

이차원전기영동을 이용한 *Escherichia coli* O157:H7 균주간 항원 Spot의 비교

안영창, 신기욱, 신용승, 이응구, 이형준, 박미림, 김영립, 정태성, 김곤섭, 김용환

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소

(게재승인 : 2002년 5월 28일)

Comparison of Antigenic Spots between *Escherichia coli* O157:H7 Strains by 2-Dimensional Gel Electrophoresis

Yeong-Chang Ahn, Gee-Wook Shin, Yong-Seung Shin, Eung-Goo Lee, Hyoung-Jun Lee, Mi-Rim Park,

Young-Rim Kim, Tae-Sung Jung, Gon-Sup Kim and Yong-Hwan Kim

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeong Sang Nation University

(Accepted : May 28, 2002)

Abstracts : Proteomics is an emerging powerful tool in studying protein expression and function. At present study, proteomics was employed to evaluate the antigenicity among *Escherichia coli* O157:H7 strains using 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and immunoblotting. SDS-PAGE and immunoblotting analysis revealed no big differences among *E. coli* O157:H7 strains. 2-DE analysis, however, revealed common antigens as well as specific antigens. The immunoblotting analysis revealed 20 common antigenic spots among *E. coli* O157:H7 strains. In addition, there were 3 and 13 spots as common antigens between ATCC 43894 and KSC 109, and between ATCC 43894 and ACH 5, respectively. Antigenic spots specific for individual strain were also identified as 15, 8 and 22 for ATCC 43894, ACH 5 and KSC 109, respectively.

The common antigens would be useful by employing either vaccine development or diagnosis marker, or both, whereas the specific antigens of individual strains would be applicable for epidemiological study. This study suggest that proteome analysis, representative as 2-DE, is valuable tool in exploring the *E. coli* antigenicity.

Key words : *E. coli*, 2-DE, immunoblotting, antigenic spots

서 론

Escherichia coli (*E. coli*)는 인간과 동물의 장내 정상세균총으로 존재하면서 장관계질환 또는 비장관계 질환의 중요한 원인체로 작용하여 여러 가지 질병을 유발시킨다. 1,2 설사 유발 대장균은 혈청형, 독소와 부착인자의 생산능력 및 장상피세포에 대한 작용 그리고 임상 증상과 증후 등을 기초로 하여 enteropathogenic *E. coli*

(EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) 및 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)의 4가지 주요한 균으로 분류한다³. 최근에는 EHEC균의 verotoxin (VT) 생산 대장균에 의한 환자가 전세계적으로 다발함에 따라 균의 항원성 및 생리·생화학적 성상에 관하여 많은 연구가 이루어지고 있다^{4,5}. VT 생산 대장균 O157:H7의 집단적 발생 예는 1982년 오염된 햄버거의 섭취로 인하여 오레건주와 미시건주에서 발생한 예가

이 연구는 농림기술개발사업 (과제번호: 20010067)과 한국과학재단 (과제번호: 20010283)의해 부분적으로 수행되었습니다.

* Corresponding author : Yong-hwan Kim, Phone : +82-55-751-5820

있으며 특히, 1996년 일본에서는 9346여명의 환자가 발생하여 그 중 12명의 노약자들이 사망하여 세계적으로 문제시 되었다^{6,7,8}.

VT 생산대장균은 사람에서 설사병, 용혈성 요독증후군, 출혈성 결장염 및 수중성 질환 등을 유발하는 중요한 원인체이며^{9,10,11}, 이 균의 혈청형은 43종 이상이 있는 것으로 알려져 있다³. 또한, E. coli에 감염된 환자로부터 분리되는 균의 절반이상이 O157:H7인 것으로 보고되었다¹².

VT생산대장균의 분리율은 소의 분변 재료에서 11~84%, 원유에서 10%, 돈육에서 1.5~3.8%, 계육에서 1.5%로 보고된 바 있어 공중보건학적인 측면에서 많은 주의가 필요하다^{13,14}.

E. coli를 포함한 주요 병원성 세균에 대한 DNA수준의 많은 연구에 이어 최근에는 최종 생리 활성물질인 단백질 수준에서의 접근의 필요성이 증대되고 있다^{15,16}. 이러한 유전자의 기능을 밝히는 분자생물학적 방법으로는 DNA array chip, protein chip, structural genomics, transgenic animals, proteomics 등이 있다. 그 중 프로테오믹스 (proteomics)는 genome의 기능을 밝히려는 학문이자 기법으로서 발현 단백질의 유형을 비교 분석하여 특정 생명현상에 관여하는 중요한 단백질을 찾아 그 기능을 밝히려는 연구 방법으로, 현대 생명과학 연구의 두드러진 특징인 신속대량분석법의 발달에 따라 총체적인 접근이 가능하게 되었다. 특히 의학미생물에 있어서 프로테오믹스는 병원균의 역학조사 및 명명, 병원성 발현 기작의 규명, 균력 결정기의 발현, 병원성균주와 비병원성균주의 구분 및 병원균에 대한 약제 내성 등을 연구하는데 응용 될 수 있다^{17,18}.

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

재료 및 방법

공시 균주

실험에 사용한 E. coli O157:H7 균주는 Enteric Reference Laboratory for Disease Control Health and Welfare (Ottawa, Canada)에서 분양받은 ACH 5, 국립보건원에서 분양 받은 ATCC 43894, 국내 분리균주인 KSC 109등의 3개의 대표 균주를 사용하였다.

Sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

각 균주를 10ml의 LB broth에 접종 한 후 37°C에서 220 rpm으로 진탕배양하여 흡광도 0.7~0.9 (O.D. 610nm) 수준까지 배양한 후 1ml을 취해서 원심침전하여 균체를 모으고 200 μ l의 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)를 가하고 동량의 SDS-PAGE sample buffer (Bio-Rad)를 혼합하여 100°C에서 5분간 가열한 후에 15,000 \times g에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. 12.5% SDS-Polyacrylamide gel에 well당 20 μ l (10 μ g of protein/20 μ l)를 loading 하여 전기영동 후 Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250으로 염색하고 탈색 후 단백질 분획을 확인하였다.

2-DE를 위한 시료 준비

세균으로부터 단백질 추출은 O Farrell¹⁹의 방법을 준용하였으며 각 균주는 12시간 예비 배양한 후 100 μ l를 15ml의 LB broth에 접종하여 37°C에서 220 rpm으로 진탕배양하여 흡광도 0.7~0.9 (O.D. 610nm) 수준까지 배양하였다. 배양액을 4°C에서 950 g로 10분간 원심 침전시킨 후 pellet을 PBS 10 ml에 부유 시킨 다음 950 g로 10분간 3회 세척하였다. Pellet에 1 ml의 lysis buffer (9 M urea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-HCl, 65 mM DTT, and 0.5% Phamalyte)를 가하여 얼음에 1시간 동안 반응시킨 다음 15,000 g에서 30분간 원심시켜 상층액을 회수하여 Bradford 법을 준용하여 단백질을 정량하였다.

Isoelectric focusing (IEF)

단백질 추출용액을 rehydration solution (9 M urea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-HCl, 65 mM DTT, fewer bromophenol blue 그리고 0.5% Phamalyte)에 단백질 최종 농도가 80 μ g/ml이 되도록 희석한 후 immobilized pH gradient (IPG) strip holder (Amersham Pharmacia Biotech Inc., 7 cm)에 100 μ l를 loading한 다음 IPG strip을 올리고 cover fluid oil을 가하였다. IPGphor system (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)을 이용한 focusing 조건은 electronic panel의 온도가 20°C로 실험이 끝날 때까지 유지되게 하였으며 12시간 rehydration 후 500 Volt에서 30분, 1,000 Volt에서 30분, 4,500 V에서 10시간하여 최종 45,750 Vhs이 되도록 programming 하였다. Focusing이 끝난 후 IPG strip은 다음 과정을 할 때까지 -70°C에 보관하였다.

Equilibrations 및 SDS-PAGE

-70°C에 보관한 IPG strip을 SDS-PAGE에 적용하기 전에 equilibrations 과정을 수행하였다. 이 과정은 15 ml tube에 IPG strip 넣고 난 후 5 ml의 SDS-PAGE equilibration buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol)와 50 mg의 DTT로 처리하여 15분간 교반기에서 반응시키고 다시 5ml의 SDS-PAGE equilibration buffer에 125mg의 iodoacetamide로 처리하여 15분간 반응시켰다. IPG strip을 dDW로 가볍게 세척한 다음 Whatman filter paper로 탈수하여 12.5% acrylamide gel의 상단부에 loading 시키고 빈 공간은 0.5% low melting agarose solution을 분주하였다. 15mA의 조건으로 5분 전개한 후 30mA로 변환시켜 SDS-PAGE를 수행한 후 gel은 Blum *et al.*²⁰의 방법에 따라 silver staining 하였다.

Immunoblotting

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

Data Analysis

Silver staining한 gel 과 Immunoblotting한 membrane을 scanning 후 전용 이미지분석 프로그램인 Phoretix 2D program (Ver. 5.01)을 이용하여 data를 분석하였다.

결 과

ACH 5, KSC 109, ATCC 43894의 세 균주간의 SDS-PAGE 및 Immunoblotting결과 비교

실험에 사용한 세 균주 (ACH 5, KSC 109, ATCC 43894)로부터 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 실시한 후 Coomassie brilliant blue staining을 한 결과 (Fig. 1A) 세 균주 모두 비슷한 단백질 패턴을 확인할 수 있었으나 각 균주 특이 단백질은 확인할 수 없었다. 또한, O157 다가 항혈청으로 immunoblotting을 한 결과 (Fig. 1B) 역시 각 균주 특이 항원 단백질을 구별 할 수 없어 기존의 단

백질 분리법으로는 세 균주를 비교할 수 없었다.

ACH 5, KSC 109, ATCC 43894주에 대한 2-DE 유형

세 균주에서 추출한 단백질을 pH 3-10 범위의 IPG dry strip으로 2-DE 후 silver staining한 결과 실험에 적용한 모든 균주에 대한 단백질 spot은 모두 pH 4.5-5.5 (그림 생략) 사이에 모여 있었다. 그래서 pH 4-7범위의 strip으로 2-DE를 하였던 바 ACH5주는 총 380여개 (Fig. 2A), KSC109주는 360여개 (Fig. 2B), 그리고 ATCC43894는 390여 개 (Fig. 2C)의 spot들이 검출되었다.

ACH 5, KSC 109, ATCC 43894주에 대한 2-DE immunoblotting 유형

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

Data 분석

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

고 찰

Escherichia coli O157:H7은 Verotoxin을 생산하여 출혈성 결장염, 용혈성 요독 증후군 등 치명적인 증상을 유발하며 특히 면역기능이 약화된 노약자나 어린이에서는 사망하는 경우도 종종 보고 되고 있다^{1,2,4,5,8}. *E. coli* O157:H7은 국내에서는 낮은 분리율을 보이고 있으나²¹, 식품, 토양, 물을 통하여 오염될 수도 있으므로 식품 및 환경에 대한 공중 위생학적인 조사가 다양하게 수행되어야 할 것으로 생각된다.

병원성 세균의 유전정보에 대한 이해는 병원성 세균의 대사와 생리를 예측하기 위한 필수적인 단계로서 여

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

Strain	Spot	pI	MW	Strain	Spot	pI	MW	Strain	Spot	pI	MW	Strain	Spot	pI	MW	
Com. spot (20)	2	5.5	91.89	KSC 109 spot (3)	35	6.6	33.50	Only at ATCC4 3894 spot (15)	1	5.7	103.67	Only at KSC 109 spot (22)	60	6.0	69.84	
	6	5.1	76.83		36	5.8	29.05		3	6.0	81.48		61	6.1	69.28	
	7	4.9	76.12		46	5.5	17.46		4	6.0	81.17		62	6.3	69.28	
	8	4.8	61.94						5	4.7	78.13		63	6.2	69.00	
	9	4.9	63.61						12	5.8	54.61		64	6.4	67.88	
	10	5.8	61.52						14	6.1	54.04		65	5.4	67.04	
	11	5.7	60.78						22	5.4	44.56		66	5.5	67.04	
	13	5.3	54.15						23	6.4	44.12		67	5.3	66.20	
	16	5.5	51.60						32	6.2	32.23		68	5.3	66.20	
	18	5.0	48.96		ACH5 spot (13)	15	6.2		53.54	34	5.3		31.05	69	6.6	66.20
	20	5.2	45.79			17	5.4		50.73	38	5.0		27.41	70	5.2	65.08
	24	5.6	44.37			18	5.6		45.37	40	5.1		27.36	71	6.9	64.90
	27	5.3	40.13			21	5.5		45.16	41	6.4		26.66	72	5.4	62.56
	28	5.4	39.75	25		5.2	41.22	47	6.4	12.00	73	5.5	62.28			
	33	5.4	33.03	26		5.8	40.07	49	6.5	8.81	74	5.5	61.41			
	44	4.8	18.61	28		6.5	37.21				75	5.6	61.02			
	46	6.2	16.24	30		4.8	35.36	Only at ACH5 spot (8)	52	4.9	92.20	76	6.2	54.36		
	48	6.6	11.90	31	5.9	33.73	53		4.7	67.00	77	6.0	35.08			
	50	4.6	6.21	37	6.3	28.94	54		6.2	66.67	78	6.3	28.29			
	51	4.6	4.27	38	4.9	27.55	55		4.7	44.96	79	5.3	19.59			
			42	5.1	22.51	56	5.7		39.95	80	6.0	17.18				
			43	4.6	21.60	57	5.5		39.64	81	5.9	16.05				
						58	4.5		26.59							
								59	6.6	18.57						

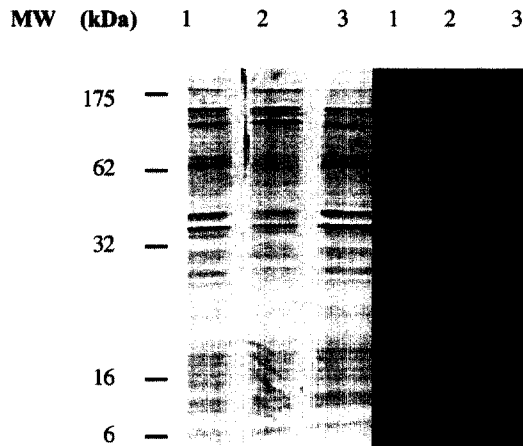


Fig. 1. (A) SDS-PAGE patterns of whole proteins from three different *E. coli* O157:H7 strains. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

(B) The immunoblotting images of the same bacteria of (A). Bacteria proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane and then reacted with O157 polyclonal antisera.

Lane 1; ACH 5, Lane 2; KSC 109, Lane 3; ATCC 43894

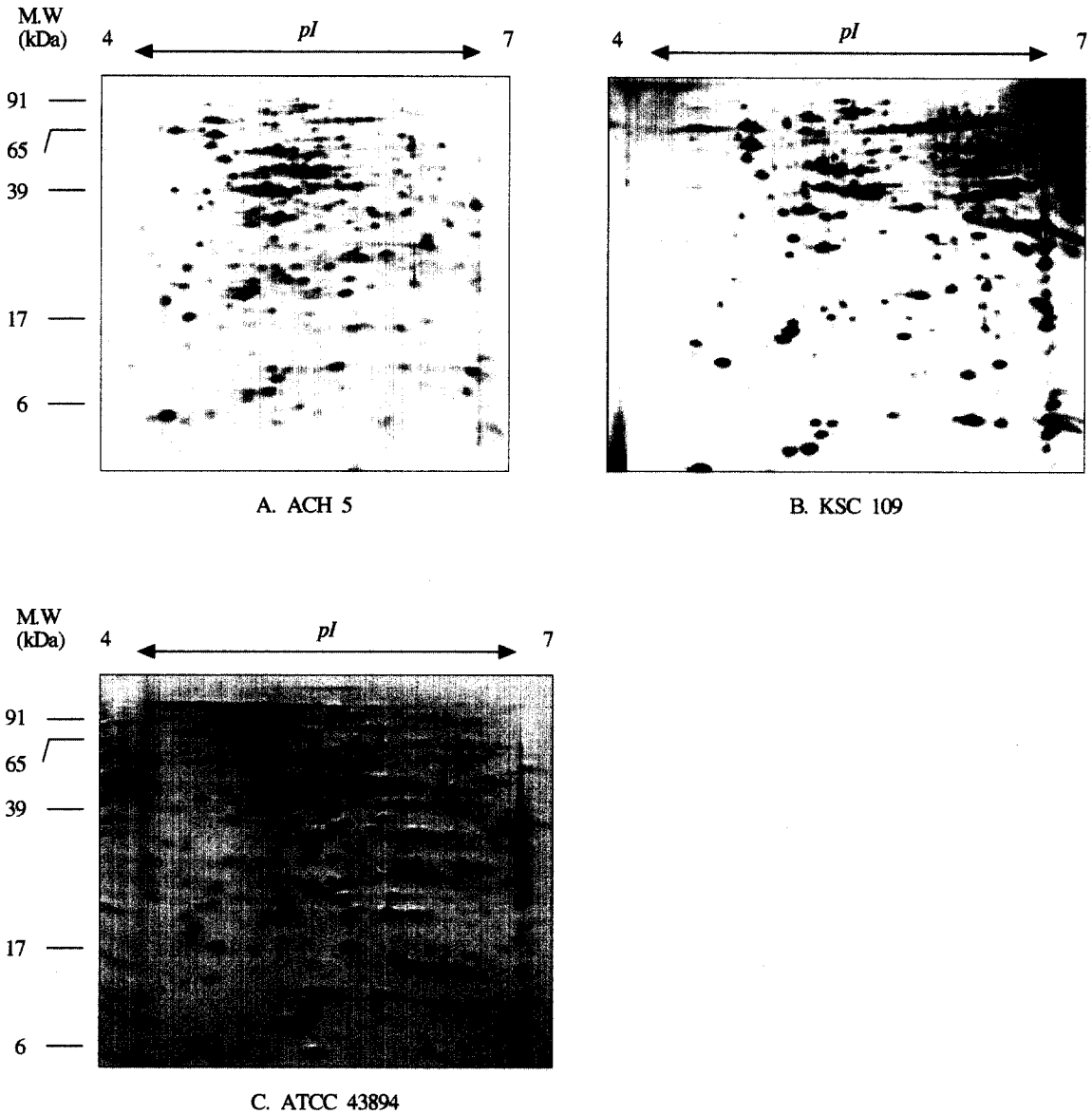


Fig. 2. 2-DE images of ACH5, KSC109 and ATCC 43894. Gels were stained with silver nitrate and analysed with Phoretix 2D program. Approximately 380, 360, and 390 spots were detected from ACH5, KSC109, and ATCC43894, respectively.

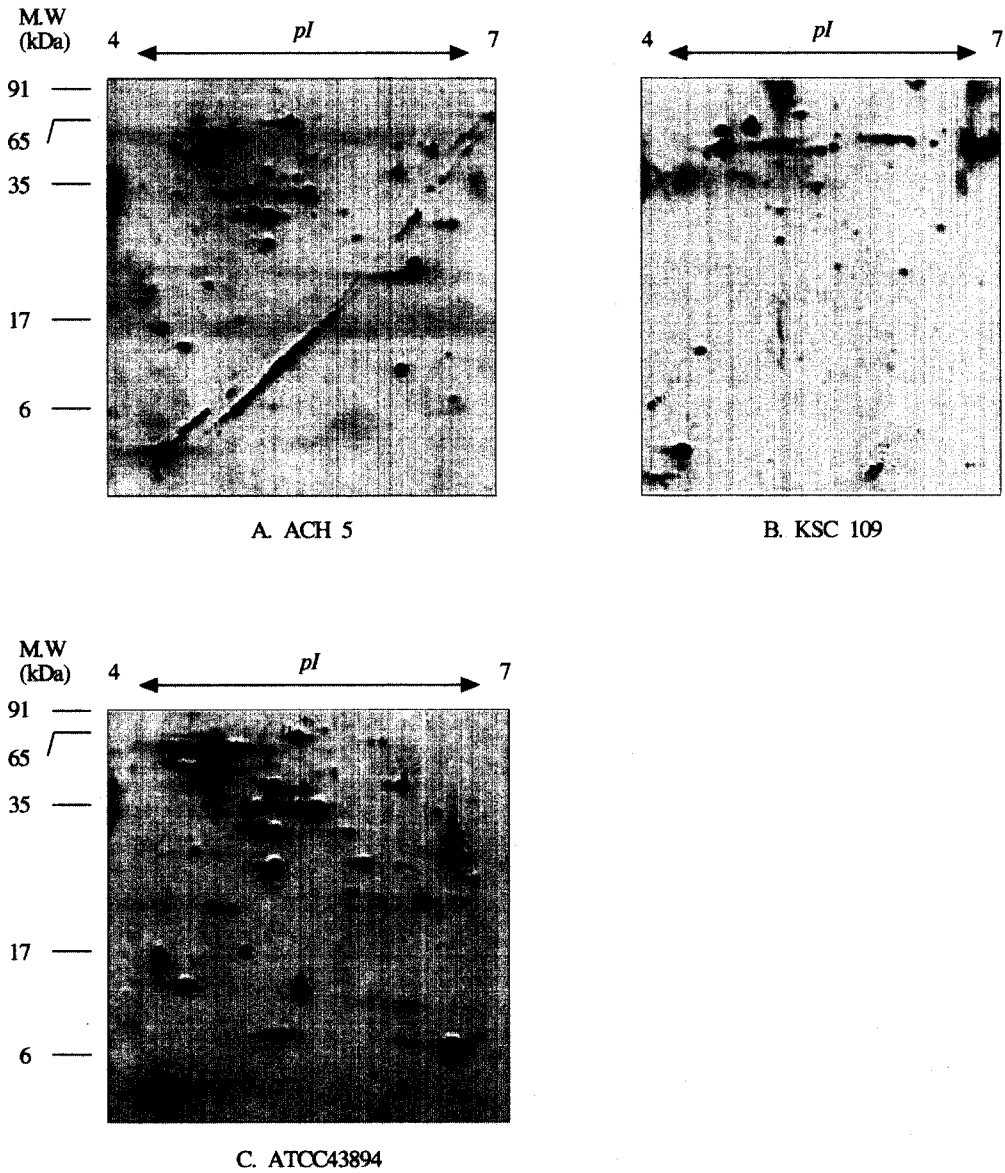


Fig. 3. Immunoblotting images of ACH5, KSC109 and ATCC 43894 using rabbit anti-sera raised against O157. Approximately 41, 45, and 51 spots were observed from ACH5, KSC109, ATCC 43894, respectively.

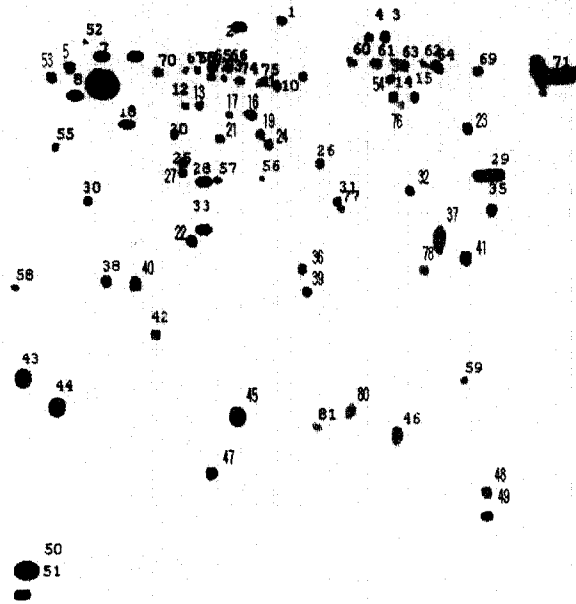


Fig. 4. Common and specific antigenic spots between strains of O157:H7 examined. A total of 51 spots (orange color) were identified as common antigens among 3 strains. 3 spots were shared between ATCC 43894 and KSC 109, and 13 spots were between ATCC 43894 and ACH 5. Specific antigenic spots were found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

한 최근의 성과는 Blattner *et al*¹⁵에 의하여 염기서열이 해독 되었으며, Hayashi *et al*¹⁶은 *E. coli* O157:H7의 완전한 염기서열을 제시하므로써 비병원성 균주인 K-12와의 비교를 통하여 병원성 및 생리학적 특성을 이해하는데 크게 기여 하였고, 특히 O157:H7감염기전을 연구하는데 새로운 전기를 마련하였다.

2-DE를 이용한 proteome연구의 방향은 일차적으로 해독된 유전정보를 바탕으로 proteome 데이터베이스를 구축하는 데 있으며, 표준 gel format을 사용하여 2-DE로 분리한 spot들을 단백질 미량분석기술과 접목하여, 2-DE gel상에 나타난 모든 단백질을 계층 정보의 특정유전자와 연결시켜 유전자의 최종 산물인 단백질과의 상관관계를 데이터베이스로 구축하는 것을 목표로 한다^{17,22}.

공시한 3균주 (ATCC 43894, ACH 5, KSC 109)에서 분리한 단백질을 silver staining한 결과 390, 380 및 360개의 각spot들이 검출되었다. ExPASy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/EXPCY>)에서 제공한 *E. coli* reference map에서 확인할 수 있는 pH 4-5범위에서 449개의 spot, pH 4.5-5.5 범위에서 1027개의 spot, pH 5-6 에서는 1536개의 spot, pH 5.5-6.7 에서는 605개의 spot, pH 6-9 에서는 1100개의 spot, pH 6-11 범위 1237개의 spot

검출결과와 Tonella *et al*²³이 해상도를 높이기 위하여 좁은 pH범위의 gel을 사용하여 4950개의 spot 검출결과가 보고되고 있다. 이 두 실험결과에 비교하여 본 실험에서는 10배의 낮은 검출율을 보였다. 이러한 차이는 mini gel의 한계라고 생각되며 보다 정확한 결과를 위하여 보다 큰 전기영동 장치와 narrow pH range의 strip 을 사용하여 spot 검출율을 높여야 할 것으로 생각된다.

또한, 본 실험에서는 *E. coli* O157:H7의 세 균주를 2-DE를 이용하여 O157 다가항혈청을 반응시켜 균주간 항원성의 차이를 파악하고 이용가능성을 검토하고자 하였다. 공시 균주간의 항원spot을 비교 검토한 결과 전통적 일차원적인 전기영동 (SDS-PAGE)에서는 세 균주 모두 비슷한 양상 (Fig. 1)을 보였으나, 2-DE를 수행한 결과 공시균주간의 차이를 분명히 확인할 수 있었다. 이는 최근 Yokoyama *et al*²⁴등이 일본에서 발생한 출혈성 설사환자의 가검물로부터 분리한 *E. coli* O157:H7 NGY9, NGY33, NGY120의 세 균주를 재료로 2-DE 분석을 하였을 때에는 NGY33과 NGY120는 계통상 비슷하였으나 NGY9는 많은 차이가 있음을 보고한 성적과 유사하였다. 각 균주에서 검출된 단백질 spot을 바탕으로 세 균주의 항원 map을 작성하기 위하여 O157 다가 항혈청과 반

응시킨 후 ATCC 43894, ACH 5, KSC 109에서 각 51, 41, 45 개의 항원 spot들을 검출하였다. 국내 분리균주인 KSC 109에서는 다른 두 균주와 공통항원도 많이 존재하였으나 반면에 분자량 65 kDa 위치에 pH 5.2~7.0 범위에서 개별항원이 많이 검출되었다. 이러한 immunoblotting을 통한 항원단백질의 검출 결과는 2-DE 이전의 기술로는 확인하기 어려운 사실로서 2-DE의 효율성을 입증할 수 있었다.

본 실험에서 균주간의 차이를 2-DE를 적용하여 명확히 알 수 있었으며, 이러한 프로테오믹스를 통한 데이터베이스 구축의 효과는 단기적으로는 특이진단 marker의 개발에 응용가능하며, 장기적으로는 질병을 효과적으로 예방하는데 이용 가능하다^{18,25}. 즉 질병을 유발하는 병원체간 차이점을 단백질 수준에서 알 수 있어 보다 정밀한 역학조사가 가능할 것으로 생각된다.

결 론

E. coli O157:H7 중 외래균주인 ACH 5, ATCC 43894와 국내 분리균주인 KSC 109 등의 세 균주에 대해 이차원 전기영동법을 이용하여 각 항원성을 비교 조사하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 이차원전기영동을 통하여 세균 proteom의 완전한 분리가 가능하였으며 단백질의 pI와 분자량을 동시에 알 수 있었다.
2. Immunoblotting의 detection system으로 ECL kit를 사용하여 민감도를 증가시켜 보다 많은 항원을 검출할 수 있었다.
3. 세 균주에서 주요 항원들은 같은 수준으로 나타나는 것으로 확인되었으며, 차후 많은 균주에 대한 항원단백질을 확인 후 이들을 백신개발이나 진단에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.
4. 각 균주간의 특이적인 항원이 발견되었으며 이들 항원은 역학조사나, 보다 특이적인 진단에 이용할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 항원들의 차이는 균주간의 병원성의 차이를 설명하는 중요한 단서가 될 수 있으리라 사료된다.

참고문헌

1. McNeish AS, Turner P, Fleming J, et al. Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli* *Lancet*, 2(7942):946-948, 1975.
2. Trusczyński M, Pilaszek J. Pathogenic properties of

Escherichia coli enterotoxin after parenteral administration to pigs, rabbits and mice. *Res Vet Sci*, 11(2):117-22, 1970.

3. Albert B. Manual of clinical microbiology, 5th ed. 367-370, 1991.
4. Garwin JL, Klages AL, Cronan JEFr. Structural, enzymatic, and genetic studies of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases I and II of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 255(24):11949-11956, 1980.
5. Cleary TG, Mathewson JJ, Faris E, et al. Shiga-like cytotoxin production by enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. *Infect Immun*, 47(1):335-337, 1985.
6. Rocchi G, Capozzi M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection *Recenti Prog Med*, 90(11):613-618, 1999.
7. Pebody Rg, Furtado C, Rojas A, et al. An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiol Infect*, 123(2):217-223, 1999.
8. Michino H, Araki K, Minami S, et al. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol*, 150(8):787-796, 1999.
9. Konowalchuk J, Speirs JJ, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 18(3):775-779, 1977.
10. Karmali MA, Petric M, Lim C, et al. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 151(5):775-782, 1985.
11. Pai CH, Ahmed N, Lior HV, et al. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* : a two-year prospective study. *J Infect Dis*, 157(5):1054-1057, 1988.
12. Hockin JC and Lior H. Hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by to *Escherichia coli* O157:H7 in Canada. *Can Dis Wkly Rep*, 13, 203-204, 1987.
13. Read SC, Gyles CL, Clarke RC, et al. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario. *Epidemiol Infect*, 105(1): 11-20, 1990.
14. Suthienkul O, Brown JE, Seriwatana J, et al. Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in retail meats and

- cattle in Thailand. *Appl Environ Microbiol.* 56(4):1135-1139, 1990.
15. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331):1453-1474, 1997.
 16. Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, *et al.* Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12, *DNA Res*, 8(1):11-22, 2001.
 17. Williams KL. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis*, 20(4-5):678-688, 1999.
 18. O'Connor CD, Adams P, Alefounder P, *et al.* The analysis of microbial proteomes: Strategies and data exploitation. *Electrophoresis*, 21(6):1178-1186, 2000.
 19. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250(10):4007-4021, 1975.
 20. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8:93-99, 1987.
 21. 정석찬. 국내 발견 신세대 식중독균의 문제점과 예방대책 *Escherichia coli* O157:H7의 특성 및 최근 연구동향. 한국식품안전성 학회 심포지엄, 1998.
 22. Gevaert K, Vandekerckhove J. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*, 21(6):1145-1154, 2000.
 23. Tonella L, Hoogland C, Binz P, *et al.* New perspectives in the *Escherichia coli* proteome investigation. *Proteomics*, 1(3):409-423, 2001.
 24. Yokoyama, K, Iinuma Y, Kawano Y, *et al.* Resolution of *Escherichia coli* O157:H7 That Contaminated Radish Sprouts in Two Outbreaks by Two-dimensional Gel Electrophoresis, *Current Microbiology*, 43(5):311-315, 2001.
 25. Cordwell SJ, Nouwens AS, Walsh BJ. Comparative proteomics of bacterial pathogens, *Proteomics*, 1(4):461-472. 2001.