

## Recombination and Expression of *eaeA* Gene in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

Hong Kim and Jong-Bae Kim<sup>†</sup>

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University,  
Wonju 220-710, Korea

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains of serotype O157:H7 have been shown to colonize the intestinal epithelial cell by the attaching and effacing (AE) mechanism. The AE lesion is mediated by an intimin, of which production and expression are controlled by a 3-Kb *eaeA* gene located EHEC chromosomal DNA. If the *eaeA* gene is mutated, EHEC O157:H7 strains lose capacity of adhesion to intestinal epithelial cells. In this study, a 891 bp of the 3'-end region of a gamma intimin was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR product was inserted into pSTBlue-1 cloning vector and transformed into DE3 (BL21) competent cell. After plasmid mini-preparation and restriction enzyme digestion of *eaeA*/891-pSTBlue-1 vector, target *eaeA* gene was re-inserted into pET-28a expression vector and was transformed. Then the expression of recombinant *eaeA*/891 (891 bp) gene was induced by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The expression of the 40-KDa recombinant protein was identified in SDS-PAGE and confirmed by immunoblotting using the His · Tag<sup>®</sup> and T<sub>7</sub> · Tag<sup>®</sup> monoclonal antibody. This recombinant protein expressed by *eaeA* gene could be applied in further studies on the mechanisms of *E. coli* O157:H7 infection and the development of recombinant vaccine.

**Key Words:** EHEC O157:H7, Intimin, *eaeA* gene, PCR, Immunoblotting

### 서 론

지난 수 십 년 동안 병원성 미생물에 의한 음식물 매개성 질병의 전파는 식품 위생 및 공중 보건학 분야에 많은 부담을 주고 있다. 캔 상품 제조 과정에서의 보툴리눔증<sup>27)</sup>, 냉장 처리하지 않은 아이스크림이나 햄, 고기 등으로 인한 포도구균성 식중독<sup>4,13)</sup>, 감염된 고기에서의 살모넬라증 등이 발견되었고<sup>26,32)</sup>, 방균 노력을 기울였음에도 불구하고 새로운 식중독 원인균에 의한 문제점들이 야기되고 있다. 음식물 매개성 질병의 원인균으로는 *Listeria monocytogenes*<sup>22)</sup>, *Staphylococcus aureus*<sup>4,13)</sup>, *Salmonella* spp.<sup>26,32)</sup>, *Shigella* spp.<sup>16)</sup>, *Vibrio parahaemolyticus*<sup>19)</sup>, *Yersinia enterocolitica*<sup>29)</sup> 등이 비교적 잘 알려져 있고, 최근에는 *Escherichia coli* 혈청형 O157:H7에 의한 음식물 매개성 질병이 보고되어 관심을 끌고 있다.

식중독과 함께 설사를 유발하는 대장균은 각기 다른 기전

에 의해서 질병을 일으키는데 증상에 따라서 4가지 종류의 대장균으로 분류할 수 있다<sup>14)</sup>. 이 중 enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)로 알려진 verotoxin을 생성하는 대장균은 장관세포에 감염하여 사람에게서 혈액이 섞인 설사를 일으킨다<sup>14,24)</sup>.

미국의 Centers for Disease Control and Prevention (CDC)에서는 1973년부터 1982년 사이에 분리한 3,000 주(株)의 *E. coli* 중 단 1 주(株)만을<sup>24)</sup>, 영국의 Public Health Laboratory에서는 1978년부터 1983년 사이에 분리한 15,000 주(株)의 *E. coli* 중 역시 단 1 주(株)만을, 그리고 캐나다의 Laboratory Center for Disease Control에서는 1978년부터 1982년 사이에 환자의 설사로부터 분리한 2,000 주(株)의 *E. coli* 중 6 주(株)만을 EHEC O157:H7으로 분리하였다<sup>6,10,12)</sup>. 그러나 *E. coli* O157:H7에 의한 감염은 1982년 미국의 오레곤 주에서 26명과 미시건 주에서 21명이 감염되어 처음 보고된 이후 급격히 증가하여 최근의 CDC 통계에 따르면 매년 25,000건의 감염사례가 보고되고 있고<sup>9)</sup>, 1997년에는 일본에서 집단으로 감염된 사례가 보고되어 사회적으로 큰 문제가 되고 있다<sup>11)</sup>. 이 세균의 특징은 다른 종류의 대장균과는 다르게 심각한 경련을 동반한 통증과 혈액이 섞인 설사를 유발하고, 심한 경우에는 출혈성 요독증까지 일으킨다<sup>2,8,17,23)</sup>. O, H 혈청형에 따라서 위와 같은 증상을 일으키는 세균을 O157:H7이라고 분류하였는데, sorbitol

\* 논문 접수: 2002년 7월 6일

수정재접수: 2002년 9월 23일

<sup>†</sup>별책 요청 저자: 김종배, (우) 220-710 강원도 원주시 흥업면 연세대학교 보건과학대학 임상병리학과 235호

Tel: 033-760-2423, Fax: 033-760-2195

e-mail: kimjb@dragon.yonsei.ac.kr

이 첨가된 MacConkey 배지에서 sorbitol을 분해하지 못하여 무색 집락을 형성하는 특징을 가지고 있다<sup>8,23)</sup>.

EHEC 감염에 대한 정확한 기전은 동물 실험시 이 세균이 맹장 (cecum)과 회장 (ileum) 말단에서 attaching-and-effacing (AE) 작용에 의해서 집락을 형성하는 것을 통해서 밝혀졌다<sup>9,30,31)</sup>. AE lesion은 우선 bundle-forming pili를 이용하여 부착을 시작하고, *eaeA*라고 불리는 유전자가 발현한 intimin이 부착을 매개하면서 세균이 장관세포에 부착하여 바로 아래 인접한 cytoplasm 내에 polymerized filamentous actin이 축적되는 현상이다<sup>7)</sup>. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)도 이와 같은 비슷한 방식으로 eukaryotic cell에 부착하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

*eaeA* 유전자는 EHEC의 chromosomal DNA상에 위치한 3-Kb의 유전자로 94-KDa의 intimin이라고 불리는 outer membrane protein (OMP)을 생성한다. 즉 intimin은 세포의 membrane receptor에 결합하여 세포에 부착한 세균과 polymerized actin filament를 직접적으로 연결시키는 중요한 역할을 한다<sup>17)</sup>.

한편 EHEC에서 AE lesion의 생성 기전은 EPEC가 장관 세포에 부착하는 기전과 매우 유사해서 intimin을 발현하는 *eaeA* 유전자와 비교하면 염기 서열의 5' end 시작부터 중간까지 약 2,200 bp에서 97%의 높은 유사도를 보이는 반면 3' end 부분의 800 bp에서는 59% 정도만이 유사하다고 한다<sup>3)</sup>. 즉 *eaeA* 유전자에 의해서 발현하는 intimin에서 C-terminal 부분의 아미노산 서열이 다르므로 *E. coli*는 서로 다른 항원구조와 특이적인 수용체를 가지게 된다. 다른 항원구조로 alpha ( $\alpha$ )에서 delta ( $\delta$ )까지 4가지 종류로 intimin을 나눌 수 있게 되는데 이 중 EPEC는 intimin  $\alpha$ 로, EHEC는 intimin  $\gamma$ 로 분류하여 구분할 수 있다<sup>26)</sup>.

본 연구에서는 intimin을 발현하는 *eaeA* 유전자 염기 서열 중 EHEC에만 특이적인 region인 3' end 부분을 PCR으로 증폭한 후, 삽입하고자 하는 vector와 동일한 자리를 인지하는 제한효소로 처리한 다음 vector에 삽입하여 plasmid가 결합된 *E. coli*에 형질전환 시킴으로써 특정한 재조합 유전자를 발현시키고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 균주, 배양 조건과 플라스미드

본 실험에 이용한 표준 균주는 혈청형 O157:H7인 *E. coli* ATCC 35150으로서 미국의 American Type Culture Collection (ATCC)에 주문하여 구입하였다. 재조합 DNA의 host로는 *E. coli* 중 DE3 (BL21)를 사용하였으며, cloning vector에는 pST-Blue-1을, expression vector에는 pET-28a plasmid (Novagen Inc., Madison, WI, U.S.A.)를 구입하여 제조회사의 권장 술식에 따라서 사용하였다.

세균은 Luria-Bertani (LB) broth나 LB agar에 접종한 후

37°C에서 18~24시간 동안 증균하여 실험에 사용하였다. 필요에 따라서 ampicillin 50  $\mu$ g/ml, kanamycin 30  $\mu$ g/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)의 항생제를 배지에 첨가하여 사용하였다.

### 2. *eaeA*/891 plasmid의 재조합

1) *eaeA* 유전자에 대한 oligonucleotide primer의 제작  
EHEC의 장관 내 상피세포 부착에 관여하는 intimin 단백질을 발현하는 유전자 *eaeA*에 대한 oligonucleotide primer를 제작하기 위하여 Genbank database (NIH, U.S.A.)에 접속하였다. *eaeA* 유전자 중  $\gamma$  intimin을 발현하는 *eaeA* 유전자의 C-terminal 부분에 해당하는 891 bp를 *eaeA*/891이라고 하였다. 이 유전자를 포함하면서 증합효소 연쇄반응에 필요한 최적의 primer는 Oligo software (National Bioscience, Plymouth, MN, U.S.A.)를 이용하여 upper의 경우 5'-GCGGAGATGACTTCA-GCA-3' (IntU)를, lower의 경우에는 5'-TTATTCTACACAAA-CCGC-3' (IntL)의 염기 서열을 본 연구에서 설계하였고, 주문 제작 (Bioneer Co., Taejun, Korea) 하였다.

#### 2) PCR

표준 균주의 DNA를 template로 이용하여 앞에서 제작한 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. 우선 boiling lysis 방법<sup>25)</sup>으로 추출한 genomic DNA 2  $\mu$ 에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTP를 1.6  $\mu$  넣었다. 그 후 10X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl) 2  $\mu$ , 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.6  $\mu$ , primer set 20 pmol/ $\mu$ 를 각각 2.0  $\mu$ , *Taq* polymerase 0.05 U를 첨가하고, 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 20  $\mu$ 가 되도록 하여 thermal cycler (Hybrid Ltd., Middlesex, U.K.)에서 표적 DNA의 증폭을 시도하였다. PCR 반응은 총 30 cycle을 시행하였으며, 첫 cycle이 시작하기 전에 94°C에서 1분 30초간 가온한 후 매 cycle 당 94°C에서 40초 동안 denaturation, 58°C에서 40초 동안 annealing, 72°C에서 1분 동안 extension 반응을 시행하였다. 그리고 완전한 extension을 위해 72°C에서 15분간 지속하였다. 반응이 종료된 후 0.5  $\mu$ g/ml의 ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 전기영동하여 표적 DNA의 증폭 여부를 확인하였다.

#### 3) *eaeA* 유전자와 pSTBlue-1 plasmid의 재조합

PCR으로 증폭한 *eaeA* 유전자는 GENE CLEAN TURBO Kit (BIO101 Inc., Carlsbad, CA, U.S.A.)로 정제하였고, Introductory pSTBlue-1 Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen Inc., Madison, WI, U.S.A.)를 사용하여 pSTBlue-1 vector에 삽입한 후, X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside, Bioneer Co., Taejun, Korea)을 표면에 바른 LB agar plate에 넓게 퍼서 접종하였다. 37°C에서 18시간 동안 배양한 후, 증식된 흰색 집락을 ampicillin 50  $\mu$ g/ml, kanamycin 30  $\mu$ g/ml의 항생제가 첨가된 LB broth에 접종하여 다시 배양한 세균은 증합효소 연쇄반응

을 이용하여 각각의 표적 DNA가 정확히 삽입되었는지를 확인하였고, plasmid DNA mini-preparation method<sup>25)</sup>로 plasmid DNA를 분리하였다 (Fig. 1).

4) *eaeA* 유전자와 pET-28a plasmid vector의 재조합 pSTBlue-1 vector에 삽입된 *eaeA* 유전자는 다시 expression vector로 삽입될 경우 발현이 제대로 이루어지도록 reading *Xho*I로 처리한 후 추출한 insert DNA에, 동일한 제한효소로 처리한 pET-28a plasmid vector를 3:1의 mole 비로 섞었다. 반응액에 T<sub>4</sub> DNA ligase (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 7.5)를 첨가한 후, 16°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후 DE3 (BL21)에 ligate를 넣고 형질전환한 후, selective marker로서 kanamycin (30 µg/ml)이 포함된 LB agar에 넓게 퍼서 접종하였다. 배양 후 얻은 단독 집락은 표적 DNA의 삽입 여부를 확인하기 위해서 PCR을 실시하였고, 증폭이 확인된 유전자 재조합 transformants에서 plasmid DNA를 분리하여 ligation site를 인지하는 제한효소로 처리하였다 (Fig. 1).

### 3. 재조합 DNA의 발현 분석

1) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

재조합 유전자 *eaeA*/891의 시험관 내 발현양상을 분석하기

위하여 Laemmli<sup>15)</sup>의 discontinuous buffer system을 이용하여 15% separating gel에서 SDS-PAGE를 실시하였다. 우선 iso-propyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Bioneer Co., Taejeon, Korea)를 처리한 세균 배양액을 취하여 Lowry 단백질 정량법<sup>18)</sup>으로 1 mg/ml의 농도로 단백량을 일정하게 조절하였다. 시료는 sample buffer와 혼합한 다음 95°C heating block에서 5분간 증탕한 후 10 mA로 전기영동한 후 Coomassie blue-R 250 용액으로 염색하였다.

### 2) Immunoblotting (Western blotting)

Immunoblotting은 Towbin 등<sup>28)</sup>의 방법에 따라서 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel을 NC paper에 transfer한 후, 1% BSA-TBST 완충액 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)으로 교반 처리하여 항원이 부착되지 않은 부위를 차단하고, 세척하였다. 여기에 T<sub>7</sub>·Tag<sup>®</sup> monoclonal antibody (Novagen Inc., Madison, WI, U.S.A)는 1:20,000으로 희석하여 37°C에서 30분 동안, His·Tag<sup>®</sup> monoclonal antibody (Novagen Inc., Madison, WI, U.S.A)의 경우에는 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 하루동안 처리하여 항원-항체반응을 유도하였다. 반응이 끝난 후 다시 완충액으로 세척하였고, alkaline phosphatase conjugated anti-human IgG (H+L) (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.)를 TBST를 완충액으로 사용하여 1:4,000으로 희석한 후, 37°C에서 30분 동안 처리하였다. Nitro blue

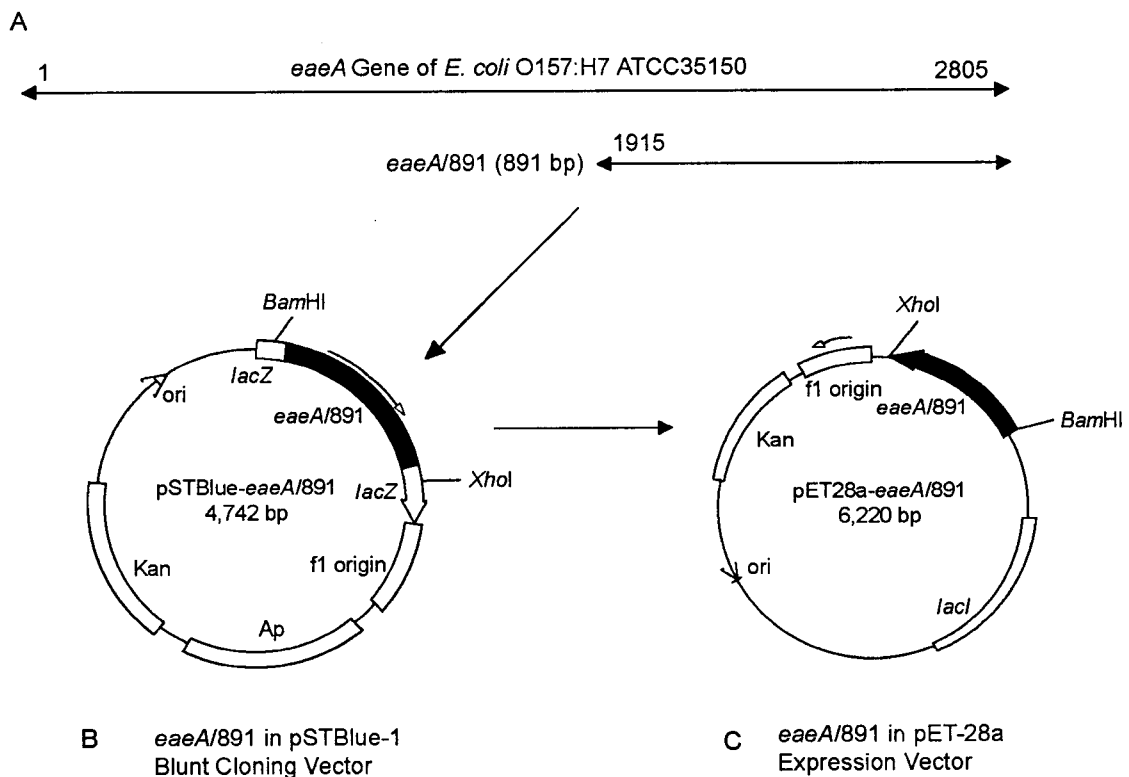
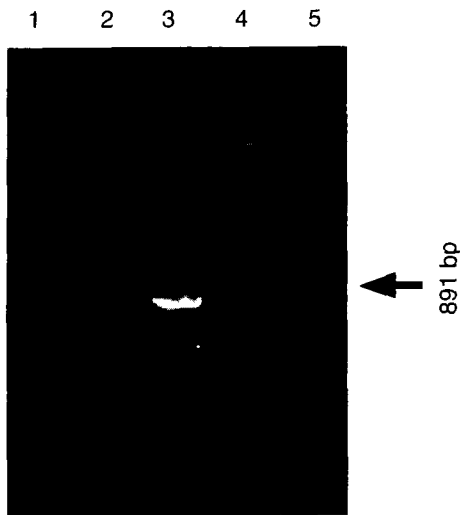


Fig. 1. *eaeA*/891-pSTBlue-1 and *eaeA*/891-pET-28a plasmid construction. A, PCR product of *eaeA*/891 (891 bp) map in EHEC O157:H7; B, *eaeA*/891-pSTBlue-1 plasmid; C, *eaeA*/891-pET-28a plasmid.



**Fig. 2.** PCR amplification of EHEC O157:H7 *eaeA* gene specific primer IntU-IntL and restriction enzyme digestion of recombinant cloning vector and expression vector. Lane 1,  $\lambda$  HindIII+EcoRI marker (Promega Co., U.S.A); Lane 2, DNA molecular size standards (100 bp ladder [GenoTech Co., Korea]); Lane 3, PCR product of *eaeA*/891 gene (891 bp); Lane 4, *eaeA*/891-pSTBlue-1 (treated with *Bam*HI and *Xho*I); Lane 5, *eaeA*/891-pET-28a (treated with *Bam*HI and *Xho*I).

tetrazolium (NBT)와 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)를 첨가하여 제조한 기질용액에 넣어 효소반응을 진행시켰다. 효소반응은 반응 정지용 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA)으로 중지시킨 후, NC paper를 건조시켰다.

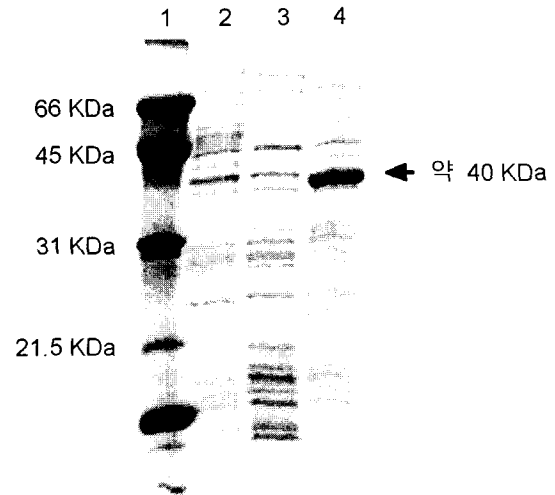
## 결 과

### 1. *eaeA* 유전자의 PCR

본 실험에서는 EHEC 혈청형 O157:H7 세균에서 *eaeA* 유전자의 증폭을 시도하였다. 서로 다른 네가지 종류의 intimin 중 EHEC O157:H7에서 특징적인 gamma intimin을 발현하는 유전자의 3' end 부분을 증폭하기 위하여 *eaeA*/891에 대한 IntU와 IntL primer를 자체 제작하였다. PCR을 실시한 결과 IntU와 IntL primer set에 대한 891 bp의 증폭 산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

### 2. pSTBlue-1 cloning vector를 이용한 *eaeA* 유전자의 재조합

PCR을 실시하여 증폭한 891 bp의 *eaeA*의 유전자는 정제된 후 pSTBlue-1 plasmid vector에 삽입하였다. Insert DNA의 삽입 여부를 확인하기 위하여 PCR을 시행하였으며 (data not shown), plasmid DNA를 분리하여 제한효소를 처리하였다. 그 결과 전기영동 상에서 insert DNA (891 bp)와 pSTBlue-1 plasmid vector (3,851 bp)를 확인하였다 (Fig. 2).



**Fig. 3.** SDS-PAGE of recombinant *eaeA* gene with pET-28a expression vector in DE3 (BL21). Lane 1, molecular weight marker proteins (21.5 KDa: soybean trypsin inhibitor, 31 KDa: carbonic anhydrase, 45 KDa: ovalbumin, 66 KDa: bovine serum albumin); Lane 2, DE3 (BL21) competent cell; Lane 3, pET-28a in DE3 (BL21); Lane 4, *eaeA*/891-pET-28a in DE3 (BL21).

### 3. pET-28a expression vector에 *eaeA* 유전자의 재조합

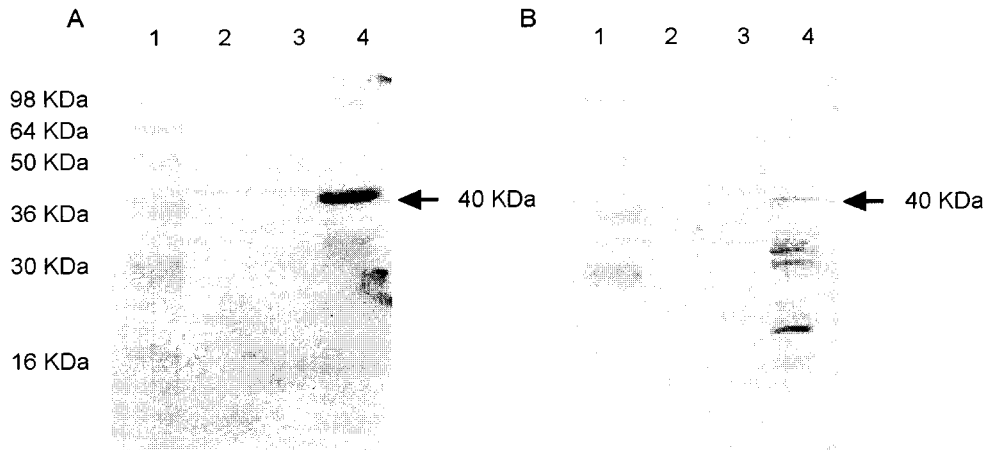
제한효소를 처리하여 cloning vector에서 분리한 insert DNA를 다시 추출하였고, 동일한 제한효소를 pET-28a expression vector에도 처리하여 정제하였다. 한편 *eaeA* 유전자의 pET-28a expression vector내 삽입시 *eaeA* 유전자가 pET-28a expression vector system 내에서 성공적으로 발현할 수 있도록 DNA의 reading frame을 확인한 후, 추출한 DNA와 expression vector를 3:1의 mole 비율로 섞어서 ligation하였고, DE3 (BL21) cell에 형질전환 하였다. Insert DNA의 삽입 여부를 확인하기 위해서 다시 추출한 plasmid DNA는 동일한 제한효소를 처리하여 insert DNA와 pET-28a vector (5,368 bp)를 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

### 4. 재조합 *eaeA* 유전자의 SDS-PAGE

재조합 *eaeA* 유전자의 발현을 확인하기 위하여 IPTG를 이용하여 재조합 *eaeA* 유전자의 발현을 유도하였고, SDS-PAGE를 실시하였다. Molecular weight marker protein을 기준으로 단백질 분획을 조사한 결과 *eaeA*/891-pET-28a에서 약 40-KDa의 특이적인 단백질 분획이 확인되었다 (Fig. 3).

### 5. Immunoblotting

SDS-PAGE를 실시하여 확인한 특이적인 단백질 분획이 재조합 *eaeA* 유전자의 발현에 의한 단백질 산물인지를 확인하기 위하여 His·Tag<sup>®</sup>과 T<sub>7</sub>·Tag<sup>®</sup> monoclonal antibody를 이용하여 immunoblotting을 실시하였다. 그 결과 SDS-PAGE에



**Fig. 4.** Immunoblot analysis of recombinant *eaeA* genes with pET-28a-c(+) expression vector in DE3 (BL21). Lane 1, SeeBlue™ pre-stained standard marker; Lane 2, DE3 (BL21) competent cell; Lane 3, pET-28a in DE3 (BL21); Lane 4, *eaeA*/891-pET-28a in DE3 (BL21); Lane 1 to 4 are same in A (His · Tag<sup>®</sup> monoclonal antibody) and B (T<sub>7</sub> · Tag<sup>®</sup> monoclonal antibody).

서 나타났던 40-KDa의 단백질에 대하여 His · Tag<sup>®</sup>과 T<sub>7</sub> · Tag<sup>®</sup> monoclonal antibody가 특이적으로 반응하는 것으로 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

## 고 찰

장관 내 감염을 일으키는 EHEC O157:H7<sup>6)</sup>은 출혈성 설사를 유발하고<sup>2,8,17,23)</sup>, 심각한 경우 출혈성 요독증까지 일으킨다<sup>5,6,10)</sup>. 이 세균은 장관 내 상피세포에 접착하여 AE lesion을 형성함으로써 감염을 일으키는데 *eaeA* 유전자가 발현한 intimin을 매개로 상피세포를 파괴함으로써 특징적인 임상 증상인 출혈성 설사를 일으킨다<sup>21)</sup>. 94-KDa의 intimin은 EHEC의 chromosomal DNA 상에 위치한 3-Kb의 *eaeA* 유전자가 발현하는데 이 단백질이 EHEC의 상피세포 접착에 중요한 역할을 담당한다고 할 수 있다<sup>17)</sup>. 따라서 본 연구에서는 EHEC의 설사 기전에서 중요한 역할을 담당하는 intimin에 대한 연구를 통해서 EHEC의 감염을 예방하기 위한 유전자 재조합 vaccine 개발에 관한 기초를 마련하고자 하였다.

우선 intimin을 발현하는 *eaeA* 유전자를 PCR으로 증폭하기 위해서 특이적인 primer를 제작하였다. Beebakee 등<sup>3)</sup>과 Yu 등<sup>33)</sup>의 연구 결과에 따르면 EHEC와 EPEC에서 *eaeA* 유전자의 염기 서열은 위치마다 유사도가 다르다고 하였는데, EHEC와 EPEC의 전체 염기 서열을 비교할 때 5' end 부분에 해당하는 약 2,200 bp는 97%의 유사도를 보인 반면 3' end 부분에 해당하는 염기 서열은 59%의 낮은 유사도를 보인다고 보고하였다.

위의 연구 결과를 이용하여 Reid 등<sup>23)</sup>은 multiplex PCR을 실시하여 병원성 *E. coli*에서 5' end 부분을 공통적으로 포함한 primer를 제작하여 intimin α, β, γ의 subtype을 구분하였다.

또한 Batchelor 등<sup>2)</sup>은 intimin을 서로 다른 네 가지의 subtype으로 분류하였는데, 이중 EHEC는 γ intimin에 해당한다고 보고하였다. 본 연구에서는 EPEC와 구별할 수 있는 EHEC의 γ intimin을 발현하는 *eaeA* 유전자의 염기 서열 중 3' end에 해당하는 891 bp를 증폭하고자 하였다.

합성한 oligonucleotide primer set를 이용하여 PCR을 실시하였고, 전기영동을 시행한 결과 primer design시 예상하였던 891 bp의 증폭 산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

중합효소 연쇄반응으로 증폭한 반응 산물은 양 끝단이 blunt end인 점을 감안하여 blunt end를 가지고 있는 cloning vector로 삽입하였다 (Fig. 2). *eaeA* 유전자가 삽입된 cloning vector의 multicloning 제한효소 위치 중 expression vector와 동일한 제한효소이면서 삽입한 *eaeA* 유전자가 발현할 수 있도록 염기 배열 상에서 reading frame을 확인한 후 pET-28a expression vector에 *eaeA* 유전자를 삽입하였다 (Fig. 2).

*eaeA* 유전자가 expression vector에 제대로 삽입한 것을 최종 확인한 후, 발현 효율을 높이기 위해서 log phase 상태의 배양액에 직접 IPTG를 처리한 다음 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과 재조합 DNA를 형질전환한 세균의 단백질 분포에서 약 40-KDa의 특이적인 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 이것은 삽입한 DNA, 즉 *eaeA*/891이 pET-28a plasmid vector 내에서 제대로 발현되고 있음을 보여주는 증거라고 할 수 있다.

실제로 McKee 등<sup>20)</sup>의 발현에 관한 연구에서는 intimin의 발현을 재조합 DNA를 이용하여 시도하였는데, *eaeA* 유전자의 전체 염기 서열을 cloning하여 발현시킨 결과 약 97-KDa의 발현 산물을 확인하였고, Louie 등<sup>17)</sup>은 GST fusion protein을 사용하여 97-KDa의 발현 산물을 확인하였다고 보고하였다. McKee 등과 Louie 등의 연구 결과가 본 연구의 결과와

다른 이유는 본 연구에서는 *eaeA* 유전자의 전체 염기 서열을 대상으로 발현을 시도한 것이 아니라, 유전자의 일부분에 해당하는 3' end의 891 bp만을 대상으로 하였기 때문이며, 이로 인해 97-KDa이 아닌 40-KDa의 발현 산물이 확인되었다. 실제로  $\gamma$  intimin에 대한 EHEC의 *eaeA* 유전자에 대한 염기 서열을 이용하여 유전자 재조합 단백질의 분자량을 이론적으로 계산해 본 결과 약 37.7-KDa의 발현 산물이 나오는 것으로 예상하였고, 실험 결과로 나타난 약 40-KDa의 발현 산물과 비교해 볼 때 큰 차이가 없다는 것을 확인할 수 있었다.

SDS-PAGE를 통해서 확인한 특징적인 단백질 분획이 expression vector 내에 삽입한 *eaeA* 유전자에 의한 발현 산물 인지를 확정하기 위해서 immunoblotting을 실시하였다. 이때 사용한 His·Tag<sup>®</sup>과 T<sub>7</sub>·Tag<sup>®</sup> monoclonal antibody는 multicloning site에 삽입한 DNA가 발현하는 경우 multicloning site의 상하에 위치한 histidine과 T<sub>7</sub> protein의 염기 서열도 동시에 발현하여 목적하는 단백질의 발현을 확인할 수 있도록 도와준다. Immunoblotting을 실시한 결과 SDS-PAGE에서 나타났던 특이적인 40-KDa의 단백질 band에 대하여 monoclonal antibody가 특이적으로 반응하였다 (Fig. 4).

본 실험의 결과를 바탕으로 앞으로는 재조합 DNA가 발현하는 단백질을 이용하여 활성도를 분석하거나 순수하게 분리, 정제한 후 polyclonal 혹은 monoclonal antibody를 제조하여 환자의 검체에서 EHEC O157:H7을 신속하게 검출할 수 있는 진단용 ELISA kit의 개발에 이용하거나, 더 나아가 EHEC O157:H7의 감염을 사전에 예방할 수 있는 vaccine의 개발에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

#### 감사의 글

이 논문은 농림부 농림기술개발과제 (관리번호: 299087-3, 축산식품에서 병원성 세균 신속 검출 및 추적 기술 개발)의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Adu-Bobie J, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MMS, Dougan G and Frankel G (1998): Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin  $\alpha$  and intimin  $\beta$  from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **66**: 5643-5649.
- 2) Batchelor M, Knutton S, Caprioli A, Huter V, Zaniol M, Dougan G and Frankel G (1999): Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. *J Clin Microbiol*, **37**: 3822-3827.
- 3) Beebakhee G, Louie M, deAzavedo J and Brunton J (1992): Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol Lett*, **91**: 63-68.
- 4) Becker K, Roth R and Peters G (1998): Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol*, **36**: 2548-2553.
- 5) Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ and Blattner FR (1998): The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res*, **26**: 4196-4202.
- 6) Day NP, Scotland SM, Cheasty T and Rowe B (1983): *Escherichia coli* O157:H7 associated with human infections in the United Kingdom. *Lancet*, **1**: 825.
- 7) Donnenberg MS and Kaper JB (1992): Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **60**: 3953-3961.
- 8) Farmer III JJ and Davis BR (1985): H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detection *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol*, **22**: 620-625.
- 9) Francis DH, Collins JE and Duimstra JR (1986): Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. *Infect Immun*, **51**: 953-956.
- 10) Griffin PM and Tauxe RV (1991): The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev*, **13**: 60-98.
- 11) Izumiya H, Terajima J, Wada A, Inagaki Y, Itoh I, Tamura K and Watanabe H (1997): Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field electrophoresis. *J Clin Microbiol*, **35**: 1675-1680.
- 12) Johnson WM, Lior H and Bezanson GS (1983): Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet*, **1**: 76.
- 13) Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR and Rozee KR (1991): Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **29**: 426-430.
- 14) Karmali MA, Steele BT and Petric M (1983): Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet*, **1**: 619-620.

- 15) Laemmli CK (1970): Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- 16) Litwin CM, Storm AL, Chipowsky S and Ryan KJ (1991): Molecular epidemiology of *Shigella* infection: plasmid profiles, serotype correlation, and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*, **29**: 104-108.
- 17) Louie M, deAzavedo JCS, Handelsman MYC, Clark CG, Ally B, Dytoc M, Sherman P and Brunton J (1993): Expression and characterization of the *eaeA* gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infect Immun*, **61**: 4085-4092.
- 18) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 19) Marano NN, Daniels NA, Easton AN, McShan A, Ray B, Wells JG, Griffin PM and Angulo FJ (2000): A Survey of Stool Culturing Practices for *Vibrio* Species at Clinical Laboratories in Gulf Coast States. *J Clin Microbiol*, **38**: 2267-2270.
- 20) McKee ML, Melton-celsa AR, Moxley RA, Francis DH and O'Brien AD (1995): Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infect Immun*, **63**: 3739-3744.
- 21) McKee ML and O'Brien AD (1996): Truncated enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 intimin (*eaeA*) fusion protein promote adherence of EHEC strains to HEp-2 cells. *Infect Immun*, **64**: 2225-2233.
- 22) Niederhauser C, Candrian U, Hofelein C, Jermini M, Buhler HP and Luthy J (1992): Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Appl Environ Microbiol*, **58**: 1564-1568.
- 23) Reid SD, Betting DJ and Whittam TS (1999): Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, **37**: 2719-2722.
- 24) Riley LW, Remis RS and Helgerson SD (1983): Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* serotypes. *N Engl J Med*, **308**: 681-685.
- 25) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): Lysis of boiling. pp 29-30, In Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Ed), "Molecular Cloning", 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 26) Stone GG, Oberst RD, Hays MP, McVey S and Chengappa MM (1994): Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation - PCR procedure. *J Clin Microbiol*, **32**: 1742-1749.
- 27) Szabo EA, Pemberton JM, Gibson AM, Thomas RJ, Pascoe RR and Desmarchelier PM (1994): Application of PCR to a clinical and environmental investigation of a case of equine botulism. *J Clin Microbiol*, **32**: 1986-1991.
- 28) Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 4350-4354.
- 29) Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J and Heesemann J (1998): Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol*, **36**: 2557-2564.
- 30) Tzipori S, Karch H, Wachsmuth KI, Robins-Browne RM, O'Brien AD, Lior H, Cohen ML, Smithers J and Leviae MM (1987): Role of 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxin in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, **55**: 3117-3125.
- 31) Tzipori S, Wachsmuth KI, Chapman C, Birner R, Brittingham J, Jackson C and Hogg J (1986): The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis*, **154**: 712-716.
- 32) Way JS, Josephson KL, Pillai SD, Abbaszadegan M, Gerba CP and Pepper IL (1993): Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, **59**: 1473-1479.
- 33) Yu J and Kaper JB (1992): Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol*, **6**(3): 411-417.