

*Staphylococcus aureus*의 재조합 fibronectin-binding protein의 생산

김 두 · 정자룡 · 박희명* · 한홍을*

강원대학교 축산대학 수의학과
서울대학교 수의과대학*
(1997년 8월 7일 접수)

Production of the recombinant fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*

Doo-kim, Cha-ryong Cheong, Hee-myong Park* , Hong-ryul Han*

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University
College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Received Aug 7, 1997)

Abstract : To produce the recombinant fibronectin-binding protein(FnBP) for development of subunit vaccine against *Staphylococcus aureus* . The *fnbp* gene was amplified from the chromosomal DNA of *S aureus* KNU 196 strain using the polymerase chain reaction, and cloned into pGEX-4T-2. Then, the recombinant FnBP fused with glutathione-S-transferase was produced in *E coli* , purified by affinity chromatography, and identified its antigenicity and immunogenicity by Western blot.

The recombinant FnBP produced in this study is considered to have the same property of native FnBP purified from *S aureus* , and is expected to be useful as a candidate for *S aureus* subunit vaccine.

Key words : *Staphylococcus aureus* , fibronectin binding protein, recombinant.

서 론

접촉성 유방염 원인균인 *Staphylococcus aureus* 는 젖소의 체표면에 상재하며 유두를 통한 유방내 침입과정이 성립되면 유즙내에 출현한 PMN cell에 의해서 탐식되더라도 PMN cell의 살균력 저하로 세포내에 계속 생존할

뿐만 아니라 오히려 치료약제로부터 보호를 받게 된다¹³. 또한 이 균은 유선조직내에서 다양한 크기의 미소 농양을 형성함으로써 약물의 침투가 어려워 준임상형과 임상형의 감염형태를 반복하는 고질적인 질병의 양상을 띠게 된다. 또한 유즙에서 분리된 *S aureus* 는 다른 원인균보다 각종 항생물질에 대한 내성 출현율이 높아 항생제 치료로 효과적으로 제거되지 않는다⁴⁻⁷.

Address reprint requests to Dr. Doo Kim, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Republic of Korea.

S aureus 는 병원성 물질인 다양한 세포내외 세포외 단백질을 생산하는데 이들 단백질은 여러 신체조직에서 집락을 형성하고 증식하기 위하여 필수적이다⁷. 그리고 숙주세포와 세포외 기질에 집락을 형성하는데 관여하는 다양한 세균의 표면단백질들, 조직에 손상을 초래하는 효소들과 독소들의 상호작용에 의하여 이 세균에 의한 질병이 성립된다. 이들중 단일 병원성 물질만으로는 숙주의 저항성을 극복하기 어렵기 때문에 숙주내에서 증식하여 질병을 유발하기 위해서는 *S aureus* 의 병원성에 관여하는 다양한 부착기전, 균체의 독소, 표면단백질과 효소 등의 상호복합적인 협동작용이 필요하다⁸.

S aureus 의 표면단백질로는 IgG의 Fc 부위와 결합하여 숙주의 흡소나작용과 탐식작용을 방해하는 protein A⁹⁻¹¹, 숙주의 혈액과 세포외 기질에 존재하는 fibronectin과 결합하여 집락형성을 촉진하는 fibronectin binding protein(FnBP)과 그 외에 collagen-binding protein, fibrinogen-binding protein, laminin-binding protein과 vitronectin-binding protein 등이 있다^{12,13}.

1970년대 후반에 fibronectin이 진핵세포 뿐만 아니라 *S aureus* 균체에도 결합한다는 것이 밝혀진 이후에 많은 병원성 미생물들이 고도의 특이성과 높은 친화력으로 fibronectin과 결합한다는 것이 밝혀졌다^{14,15}. 미생물과 세포외 기질의 fibronectin과의 결합은 일부의 미생물들이 숙주조직에 집락을 형성하고 감염을 형성하는데 결정적인 역할을 한다. 그 이후 *S aureus* Newman strain으로부터 분자량 197~210 kDa에 해당하는 FnBP가 분리되었으며 이 단백질은 fibronectin receptor로 확인되었다^{16,17}.

젖소의 유방염을 예방하기 위한 백신개발에 있어서 *S aureus* 의 pseudocapsule과 α -toxin을 함유하는 bacterin 형태였던 기존의 유방염 백신들은 유방염의 임상증상을 완화하고 우유의 체세포를 감소시키는 효과는 있었으나 신감염(新感染)을 예방하지 못하는 단점이 있다^{18,19}.

본 연구에서는 임상형 유방염의 임상증상의 완화와 아울러 신감염의 억제에 위하여 *S aureus* 의 pseudocapsule과 α -toxin에 재조합 FnBP가 첨가된 *S aureus* 의 sub-unit 백신개발을 목적으로 재조합 FnBP를 분자생물학적 방법으로 대량생산하고 순수분리하였으며 그 항원성과 면역원성을 확인하였다.

재료 및 방법

Staphylococcus aureus 의 chromosomal DNA 분리 : *S aureus* 의 *fnbp* gene을 증폭하는데 주형으로 이용할 chromosomal DNA는 국내의 임상형 유방염에서 분리한 KNU 196 strain을 사용하여 Kohoe의 방법²⁰을 개량하여 분리하였다. 즉, *S aureus* 를 tryptic soy broth에서 배양한 후, 원심분리하여 lysis buffer(Tris (pH 8.0, 50mM), EDTA (10mM), glucose (50mM))로 세척하였고 lysostaphin(100 μ g/ml)과 proteinase K(100 μ g/ml)로 차례로 소화시킨 후, phenol과 chloroform으로 chromosomal DNA를 추출하였으며 sodium acetate(0.5M)와 ethanol을 사용하여 침전시킨 후 RNase로 처리하고 다시 phenol과 chloroform으로 chromosomal DNA를 추출한 후 ethanol로 침전시켰다. 마지막으로 TE buffer(10mM Tris HCl/1mM EDTA, pH 8)에 용해시켜 4 $^{\circ}$ C에 보관하여 실험에 사용하였다.

Polymerase chain reaction에 의한 fibronectin-binding protein gene의 증폭 :

1) Oligonucleotide primers : Cloning에 필요한 *fnbp* gene의 D1에서 D3 까지의 domain을 PCR 기법을 이용하여 Fig 1과 같이 증폭하기 위하여 Signas *et al*²¹이 보고한 *S aureus fnbp* gene의 nucleotide sequence를 참조하여 ① 5'-CCGGATCCGAAGGTGGCCAAAAT-3'과 ② 5'-CCGAATTCATTTGGCCGCTTACTT-3'의 1쌍의 oligonucleotide primer를 DNA Synthesizer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 제작하였다. 각 primer에는 BamH I 과 EcoR I 의 제한효소 절단부위를 각각 삽입하였다.

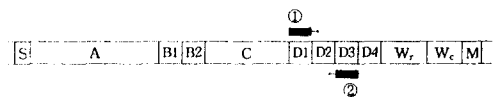


Fig 1. Schematic diagram of the different regions of the *fnbp* gene of *S aureus*. S, signal sequence; A and C, spacer regions; B and D, different repeat regions outside the cell wall domain; W_r, repetitive region of the cell wall-spanning domain; W_c, nonrepetitive region of the game domain; M, membrane-spanning domain, ① and ②, primers.

2) 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction) : KNU 196 strain에서 분리한 chromosomal DNA를 주형으로 하여 *fnbp* gene을 증폭하기 위하여 4가지의 200 μ M의 deoxynucleotide triphosphate(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1쌍의 primer(100pM), 2.5 unit의 Taq DNA polymerase(New

England Biolabs(NEB), USA), 10×PCR buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.5, 25mM MgCl₂, 5% DMSO, 0.2mg/ml gelatin), template DNA와 멸균된 증류수를 혼합하여 100μl 가 되도록 조정하였다.

PCR 반응액을 DNA Thermal Cycler 480(Perkin Elmer-Cetus, USA)를 이용하여 94℃에서 5분간 가열한 후, 94℃에서 1분간(denaturation), 52℃에서 2분간(annealing), 72℃에서 1분간(extention)의 과정을 30회 반복하여 증폭시킨 후, 증폭된 DNA를 72℃에서 15분간 연장시켰다. 증폭된 *fnbp* gene은 0.7% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator(Vibberlourmat, France)에서 확인하였다.

Staphylococcus aureus *fnbp* gene의 cloning : PCR 기법에 의하여 증폭된 *fnbp* gene을 vector plasmid인 pGEX-4T-2(Pharmacia Biotech, Sweden)에 cloning 하기 위하여 *BamH I* 과 *EcoR I* 을 사용하여 증폭된 *fnbp* gene과 pGEX-4T-2를 잘라 agarose gel에 전기영동시킨 후 해당되는 DNA band를 Prep-A-Gen DNA Purification System (Bio Rad, USA)으로 추출하였다. 추출된 *fnbp* gene과 pGEX-4T-2를 ligase(NEB, USA)로 15℃에서 하룻밤 동안 ligation 시킨 후, *DH5a E coli* 에 재조합 DNA(*fnbp*/pGEX-4T-2)를 형질전환시켰다.

삽입된 *fnbp* gene의 DNA sequencing : *fnbp* gene이 vector DNA에 올바르게 cloning 된 것을 확인하기 위하여 Sanger 등²²의 dideoxynucleotide chain reaction method에 의거하여 Sequenase kit(United States Biochemicals)와 pGEX sequencing primer(5'-GGGCTGGCAAGCCACGTT-TGGTG-3', 5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3')를 사용하여 sequencing을 실시하였다.

재조합 FnBP의 발현 : 형질전환된 *DH5a E coli* 가 재조합 FnBP를 발현하는지를 확인하기 위하여 재조합 *fnbp* gene을 함유하는 양성 clone을 LB broth에서 OD₆₀₀ 값이 1이 되도록 배양한 후 isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG)로 재조합 FnBP의 발현을 유도하였으며 추가배양을 실시하였다. 발현된 재조합 FnBP는 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시한 후 Coomassie brilliant blue staining 용액으로 염색하여 확인하였다.

재조합 FnBP의 순수분리 : 재조합 FnBP를 순수분리하기 위하여 IPTG를 첨가하여 발현을 유도시킨 *DH5a E coli* 의 배양액을 원심분리하여 집균하였고 세균침전

물을 PBS에 부유시켜 French press를 사용하여 16,000psi로 용균시켰으며, Bulk GST Purification Module(Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용한 affinity chromatography를 실시하여 glutathione-S-transferase와 fusion 된 FnBP를 순수분리하였다.

재조합 FnBP의 Western blot : 순수분리된 재조합 FnBP의 항원성과 면역원성을 확인하기 위하여 Western blot을 실시하였다. 재조합 FnBP의 항원성을 확인하기 위하여 GST-FnBP를 thrombin으로 소화시켜 gel chromatography를 실시하여 순수분리된 재조합 FnBP를 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였으며 전개된 재조합 FnBP는 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 재조합 FnBP가 부착된 nitrocellulose membrane은 gelatin으로 blocking한 후, 토끼에서 제조한 천연 FnBP의 polyclonal antiserum과 반응시키고, horseradish peroxidase anti-rabbit IgG와 반응시킨 후 4-chloro-1-naphtol 용액을 첨가하여 발색시켜 관찰하였다. 분자량은 prestained molecular size marker(Bio Rad, USA)를 지표로 하여 결정하였다.

재조합 GST-FnBP의 면역원성을 확인하기 위하여 천연 FnBP를 항원으로 사용하였고 재조합 GST-FnBP를 토끼에 면역시킨 혈청을 1차항체로 사용하여 항원성 검사와 동일한 방법으로 Western blot을 실시하였다.

결 과

중합효소 연쇄반응에 의한 fibronectin-binding protein gene의 증폭 : 재조합 fibronectin-binding protein의 생산을 목적으로 cloning에 필요한 *Staphylococcus aureus* 의 *fnbp* gene을 증폭하기 위하여 KNU 196 strain에서 분리한 chromosomal DNA를 주형으로 하여 *fnbp* gene의 D1에서 D3까지의 domain을 PCR 기법으로 증폭시킨 결과 375bp의 band가 증폭되었다.

Staphylococcus aureus *fnbp* gene의 cloning 및 재조합 단백질의 발현 : PCR 기법에 의하여 증폭된 *fnbp* gene을 pGEX-4T-2에 ligation시켜 *DH5a E coli* 에 형질전환시킨 후 재조합 FnBP를 발현시킨 결과, 재조합 FnBP는 glutathione-S-transferase(GST; Mw=26kDa)와 융합된 GST-FnBP 형태의 49kDa의 단백질이 생산되었다. 발현량은 발현개시후 배양시간에 비례하여 5시간까지 발현량이 증가하였다(Fig 2).

재조합 FnBP의 순수분리 : 재조합 GST-FnBP를 순수

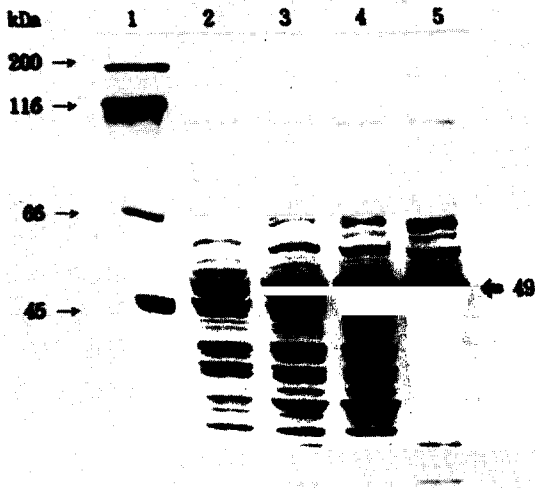


Fig 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the recombinant GST-FnBP. Lane 1; molecular weight standards, Lane 2; before the induction of GST-FnBP, Lane 3; 1 hour after the induction of GST-FnBP, Lane 4; 3 hours after the induction of GST-FnBP, Lane 5; 5 hours after the induction of GST-FnBP.

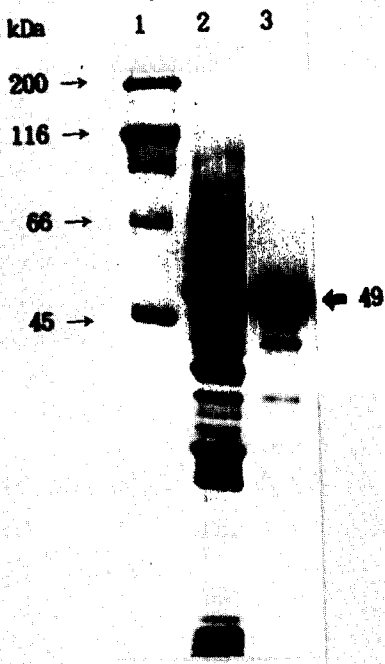


Fig 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the recombinant GST-FnBP purified by the GST affinity chromatography system. Lane 1; molecular weight standards, Lane 2; GST-FnBP expressed before purification, Lane 3; purified GST-FnBP.

분리하기 위하여 Bulk GST Purification Module을 이용한 affinity chromatography를 실시한 결과, Fig 3에서와 같이 49 kDa에 해당하는 재조합 GST-FnBP가 순수분리되었다.

재조합 FnBP의 Western blot : 순수분리된 재조합 FnBP가 항원성을 갖는지를 확인하기 위하여 재조합 FnBP를 항원으로 사용하고 polyclonal anti-FnBP rabbit serum을 1차항체로 이용한 Western blot을 시행한 결과, Fig 4에서와 같이 23kDa에 해당하는 부위에서 면역반응이 나타났다.

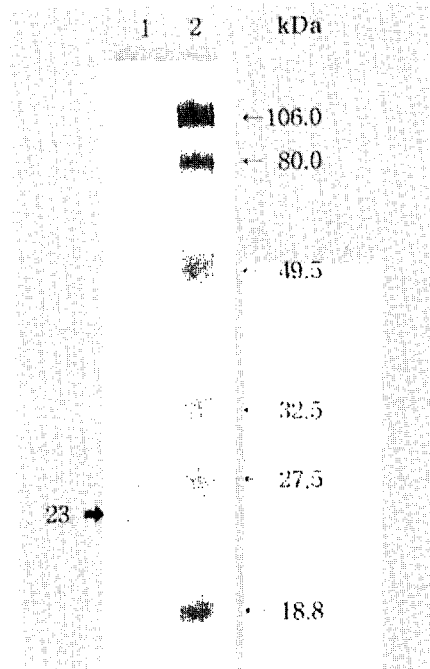


Fig 4. Western blot analysis of the recombinant FnBP. Lane 1; Western blot of the recombinant FnBP used as antigen, and rabbit anti-native FnBP serum used as the primary antibody, Lane 2; molecular weight standards.

재조합 FnBP의 면역원성을 확인하기 위하여 천연 FnBP를 항원으로 사용하고 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 토끼의 혈청을 1차항체로 사용하여 Western blot을 시행한 결과는 Fig 5와 같이 천연 FnBP의 165kDa과 200kDa에 해당하는 band에서 강한 면역반응을 나타내었다.

삽입된 *fnbp* gene의 DNA sequencing : *fnbp* gene이 vector DNA에 올바르게 cloning 된 것을 확인하기 위하여 pGEX-4T-2에 삽입된 *fnbp* gene을 sequencing한 결과,

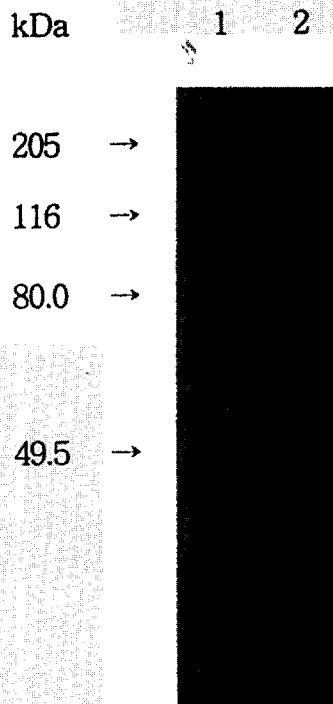


Fig 5. Western blot analysis of the anti-recombinant GST-FnBP serum. Lane 1; molecular weight standards, Lane 2; Western blot of the native FnBP used as antigen, and rabbit anti-recombinant GST-FnBP serum used as the primary antibody.

D1에서 D3까지의 domain에 해당하는 355bp의 gene이 vector plasmid에 올바른 상태로 삽입되었다(Fig 6).

고 찰

*S aureus*의 세포 표면단백질인 fibronectin binding protein은 숙주 체액내의 fibronectin과 결합하여 숙주세포에 부착하기 때문에 FnBP는 *S aureus*가 여러 신체조직에서 집락을 형성하고 성장하기 위한 중요한 병원성 인자이다^{14,23}.

Kuusela¹⁴가 *S aureus*와 fibronectin이 결합하여 숙주세포에 부착한다고 보고한 이후, *S aureus* 표면의 fibronectin 결합물질에 밝히려는 연구와 FnBP의 결합기전을 밝히려는 많은 연구들이 수행되었다. 초기에는 *S aureus* 균체로부터 직접 FnBP를 분리하는 방법이 시도되었으나 이렇게 분리된 FnBP는 불안정하며, 분리되는 양이 적은 문제점이 있었다. 이후 fibronectin과 fibronectin-

binding receptor가 결합하는 성질을 이용하여 FnBP를 분리하는 방법이 이용되었는데 초음파로 *S aureus*를 용균시킨 후 fibronectin과 반응시켜 fibronectin-receptor를 순수 분리한 결과 그 분자량이 18kDa²⁴, 197kDa과 210kDa^{16,17} 등으로 다양하게 나타났다. 이러한 분자량의 차이는 분리방법의 차이에 따라 단백질해에 의한 단열이 다르기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 이전의 FnBP의 분리방법은 생산량, 비용 그리고 분리과정 등에서 비효율적이었으므로 이를 극복하기 위하여 유전자 재조합기법에 의하여 FnBP를 생산한 많은 연구들이 이루어졌다. Flock *et al*²⁵은 *S aureus* strain 8325-4, Newman, Cowan I 으로부터 분리된 *fnbp* gene을 vector pBR322에 cloning 하여 87kDa과 165kDa의 FnBP를 생산하였다. 이 FnBP의 아미노산 서열은 Fröman *et al*¹⁷이 *S aureus*에서 분리한 native FnBP의 아미노산 서열과 매우 유사하였다. 이 연구에서 생산된 87kDa protein은 전사 또는 번역과정중의 조기종료(pretermination)나 165kDa protein의 단백질해에 의한 단열에 의하여 생성된 것으로 추정되었으며 fibronectin-binding activity는 FnBP의 일부 부위에서만 나타나는 것으로 밝혀졌다.

Huff *et al*²⁶은 fluorescence anisotropy를 이용하여, Signäs *et al*²¹이 분리한 FnBP에서 3가지 연속적인 D motif와 fibronectin 29kDa N-terminal fragment(Fn29K)의 결합을 조사한 결과, 그 결합력이 D3 > D2 > D1이라는 사실과 Fn 29K에는 5가지 형태의 "finger" module이 존재하는 것을 밝혔다. Huff *et al*²⁶은 vector pGEX-2T를 이용하여 *E coli*에서 약 23kDa의 재조합 FnBP를 발현시켰다.

본 연구는 유방염에서 문제시 되고 있는 *S aureus*에 대한 subunit vaccine의 개발에 필요한 재조합 FnBP를 대량생산하기 위하여 Huff *et al*²⁶의 연구방법에 의거하여 cloning vector로서 pGEX-4T-2를 사용하여 glutathione-S-transferase와 fusion된 23kDa의 재조합 FnBP를 생산하였다. 그리고 본 연구에서 생산된 재조합 FnBP가 *S aureus*에서 분리된 천연의 FnBP와 유사한 물질인지를 확인하기 위하여 cloning 된 *fnbp* gene의 서열을 분석한 결과, Signäs *et al*²¹이 보고한 nucleotide와 18개의 차이(95.0%의 상동성)가 있었으며 아미노산은 6개가 차이나는 것으로 추정되었다.

천연 FnBP와 생산된 재조합 FnBP의 항원성과 면역원성에 대한 연구가 여러 연구자들에 의하여 다양한 방법으로 수행되었다. Espersen과 Clemmensen¹⁶은 fibronectin-

45

GGC CAA AAT AGC GGT AAC CAG TCA TTC GAG GAA GAC ACA GAA GAA
Gly Gln Asn Ser Gly Asn Gln Ser Phe Glu Glu Asp Thr Glu Glu

90

GAT AAA CCT AAA TAT GAA CAA GGT GGC AAT ATC GTA GAT ATC GAT
Asp Lys Pro Lys Tyr Glu Gln Gly Gly Asn Ile Val Asp Ile Asp

135

TTC GAT ATT GTA CCT CAA ATT CAT GGT CAA AAT AAA GGT GAT CAG
Phe Asp Ser Val Pro Gln Ile His Gly Gln Asn Lys Gly Asp Gln

180

TCA TTC GAA GAA GAT ACA GAG AAA GAC AAA CCT AAG TAT GAA CAA
Ser Phe Glu Glu Asp Thr Glu Lys Asp Lys Pro Lys Tyr Glu Gln

225

GGT GGT AAT ATC ATT GAT ATC GAC TTA GAC AGT GTG CCA CAA ATT
Gly Gly Asn Ile Ile Asp Ile Asp Leu Asp Ser Val Pro Gln Ile

270

CAT GGA TTC AAT AAG CAT AAT GAA ATT ATT GAA GAA GAT ACA AAC
His Gly Phe Asn Lys His Asn Glu Ile Ile Glu Glu Asp Thr Asn

315

AAA GAT AAA CCA AAT TAT CAA TTC GGT GGA CAC AAC ATT GTT GAT
Lys Asp Lys Pro Asn Tyr Gln Phe Gly Gly His Asn Ile Val Asp

355

TTT GAA GAA GAT ACA CTT CCG AAA GTA AGC GGC CAA AAT G
Phe Glu Glu Asp Thr Leu Pro Lys Val Ser Gly Gln Asn

Fig 6. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the cloned fibronectin-binding protein gene into pGEX-4T-2.

sepharose affinity chromatography 및 fibronectin에 반응하는 monospecific antibody와 *S aureus* polyspecific antibody를 이용하여 crossed immunoelectrophoresis 기법으로 *S aureus* strain E2371로부터 생산된 fibronectin-binding protein (Mr=197kDa)이 항원성이 있음을 증명하였으며, Flock et

al²⁵은 I-labeled 29kDa의 fibronectin fragment를 autoradiography를 이용하여 179kDa의 FnBP의 항원성을 확인하였다. Jönsson et al²⁷은 I-labeled 24kDa의 fibronectin fragment를 이용하여 165~200kDa과 85~90kDa FnBP의 항원성을 확인하였고, Ciborowski et al²⁸도 Western blot au-

toradiography을 이용하여 생산된 재조합 FnBP의 면역원성을 확인하였다.

본 연구에서 생산된 재조합 FnBP의 항원성을 확인하기 위하여 재조합 FnBP와 천연 FnBP를 토끼에 면역시킨 혈청과 반응시켜 재조합 FnBP의 항원성을 입증하였다. 또한 재조합 FnBP에 대한 항체를 토끼에서 생산하여 천연 FnBP와 Western blots을 실시하였을 때 천연 FnBP와 강한 면역반응을 보여 본 연구에서 생산한 재조합 FnBP는 항원성과 아울러 면역원성을 갖는 것으로 입증되어 천연 FnBP와 같은 기능을 갖는 물질로 확인되었다.

Mamo *et al*²⁹은 유전자 재조합 기법으로 생산된 재조합 FnBP의 면역원성과 예방접종의 방어효과를 조사하기 위하여 FnBP를 토끼에 면역접종시켜 마지막 접종후 18~21일에 *S aureus*를 유방내 주입후 유선을 육안과 조직학적으로 분석한 결과, 재조합 FnBP vaccine이 *S aureus*에 의한 유방염을 효과적으로 예방하였다고 보고하였다.

본 연구에서 생산된 재조합 FnBP는 GST-FnBP인 용합 단백질로서 Ciborowski *et al*²⁸의 연구결과와 마찬가지로 GST와 FnBP를 분리하지 않는 것이 안정성이 높을 것으로 생각되며, 또한 vaccine으로 응용시 접종된 동물에서 FnBP에 대한 면역원성이 높게 나타날 것으로 예상된다.

본 연구에서 생산된 재조합 FnBP는 국내에서 문제시되고 있는 *S aureus*에 대한 vaccine의 후보물질로 유용하다고 생각된다. 또한 생산된 FnBP를 이용한 젖소의 유방염 백신개발에 있어서 FnBP 단일물질만을 이용하기 보다는 *S aureus*의 다른 병원성 물질인 pseudocapsule, protein A와 α -toxin 등이 복합된 다가백신이 효과적일 것으로 생각되며³⁰ 생산된 FnBP의 면역원성을 확인하기 위하여 동물접종시험 등의 연구가 앞으로 수행될 예정이다.

결 론

재조합 fibronectin-binding protein을 함유하는 *S aureus*의 subunit vaccine 개발에 필요한 재조합 FnBP를 생산하기 위하여 *S aureus* KNU 196 strain의 chromosomal DNA로부터 중합효소 연쇄반응으로 *fnbp* gene을 증폭시켰다. 증폭된 *fnbp* gene을 expression vector인 pGEX-4T-2에 cloning한 후 재조합 DNA를 DH5a *E coli*에 형질전환시

켰다. 형질전환된 *E coli*로부터 glutathione-S-transferase와 용합된 재조합 FnBP를 생산하였고, affinity chromatography로 순수분리하였으며, Western blot기법으로 항원성과 면역원성을 확인하였다.

본 연구에서 생산된 재조합 FnBP는 *S aureus*에서 분리한 천연의 FnBP와 같은 기능을 갖는 물질로서 *S aureus* subunit vaccine의 후보물질로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Russel MW, Brooker BE, Reiter B. Inhibition of bacterial activity of bovine polymorphonuclear leukocytes and related systems by casein. *Res Vet Sci*, 20: 30-35, 1976.
2. Frost AJ, Wanasinghe DD, Woolcock JB. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infect Immun*, 15: 245-253, 1977.
3. Ziv G. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy. *VM/SAC*, 657-670, 1980.
4. Craven N, Anderson JC, Jones TO. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Rec*, 118:290-291, 1986.
5. 김두. 유우의 임상형 유방염 원인균과 항생제 감수성의 변화양상. 대한수의학회지, 28: 397-404, 1988.
6. 한홍률. 우리나라 젖소의 유방염 원인균에 관한 연구. 서울대수의대 논문집, 1-23, 1978.
7. Shanson DC. Staphylococcal infection in hospitals. *Br J Hosp Med*, 35: 312-319, 1990.
8. Gyles CL, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames: 21-35, 1993.
9. Forsgren A, Ghetie V, Lindmark R. *et al*. Protein A and its exploitation. *Academic Press*, London:429, 1983.
10. Jonsson P, Lindberg M, Haraldsson I, *et al*. Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: Studies of alpha-hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infect Immun*, 49:765-69,

- 1985.
11. Moks T, Abrahmsin L, Nilsson B, *et al.* Staphylococcal protein A consist of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem* , 156: 637-641, 1986.
 12. Hallén Sandgren C, Mamo W, Larsson I, *et al.* A periodate-sensitive anti-phagocytic surface structure induced by growth in milk whey, on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Microb Pathog* , 11: 211-220, 1991.
 13. Mamo W, Hallén Sandgren C, Lindahl M, *et al.* Induction of anti-phagocytic surface properties of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis by growth in milk whey. *J Vet Med* , 38:401-10, 1991.
 14. Kuusela P. Fibronectin bind to *Staphylococcus aureus* . *Nature* , 276: 718-720, 1978.
 15. Wadström T, Switalski L, Speziale P, *et al.* Binding of microbial pathogens to connective tissue fibronectin: an early step in localized and invasive infection. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections* . Heidelberg, Springer Verlag: 193-207, 1985.
 16. Espersen F, Clemmensen I. Isolation of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* . *Infect Immun* . 37: 526-531, 1982.
 17. Fröman G, witalski LM, Speziale P, *et al.* Isolation and characterization of fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus* . *J Biol Chem* , 262: 6564-6571, 1987.
 18. Nickerson SC, Owens WE, Boddie RL. Effect of *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infection and mammary histology in nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci* , 16:1290-1299, 1993.
 19. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross, NL, *et al.* A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle; 1. Clinical parameters. *J Dairy Sci* , 77: 1267-1275, 1994.
 20. Kohoe M, Dunean J, Foster T, *et al.* Cloning, expression and mapping of the *Staphylococcus aureus* α -hemolysin determinant in *Escherichia coli* K-12. *Infect Immun* , 41:1105-1111, 1983.
 21. Signäs C, Raucci G, Jönsson K, *et al.* Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* : Use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* , 86:699-703, 1989.
 22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* , 74:5463, 1977.
 23. Kuypers JM, Proctor RA. Reduced adherence to traumatized rat heart valves by a low fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* , 57: 2306-2312, 1989.
 24. Rydén C, Rubin K, Spiziale P, *et al.* Fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus* . *J Biol Chem* , 258:3396-3401, 1983.
 25. Flock JI, Fröman G, Jönsson K, *et al.* Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* . *EMBO J* , 6:2351-2357, 1987.
 26. Huff S, Matsuka YV, McGavin MJ, *et al.* Interaction of N-terminal fragments of fibronectin with synthetic and recombinant D motifs from its binding protein on *Staphylococcus aureus* studied using fluorescence anisotropy. *J Biol Chem* , 269:15563-15570, 1994.
 27. Jönsson K, Signäs C, Müller HP, *et al.* Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus* . *Eur J Biochem* , 202:1041-1048, 1991.
 28. Ciborowski P, Flock JI, Wadström T. Immunological response to a *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol* , 37:376-381, 1992.
 29. Mamo W, Jonsson P, Flock JI, *et al.* Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein(FnBP-A) to challenge with *S aureus* . *Vaccine* , 12: 988-992, 1994.
 30. Foster TJ. Potential for vaccination against infection caused by *Staphylococcus aureus* . *Vaccine* , 9:221-227, 1991.