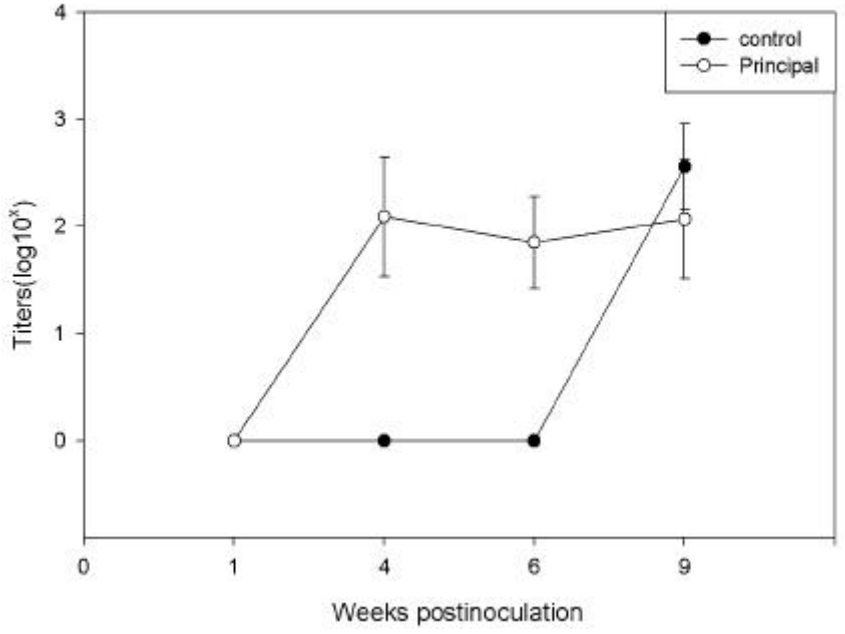

Fig. 3-15. Geometric mean titer of antibody to *S. typhimurium*. The principal and control chicken were challenged with wild type *S. typhimurium* at 7 weeks post-inoculation. Blood samples were collected at 4, 6, and 9 weeks post-inoculation.

4. 제 4 세부과제 : 살모넬라균 재조합 항원단백 정제, 생화학적 성상시험 및 재조합 변이주의 대량생산 체계구축

1) *Salmonella*균의 생화학적 특성시험

S. enteritidis, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*의 균체 항원으로서 Outer membrane protein(OMP)를 purification하여 OMP의 생화학적 성상 및 분자적 성질을 조사하기 위해서 detergent인 Sarkosyl(2%)/10mM HEPES과 β-octyl-glucoside(1%)/10mM HEPES를 각각 이용하여 OMP를 solubilizing하였다.

Tryptic soy broth에서 네 개의 균주를 37℃에서 각각 배양한 후 stationary phase 말기에서 cell을 harvest했다. 상등액은 버리고 pellet을 PBS에 resuspending하여 sonicator로 cell을 disrupture시켰다. 이를 원심분리(6,000rpm에서 20분 동안)하여 debris는 버리고 상등액을 취하여 30,000rpm에서 한 시간 동안 초원심분리했다. 그 후 상등액은 버리고 pellet을 non-ionic detergent인 Sarkosyl(2%) in 10mM HEPES과 β-octyl-glucoside(1%) in 10mM HEPES에 각각 resuspending후 4℃에서 gently shaking을 했다(O/N). 이를 다시 30,000rpm에서 한 시간 동안 초원심분리 후 생긴 pellet을 10mM Tris-Cl(pH7.2)에 resuspending 한 후, 24시간 동안 dialysis했다.

Fig. 4-1A는 *S. pullorum*을 Sarkosyl(2%) in 10mM HEPES를 이용한 것이고, Fig. 4-1B는 *S. gallinarum*을 Sarkosyl(2%) in 10mM HEPES를 이용한 것이다. 또한 Fig. 4-2A는 *S. enteritidis*을 β-octyl-glucoside(1%) in 10mM HEPES를 이용한 것이고 Fig. 4-2B는 *S. typhimurium*을 β-octyl-glucoside(1%) in 10mM HEPES를 이용한 것이다. Fig. 에서 보는 바와 같이 detergent로서 Sarkosyl(2%) in 10ml HEPES를 이용한 것이 정제과정 중 β-octyl-glucoside(1%) in 10mM HEPES를 이용한 것보다 minor band가 없이 정제가 보다 잘 되었다.

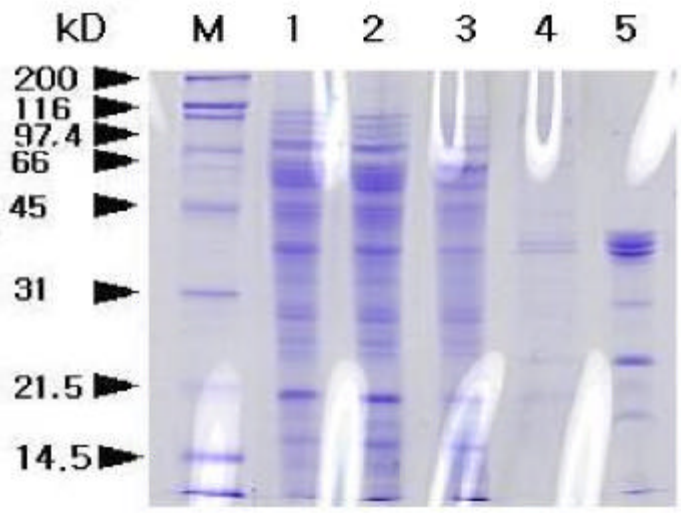

Fig 4-1A. Purification of OMP from *Salmonella pullorum*.
Lane 1, whole cell lysate; 2, supernatant after sonication; 3, supernatant after ultracentrifugation 4: solubilized in non-ionic detergent; 5, OMP

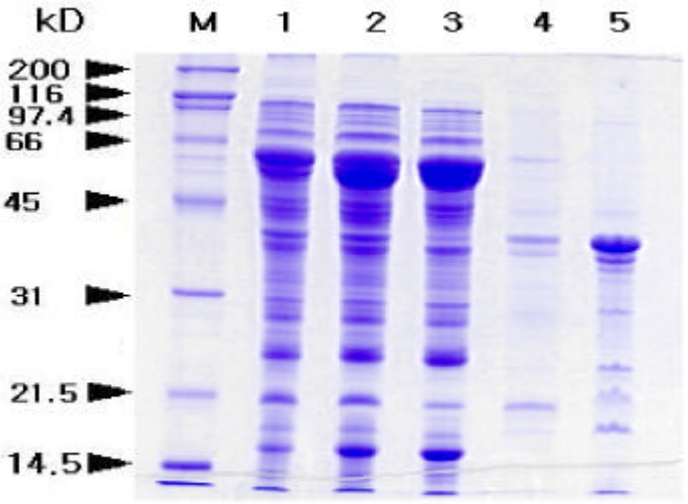

Fig 4-1B. Purification of OMP from *Salmonella gallinarum*.
Lane 1, whole cell lysate; 2, supernatant after sonication; 3, supernatant after ultracentrifugation 4: solubilized in non-ionic detergent; 5, OMP

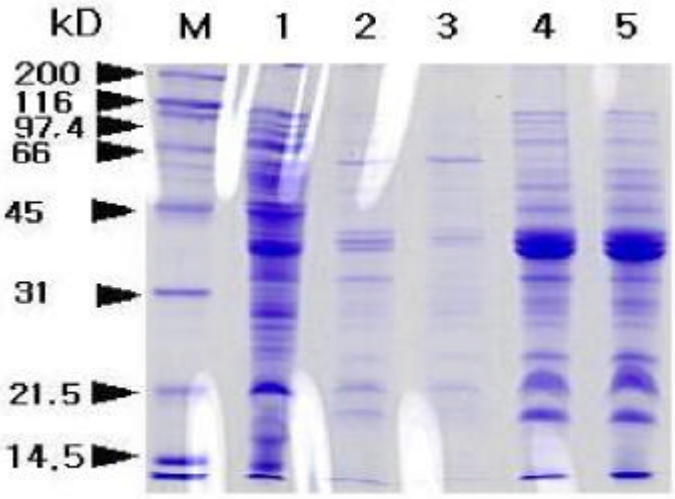

Fig. 4-2A. Purification of OMP from *Salmonella enteritidis* using β-octyl-glucoside.

Lane 1, whole cell lysate; 2, solubilized in non-ionic detergent; 3, supernatant after 2nd ultracentrifugation 4, OMP; 5, OMP after dialysis

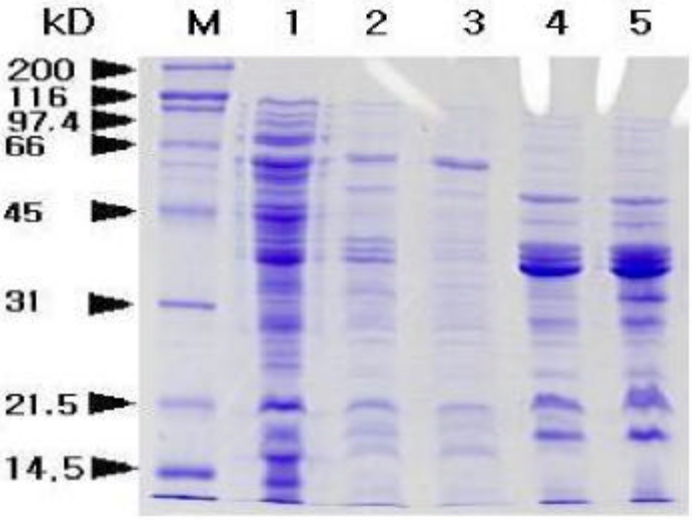

Fig. 4-2B. Purification of OMP from *Salmonella typhimurium* using β-octyl-glucoside.

Lane 1, whole cell lysate; 2, solubilized in non-ionic detergent; 3, supernatant after 2nd ultracentrifugation 4, OMP; 5, OMP after dialysis

또한 정제한 OMP를 gel chromatography로 분리·정제하고자 하였으나, OMP가 insoluble 상태였기 때문에, cloumn에 loading할 수가 없었다. 따라서 여러 가지 방법으로 insoluble OMP를 처리하여 phast system을 이용한 전기영동의 결과 gel chromatography를 하기엔 purification한 OMP의 농도가 너무 낮다는 것을 알았다.(Fig 4-3A, 4-3B) GPC column의 total bed volume이 300 ㎖이므로 Fig. 4-3A, 4-3B와 같이 희석했을 때 두꺼운 band가 나타나야만 GPC를 이용할 수 있으나, 희석했을 때 major band뿐만 아니라, 어떠한 band도 거의 나타나지 않았기 때문에 GPC로 OMP를 purification하는 것은 불가능했다.

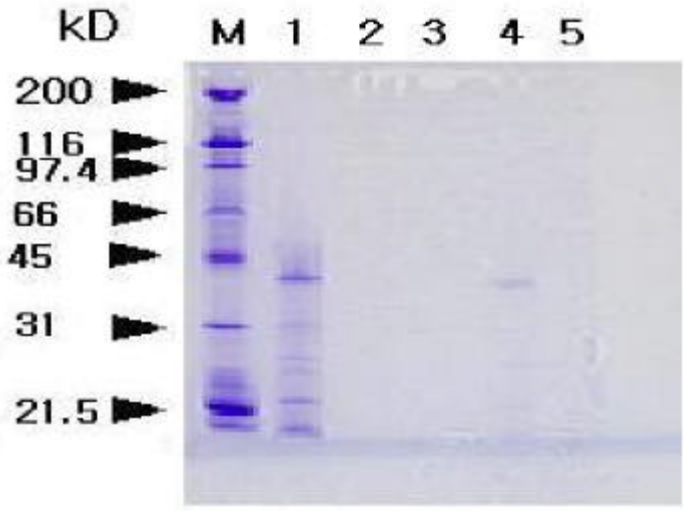

Fig. 4-3A. Purification of OMP from *Salmonella enteritidis*.
Lane 1, OMP after dialysis; 2, supernatant after centrifugation; 3, filtered OMP (pore size: 0.45μ); 4, 5, diluted OMP after dialysis

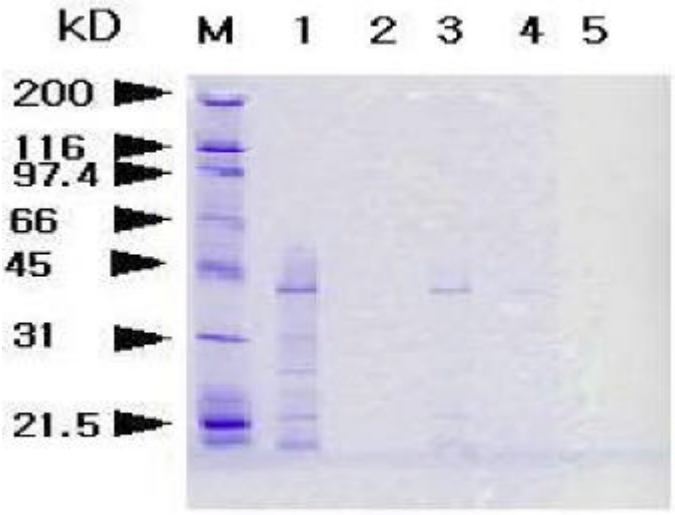

Fig. 4-2B. Purification of OMP from *Salmonella typhimurium*.
Lane 1, OMP after dialysis; 2, supernatant after centrifugation; 3, filtered OMP (pore size: 0.45μ); 4, 5, diluted OMP after dialysis

Outer membrane protein(OMP)의 생화학적 성상 변화를 알아 보기 위하여 SDS-PAGE 분석시 sample 처리의 온도와 시간, mercaptoethanol첨가의 유무에 따른 조건별 처리를 달리 하였다.

Fig. 4-4는 Sarkosyl로 정제한 *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*의 OMP를 SDS-PAGE 분석시에 60℃에서 30분(lane 1-4), 100℃에서 5분간(lane 5-8) 처리한 것이며 Fig. 4-5A는 β-octyl-glucoside로 정제한 *S. enteritidis*과 *S. typhimurium*의 OMP를 SDS-PAGE 분석시에 mercaptoethanol를 넣지 않고 100℃에서 5분(lane 1) boiling한 것과 mercaptoethanol을 넣고 각각 60℃에서 30분(lane 2) incubation, 100℃에서 5분(lane 3)간 boiling 한 것이다. Fig. 4-5B는 β-octyl-glucoside로 정제한 *S. pullorum*, *S. gallinarum*의 OMP를 SDS-PAGE 분석시에 mercaptoethanol를 넣지 않고 100℃에서 5분(lane 4) boiling한 것과 mercaptoethanol을 넣고 각각 60℃에서 30분(lane 5) incubation, 100℃에서 5분(lane 6)간 boiling 한 것이다. 본 연구의 결과 mercaptoethanol을 넣은 것과 넣지 않은 것의 차이는 없었으며, 100℃에서 5분 boiling했을 때 나타나는 main protein band(40 kDa, 39 kDa, 36 kDa) 중 1개(Mw 36 kDa)가 60℃에서 30분간 incubation했을 때 29 kDa에서 나타났다. 문헌에서 OMP C, OMP F, OMP A가 각각 36 kDa, 35kDa, 33kDa으로 보고 되어 있으나, 본 연구에서의 OMP의 크기와는 다소 차이가 있었다.

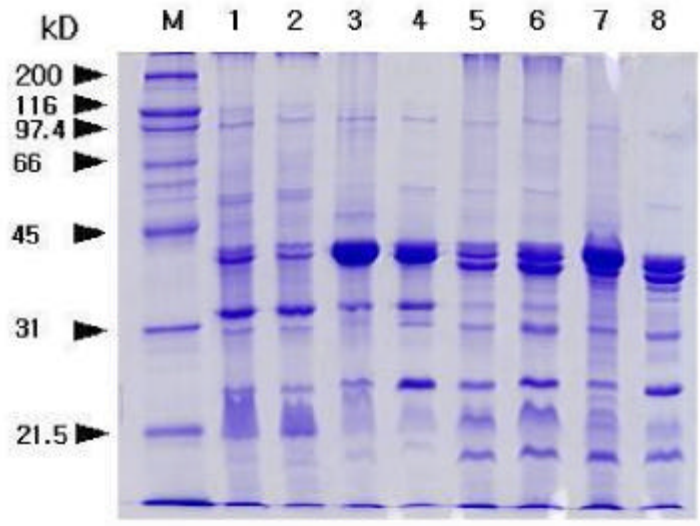

Fig. 4-4. Molecular weight profiles of OMP under different haet-treatments. Lane 1, *Salmonella enteritidis*, 60℃, 30 min; 2, *Salmonella typhimurium*, 60℃, 30 min; 3, *Salmonella gallinarum*, 60℃, 30 min; 4, *Salmonella pullorum*, 60℃, 30 min; 5, *Salmonella enteritidis*, 100℃, 5 min; 6, *Salmonella typhimurium*, 100℃, 5 min; 7, *Salmonella gallinarum*, 100℃, 5 min; 8, *Salmonella pullorum*, 100℃, 5 min.

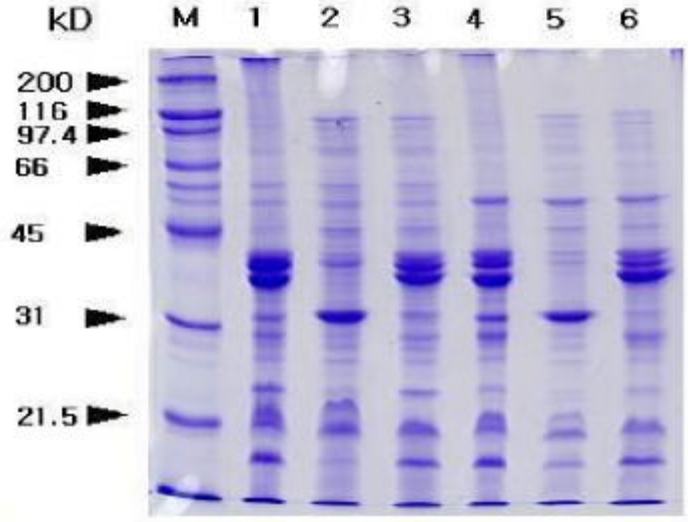

Fig. 4-5A. Molecular weight profiles of OMP using β-octyl-glucoside. Lane 1 3, *Salmonella enteritidis*, without mercaptoethanol(1), 60℃, 30 min (2), 100℃, 5 min (3); 4 6, *Salmonella typhimurium*, without mercaptoethanol(4), 60℃, 30 min (5), 100℃, 5 min (6).

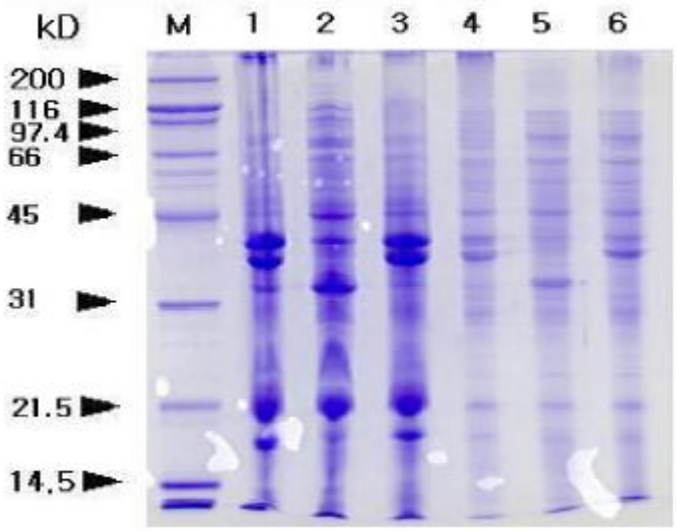

Fig. 4-5B. Molecular weight profiles of OMP using β-octyl-glucoside. Lane 1 3, *Salmonella gallinarum*, without mercaptoethanol(1), 60℃, 30 min (2), 100℃, 5 min (3); 4 6, *Salmonella pullorum*, without mercaptoethanol(4), 60℃, 30 min (5), 100℃, 5 min (6).

2) 재조합 단백항원의 생화학적 성상시험

제 2 세부과제에서 마련한 재조합 단백항원의 생화학적 성상시험의 기초 연구를 하였다. pQE9 vector에 *S. typhimurium agf*B와 *S. gallinarum agf*A, B를 cloning한 colony를 받아 expression 실험에 들어갔다.

항생제를 넣은 LB broth에서 clone된 cell을 OD값이 0.5 0.6이 되도록 배양한 후에 IPTG를 final concentration 1mM이 되게 첨가하여 4시간 동안 induction했다. Induction후에 harvest한 것을 sample buffer에 직접 섞어서 SDS-PAGE 분석을 했고, 또한 harvest한 cell을 lysis buffer(8M urea 포함)로 O/N lysis한 후 whole cell lysate, whole cell lysate을 원심분리 후 생긴 supernatant, precipitate 등을 SDS-PAGE로 분석을 했다 (Fig. 4-6). Fig. 4-6A에서 Fig. 4-6F 까지 control은 induction전의 sample을 나타내고, control 다음의 strain별 lane은 induction한 후를 나타낸다. Expression된 proteins이 약 17kD 부근인데, *S. typhimurium agf*B는 expression이 확인이 되었으나 다른 균주에서는 band가 너무 흐려서 불확실 했다. 따라서 sample loading 양을 두 배로 늘려서 SDS-PAGE 분석을 해보았으나, *S. typhimurium agf*B를 제외하고는 expression이 되지 않았다. 따라서 expression된 *S. typhimurium agf*B만을 가지고 Western blot을 한 결과, 17kD 부근에서 매우 희미한 band가 보였다. 따라서 이 protein이 Talon metal affinity resin에 binding되는지의 여부를 알아보고자 denaturing condition에서 purification을 large scale로 수행하였다. 항생제를 넣은 LB broth에서 *S. typhimurium agf*B를 expression한 후 cell down을 시켜 상등액은 버리고 pellet을 lysis buffer(pH 8.0, 8M urea 포함)로 O/N lysis했다. 이를 다시 cell down하여 debris는 버리고 상등액만을 talon metal affinity resin에 약 50분간 binding시킨 후 2,000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 binding되지 않은 상등액은 버렸다. lysis buffer를 넣고 실온에서 10분 동안 gently mixing후에 2,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거했다.(이 과정을 두 번 더 반복했다.- washing step) washing 단계가 끝나면 elution buffer(resin bed volume의 1배 만큼 첨가)를 넣고, 실온에서 10분 동안 gently mixing후 2,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 회수했다. (이 과정을 두 번 더 반복했다.) 정제 과정 중 단계별로 sampling하여 SDS-PAGE analysis을 하였다 (Fig. 4-7).

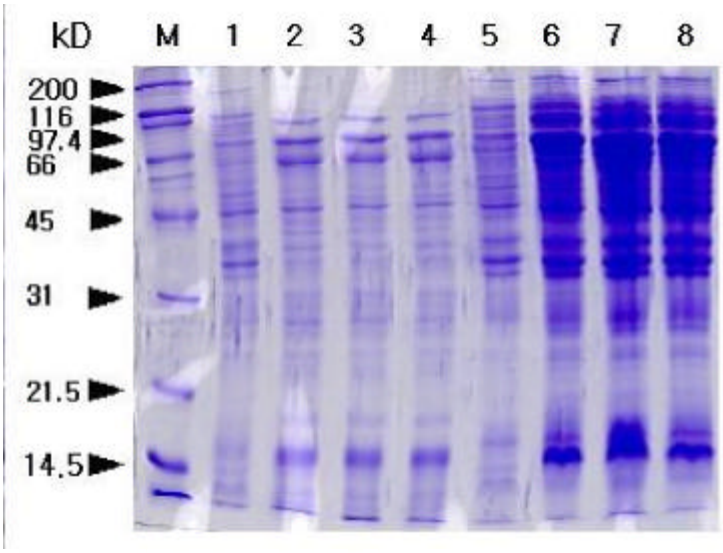

Fig. 4-6A. Expression of *agf*B from *Salmonella typhimurium* in *E. coli*
Lane 1, control; 2 4: *agf*B from *Salmonella typhimurium* (supernatant); 5, control; 6 8, *agf*B from *Salmonella typhimurium* (precipitate)

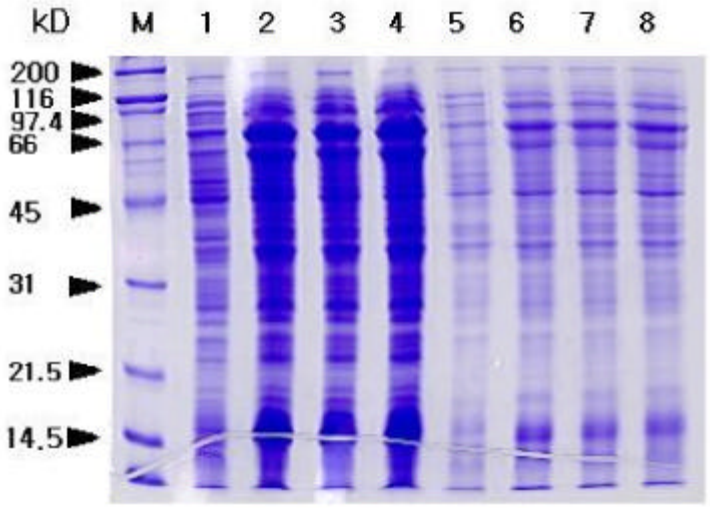

Fig. 4-6B. Expression of *agf*B proteins from *Salmonella typhimurium* in *E. coli.*
Lane 1, control; 2 4, *agf*B from *Salmonella typhimurium* (harvested); 5, control; 6 8, *agf*B from *Salmonella typhimurium (*whole cell lysate)

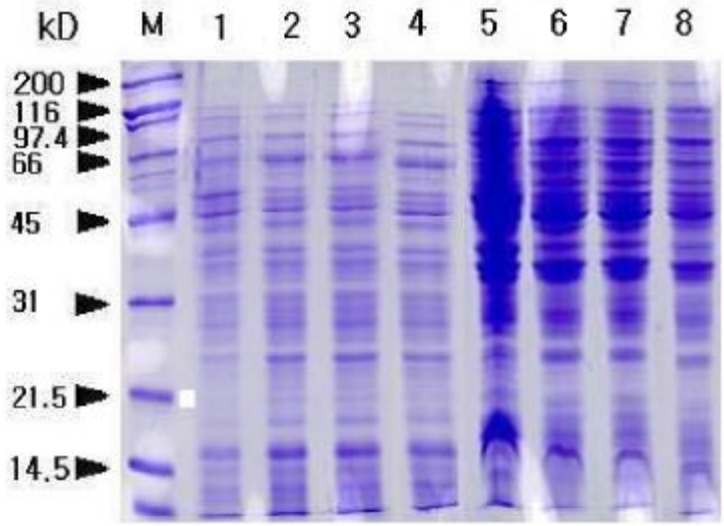

Fig 4-6C. Expression of *agf*A from *Salmonella gallinarum* in *E. coli.*
Lane 1, control; 2 4: *agf*A from *Salmonella gallinarum* (supernatant); 5, control; 6 8, *agf*A from *Salmonella gallinarum* (precipitate).

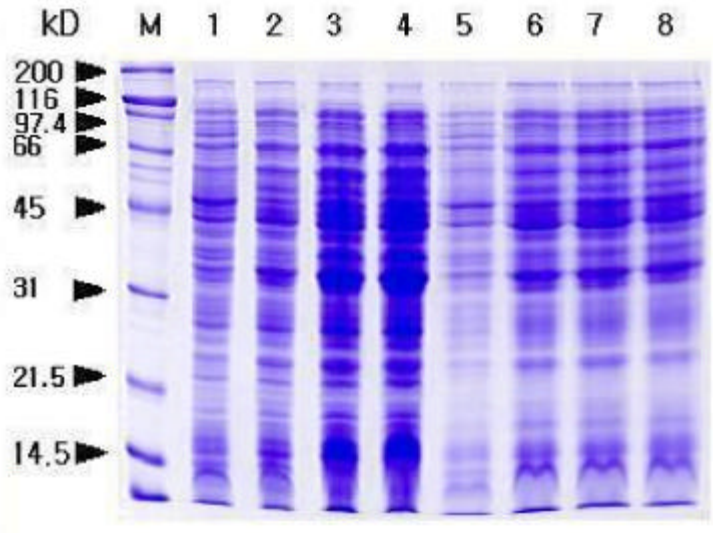

Fig 4-6D. Expression of *agf*A proteins from *Salmonella gallinarum* in *E. coli.*
Lane 1, control; 2 4, *agf*A from *Salmonella gallinarum* (harvested); 5, control; 6 8, *agf*A from *Salmonella gallinarum* (whole cell lysate).

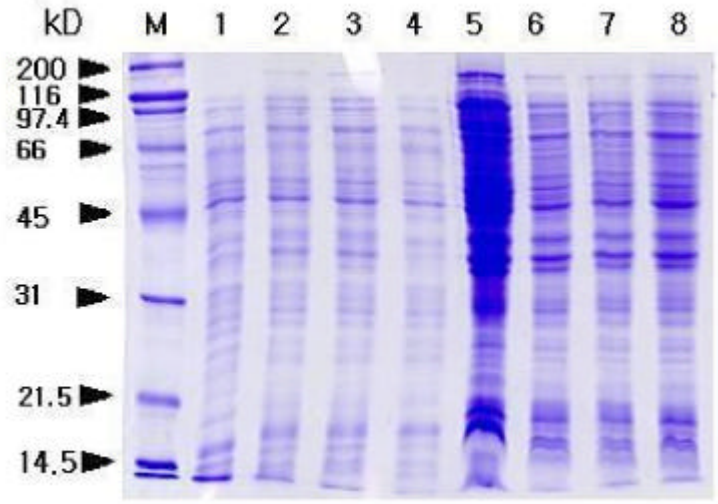

Fig 4-6E. Expression of *agf*B from *Salmonella gallinarum* in *E. coli.*
Lane 1, control; 2 4: *agf*B from *Salmonella gallinarum* (supernatant); 5, control; 6 8, *agf*B from *Salmonella gallinarum* (precipitate).

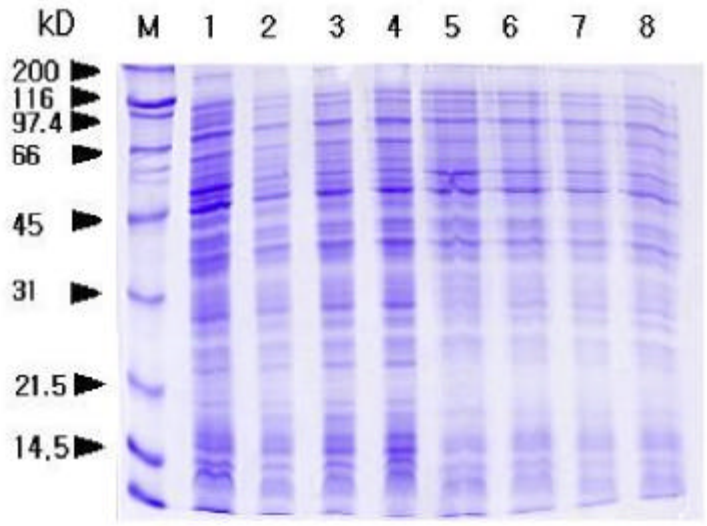

Fig 4-6F. Expression of *agf*B proteins from *Salmonella gallinarum* in *E. coli.*
Lane 1, control; 2 4, *agf*B from *Salmonella gallinarum* (harvested); 5, control; 6 8, *agf*B from *Salmonella gallinarum (*whole cell lysate).

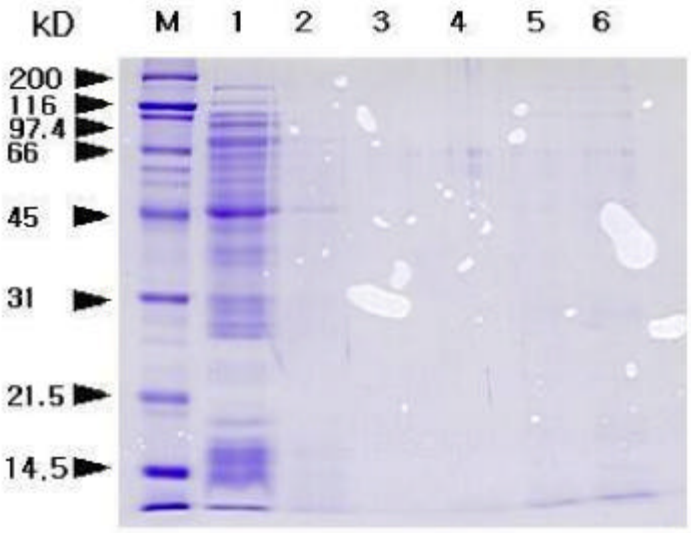

Fig. 4-7. Purification of *agf*B from *Salmonella typhimurium* in *E. coli* using Talon metal affinity chromatogarphy.
Lane 1, after resin binding; 2, first washing; 3, second washing; 4, third wasing; 5, first elution; 6, second elution.

Expression을 하기 위해서 제 2 세부과제에서 제조한 *S. pullorum agf*A, *agf*B와 *S. enteritidis agf*A를 pGEX-2T vector에 GST fusion protein으로 cloning한 cell을 expression 하였다. 항생제를 넣은 2x YTA broth에서 clone된 cell을 배양한 후 OD600 값이 0.6 0.8사이에 이르면 IPTG의 농도가 0.3 mM이 되게 첨가하여 induction 했다. 이 때 각각 시간별로 sampling을 하여 expression 정도를 SDS-PAGE로 확인을 했다. Induction후 시간별로 sampling을 하여 비교해 본 결과 (sample의 처리는 앞의 *S. typhimurium agf*B, *S. gallinarum agf*B, *agf*A와 동일했다) 별다른 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4-8). pGEX-2T에 fusion된 GST의 크기가 29 kDa이고 재조합 단백항원이 17 kDa 정도이므로 46 kDa 부근에서 expression이 확인되어야 했으나 band가 나타나지 않았다.

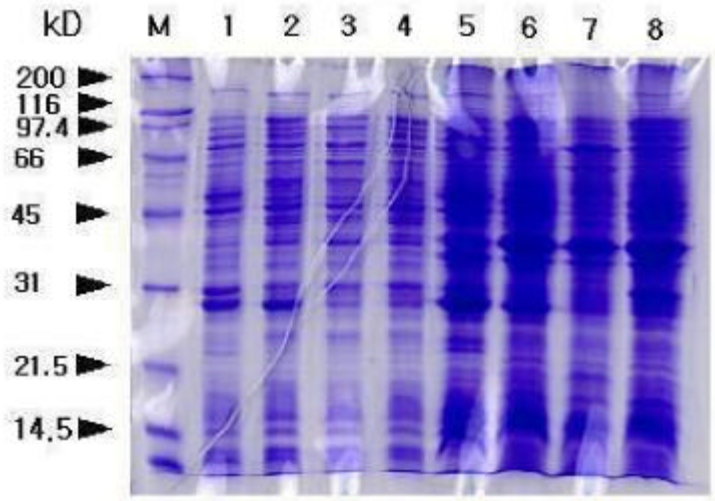

Fig. 4-8A. Expression of *agfA*, *agfB* from *Salmonella pullorum*, *Salmonella enteritidis* in *E. coli BL21* (1 hr).

Lane 1, control; 2, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 3, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 4, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 1 4, supernatant); 5, control; 6, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 7, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 8, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 5 8, precipitate).

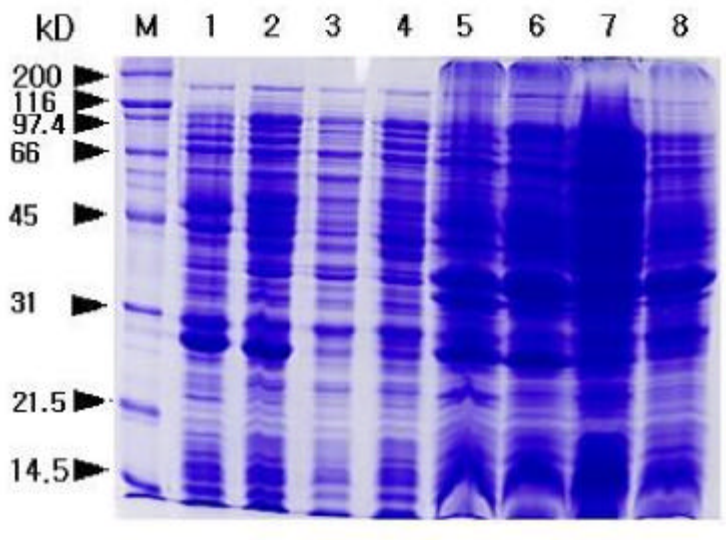

Fig. 4-8B. Expression of *agfA*, *agfB* from *Salmonella pullorum*, *Salmonella enteritidis* in *E. coli BL21* (2 hrs).

Lane 1, control; 2, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 3, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 4, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 1 4, supernatant); 5, control; 6, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 7, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 8, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 5 8, precipitate).

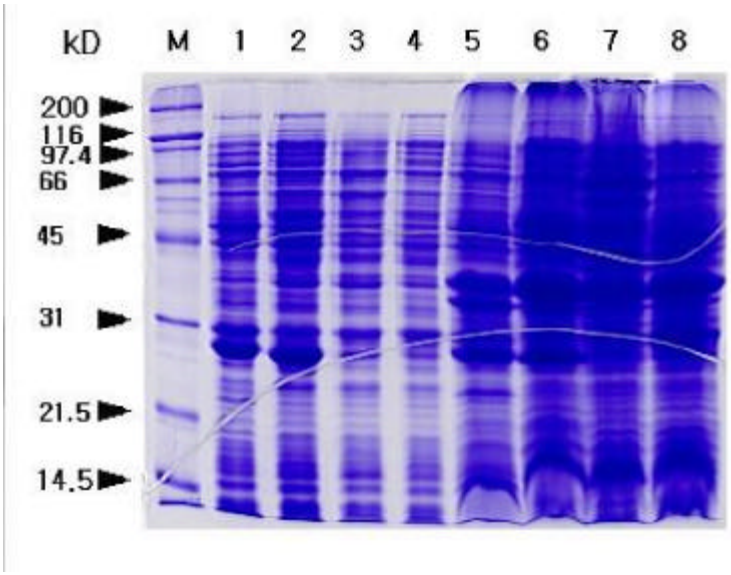

Fig. 4-8C. Expression of *agfA*, *agfB* from *Salmonella pullorum*, *Salmonella enteritidis* in *E. coli BL21* (3 hrs).

Lane 1, control; 2, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 3, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 4, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 1 4, supernatant); 5, control; 6, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 7, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 8, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 5 8, precipitate).

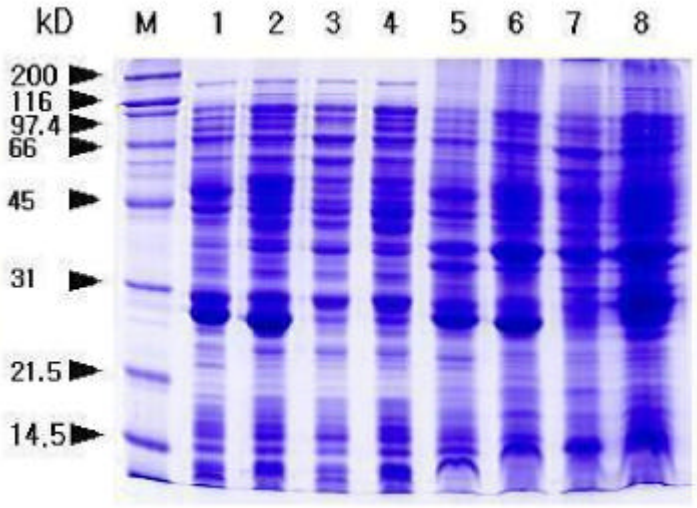

Fig. 4-8D. Expression of *agfA*, *agfB* from *Salmonella pullorum*, *Salmonella enteritidis* in *E. coli BL21* (4 hrs).

Lane 1, control; 2, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 3, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 4, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 1 4, supernatant); 5, control; 6, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 7, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 8, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 5 8, precipitate).

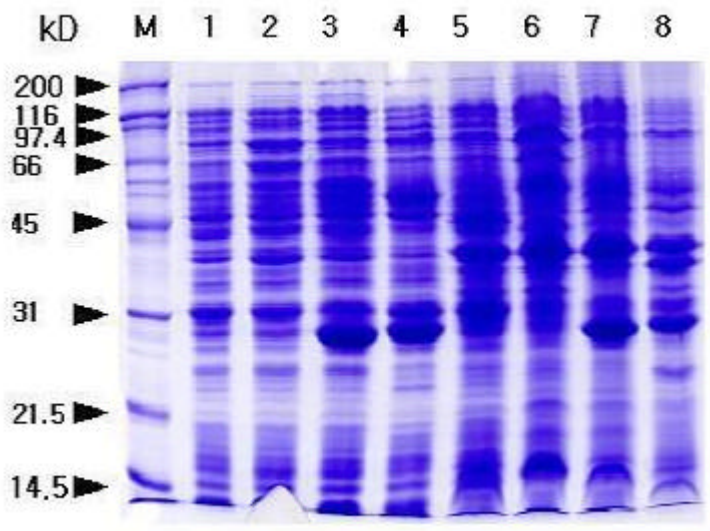

Fig. 4-8E. Expression of *agfA*, *agfB* from *Salmonella pullorum*, *Salmonella enteritidis* in *E. coli BL21* (5 hrs).

Lane 1, control; 2, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 3, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 4, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 1 4, supernatant); 5, control; 6, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 7, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 8, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 5 8, precipitate).

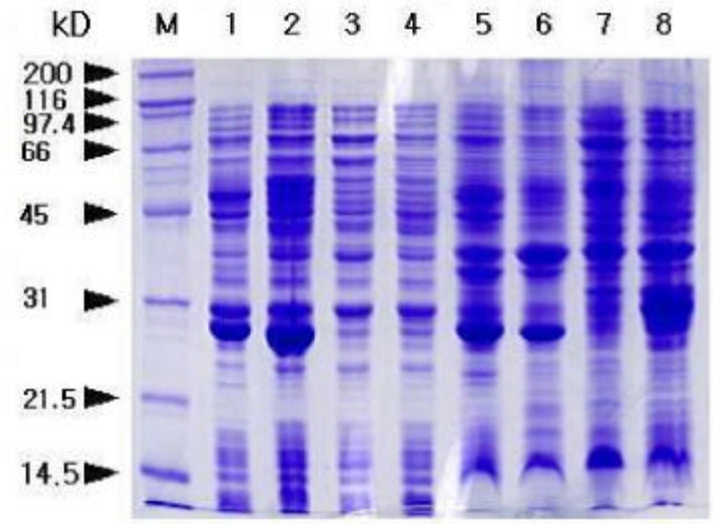

Fig. 4-8F. Expression of *agfA*, *agfB* from *Salmonella pullorum*, *Salmonella enteritidis* in *E. coli BL21* (6 hrs).

Lane 1, control; 2, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 3, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 4, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 1 4, supernatant); 5, control; 6, *agfA* from *Salmonella pullorum*; 7, *agfB* from *Salmonella pullorum*; 8, *agfA* from *Salmonella enteritidis* (Lane 5 8, precipitate).

3) 재조합 단백항원의 분리·정제 및 대량 생산 체제 확립

제 2세부과제에서 Maltose Binding Protein(MBP) fused protein으로 다시 pMAL vector에 signal peptide를 잘라 내고 primer를 새로이 작성하여 cloning을 하여 제조된 cell로 expression을 하였다.

*S. pullorum agf*A, *S. typhimurium agf*A, *S. enteritidis agf*A, *S. gallinarum agf*A의 cloning된 colony로 expression 실험을 하였다. 배지 조성은 ℓ당 tryptone 10g, NaCl 5g, Yeast extract 5g, glucose 2g이며, 멸균 후 ampicillin을 첨가했다. O/N culture를 △-flask의 배지에 2% inoculation을 한 후 37℃에서 세 시간 삼십분 동안 OD600 값이 0.5 0.6정도가 되게 배양했다. 적정 OD 값에 이르면 IPTG 농도가 0.3mM이 되게 첨가하고 이 때 배양 온도를 32℃로 낮추고 네 시간 동안 induction을 하였다. 그 결과 *S. gallinarum agf*A가 Fig. 4-9에서 보는 것처럼 expression이 되었다. Lane 4 6은 control과는 다른 band가 55 kDa 부근에 나타난다. 이것은 42 kDa의 MBP와 13 kDa (signal peptide를 잘라냈음)의 *S. gallinarum agf*A를 합한 크기이다. 이렇게 expression된 *S. gallinarum agf*A를 purification을 하고자 amylose resin을 이용하였다. *S. gallinarum agf*A in *E. coli* 200㎖을 키워서 expression을 확인한 후 harvest하여 15㎖ column buffer에 resuspending하여 -20℃에서 O/N하였다. 이것을 sonicator를 이용하여 cell을 disrupture 시킨 후 centrifugation을 하여 상등액만을 취하여 amylose resin에 resuspending한 후 실온에서 한 시간 동안 binding을 시켰다. binding 후에 2,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 column buffer에 다시 amylose resin을 resuspending하여 3회 washing을 한 후 elution 하였다. 정제가 되었는지를 알아보기 위해서 SDS-PAGE 분석을 한 결과 Fig. 4-10과 같이 정제가 되었다.

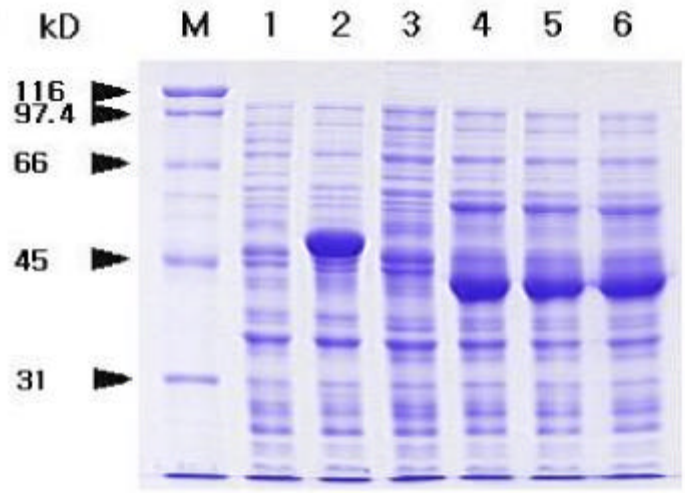

Fig. 4-9 Expression of *agfA* from *Salmonella gallinarum in E. coli.*
Lane 1, control (pMAL in E.coli XF); 2, induced control; 3, uninduced *agfA* from *Salmonella gallinarum*; 4 6, induced *agfA* from *Salmonella gallinarum*

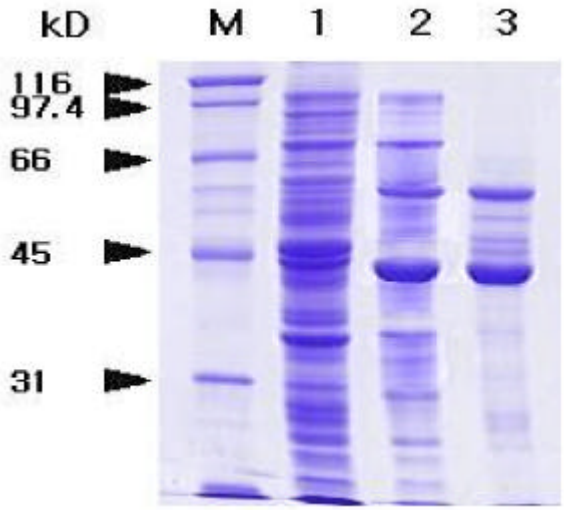

Fig. 4-10. Purification of *agfA* from *Salmonella gallinarum* in *E. coli.*
Lane 1, uninduced; 2, induced; 3, bound *agfA*

4) 재조합 단백 항원의 cloning 및 대량생산체계 구축

재조합 단백 항원의 생화학적 성상 비교를 하기위하여 그리고 제2세부과제에서 제조되지 않은 *S. entiritidis agf*A subunit gene을 pMAL-CR1에 cloning하여 MBP-AgfA fused protein을 제조하였다 (Fig. 4-11). *agf*A cloning을 위해 *S. entiritidis*의 chromosomal DNA를 template로 하여 *agf*A subunit의 DNA 단편을 PCR로 증폭하였다. Primer의 염기서열은 5'-GCG**GAATTC**ATGAAACTTTTAAAAGTGG-3'와 5'-CGC**GTCGAC**ATACTGGTTAGCCGTGGC-3' 이었다. PCR 조건은 94℃ 5 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min로 1 cycle, 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min로 30 cycle, 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min로 1 cycle 이었다. 증폭된 *agf*A DNA는 2% agarose gel에서 그 393 bp size가 확인되었다 (Fig. 4-12). 증폭된 DNA를 정제한 후 *Eco*RⅠ과 *Sal*Ⅰ로 절단하였다. Vector pMAL-CR1을 *Eco*RⅠ과 *Sal*Ⅰ로 절단하고 insert인 *agf*A와 16℃에서 ligation 시켰다. Ligation mixture를 *E. coli DH5*α에 transfomation한 후 transformant의 plasmid DNA를 추출하고 *Eco*RⅠ과 *Sal*Ⅰ로 digest 하였다. Vector pMAL-CR1과 clone 1, 2, 3에서 *agf*A의 DNA가 cloning 되었음을 확인하였다 (Fig. 4-13). *agf*A 유전자 cloning이 확인된 transformant에서 MBP-AgfA fused protein의 발현을 조사하였다. Transformant를 ampicillin이 함유된 LB media에서 OD가 0.5까지 배양한 후 최종농도 1 mM IPTG를 첨가하고 5시간 더 배양한 후 harvest 하였다. SDS-PAGE 결과 uninduced cell에서는 MBP-AgfA subunit가 발현되지 않았으나 induction된 cell에서 MBP-AgfA subunit가 다량 생산되었다 (Fig. 4-14). MBP-AgfA fused protein은 총 단백질의 25-30 %에 해당되었다. MBP-AgfA fused protein으로부터 AgfA subunit를 분리 정제하기 위해서 harvested cell을 sonication으로 lysis 시켰다. 12000 rpm에서 5 min 원심분리하여 얻은 cell extract를 amylose resin과 4℃에서 2시간 반응시켜 MBP-AgfA fused protein을 amylose resin에 binding 시킨 후 amylose resin을 buffer로 3회 washing한 후 MBP-AgfA fused protein을 정제하였다 (Fig. 4-15). 또한 amylose resin에 factor Xa를 넣고 4℃에서 16 시간 반응시켜

AgfA가 MBP로부터 분리되도록 하였다. SDS-PAGE를 통해 분리된 AgfA의 존재를 확인했다 (Fig. 4-15). Lane 1에서는 uninduced total cell extract, lane 2에서는 MBP-AgfA가 발현된 cell의 total cell extract로 MBP-AgfA가 25-30% 발현되었고 amylose resin으로 정제했을 시 90-95%의 purity를 나타내었다 (Lane 3). MBP-AgfA를 factor Xa로 digest한 후 전체 sample을 SDS-PAGE로 분리했을 때 MBP-AgfA가 MBP와 AgfA로 cleave됨을 확인했다.

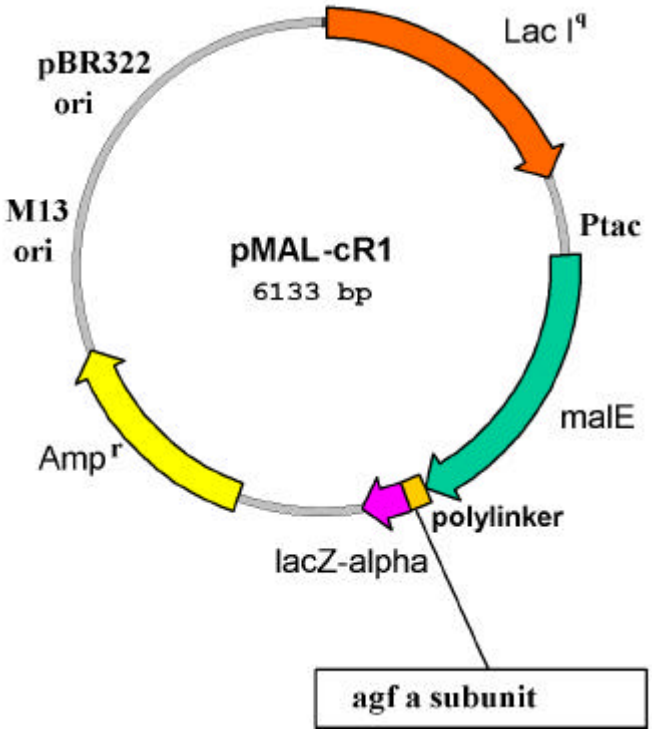

Fig. 4-11-1. Preparation of *Salmonella enteritidis agf*A subunit as a MBP fused protein.

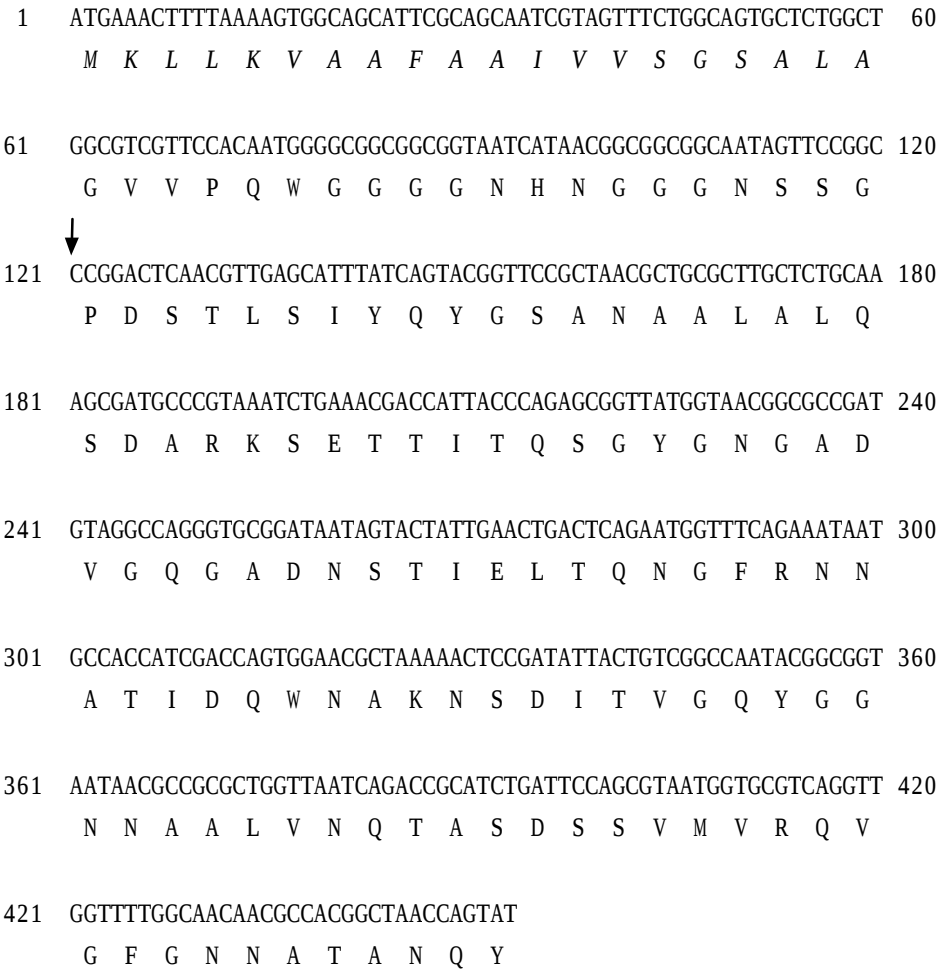

Fig. 4-11B. DNA sequence of *agjA* of *Samonella enteritidis*.
Arrow indicates the cleavage site of signal sequences.

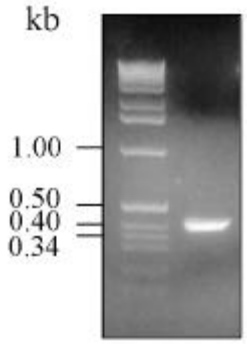

Fig. 4-12. PCR amplification of *agf*A subunit DNA

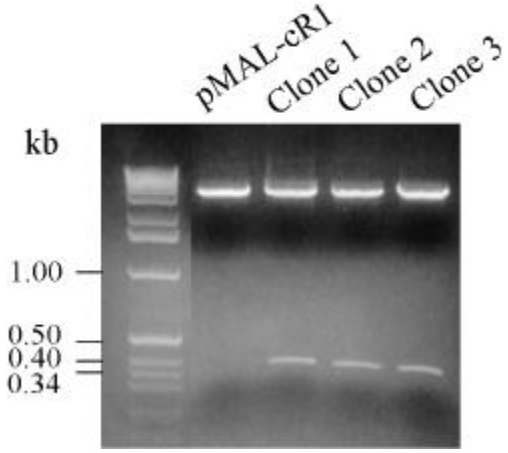

Fig. 4-13. Cloning of *agf*A subunit.

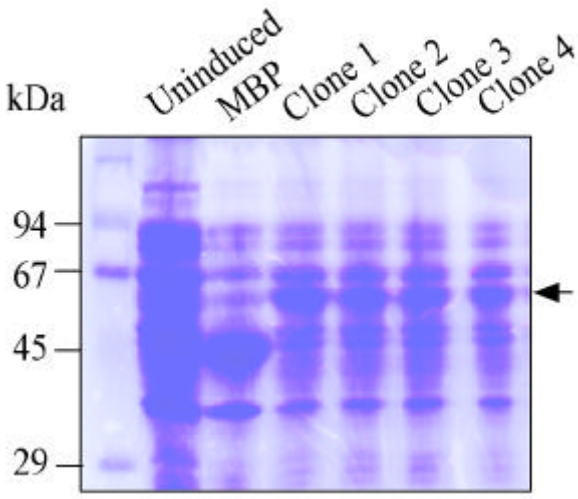

Fig. 4-14. Expression of MBP-AgfA fused protein

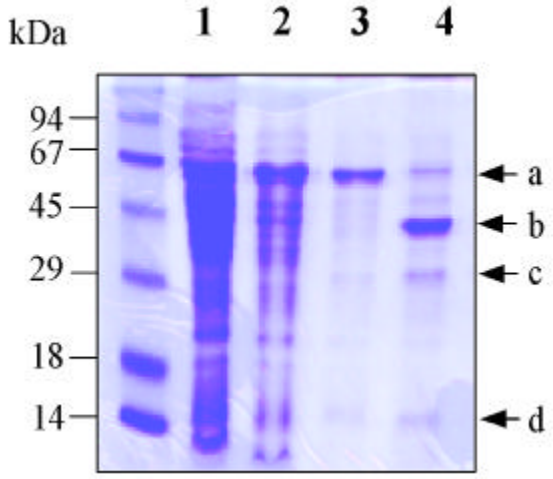

Fig. 4-15A. Purification of MBP-AgfA subunit protein.

Lane 1, uninduced; 2, induced; 3, purified MBP-AgfA fusion protein; 4, factor Xa digested.

a, MBP-AgfA fused protein; b, MBP; c, factor Xa; d, AgfA subunit.

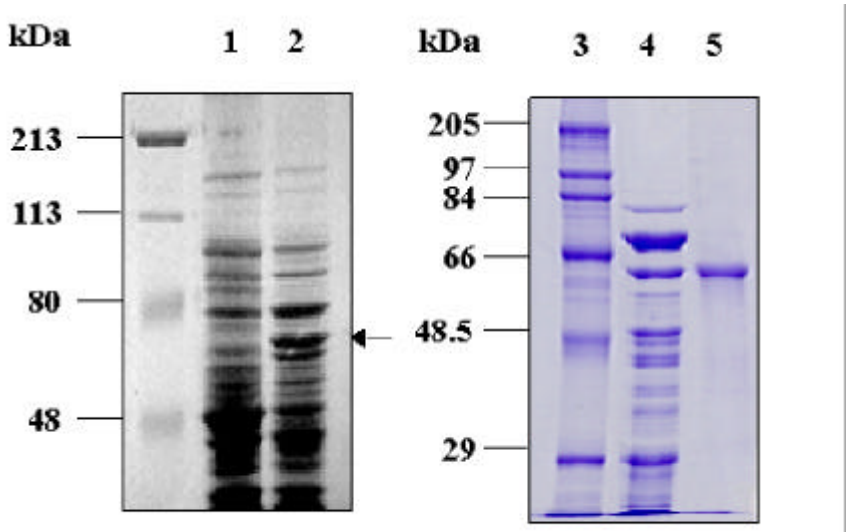

Fig.4-15B. Expression and purification of MBP-AgfA subunit protein.

Lane 1, uninduced cell; 2, induced cell; 3, molecular weight marker; 4, supernatant after sonication of crude cell extract; 5, MBP-AgfA

5) 재조합 단백 항원의 생화학적 특성 시험

S. enteritidis, *S. gallinarum*, *S. pullorum*의 준비된 단백 항원을 이용하여 생화학적 성상 시험에 들어갔다.

*S. enteritidis*의 경우는 제 4세부 과제에서 직접 cloning하여 재조합 단백 항원을 제조하였고, *S. gallinarum*, *S. pullorum*은 제 2세부 과제에서 cloning 한 재조합 단백 항원을 이용하였다.

Ampicillin을 넣은 LB 배지에 clone된 cell을 OD600에서 0.5가 되도록 배양한 후에 IPTG를 1mM이 되게 첨가하여 4시간 동안 induction했다. cell을 harvest 하여(6,000rpm, 10min, 4℃), column buffer(20mM Tris-Cl pH 7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA)에 suspension한 후 final concentration 1mM이 되게 PMSF를 첨가하고, sonication을 하였다. 12,000rpm에서 30분(4℃) 동안 원심분리를 한 후 crude cell extract를 얻었고, 이 것을 amylose resin에 binding 하였다.(4℃, 3시간) column buffer로 3 4회 resin을 washing한 후 elution buffer(10mM Maltose, 20mM Tris-Cl pH 7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA)로 elution하였다. 각각의 cell의 purificatioin 과정은 Fig. 4-16A, 4-16B, 4-16C과 같다.

S. enteritidis MBP-AgfA fusion protein은 60kDa의 깨끗한 single band를 얻을 수 있었으나 *S. pullorum* MBP-AgfA fusion protein과 *S. gallinarum* MBP-AgfA fusion protein은 45kDa의 MBP가 같이 expression 되었기 때문에 single band를 얻을 수가 없었다. 따라서 MBP-AgfA fusion protein만을 분리하고자 FPLC를 이용하여 Gel permeation chromatogrphy와 Ion exchange chromatogrphy를 시도해 보았다. 첫 번째, Gel permeation chromatogrphy를 하기 위해서 Sephacryl S-200HR을 사용하여 MBP와 MBP-fusion AgfA protein을 분리 하고자 하였다. Column의 V0=43.43㎖, Height=60㎝, Diameter=1.6㎝, Column volume은 120.637㎖이며, Eluted *S. gallinarum* MBP-fusion AgfA protein의 농도는 OD280=3.0이었으며, Eluted *S. pullorum* MBP-fusion AgfA protein의 농도는 OD280=2.7이었고, 각각 1㎖씩을 loading 하였다. 그 결과는 Fig. 4-17A, 4-17B와 같으며, sample이 on-line filter에서

많이 걸러져 농도가 많이 희석됨을 알 수 있었다. 각각의 peak를 소량씩 취하여 SDS-PAGE를 한 결과 Fig. 4-18A, 4-18B와 같으며 MBP와 MBP-fusion AgfA는 분리가 되지 않음을 알 수 있었다. Gel permeation chromatogrphy로는 분리가 되지 않아서, 두 번째 방법으로 FPLC를 이용하여 Ion exchange chromatogrphy를 시도해 보았다. Mono Q column(anion exchange chromatogrphy)을 사용하였으며 Colume volume=0.982㎖ 이며, buffer A로는 10mM Tris-Cl pH 8.0을 사용하였고, buffer B로는 1M NaCl in 10mM Tris-Cl pH 8.0을 사용하였으며, buffer B의 농도를 0M에서 1M까지 상승시켰다. 또한 *S. gallinarum* MBP-fusion AgfA protein을 elution하여 loading한 sample의 농도는 OD280=1.02였으며, 2㎖을 loading하였다. 그 결과 3개의 peak를 얻을 수 있었으며, 가장 높은 농도의 peak는 OD280=0.04로 매우 낮았다. 또한 sample을 loading하자마자 대부분의 sample이 flowthrough로 빠져나갔으며, SDS-PAGE로 확인한 결과 MBP와 MBP-fusion AgfA protein은 분리가 되지 않았다. Ion exchange chromatogrphy의 결과는 Fig. 4-19와 같고, 각 peak를 소량 취해서 SDS-PAGE를 한 결과는 Fig. 4-20와 같다.

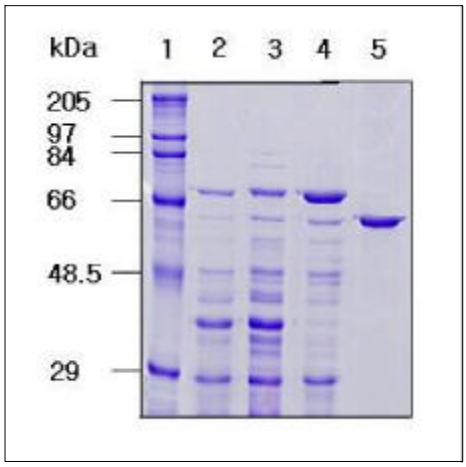

Fig 4-16A. Purification of *Salmonella enteritidis* MBP-fusion AgfA
lane 1, Protein molecular weight marker; 2, uninduced; 3, induced; 4, crude cell extract; 5, Eluted MBP-AgfA protein

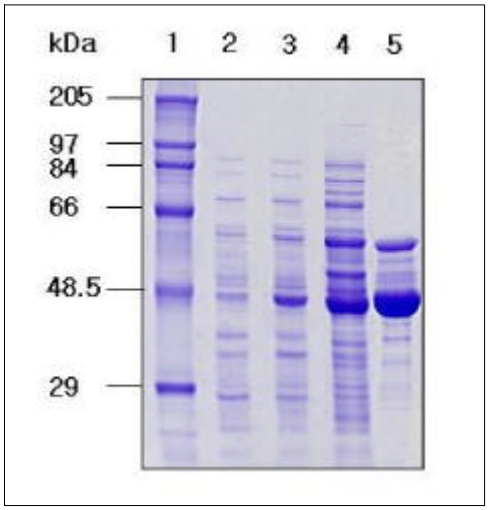

Fig 4-16B. Purification of *Salmonella gallinarum* MBP-fusion AgfA
Lane 1, Protein Molecular weight marker; 2, uninduced; 3, induced; 4, crude cell extract; 5, Eluted MBP-AgfA protein & MBP

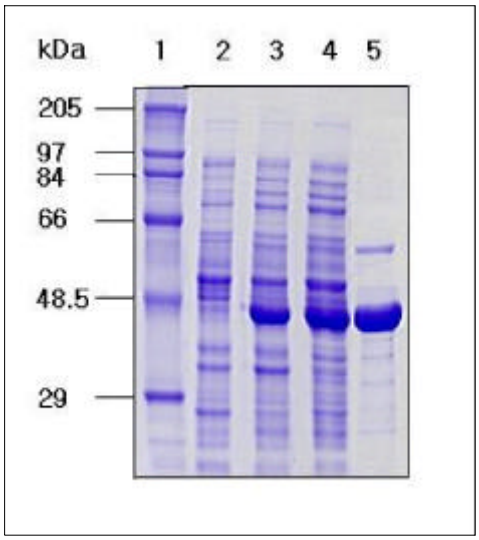

Fig 4-16C. Purification of *Salmonella pullorum* MBP-fusion AgfA
Lane 1, Protein Molecular weight marker; 2, uninduced; 3, induced; 4, crude cell extract; 5, Eluted MBP-AgfA protein & MBP

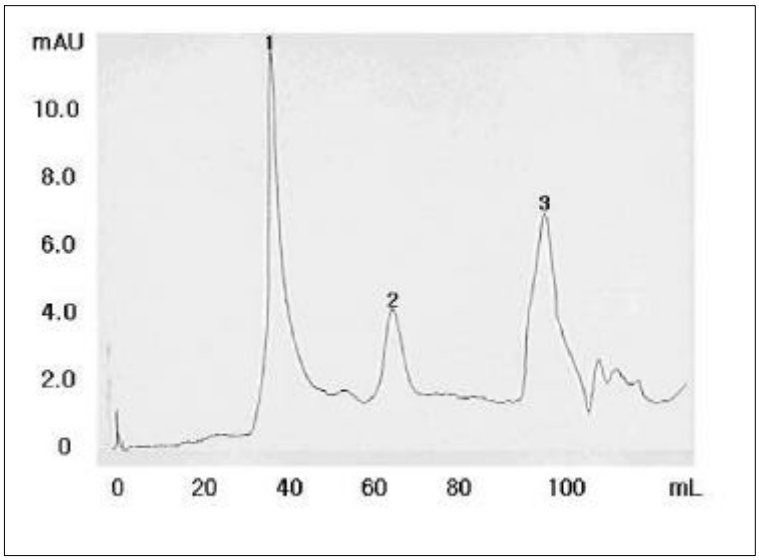

Fig. 4-17A. Gel permeation chromatogram of *Salmonella gallinarum* MBP-AgfA protein

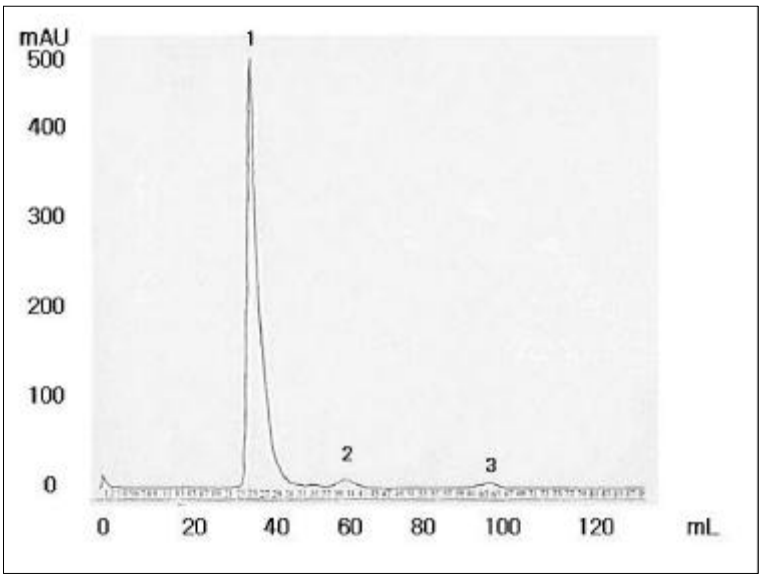

Fig. 4-17B. Gel permeation chromatogram of *Salmonella pullorum* MBP-AgfA protein

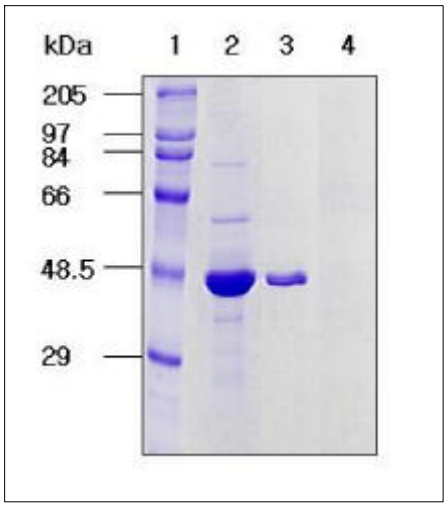

Fig. 4-18A. SDS-PAGE of separated peak in GPC (*Salmonella gallinarum*)
Lane 1, Protein molecular weight marker;2, first peak; 3, second peak; 4, third peak

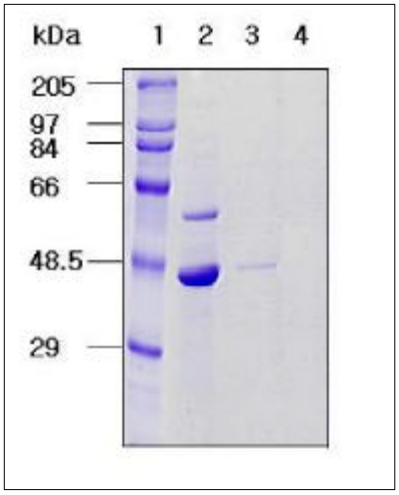

Fig. 4-18B. SDS-PAGE analysis of separated peak in GPC (*Salmonella pullorum*)
Lane 1, Protein molecular weight marker;2, first peak; 3, second peak; 4, third peak

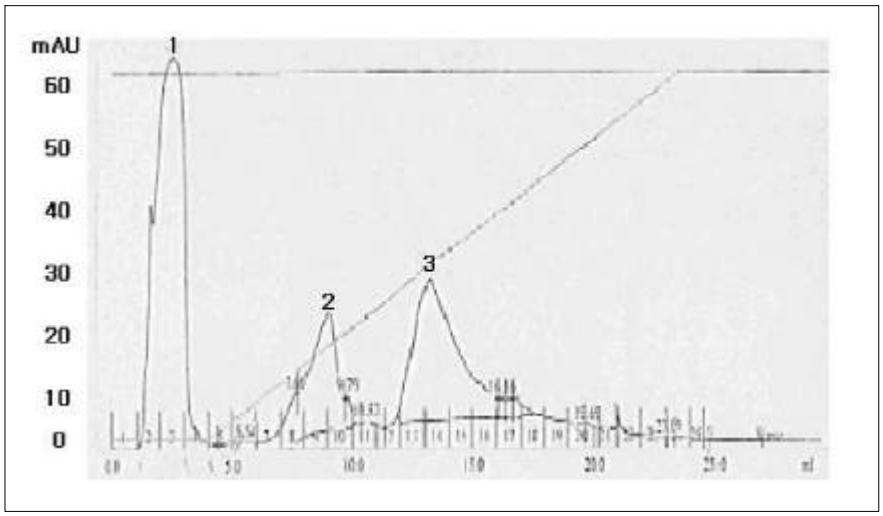

Fig. 4-19. Ion Exchange chromatogram of *Salmonella gallinarum* MBP-fusion AgfA

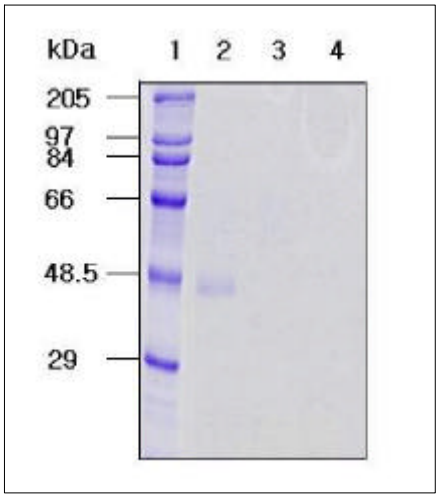

Fig. 4-20. SDS-PAGE analysis of separated peak in IEC (*Salmonella gallinarum*)

Lane 1, Protein molecular weight marker;2, first peak; 3, second peak; 4, third peak

6) 재조합 단백 항원의 분획·정제 및 대량생산 체제 확립

Amylose resin을 이용하여 *S. enteritidis* MBP-fusion AgfA protein을 대량 생산하여 제 2 세부과제와 협동하여 antibody 제조에 들어갔다.

대량 제조한 *S. enteritidis* MBP-fusion AgfA protein 중에서 가장 purity가 높은 것을 골라서 제 2 세부과제 팀에게 가져다 주었다. 1차로 OD260=3.0이 되는 Eluted *S. enteritidis* MBP-fusion AgfA protein 800㎕를 PBS로 희석한 후, incomplete adjuvant 2㎖과 섞어서 토끼 두 마리에 각각 injection하였고, 3주 후에 OD260=0.607이 되는 Eluted *S. enteritidis* MBP-fusion AgfA protein 1.5㎖을 소량의 PBS로 희석하고 incomplete adjuvant와 섞은 후 1차 booster injection을 하였고, 4주 째에 2nd injection을 하였다.(OD260=0.78, 1.6㎖) 5주 째에 토끼의 심장에서 채혈을 한 후 serum만을 분리하여 제 4 세부과제로 가져와 antibody의 생성여부를 확인하였다.

SDS-PAGE에 의해 분리된 protein을 Semi-Dry transfer units(Pharmacia Biotech. Co.)로 PVDF(polyvinylidene difluoride, Bio-Rad Co.) membrane에 두 시간 동안 transfer하였다. transfer후 blocking buffer(5% skim milk, 0.25M Tris-Cl, pH 8.0)로 한 시간 동안 blocking한 후 1차 antibody를 1:1000으로 희석하여 O/N shaking하였다.(Room Temperature) Washing solution(20mM Tris-Hcl pH 7.5, 500mM NaCl, 0.05% tween-20)으로 15분씩 3회 washing을 한 후 biotinylated anti-rabbit IgG made in goat, secondary antibody를 1:1000으로 희석하여 2.5시간 동안 binding하였다. 다시 10분씩 3회 washing을 한 후 ABsolution(Avidin and biotinylated horseradish peroxidase, Vector Co.)으로 45분 동안 반응시킨 후 10분씩 3회 washing하였다. DAB(diaminobenzidine, Vector Co.)solution으로 수초간 발색시킨 후 물에 넣어 반응을 정지시켰다. 그 결과는 Fig 4-21과 같으며 마우스와 치킨 실험을 위하여 Eluted *S. enteritidis* MBP-fusion AgfA protein을 대량 제조하여 제 2 세부과제 팀에게 넘겨 주었다(Fig. 4-22).

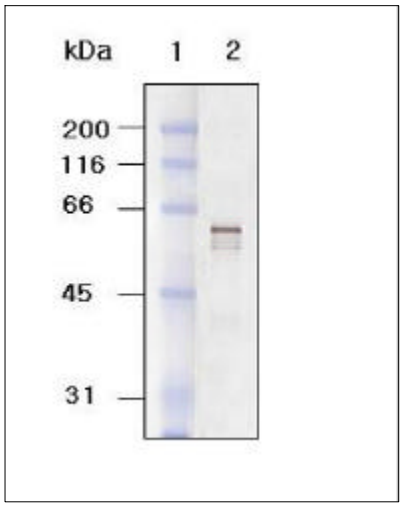

Fig. 4-21. Western blot analysis

Lane 1, Prestained marker; 2, Eluted *Salmonella enteritidis* MBP-fusion AgfA protein

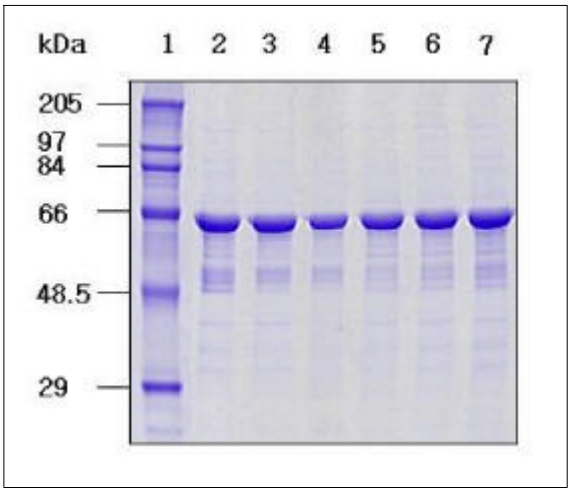

Fig. 4-22. Eluted *Salmonella enteritidis* MBP-fusion AgfA protein

Lane 1, Protein molecular weight marker; 2 7, Eluted *Salmonella enteritidis* MBP-fusion AgfA protein

7) 야외분리주, 변이주 및 재조합 단백항원의 생화학적 성상 비교

제 3 세부 관제 팀에서 넘어 온 *S. typhimurium*의 mutant로 OMP의 생화학적 성상 시험을 하였다. 우선 야외분리주와 변이주를 똑같은 조건에서 배양하여 그 둘 사이의 차이점을 비교하였다. LB 배지에 야외분리주(wild type)와 변이주(mutant, kanamycin포함)의 O/N culture를 만들고, inoculation한 후 stationary phase에서 각각을 harvest하였다. PBS로 harvest한 cell을 2번 washing한 후에 다시 PBS에 suspension하여 final concentration 1mM이 되게 PMSF를 넣고, sonication을 한 후 원심분리(6,000rpm, 20min, 4℃)하여 debris는 버리고, supernatant만을 취하여 초원심분리를 하였다.(30,000rpm, 1hr, 4℃) 초원심분리를 하여 생긴 pellet을 10mM HEPES in 2% Sarkosyl에 suspension하였고, 4℃ O/N inverting하였다. 다시 초원심분리(30,000rpm, 1hr, 4℃)를 하여 생긴 하얀 gelly같은 pellet을 10mM Tris-Cl(pH 7.2) 1㎖에 suspension하였다. Fig 4-23A는 purification한 야외분리주와 변이주의 OMP profile을 비교한 것이며 Fig 4-23B는 야외분리주의 OMP purification 과정을 나타내며 Fig 4-23C는 변이주의 OMP purification 과정을 나타낸 것이다. 야외분리주와 변이주의 OMP를 분리하여 비교한 결과, 40kDa, 39kDa, 36kDa의 크기를 가지며, 차이는 없는 것으로 보여진다.

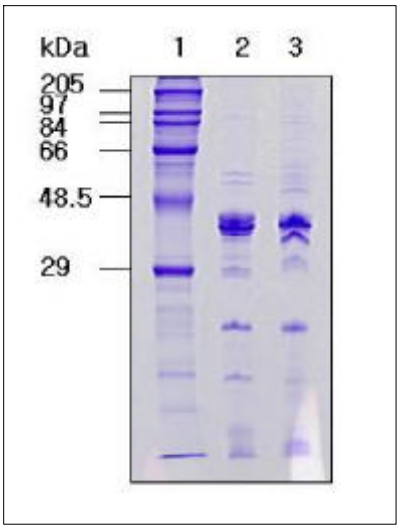

Fig. 4-23A. Comparison of wild type and mutant of *Salmonella typhimurium*

Lane 1, Protein molecular weight marker; 2, Wild type; 3, Mutant

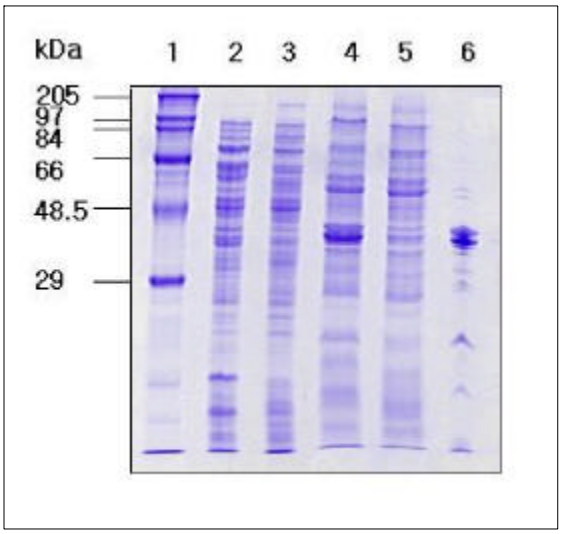

Fig. 4-23B. Purification of *Salmonella typhimurium* (wild type)

Lane 1, Protein molecular weight marker; 2, whole cell; 3, supernatant after 1st ultracfg.; 4, detergent soluble; 5, supernatant after 2nd ultracfg.; 6. OMP

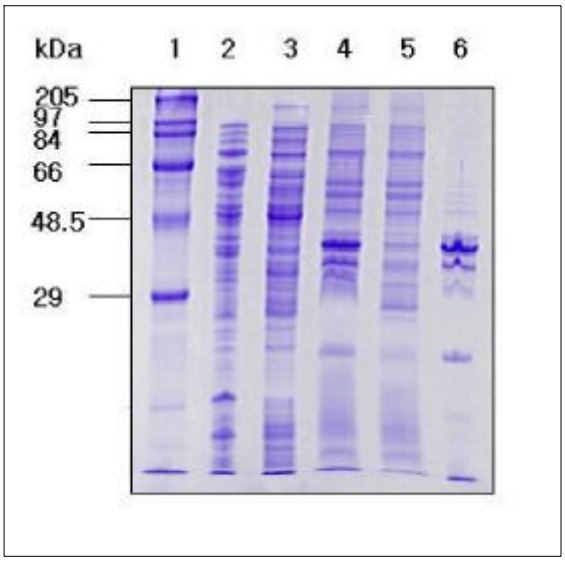

Fig. 4-23C. Purification of *Salmonella typhimurium*(mutant)

Lane 1, Protein molecular weight marker; 2, whole cell; 3, supernatant after 1st ultracfg.; 4, detergent soluble; 5, supernatant after 2nd ultracfg.; 6. OMP

8) 변이주의 계대배양에 따른 항원단백의 안정성

*Salmonella typhimurium*의 mutant와 wild type을 똑같은 조건에서 10회 계대 배양을 한 후 3)과 동일한 방법으로 항원단백을 정제하여 wild type과 mutant의 차이점을 살펴보았고(Fig 4-24.), 계대 배양을 하지 않은 wild type과 계대 배양을 한 wild type을 비교해 보았으며(Fig 4-25), 계대 배양을 하지 않은 mutant와 계대 배양을 한 mutant를 각각 비교해 보았다(Fig 4-26).

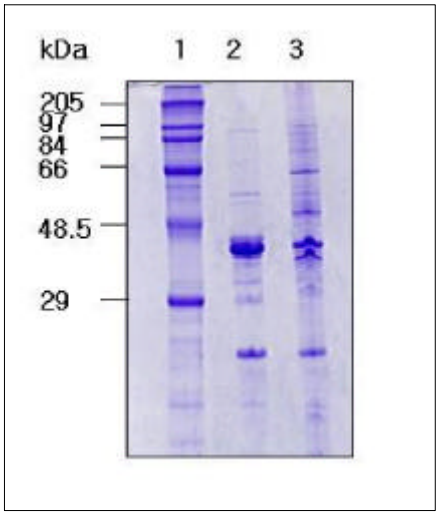

Fig. 4-24. *Salmonella typhimurium* wild type and mutant
Lane 1, Protein molecular weight marker; 2, wild type; 3, mutant

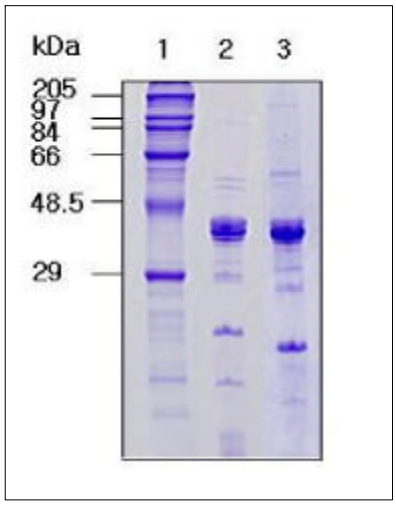

Fig. 4-25. *Salmonella typhimurium* wild type

Lane 1, Protein molecular weight marker; 2, non-; 3,

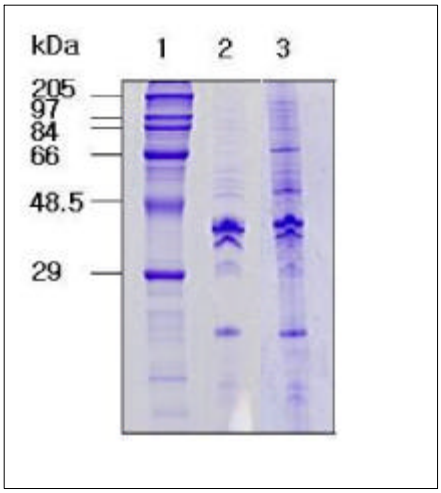

Fig. 4-26. *Salmonella typhimurium* mutant

Lane 1, Protein molecular weight marker; 2, wild type; 3, mutant

5. 협동연구과제 : 분자생물학적 기술로 개발된 백신의 안전성 및 효능시험('99- '00)

1) *S. enteritidis* AgfA subunit protein**의 토끼와** SPF **병아리에 대한 안전성, 면역원성, 방어효능시험은 제** 2 **세부과제에서 공동으로 수행하였고, 그리고 다** *S. enteritidis* **및** *S. typhimurium* mutants**의 마우스 및** SPF **병아리에 대한 안전성, 병원성, 면역원성 및 방어효능시험은 제** 3 **세부과제에서 공동으로 수행하였다.**

2) 변이주 대량배양 시스템 구축 기초시험 및 동물접종시험:

작제된 *S. typhimurium* mutants(KM resistant)**를** Fermenter(**한국발효기주식회사**, model 300L)**를 이용하여 대량 배양할 때 최적의 발육조건을 규명하기 위하여 공기(산소)공급량, 배양온도,** pH, enrichments, antifoam**의 종류에 따른 증식 균수를 확인하였다.**

Fermenter**에서 온도** 37℃, **공기공급량** 50 ℓ/min**하에서 배지의** pH**를** 6.5, 7.0, 7.5**로 조정하며,** 20**시간 배양하였을 때 균수를 측정한 결과** Table 5-1**에서 나타낸 바와 같이** pH 7.0 **및** 7.5**에서 증식성이 높았다.**

Table 5-1. pH**별** *S. typhimurium* mutants**의 증식성 시험**

pH	6.5	7.0	7.5
균 수(cfu/ml)	1.4×10^{10}	3.2×10^{10}	2.5×10^{10}

Fermenter에서 온도 37℃, pH7.0에서 공기공급량(air flow)을 0, 10, 50 및 100ℓ/min로 조절하며 20시간 배양했을 때 균수를 측정한 결과 Table 5-2에서 기술한 바와 같이 50ℓ/min에서 높게 나타났다.

Table 5-2. 공기공급량에 따른 변이주의 증식성 시험

공기공급량 (ℓ/min)	0	10	50	100
균 수(cfu/ml)	0.8×10^{10}	1.9×10^{10}	5.4×10^{10}	3.6×10^{10}

Fermenter에서 동일한 pH7.0, 공기공급량 50 ℓ/min하에서 20시간 배양하였을 때 배양온도에 따른 균수를 측정한 결과(Table 5-3), 37℃에서 가장 높았다.

Table 5-3. 온도에 따른 변이주의 증식성 시험

온 도	32℃	37℃	40℃
균 수(cfu/ml)	0.3×10^{10}	8.7×10^{10}	1.8×10^{10}

온도 37℃, pH7.0, 공기공급량 50 ℓ/min하에서 20시간 배양하였을 때, Enrichments의 첨가에 따른 균수를 측정한 결과(Table 5-4), Dextrose+Iron이 가장 높은 증식성을 보였다.

Table 5-4. Enrichments의 종류에 따른 변이주의 증식성 시험

Enrichments	무첨가	Dextrose*	Iron**	Dextrose+Iron
균 수(cfu/ml)	0.8×10^{10}	2.9×10^{10}	2.1×10^{10}	4.9×10^{10}

* Dextrose : 50% dextrose를 배지 ℓ당 17㎖ 첨가

** Iron : $FeSO_4 7H_2O$을 배지 ℓ당 13㎎ 첨가

온도 37℃, pH7.0, 공기공급량 50 ℓ/min 하에서 Antifoam의 종류에 따라 20시간 배양하였을 때 균수를 측정한 바(Table 5-5), AF 289에서 가장 높은 증식성이 인정되었다.

Table 5-5. Antifoam의 종류에 따른 변이주의 증식성 시험

Antifoam	AF 204 (Sigma A6207)	AF 289 (Sigma A6332)	AF O-60 (Sigma A7957)
균 수(cfu/ml)	4.9×10^{10}	6.9×10^{10}	3.8×10^{10}

최적 배양조건에서 대량 배양한 *S. typhimurium* mutants를 9,000rpm에서 20분간 원심분리하여 침전 균체를 멸균 PBS로 10^{10}/㎖되게 재부유하여 체중 15 20g 마우스 20마리는 접종군, 10마리는 무처치 대조군으로 하여 접종군에는 두당 0.5㎖씩 경구투여하고 접종후 2주간 관찰한 결과 모든 마우스가 건강하게 생존하였다. 그 다음 접종군과 대조군에게 wild type *S. typhimurium* 배양균액 200㎕(10MLD 2×10^{8}/0.2㎖)를 복강에 주사하고 접종후 10일간 관찰하였다. 그 결과 (Table 5-6) 접종군은 90% 그리고 대조군은 30% 생존하였다.

Table 5-6. *S. typhimurium mutants*의 마우스에 대한 안전성 및 방어효능 시험

일자*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	생존율
접종군	20/20**	19/20	18/20	18/20	18/20	18/20	18/20	18/20	18/20	18/20	90%
대조군	10/10	9/10	6/10	3/10	3/10	3/10	3/10	3/10	3/10	3/10	30%

* 공격접종후 경과 일자

** 생존수/시험수

최적 배양조건에서 대량 배양한 mutants를 10㏀/㎖로 맞추어 300 350g정도 되는 기니픽을 접종군(5 수)과 대조군(5 수)으로 나누고, 접종군에는 두당 0.5㎖씩 경구투여하고 접종후 3주까지 관찰한 결과 모두 건강하게 생존하였다. 3주후에 채혈하여 시험관 응집항체가와 ELISA항체가를 검사한 결과(Table 5-7),

Table 5-7. *S. typhimurium mutants*의 기니픽에 대한 안전성 및 면역반응시험

구 분		접 종 군	대 조 군	비 고
접종전	응집항체가	0	0	
	ELISA항체가	0	0	
접종후	응집항체가	20-80	0	
	ELISA항체가	0	0	
폐 사 수		0 / 5*	0 / 5	

* 폐사수 / 시험수

S. enteritidis agjA 항원 단백질을 adjuvant(ISA 70)와 1:1혼합하여 체중 15 20g 마우스에 20마리는 접종군, 10마리는 무처치 대조군으로 하여 접종군에 두당 400㎕씩 복강 접종하고, 접종 2주후까지 관찰한 결과 모두 건강하였다. 그 후 접종군과 대조군에게 wild type *S. enteritidis* 배양균액 200㎕(10MLD 2 ×10⁶/0.2㎖)를 복강에 주사하여 접종후 10일간 생존여부 관찰한 결과(Table 5-8), 접종군은 90%, 대조군은 40%의 생존율을 나타내었다.

Table 5-8. *S. enteritidis agjA* 항원단백의 마우스에 대한 안전성 및 방어효능 시험

일자*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	생존율
접종군	19/20**	18/20	18/20	18/20	18/20	18/20	18/20	18/20	18/20	18/20	90%
대조군	10/10	10/10	9/10	6/10	5/10	5/10	4/10	4/10	4/10	4/10	40%

* 공격접종후 경과 일자

** 생존수/시험수

S. enteritidis AgfA 항원 단백질을 adjuvant(ISA 70)와 1:1혼합하여 300 350g정도 되는 기니픽을 접종군 5수, 대조군 5수로 배치하여 접종군에 두당 400㎕씩 근육 접종하고, 3주 동안 관찰한 결과 모두 건강하였으며, 접종후 3주 동안 폐사수와 시험관 응집항체가 및 ELISA항체가를 검사한 결과 Table 5-9와 같다.

Table 5-9. *S. enteritidis agfA* 항원단백의 기니픽에 대한 안전성 및 면역반응 시험

구 분		접종군	대조군	비 고
접종전	응집항체가	0	0	
	ELISA항체가	0	0	
접종후	응집항체가	0	0	
	ELISA항체가	400-1600	0	
폐사수		0 / 5*	0 / 5	

* 폐사수 / 시험수

연구결과 발표실적

논문

1. 전무형, 김태중, 장경수, 강경임, 김귀현, 김기석, 유상식, 김현수, 신광순, 김철중 : *SejA* 유전자 PCR에 의한 *Salmonella* serogroup D1의 특이적 검출. 대한수의학회지, 39(3), 523-530 (1999)

2. Won, M., Kim, S., Lee, S., Kim, C., Kim, H., Jun, M., and Song, K. B.: Overproduction of *agjA* subunit of *Salmonella enteritidis* as a MBP-fusion protein in *E. coli*. *Biotechnol. Letters*. **22**(14), 1165-1168. (2000)

3. Misun Won, Soyoun Kim, Seunghwan Lee, Chuljoong Kim, Hyunsoo Kim, Moohyung Jun and Kyung Bin Song : Prediction of Secondary structure of *AgjA* subunit of *Salmonella enteritidis* overexpressed as a MBP-fused protein. (2000) (submitted)

특허_출원

1. 송경빈, 원미선, 김소연, 이승환, 김철중, 전무형, 김현수: 살모넬라 엔테러타이더스의 에이지에프에이 서브유니트의 말토스결합단백질과 융합된 단백질로의 대장균에서의 발현, 출원일: 2000. 5.10 출원번호: 10-2000-0024818

학술회의_발표

1. 전무형, 김태중, 장경수, 강경임, 김귀현, 김기석, 김현수, 신광순, 김철중: *SejA* 유전자 PCR에 의한 Salmonella serogroup D1의 특이적 진단. 한국수의공중보건학회, 1998, 11, 21.(1998)

2. Suk Kim, Moo-hyung Jun, Kyung-soo Chang, Kwang-soon Shin, Hyun-soo Kim, Chul-joong Kim: Nucleotide sequences of *SejA* gene and dot-blot hybridization using *SejA* probe for detection of poultry-associated *Salmonella* serogroup D1. 대한수의학회추계학술대회, 1999, 10, 15- 10, 16 (1999)

3. Yoon-i Oh Chul-joong Kim, Moo-hyung Jun, Hyun-soo Kim, Kyung-bin Song: Cloning and expression of *Salmonella* fimbriae gene(*agfA* and *agfB*) in *Escherichia coli*. **대한수의학회 추계학술대회**, 1999, 10, 15- 10, 16(1999)

4. Kim, S., Kim, C., Kim, H., Jun, M. and Song, K. B.: Purification of outer membrane proteins of *Salmonella enteritidis* and expression of *agfA* subunit as a MBP-fused protein in *E. coli*. **한국식품과학회 추계 학술발표회** (1999)

5. Yoon-i Oh, Chul-joong Kim, Moo-hyung Jun, Hyun-soo Kim and Kyung-bin Song : Expression and immunization of recombinant thin, aggregative fimbriae by *E. coli*. **대한수의학회 추계학술대회**, 2000, 10, 13 (2000)

6. Sun-hee Ban, Hae-sung Jung, In-soo Lee, Moo-hyung Jun, Chul-joong, Kim, Kyung-bin Song, Sung-hwan Cho, Hyun-soo Kim: Virulence of *rpoS* mutant of *Salmonella typhimurium* in *BALB/c* mice. **대한수의학회 추계학술대회**, 2000, 10, 13.(2000)

7. Tae-yong Kim, Ji-young Kim, Kyung-soo Chang, Suk Kim, Yoon-i Oh, Chul-joong Kim, Hyun-soo Kim, Kwang-soon, Shin, Kyung-bin Song, Moo-hyung Jun: A radial immunodiffusion enzyme assay using *Salmonella* fimbriae subunit *agfA* for detection of Salmonella infection in chicken. **대한수의학회 추계학술대회**, 2000, 10, 13.(2000)

8. Kim, S., Lee, S., Won, M., Kim, C., Kim, H., Jun, M. and Song, K. B.: Application of *agfA* subunit of *Salmonella enteritidis* thin aggregative fimbriae in vaccine development. **한국산업미생물학회 춘계학술발표회** (2000)

9. Soyoun Kim, Seunghwan Lee, Misun Won, Chuljoong Kim, Hyunsoo Kim, Moohyung Jun, and Kyung Bin Song**:** Secondary structure of *agfA* subunit of *Salmonella enteritidis*, **한국산업미생물학회 추계학술발표회** (2000)

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.