

Brucella abortus 국내 분리주의 Heat Shock Protein 암호 *groE* 유전자의 염기서열 분석과 발현

김태용¹ · 김지영 · 장경수² · 김명철 · 박창식³ · 한홍율⁴ · 진무형*

충남대학교 수의과대학

¹(주)중앙백신연구소

²켄터키대학교 의과대학

³충남대학교 형질 전환복제돼지연구센터

⁴서울대학교 수의과대학

(게재승인: 2005년 1월 9일)

Sequence analysis and expression of *groE* gene encoding heat shock proteins of *Brucella abortus* isolates

Tae-Yong Kim¹, Ji-Young Kim, Kyung-Soo Chang², Myung-Cheol Kim, Chang-Sik Park³,
Hong-Ryul Han⁴, Moo-Hyung Jun*

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹ChoongAng Vaccine Laboratory, Daejeon 305-348, Korea

²College of Medicine, University of Kentucky, Lexington KY40536-0298, USA

³Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

⁴College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Accepted: January 9, 2005)

Abstract : GroE that is a heat shock protein composed of GroEL and GroES is known as an immunodominant target of both the humoral and cellular immune responses in bovine brucellosis. This study was carried out to characterize *groE* gene encoding heat shock proteins of *B. abortus* isolated in Korea and to evaluate the immunogenicity of the GroE protein expressed in *E. coli* system. In PCR the specific signals with the size of 2,077 bp were detected in five strains isolated from the mammary lymphnodes of the dairy cattle that were serologically positive and the reference strains. In comparison of the sequences of nucleotides and amino acids among the strains, GroES showed 100% identity in both sequences. GroEL was evaluated 99.0~99.9% in nucleotides and 98.0~100% homology in amino acids. The *groE* gene including *groES* and *groEL* was inserted into pET29a vector and constructed pET29a-GroE recombinant plasmids. The inserted *groE* was confirmed by digestion with *NcoI* and *EcoRI* endonucleases and nucleotide sequencing. *E. coli* BL (DE3) was transformed with pET29a-GroE, named as *E. coli* BL (DE3)/pET29a-GroE. In SDS-PAGE, it was evident that the recombinant plasmid effectively expressed the polypeptides for GroES (10 kDa) and GroEL (60 kDa) in 0.5, 1 and 2 hours after IPTG induction. The immuno-reactivity of the expressed proteins were proved in mouse inoculation and Western blot analysis.

Key words : *B. abortus*, *groE* gene, nucleotides sequences, expression of *groE*

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-0000-0)의 지원을 받아 수행되었음.

*Corresponding author: Moo-Hyung Jun

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

[Tel: +82-42-821-6753, Fax: +82-42-822-4216, E-mail: mhjun@cnu.ac.kr]

서 론

Brucella abortus(*B. abortus*)의 주요 항원물질로 lipopolysaccharide [8], outer membrane protein(OMP) [6], cell surface proteins(BCSP31) [12, 22] 및 heat shock proteins(HSPs) 등 [8, 19]이 알려져 있다. HSPs는 열 스트레스-단백이라고도 불리며, 온도, 자외선, 에탄올 등의 스트레스가 가해질 때 세포내에서 합성되는 것으로서 단백질 합성 과정에서 complex oligomeric protein의 조합 및 펩타이드 구조 형성에 작용하며, chaperone 또는 chaperonins이라고도 불린다 [10]. 이 단백질은 *Escherichia coli*를 위시하여 여러 가지 원핵세포와 진핵세포에서 증명되었으며 [4, 5, 11, 23], 보존적 염기서열에 의해 암호되며, 공통 항원결정기에 대한 면역반응을 일으켜 자가면역 질환 유발요인으로 작용하기도 하며, 세포내 감염된 병원균의 생존을 도와주는 기능을 하는 것으로 알려져 있다 [24]. 또한 세균의 HSPs는 감염된 숙주의 항원제시세포(antigen presenting cells)의 처리 과정을 거쳐 체액성 및 세포성 면역 반응을 유도하는 주요 항원결정인자로 작용한다 [3, 14, 16, 22].

B. abortus HSPs는 균을 42°C~46°C에서 2~3시간 고온 스트레스를 가했을 때 나타나며 70, 60, 18 및 10 kDa의 단백질들이 보고되었으며 [5, 21], 이 중 60 kDa의 GroEL과 10 kDa의 GroES는 GroE HSPs로 불리운다. GroEL은 숙주 면역반응 잠재력이 가장 높고 GroES는 GroEL기능의 cofactor로 작용하는 것으로 알려져 있다 [1, 2, 9]. *B. abortus*의 GroES와 GroEL을 암호화하는 *groES*와 *groEL* 유전자는 염색체 상에 인접해서 위치하고 있으며 단백질 합성에 관련된 operon과 promoter 및 terminator sequence를 가지고 있다 [15].

최근 GroEL은 *Legionella pneumophila*, *E. coli*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* 및 *Yersinia enterocolitica*와 같은 병원성 세균에 대한 숙주의 방어기전에서 여러 가지 싸이토키인의 분비를 증가시키고, 세포 매개성 면역와 체액성 면역 반응을 유지시키는 중요한 기능을 한다고 보고된 바 있으며 [4, 11], *B. abortus*에서도 이 세포성분이 체액성 및 세포매개성 면역반응을 증진시키는 항원 단백질이라는 사실이 알려졌다 [15-17, 19]. 따라서 이들 균에 대한 *groE* 유전자의 염기서열 분석과 재조합 단백질 생산 및 기능에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다 [14, 17, 19].

*B. abortus*에서는 S19주의 *groE* operon의 클로닝과 염기서열을 분석하여 *E. coli*와 상동성을 비교한 바 있으며 [9], *B. abortus*의 HSPs는 CD4⁺ Th1 subset에 의한 감마-인터페론의 생산을 증대하여 대식세포의 기능을 향상시키고, CD8⁺ T 림프구에 의해 브루셀라균에 감염된

세포를 용해하는 기능을 증진시키는 면역원으로써 잠재력이 높기 때문에 재조합 subunit 항원 제조에 대한 연구가 수행된 바 있다 [1, 2].

본 연구에서는 국내 젖소로부터 분리된 *B. abortus* 5주와 표준균주를 공시하여 HSPs 중 면역원으로 중요한 GroES와 GroEL을 암호화하는 *groE* 유전자에 대해 PCR을 수행하고 *groE* 유전자의 염기서열과 아미노산 서열을 비교 분석하고, 아울러 이 유전자를 *E. coli*에서 발현하여 얻어진 단백질의 면역원성을 규명하기 위한 일련의 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시균 및 배양

국내에서 브루셀라 항체 양성으로 판정되어 살처분된 젖소의 유방상 림프절 및 우유로부터 분리되어 biovar 1으로 동정된 5주의 *B. abortus* KB4, KB5, KB6, KB7 및 KB8 주와 [13], 미국(National Animal Disease Center, NADC)로부터 분양 받은 *B. abortus*(biovar 1)를 참조균으로 공시하였다. 공시균은 Brucella broth(Difco, USA)와 Brucella agar(Difco, USA)를 이용하여 10% CO₂ 배양기(37°C)에서 3~5일 배양하였다.

Genomic DNA 추출

공시균을 Brucella broth에 접종하여 48시간 배양한 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 1회 세척하고 재부유시킨 균액을 -20°C에서 18시간 정치하였다. 균액을 4,000 g에서 3분간 원심한 후 침전물을 300 µl의 Single-detergent lysis buffer [50 mM Tris-Cl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 1% Triton X-100 또는 1% NP-40]에 부유한 다음 37°C에서 10분간 반응하였으며, 10% SDS 용액 150 µl를 첨가하여 실온에서 10분간 처리하였다. Phenol/chloroform/isoamyl-alcohol(P/C/I)를 동량 가하여 상층액을 취하고 100% 에타놀과 1/10배의 3M NaOAC(pH 5.2)를 가한 후 -70°C에서 30분간 정치하였다. 12,000 g에서 20분간 원심 침전시킨 후 75% 에타놀로 두 번 세척하고 건조하여 TE buffer에 재 부유시켰다. RNase(1 mg/ml) 5 µl와 proteinase K(10 mg/ml) 1 µl를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응한 다음 P/C/I를 동량 가한 후 동일한 방법으로 DNA를 추출하여 TE buffer 20 µl에 재용해하였다 [7].

Polymerase chain reaction(PCR)

Gor와 Mayfield [9] 그리고 Lin 등 [15]과 GenBank를 참고하여 *groE*에 대한 BGroE primer(product size: 2077 bp); BGroE(F) 5'-TAACACCA AGGGTTATACCATGGCTGA-3',

BGroE(R) 5'-TTTAGTCCATGGGCG A G CTTTATGGAC-3'를 제조하였으며, BGroE(R)에는 NcoI 인식부위를 만들기 위해 T를 C로 대체하였다. 핵산증폭은 genomic DNA 2 µl에 10×Ex Taq reaction buffer 5 µl, 25 mM MgCl₂ 10 µl, 2.5 mM dNTPs 4 µl, BGroE(F)와 BGroE(R) primer 각각 1 µl(100 pmol/µl)와 멸균증류수 26 µl를 첨가하고 Ex Taq polymerase(TaKaRa, Japan) 1 µl(1.25 unit/µl)를 가하여 총 50 µl가 되도록 한 후 잘 혼합하였다. Automated thermal cycler로 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 64°C에서 1분, 72°C에서 4분 동안 반응하는 일련의 과정을 30회 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다 [7, 13]. PCR 증폭 DNA는 1% ethidium bromide agarose gel을 이용하여 전기영동하였고 Image analyzer(Pharmacia, Sweden)로 판독하였다 [20].

DNA cloning

Sambrook 와 Russell [20]의 방법을 응용하여 수행하였으며, Subcloning vector로는 pGEM-T vector(Promega, USA)를 사용하였다. Insert DNA는 BGroE(F)와 BGroE(R) primers를 이용하여 증폭한 후 정제한 KB4주의 PCR 증폭 DNA를 사용하였다. Cloning vector로는 pET-29a plasmid vector(Novagen, USA)를 공시하였으며, groE 유전자를 클로닝하기 위해 NcoI (TaKaRa, Japan)으로 처리하여 linear vector로 만들고 자가융합을 억제시키기 위하여 56°C에서 1시간 calf intestine alkaline phosphatase (TaKaRa, Japan)로 처리하였다 [12, 20].

pGEM-T vector에 PCR 증폭 DNA를 융합시키기 위하여 Promega protocol을 이용하였으며, 얻어진 재조합 plasmid를 pET29a-GroE라 하였다. E. coli JM109 cell (Promega, USA)과 E. coli BL21(DE3) cell(Novagen, USA)을 융합된 pGEM-T vector와 pET29a-GroE로 형질 전환하기 위해 각각 공시하였다 [12, 20]. pET29a-GroE로 형질 전환된 균을 E. coli BL21(DE3)/pET29a-GroE,

pET-29a로 형질 전환된 것을 E. coli BL21(DE3)/pET-29a로 표기하였다.

핵산염기 및 아미노산 서열 분석

pGEM-T vector를 이용하여 groE 유전자를 클로닝한 plasmid DNA를 사용하였으며 Complement sequence를 위해 primers는 M13(F), M13(R)와 Clone Manager 6, version 6.00(Scientific & Educational Software, USA)를 이용하여 합성한 GroEseqF1, GroEseqR1, GroEseqF2, GroEseqR2, GroEseqF3, GroEseqR3를 사용하였다(Table 1). 염기서열 분석은 MacroGen Ltd. (Korea)에 위탁하여 수행하였다. Clone Manager 6, version 6.00(Scientific & Educational Software, USA)를 이용하여 핵염기 서열로부터 아미노산 서열을 결정하였으며, GenBank에서 얻어진 자료와 multialign에 의해 B. abortus 분리주의 groES와 groEL 유전자 염기서열을 B. abortus S19(Accession# M82975), B. abortus lambda-2001(Accession# M83930) 및 E. coli(Accession# X07850)와 비교 분석하였다.

E. coli system에서 groE 발현

pET29a-GroE로 형질 전환된 E. coli BL21(DE3)를 카나마이신(50 µg/ml)이 첨가된 LB agar에 도말접종하여 2~3 mm의 집락을 1개 선택하여 카나마이신(50 µg/ml)이 첨가된 LB broth 1 ml에 접종한 후 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 다시 카나마이신이 첨가된 LB broth 10 ml에 배양된 균액 50 µl를 접종하고 37°C에서 교반(200~250 rpm) 배양하면서 UV-분광광도계(흡광도 600 nm)에서 OD 0.6이 되면 배양액 1 ml를 1.5 ml 시험관에 채취하여 4°C에 보관하였고, 남은 배양액에 IPTG를 1.0 mM이 되도록 첨가하여 37°C에서 교반 배양하면서 0.5시간, 1시간 및 2시간 간격으로 1 ml의 배양액을 각각 채취하여 4°C에 보관하였다.

SDS-PAGE

채취된 배양액을 실온에서 12,000 g로 1분간 원심 침

Table 1. Primers for DNA sequencing of groE gene

Primers	Nucleotide sequences (5' to 3')	Size (mer)	Sequence position
GroEseqF1	TATCCTCGCTGACGCTGTTA	20	450~1000
GroEseqF2	GTCGCCTTACTTCGTACCA	20	987~1503
GroEseqF3	GATCAAGCAGCAGATCGAAG	20	1431~2028
GroEseqR1	TAACAGCGTCAGCGAGGATA	20	469~1
GroEseqR2	CGAAGTAAGGCGACAGGTAG	20	1000~450
GroEseqR3	GAGCTTGGCAAGACGTTCTCT	20	1503~987
M13(F)	CAGGAAACAGCTATGAC	17	1~2028
M13(R)	GTTTCCAGTCACGAC	17	2028~1

전하고 상층액을 제거한 후 1×SDS gel-loading buffer [50 mM Tris-Cl(pH 6.8), 100 mM dithiothreitol, 2%(w/v) SDS, 0.1% bromophenol blue, 10%(v/v) glycerol] 100 μ l 를 첨가하여 100°C에서 3분간 끓인 후 12,000 g로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 시험하였다. Tris-glycine electrophoresis buffer를 사용하여 80 V에서 30분간 전처리 한 후 시료를 넣고 150 V에서 2시간 정도 전기영동 하였다. 분자량을 측정하기 위해 pre-stained protein ladder (10 kDa - 190 kDa, Invitrogen, USA)를 사용하였고 전기영동이 완료된 겔을 떼어내 염색액 [Coomassie brilliant blue R-250 0.25 g, methanol 50 ml, H₂O 40 ml, acetic acid 10 ml]에 1시간 염색한 후 탈염색액 [methanol 30%, H₂O 60%, acetic acid 10%]으로 탈색시켜 관찰하였다 [20].

마우스 접종 및 GroE 특이항체 제조

Roop 등 [19]의 방법을 응용하여 수행하였다. *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE를 카나마이신(50 μ g/ml)이 첨가된 LB broth(5 ml)에서 진탕 배양한 후 IPTG를 1 mM 이 되도록 첨가하고 37°C에서 2시간 진탕 배양하였다. 이를 멸균식염수로 3회 세척한 후 초음파분쇄기(Sonics, USA)에서 60% 동력으로 10분간 처리를 하여 세포용출물을 작제하였다. 세포용출물과 incomplete Freund's adjuvant(Sigma, USA)를 1:1의 비율로 혼합한 것을 0.2 ml 씩 마우스(BALB/c) 피하에 접종하였고, 그 후 8일 간격으로 2회 추가 접종하였으며, 마지막 접종 후 10일 째에 채혈, 혈청 분리하여 -20°C에 보관하였다. *E. coli* 관련 항체 및 비특이 항체를 제거하기 위해 *E. coli* BL21(DE3)/pET-29a를 위와 같은 방법으로 배양하여 세포용출물을 제조하였다. 마우스 혈청(1 vol.)과 준비된 세포용출물(10 vol.)을 혼합하여 37°C에서 3시간 반응시킨 후 15,000 g에서 30분간 냉장 원심분리하여 상층액을 취하는 과정을 2회 반복한 다음 0.2 μ m syringe filter로 여과하였다. 얻어진 특이항혈청은 Western blot 시험에 공시하였으며, 또한 이 혈청에 대해 *B. abortus* 시험관 응집반응 진단액(국립수의과학검역원)을 이용한 항체검사와 Western blot 시험으로 발현된 GroE 단백질의 면역원성을 측정하였다.

Western blot

XCell II Blot Module(Invitrogen, USA)과 DAB substrate kit(Vector, USA)를 이용하였다. SDS-PAGE가 완료된 겔과 니트로셀룰로오즈막(Osmonics, USA)과 블로팅 판을 설치하고 25 V로 3시간 블로팅한 후, 니트로셀룰로오즈막을 꺼내어 blocking solution [10 mM Tris-Cl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05%(v/v) Tween 20, 5% Skim milk(Difco, USA)]에 담가 37°C에서 1시간 반응하

고 PBST[1.37 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.05%(v/v) Tween 20]로 5분간 3회 세척하였다. 그 다음 준비된 특이항체로 37°C에서 1시간 반응시킨 후 위와 같은 방법으로 세척하고, goat anti-mouse IgG HRP conjugate(Sigma, USA)를 1시간 반응시켰다. 그리고 다시 세척한 후 DAB substrate (5 ml)와 1분간 반응한 후 멸균증류수를 이용하여 세척하였다.

결 과

PCR에 의한 분리균주의 유전자 확인

BGroE primer를 이용하여 *B. abortus*(biotype 1) 및 5주의 국내분리 *B. abortus* 균 그리고 *B. abortus* RB51주의 DNA 추출물에 대해 PCR을 실시하였던 바, 참조균주 및 분리주 모두 2,077 bp의 특이 밴드가 관찰되었다 (Fig. 1).

groE 유전자의 클로닝

pET29a-GroE plasmid를 *Nco*I과 *Eco*RI 제한효소로 처리하여 1% agarose gel에 전기영동하여 2.0 kb와 1.7 kb 크기의 증폭된 DNA 밴드가 관찰되어 *groE* 유전자의 조합 상태를 확인하였으며, T7 promoter primer (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3')를 이용하여 염기서열 분석 결과 *Nco*I 인식부위에 정확히 삽입된 것이 검증되었다.

GroE 유전자의 염기 및 아미노산 서열 비교

GroE를 구성하는 *groES*(297 bp)와 *groEL*(1,641 bp)의 염기서열을 국내분리균 5주와 *B. abortus* S19 및 *B. abortus* lambda-2001를 비교하였던 바, *groES*의 염기서열은 7주 모두 완전 일치(100%)하였고 *E. coli*와는 59.9%의 상동성을 나타내었다. *groEL*은 국내분리균 5주와 *B.*

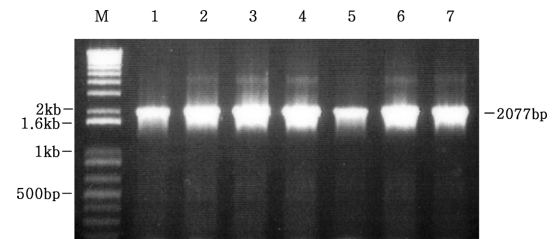


Fig. 1. Amplification patterns of *groE* in the various strains of *B. abortus* by PCR using BGroE primers. M: 1 kb DNA ladder marker, Lane 1: reference strain, *B. abortus* (biovar 1), Lane 2: *B. abortus* (RB51), Lane 3, 4, 5, 6 and 7: *B. abortus* isolates KB4, KB5, KB6, KB7 and KB8.

abortus S19 및 *B. abortus* lambda-2001에 대해 각각 99.8~99.9% 및 99.0~99.1%의 높은 상동성을 나타냈다. 또한 *E. coli*와는 68.3~69.1%의 상동성을 나타내었다 (Table 2). *groES*와 *groEL*의 염기서열을 기초로 하여 10 kDa GroES를 구성하는 98개의 아미노산 서열과 60 kDa GroEL을 구성하는 546개의 아미노산 서열을 결정하여 비교하였던 바(Fig. 2 및 3), GroES는 *B. abortus* S19, *B. abortus* lambda-2001 및 분리균주 모두 100% 일치하였다(Fig. 2). GroEL은 국내분리균주와 *B. abortus* S19 및 *B. abortus* lambda-2001와 비교에서 98.0~100%의 높은 상동성을 나타냈다. 또한 *E. coli*와는 66.6~67.7%의 상동성을 나타내었다(Table 2).

GroE 단백질 발현

E. coli BL21(DE3)/pET29a-GroE의 GroES와 GroEL 단백질 발현 상태를 규명하기 위해 IPTG 유도 후 0, 0.5, 1 및 2시간에 *E. coli*를 수확하여 SDS-PAGE법으로 분석하였다. 그 결과 유도 후 0.5, 1 및 2시간 배양한 모든 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE에서 GroES와 GroEL 단백질로 추정되는 13 kDa과 60 kDa 크기의 밴드가 각각

Table 2. Homology comparison of the nucleotide and amino acid sequences of GroEL of *B. abortus* isolates and reference strains

Bacteria	Nucleotide sequence homology (%)		Amino acid sequence homology (%)	
	S19	lambda-2001	S19	lambda-2001
	Isolates			
KB4	1640/1641* (99.9)	1627/1641 (99.1)	545/546 (99.8)	537/546 (98.4)
KB5	1638/1641 (99.8)	1625/1641 (99.0)	543/546 (99.5)	535/546 (98.0)
KB6	1640/1641 (99.9)	1627/1641 (99.1)	546/546 (100)	538/546 (98.5)
KB7	1639/1641 (99.8)	1626/1641 (99.1)	544/546 (99.6)	536/546 (98.2)
KB8	1639/1641 (99.8)	1626/1641 (99.1)	544/546 (99.6)	536/546 (98.2)
<i>E. coli</i>	1138/1647 (69.1)	1125/1647 (68.3)	370/548 (67.7)	365/548 (66.6)

*No. of identity/No. of nucleotides or amino acids

<i>B. abortus</i> S19	1	MADIKFRPLHDRVVRRVESEAKTAGGIIIPDTAKEKPOEVEVVAAGAGA
<i>B. abortus</i> lambda-2001	1A.....
<i>B. abortus</i> KB4	1
<i>B. abortus</i> KB5	1
<i>B. abortus</i> KB6	1
<i>B. abortus</i> KB7	1
<i>B. abortus</i> KB8	1
<i>B. abortus</i> S19	151	RDEAGKLVPLDVKAGDRVLPFGKWSGTEVKIGGEDLLIMKESDILGIVG
<i>B. abortus</i> lambda-2001	151
<i>B. abortus</i> KB4	151
<i>B. abortus</i> KB5	151
<i>B. abortus</i> KB6	151
<i>B. abortus</i> KB7	151
<i>B. abortus</i> KB8	151

Fig. 2. A comparison of the deduced amino acid sequences of 10 kDa GroES protein of *B. abortus* isolates compared with two *B. abortus* reference strains. The spots indicate identical residues.

백 발현 상태를 규명하기 위해 IPTG 유도 후 0, 0.5, 1 및 2시간에 *E. coli*를 수확하여 SDS-PAGE법으로 분석하였다. 그 결과 유도 후 0.5, 1 및 2시간 배양한 모든 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE에서 GroES와 GroEL 단백질로 추정되는 13 kDa과 60 kDa 크기의 밴드가 각각

<i>B. abortus</i> S19	1	MAAKDVKFGRTAREKMLRGVDLADAVKVTLPKGRVWVIEKSPGAPRIT
<i>B. abortus</i> lambda-2001	1A.....
<i>B. abortus</i> KB4	1
<i>B. abortus</i> KB5	1
<i>B. abortus</i> KB6	1
<i>B. abortus</i> KB7	1
<i>B. abortus</i> KB8	1
<i>B. abortus</i> S19	151	KDGVSVAKEVELEDKFNMGAGMLREVASKTNDTAGDGTITATVLAQAIV
<i>B. abortus</i> lambda-2001	151
<i>B. abortus</i> KB4	151
<i>B. abortus</i> KB5	151
<i>B. abortus</i> KB6	151
<i>B. abortus</i> KB7	151
<i>B. abortus</i> KB8	151
<i>B. abortus</i> S19	301	QEGAKAVAAGMFMPLDKRGDLDLAVNEVVAELKAKKINTSEEVAQVGTI
<i>B. abortus</i> lambda-2001	301
<i>B. abortus</i> KB4	301
<i>B. abortus</i> KB5	301
<i>B. abortus</i> KB6	301
<i>B. abortus</i> KB7	301
<i>B. abortus</i> KB8	301
<i>B. abortus</i> S19	451	SANAABAEIGKMIAMQKVGNSVIVVEEAKTAETELVVEGSMQDFRGL
<i>B. abortus</i> lambda-2001	451K-Q.....
<i>B. abortus</i> KB4	451G.....
<i>B. abortus</i> KB5	451G.....
<i>B. abortus</i> KB6	451G.....
<i>B. abortus</i> KB7	451G.....
<i>B. abortus</i> KB8	451G.....
<i>B. abortus</i> S19	601	SPYFVTVNEPKMVALEDAYILLHEKKLSNLQALLPVAEAVQTSKPLLI
<i>B. abortus</i> lambda-2001	601
<i>B. abortus</i> KB4	601
<i>B. abortus</i> KB5	601
<i>B. abortus</i> KB6	601
<i>B. abortus</i> KB7	601
<i>B. abortus</i> KB8	601
<i>B. abortus</i> S19	751	AEDVDEALATLVNKLKRGGLIAAVKAPGFGDRKAMLEIAIILTGQV
<i>B. abortus</i> lambda-2001	751R.....R.....R.....
<i>B. abortus</i> KB4	751
<i>B. abortus</i> KB5	751
<i>B. abortus</i> KB6	751
<i>B. abortus</i> KB7	751
<i>B. abortus</i> KB8	751
<i>B. abortus</i> S19	901	ISEDGIKLESVTLMLGRAKVSISKENTTIVDAGAKAEIDARVQGIK
<i>B. abortus</i> lambda-2001	901
<i>B. abortus</i> KB4	901
<i>B. abortus</i> KB5	901
<i>B. abortus</i> KB6	901
<i>B. abortus</i> KB7	901
<i>B. abortus</i> KB8	901
<i>B. abortus</i> S19	1051	QQIEETSDVDREKIQERLAKLAGGAVIVRGSGATEVEVEKKEKORVDDAL
<i>B. abortus</i> lambda-2001	1051
<i>B. abortus</i> KB4	1051
<i>B. abortus</i> KB5	1051
<i>B. abortus</i> KB6	1051
<i>B. abortus</i> KB7	1051
<i>B. abortus</i> KB8	1051
<i>B. abortus</i> S19	1201	NATRAAVEEIGIVAGGTALLRASTKIITAKGVNAQEPAGINIVRAIQAIPA
<i>B. abortus</i> lambda-2001	1201
<i>B. abortus</i> KB4	1201D.....
<i>B. abortus</i> KB5	1201
<i>B. abortus</i> KB6	1201
<i>B. abortus</i> KB7	1201
<i>B. abortus</i> KB8	1201
<i>B. abortus</i> S19	1351	RQITTNAGEEASVIVGKILENTSETFGYNTANGEYGDLSLGLIVDPKVV
<i>B. abortus</i> lambda-2001	1351
<i>B. abortus</i> KB4	1351
<i>B. abortus</i> KB5	1351P.....
<i>B. abortus</i> KB6	1351
<i>B. abortus</i> KB7	1351
<i>B. abortus</i> KB8	1351
<i>B. abortus</i> S19	1501	RTALQNAASVAGLLITTEAMIAELPKKDAAPAGMFGMGGMGMDNF
<i>B. abortus</i> lambda-2001	1501
<i>B. abortus</i> KB4	1501
<i>B. abortus</i> KB5	1501
<i>B. abortus</i> KB6	1501
<i>B. abortus</i> KB7	1501
<i>B. abortus</i> KB8	1501

Fig. 3. A comparison of the deduced amino acid sequences of 60 kDa GroEL protein of *B. abortus* isolates compared with two *B. abortus* reference strains. The spots indicate identical residues. The dashes indicate empty residues.

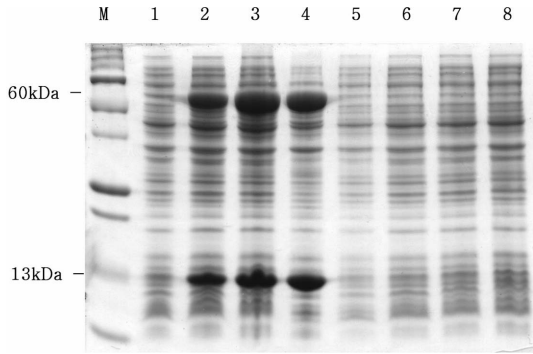


Fig. 4. SDS-PAGE profile of the *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE and *E. coli* BL21(DE3)/pET29a. M: Molecular weight marker. Lane 1~4: *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE, Lane 5~8: *E. coli* BL21(DE3)/pET29a. IPTG induction: Lane 1 and 5; 0 hr, Lane 2 and 6; 0.5 hr, Lane 3 and 7; 1 hr, Lane 4 and 8; 2 hrs.

관찰되었다. 대조군으로 공시한 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a에서는 13 kDa과 60 kDa에서 밴드가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

E. coli BL21(DE3)/pET29a-GroE를 면역시킨 마우스 항혈청과 비특이항체를 제거한 GroE 특이항체를 공시하여 Western blot을 실시하였다. 흡수처리 안된 혈청으로 반응시킨 경우 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE에서는 GroEL에 해당되는 60 kDa과 GroES에 해당되는 13 kDa에서 IPTG 유도 후 0.5, 1 및 2시간에서 모두 강한 밴드가 관찰되었으며 14~15개의 비특이 밴드가 관찰되었다. 또한 대조군 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a에서는 60 kDa과 13 kDa에서는 밴드가 없었으나 10~12개의 비특이 밴드가 관찰되었다(Fig. 5). 비특이항체를 제거한

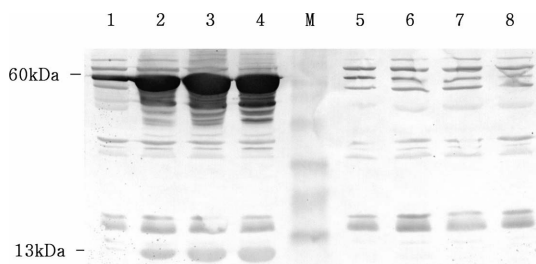


Fig. 5. Western blot analysis of the proteins expressed in *E. coli* BL21(DE3) with mouse serum hyperimmunized with *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE. M: Molecular marker. Lane 1~4: *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE, Lane 5~8: *E. coli* BL21(DE3)/pET29a. IPTG induction: Lane 1 and 5; 0 hr, Lane 2 and 6; 0.5 hr, Lane 3 and 7; 1 hr, Lane 4 and 8; 2 hrs.

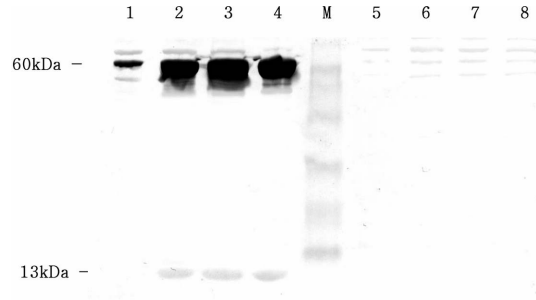


Fig. 6. Western blot analysis of the proteins expressed in *E. coli* BL21(DE3) with GroE-specific mouse serum. M: Molecular marker. Lane 1~4: *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE, Lane 5~8: *E. coli* BL21(DE3)/pET29a. IPTG induction: Lane 1 and 5; 0 hr, Lane 2 and 6; 0.5 hr, Lane 3 and 7; 1 hr, Lane 4 and 8; 2 hrs.

특이항체를 처리하여 수행한 Western blot 시험에서는 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE의 경우 13 kDa과 60 kDa에서 IPTG 유도 후 0.5, 1 및 2시간에서 모두 특이 밴드가 관찰되었으며, 발현 강도는 IPTG 처리 후 1시간에서 가장 강하게 나타났다. 대조군에서는 밴드가 관찰되지 않았다(Fig. 6).

발현 GroE 단백질의 면역원성

IPTG 처리 후 2시간된 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-

Table 3. Immunogenicity of the GroE protein expressed in *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE in mice

Groups	No. of mice immunized ^{a)}	Sera ^{b)}				
		Agglutination test		Western blot		
		1/50	1/100 ^{c)}	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a-GroE	30	-	-	+/+*	+/+	+/-
Control**	5	-	-	-/-	-/-	-/-
Control(saline)	5	-	-	-/-	-/-	-/-

^{a)}The mice were immunized with the lysate of *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE mixed with incomplete Freund's adjuvants.

^{b)}The specific sera were prepared by absorption with the lysates of *E. coli* BL21(DE3)/pET29a.

^{c)}Dilution rates of the pooled sera of 10 mice. The experiments were triplicated.

*The reactivity for GroEL/GroES was represented.

**The mice were administered with incomplete Freund's adjuvants only.

GroE의 세포용출액으로 면역하여 얻은 마우스 특이혈청에 대해 *B. abortus* 응집반응을 수행한 바 모두 음성이었으며, Western blot으로 시험한 바 혈청희석배수 10^{-3} 과 10^{-4} 에서는 GroEL 및 GroES에서 양성반응이 나타났고, 10^{-5} 에서는 GroEL은 양성 그리고 GroES는 음성으로 나타났다(Table 3). Incomplete Freund's adjuvants와 식염수를 접종한 대조군은 모두 음성이었다.

고 찰

*B. abortus*의 방어면역에 작용하는 항원물질 중 하나로 알려진 GroE HSPs은 체액성 면역과 세포성 면역을 유도하며, *B. abortus*가 식세포 내에서 생존 증식하는데 필요한 GroES나 GroEL를 포함하고 있기 때문에 중요한 항원 단백질로 간주되고 있다 [3, 8, 16, 22]. Oliveira 등 [17]은 *E. coli* maltose binding protein에 융합된 재조합 *B. abortus* GroEL은 높은 수준의 IL-2 생산을 유도했으며, *B. melitensis* Rev. 1에 감염된 기니피크의 foodpad에 재조합 GroEL을 투여했을 때 강한 지연형 과민반응을 일으킨다는 사실을 보고하였다. 그리고 Lin 등 [16]은 *E. coli*에서 발현된 재조합 *B. abortus* GroEL 단백질이 *B. abortus* S19로 면역된 마우스 혈청과 Western blot 분석에서 강한 양성반응을 나타내며, 이러한 성적을 기초로 *B. abortus*의 GroEL은 체액성 면역와 세포성 면역을 유도하는 중요한 항원 물질임을 지적한 바 있다. 그러나 아직 GroE HSPs의 생물학적 성상 및 면역학적 작용기전에 대해 밝혀지지 않은 점이 많아 이에 대해 활발한 연구가 추진되고 있다.

본 연구에서는 국내에서 분리된 *B. abortus*균으로 GroE를 암호하는 *groE* 유전자를 PCR로 증폭하고, 염기서열과 아미노산 서열을 규명하여 얻어진 결과를 *Brucella* 표준균주와 비교 분석하였으며, 아울러 이 유전자를 *E. coli*에 클로닝하고 GroE 단백을 발현하여 GroES 및 GroEL를 작제할 수 있는 기초를 확립하였다. BGroE primer는 *groES*와 *groEL*를 함께 증폭시킬 수 있도록 작제하였으며, BGroE(R) primer에는 *NcoI* 인식 부위를 만들어 pET-29a plasmid vector에 *groE*를 효과적으로 재조합할 수 있도록 하였다. PCR 시험에서 표준균주와 분리균주 모두 2,077 bp의 특이 DNA 절편이 증폭됨을 확인할 수 있었다.

PCR로 증폭된 DNA를 pGEM-T plasmid vector에 subcloning하고 *NcoI* 제한효소 처리에 의해 얻어진 2.0 kb의 DNA를 pET-29a plasmid vector에 삽입하여 pET29a-GroE plasmid를 작제하였다. pET-29a plasmid vector는 강력한 T7 lac promoter를 가지고 있으며 목적 유전자를 하류에 삽입하며 *E. coli* BL21(DE3)에서 공급하는 T7

RNA polymerase에 의해 전사되며 T7 RNA polymerase 유전자(λ DE3 lysogen)는 *E. coli* BL21(DE3) 염색체에 도입되어 있고 *lacUV5 promoter*의 하류에 위치하고 있어서 IPTG의 첨가에 의한 유도로 발현을 조절할 수 있도록 설계되어 있다. 또한 multicloning site의 *NcoI* 인식 부위가 methionin을 암호하는 개시 codon과 일치하기 때문에 불필요한 아미노산이 발현되지 않는 장점을 가지고 있으므로 본 시험에 이용하였다. 또한 *groES*와 *groEL*은 90 bp 정도의 거리를 두고 있으며 각각 개시 codon과 종말 codon을 가지고 있다 [9, 15]. pBR322 또는 pUC plasmid에서 파생된 expression vector에서는 하나의 origin으로 GroES와 GroEL과 같은 chaperone을 동시에 발현시킬 수 있는 것으로 알려져 있으며, pET-29a plasmid vector도 GroES와 GroEL을 동시에 발현시킬 수 있다 [10]. 그러나 추후 정제 및 발현의 효능을 높이기 위해 pMal vector를 이용하거나 [14], 진핵세포 [1, 14]를 이용한 GroEL의 발현에 대한 연구를 수행해야 한다고 생각된다.

본 시험에서 297 bp의 *groES*와 1,641 bp 크기의 *groEL*의 염기서열을 밝히고, 분리균주와 *B. abortus* S19 및 *B. abortus* lambda-2001와 비교 분석하였다. 그 결과 strain 간 GroES와 GroEL의 염기 및 아미노산 서열은 높은 상동성과 유전적 보존성이 확인되었다(Figs. 2, 3 및 Table 2). 또한 *E. coli*의 *groES*와 *groEL*의 아미노산 서열을 *B. abortus*균과 비교한 바 49.0~59.9% 및 66.6~69.1%의 상동성을 각각 나타내었고, 특히 GroEL의 아미노산 구조는 *E. coli*와 67.9% 일치하고, *Mycobacterium tuberculosis* 등과 59% 이상의 상동성이 있으며, 부루셀라증의 방어 면역에 주요한 역할은 한다고 보고한 Roop 등 [19] 및 Lin 등 [16]의 성적과 깊은 연관성이 있다고 추정된다.

pET29a-GroE plasmid로 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3)/pET29a-GroE를 배양하고 IPTG로 유도한 후 얻어진 세포배양액에 대해 SDS-PAGE와 Western blot를 수행하여, GroES와 GroEL이 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었고, IPTG 유도 후 1~2시간이 적정 발현시간으로 판단되었다. SDS-PAGE에서 10 kDa 인 GroES가 13 kDa 정도로 약간 크게 나타난 것은 plasmid vector에 있는 S-Tag과 fusion protein이 발현되었기 때문이라 생각되었다. 이들 S-Tag과 fusion protein은 발현된 단백을 정제하거나 Western blot으로 검색할 경우 반응성을 높이는 데 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Western blot에 공시한 GroE 특이항체는 흡착제 제거가 진행됨에 따라 *E. coli* BL21(DE3)항체에 기인된 비특이반응이 감소되고 GroE 단백질에 대한 특이성이 증가되는 것을 Western blot 시험에 의해 확인할 수 있었다 (Fig. 5 및 6). 또한 마우스에 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-

GroE를 접종하여 얻어진 혈청에서 높은 수준의 GroES와 GroEL 항체가 Western blot에서 확인되어 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE가 효과적으로 GroE 단백을 발현한다는 사실을 확인할 수 있었다. 그러나 소부루셀라 증 시험관응집반응용 항원에 대해서는 항체가 전혀 인정되지 않았다(Table 3). 이와 같은 결과는 GroE HSPs는 약독생균백신에서 자주 제기되는 *B. abortus* lipopolysaccharides의 O side chain 항원에서 유발되는 응집항체 문제와 백신과 야외감염에 기인된 항체를 감별할 수 있는 가능한 대안적 항원이라고 제시한 선행 연구들과 관련성이 있다고 생각된다 [2, 18, 19, 22]. GroE 단백을 보다 효과적으로 발현하고 정제할 수 있는 시스템을 구축하고, GroE의 항원성과 면역방어기전에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

*B. abortus*균의 방어면역에 작용하는 heat shock proteins의 일종인 GroE를 암호하는 *groE(groEL/groES)* 유전자를 PCR법으로 증폭하고, 염기서열과 아미노산 서열을 규명하여 *Brucella* 표준균주와 국내 분리주 간의 상동성을 비교 분석하였다. 또한 *groE*를 *E. coli*에서 클로닝하고 발현된 GroE 단백질의 면역원성을 시험하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

(1) BGroE primers를 이용하여 PCR을 수행한 바, 공시한 참조균주 *B. abortus*(biovar 1)와 *B. abortus* RB51 그리고 5주의 국내분리 *B. abortus*에서 2,077 bp 크기의 DNA가 증폭되었다. PCR에 의해 증폭된 2,077 bp의 DNA를 재조합한 pET29a-GroE plasmid를 작출하였고, 삽입된 *groE* 유전자를 *NcoI*과 *EcoRI* 처리와 염기서열 분석을 통해 확인하였으며, 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE를 작제하였다.

(2) 국내 분리균주의 *groES* 및 *groEL* 유전자의 염기서열을 밝히고, 분리균주와 *B. abortus* S19 및 *B. abortus* lambda-2001과 비교 분석하였다. 그 결과 GroES는 염기서열과 아미노산 서열이 100% 일치하였으며, GroEL은 염기서열이 99.0~99.9%, 아미노산 서열이 98.0~100%로 높은 상동성을 나타내었다.

(3) SDS-PAGE와 Western blot법으로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE에서 GroES와 GroEL 단백질로 인정되는 약 10 kDa과 60 kDa의 밴드가 확인되었으며, 발현도는 IPTG로 유도한 후 1~2시간째에 가장 높았다. *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-GroE 세포용출액으로 면역된 마우스 혈청에서 GroEL과 GroES에 반응하는 높은 항체가 Western blot에서 관찰되었으며, 응집항체는 음성이었다.

참고문헌

1. Bae JE, Toth TE. Cloning and kinetics of expression of *Brucella abortus* heat shock proteins by baculovirus recombinants. *Vet Microbiol* 2000, **75**, 199-204.
2. Bae JE, Schurig GG, Toth TE. Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins. Use of baculovirus recombinant-expressing whole insect cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. *Vet Microbiol* 2002, **88**, 189-202.
3. Baloglu S, Toth TE, Schurig GG, Sriranganathan N, Boyle SM. Humoral immune response of BALB/c mice to a vaccinia virus recombinant expressing *Brucella abortus* GroEL does not correlate with protection against a *B. abortus* challenge. *Vet Microbiol* 2000, **76**, 193-199.
4. Blander SJ, Horwitz MA. Major cytoplasmic membrane protein of *Legionella pneumophila*, a genus common antigen and membrane of the HSP60 family of heat shock proteins, induces protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires disease. *J Clin Invest* 1993, **91**, 717-723.
5. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998, **92**, 351-366.
6. Dubray G, Charriat C. Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. *Ann Rech Vet* 1983, **14**, 311-318.
7. Gallien P, Dorn C, Alban G, Staak C, Protz D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet Rec* 1998, **142**, 512-514.
8. Garin-Bastuji B, Bowden RA, Dubray G, Limet JN. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *J Clin Microbiol* 1990, **28**, 2169-2174.
9. Gor D, Mayfield JE. Cloning and nucleotide sequence of the *Brucella abortus groE* operon. *Biochim Biophys Acta* 1992, **1130**, 120-122.
10. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 1991, **66**, 191-197.
11. Hubbard RD, Flory CM, Collins FM. Immunization of mice with mycobacterial culture filtrate proteins. *Clin Exp Immunol* 1992, **87**, 94-98.
12. Hur JY, Kim JY, Song KH, Kim MC, Park CS, Kim

- TY, Kim JH, Jun MH.** Sequence analysis of the *omp2b* gene encoding 36 kDa outer membrane protein of *B. abortus* isolates. Korean J Vet Public Health 2003, **27**, 7-16.
13. **Kim JH, Chang KS, Kim S, Kim JY, Jun MH.** Detection of *Brucella spp.* using polymerase chain reaction. J Vet Sci CNU 1999, **7**, 13-24.
14. **Leclercq S, Harms JS, Rosinha GM, Azevedo V, Oliveira SC.** Induction of a th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. J Med Microbiol 2002, **51**, 20-26.
15. **Lin J, Adams LG, Ficht TA.** Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. Infect Immun 1992, **60**, 2425-2431.
16. **Lin J, Adams LG, Ficht TA.** Immunological Response to the *Brucella abortus* GroEL Homolog. Infect Immun 1996, **64**, 4396-4400.
17. **Oliveira SC, Harms JS, Banai M, Splitter GA.** Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. Cell Immunol 1996, **172**, 262-268.
18. **Roop RM, Fletcher TW, Sriranganathan NM, Boyle SM, Schurig GG.** Identification of an Immunoreactive *Brucella abortus* HtrA Stress Response Protein Homolog. Infect Immun 1994, **62**, 1000-1007.
19. **Roop RM, Price ML, Dunn BE, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG.** Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the gene encoding the immunoreactive *Brucella abortus* Hsp60 protein, BA60K. Microb Pathog 1992, **12**, 47-62.
20. **Sambrook J, Russell DW.** Molecular Cloning a Laboratory Manual. pp. 5.4-5.39, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
21. **Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW, Mayfield JE.** Role of immune responses to a GroEL heat shock protein in preventing brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. Comp Immun Microbiol Infect Dis 1997, **20**, 147-153.
22. **Toth TE, Cobb JA, Boyle SM, Roop MR, Schurig GG.** Selective humoral immune response of Balb/C mice to *Brucella abortus* proteins expressed by vaccinia virus recombinants. Vet Microbiol 1995, **45**, 171-183.
23. **Woolford J.** Chaperoning ribosome assembly. Mol Cell 2002, **10**, 8-10.
24. **Young RA, Elliott TJ.** Stress proteins, infection, and immune surveillance. Cell 1988, **59**, 5-8.