

## 파스튜렐라(A : 3) 균주의 재조합 외막단백질 H에 의한 가금 콜레라 감염 생쥐의 면역성 검정

김영환 · 양주성 · 권무식\*

성균관대학교 유전공학과  
(게재승인: 2006년 6월 2일)

### Protective immunity induced by recombinant outer membrane protein H of *pasteurella multocida* (A : 3) of fowl cholera in mice

Younghwan Kim, Joo-Sung Yang, Moosik Kwon\*

Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
(Accepted: June 2, 2006)

**Abstract :** *Pasteurella multocida* is a terrible veterinary pathogen that causes widespread infections in husbandry. To induce homologous and/or heterologous immunity against the infections, outer membrane protein Hs (OmpH) in the envelope of different strains of *P. multocida* are thought to be attractive vaccine candidates. Previously we cloned and characterized a gene for OmpH from pathogenic *P. multocida* (A : 3) (In Press, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 33, December). The gene is composed of 1,047 nucleotides (nt) coding 348 amino acids (aa) with signal peptide of 20 aa. The truncated *ompH*, a gene without nt coding for the signal peptide, was generated using pRSET A to name "pRSET A/OmpH-F2". This truncated *ompH* was well expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Truncated OmpH was purified for induction of immunity against live pathogen of fowl cholera (*P. multocida* A : 3) in mice. Some 50 µg of the purified polypeptide was intraperitoneally injected into mice two times with 10 day interval. Lethal dose (25 µl) of live *P. multocida* A : 3 was determined by directly injecting the pathogen into wild mice (n = 25). To demonstrate the vaccine candidate of the truncated OmpH, the live pathogen (25 µl) was challenged with the OmpH-immunized mouse group as well as positive & negative controls (n = 80). The results show that the truncated OmpH can be used for an effective vaccine production to prevent fowl cholera caused by pathogenic *P. multocida* (A : 3).

**Key words :** challenge, fowl cholera, OmpH, *pasteurella multocida* (A : 3), protective immunity, vaccination,

## 서 론

그람 음성균인 *P. multocida*는 100여년 전 Louis Pasteur가 면역화(immunization)에 관한 연구재료로 사용한 후 그 이름이 명명된 병원성 미생물이다. *P. multocida*는 돼지의 위축성 비염, 닭 등의 가금콜레라와 같은, 축산업

에 큰 피해를 입힐 수 있는 동물 감염원이다 [12, 29]. 오랜 기간 동안 이 병원균에 대한 면역화, 숙주 특이성, 병독성 및 발병원인 등에 대해 연구되어 왔지만, 실제로 분자 수준에서의 탐구는 가장 최근에 이루어지고 있으며, 안전하고 효과적인 백신의 개발은 *P. multocida*의 연구에 있어서 아직도 가장 큰 연구 영역이 되고 있다 [1,

\*Corresponding author: Moosik Kwon

Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
[Tel: +82-31-290-7861, Fax: +82-31-290-7870, E-mail: mskwon@skku.edu]

12]. 현재, *P. multocida*으로 유발되는 질병에 대한 연구는 부족한 상황이며, 가축 뿐 아니라 야생동물에게까지 감염되어, 그 병의 확산으로 인해 심각한 문제가 야기되고 있는 실정이다. *P. multocida*는 A, B, D, E, F의 다섯 가지 serogroup으로 나뉘며 [19], lipopolysaccharide antigen에 의해 16가지의 serotype으로 분류된다 [1]. 각 serotype 또는 serogroup에 따라 서로 다른 기주 생물(host)에 서로 다른 병원성을 나타내는데 [4, 7], 가금류의 가금콜레라의 경우에는 serogroup A, serotype 1, 3, 4가, 돼지의 위축성 비염의 경우에는 serogroup D, serotype 4가 주로 병원성을 나타내는 것으로 보고되고 있다 [5, 9, 12, 19].

Pasteurellosis를 예방하기 위해서 오래 전부터 vaccination에 의한 예방법이 시행되어 왔다. 현재 상용화되어 사용되는 백신은, 생독백신, heat-killed 또는 formalin-killed whole cell 백신이 대부분을 차지하고 있다 [32]. Whole-cell bacterin의 경우에는 serotype-specific protection을 보이므로 다양한 종류의 *P. multocida*에 대한 저항성을 부여하기에는 어려움이 있으며, 생독 백신에서는 다른 strain에 대한 방어효과는 높일 수 있으나, 역으로 변이에 의하여 가금콜레라가 유발되는 경우도 보고되어 있다 [2, 10, 11].

그람 음성 미생물의 외막에 transmembrane 형태로 존재하는 porin 단백질은 박테리아의 작은 친수성 분자들이 세포막을 통과하여 세포 외부로 확산되는 통로의 역할을 하거나, bacteriophage 또는 bacteriocin의 수용체 역할을 하여, 항원으로써 높은 면역력을 가지고 있다는 것이 이전 실험을 통해 유추되어 왔다 [12, 21, 23]. 또한 porin 단백질은 철분의 흡수와 관련된 기능을 하는 단백질으로써, *P. multocida*를 비롯한 감염성 미생물이 철분 제한 조건에서 배양되었을 때, 그 미생물의 외막 단백질이 과발현된다는 보고가 있다 [6, 20]. Porin 단백질은 homotrimer로써, 단량체의 분자량이 37-43 kDa로 다양하게 보여지고 있다. 이 단백질의 유전자 및 아미노산의 배열이 종 간에 잘 보존되어 있으며, 종 간에서 높은 상동성을 나타내므로 porin은 매우 효과적인 백신의 후보로서, 다양한 종류의 그람 음성 박테리아의 감염에 대한 저항성을 나타낼 수 있다 [3, 22]. 이번 실험에서는 porin 단백질 중 이미 효과적인 백신 후보로 알려진 외막단백질 H(OmpH)에 대한 유전자를 클로닝하여 제조된 OmpH 항원단백질을 이용하여 면역화를 시킨 후, 활성이 있는 *P. multocida*를 치사량만큼 투여하였다. 그 결과로써, 제조된 OmpH 단백질이 백신으로 작용하였을 때 현재 상용화된 백신과 비교하였을 때 병원균에 대하여 어느 정도의 면역성을 갖게 되는지를 살펴볼 것이다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

*Pasteurella multocida* A:3는 Sheep's blood(5%)가 포함된 BHI(Bacto brain-heart infusion, Difco, USA) 한천 배지 상에서, CO<sub>2</sub>(5%) incubator에 24시간 배양(37°C) 한 후, 대량의 BHI 액체 배지에서 동일조건으로 교반 배양되었다[10]. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 와 BL21(DE3) 균주는 LB media(Difco, USA)에서 배양되었다.

### 유전자 *ompH*의 클로닝 및 발현벡터 제작

이미 밝혀진 *ompH* 유전자를 BLAST sequence database에서 검토하여 *ompH* 유전자의 앞뒤에 위치한 염기서열로 제작한 F1 및 R1 시발체와, F1과 R1 시발체에 특정 restriction enzyme site (*Bam*HI, *Kpn*I)를 포함하고 있는 F2, R2 시발체를 제작하였다. PCR은 95°C에서 5분 pre-heating 후, 95°C 1분, 56°C 30초, 72°C 30초씩 35회 반복 후 마지막 elongation step을 72°C 3분 반응한 뒤 8°C에서 반응을 종료시켰다 [29].

PCR로 증폭된 *ompH* 유전자를 추출한 뒤(Gel Extraction Kit; Qiagen, U.S.A.) pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 삽입하여(T4 DNA ligase; Takara, Japan) *E. coli* DH5 $\alpha$  strain으로 형질전환하였다. 형질전환된 균주를 선별한 뒤 *ompH*-F2, -R2 시발체를 이용하여 sub-PCR을 수행하였다. PCR strategy는 annealing temperature만 64인 것 외에는 모두 동일했다. PCR 산물은 다시 pGEM-T\* easy vector에 sub-cloning되었다. Sub-cloning된 *ompH* 유전자는 *Bam*HI과 *Kpn*I으로 처리한 뒤, pRSET A expression vector(Invitrogen, USA)에 sub-cloning 되어 pRSET A/*ompH*-F2 벡터를 제작했다.

### OmpH 단백질 발현 및 정제

OmpH 단백질의 발현은 34°C에서 0.5 mM의 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG) induction을 수행한 후 overnight 배양하여 이루어졌다. 대조군으로 사용하기 위하여 pre-induction의 균주와 overnight 배양 후의 균주를 1 ml씩 준비하였다. Overnight동안 배양된 균주는 10,000 g로 20분간 4°C에서 원심분리된 후 균주 1그램 당 5 ml의 10 mM imidazole, pH 8.0의 lysis buffer에서 현탁되었다. 이 균주를 초음파 파쇄한 뒤 그 용해물을 10,000 g로 20분간 4°C에서 원심분리하여 상등액과 펠렛을 분리하였다. 분리된 펠렛으로부터 지용성인 denaturing condition 단백질을 분리해 내기 위해 8 M urea, pH 8.0의 lysis buffer에서 overnight동안 교반된 후 10,000 g에서 20분간 4°C에서 원심분리하여 상등액을 획득하였다.

OmpH 단백질을 정제하기 위하여, nickel-nitrilotriacetic

acid resin(Ni-NTA; Qiagen, Germany)을 사용하였다. 분리된 denaturing condition OmpH 단백질 현탁액을 컬럼에 넣어주어 실온에서 6시간 가량 Ni-NTA resin에 binding시켰다. Flow Through(FT) 샘플을 받은 뒤, 3회의 washing 과정을 거쳐 불필요한 단백질을 제거하였다. 마지막 단계로, 3 M의 denaturing condition elution buffer(8 M urea, pH 4.5)로 1시간 30분씩 총 2회 반응시켜, 단백질을 분리하였다. Elution buffer로 분리된 샘플은 Econo-Pac 10DG disposable column(BIO-RAD, USA)을 사용하여 phosphate buffered saline(PBS)로 용매를 교환하여 SDS-PAGE를 통하여 확인하였으며, Bradford 분석법을 이용하여 UV 595 nm에서 농도를 측정하였다.

### Mouse에서 anti-OmpH 항체 생산

면역원으로써의 정제된 OmpH 단백질은 OmpH 면역혈청을 얻기 위하여 mouse에 주사하였다. 5에서 7주령 사이의 80마리의 female albino ICR 쥐를 20마리씩 무작위로 4그룹으로 나누었다. 각 그룹별로 PBS(음성 대조군), formalin-killed cell(양성 대조군), OmpH 단백질을 각각 주사하였으며 마지막 그룹은 아무것도 처리하지 않았다. 청결을 위해 cage 내부는 매주 교체하여 주었다 [18]. 각각의 쥐에서 전-면역 혈청을 분리하였으며, 3일 후, 50 µg씩의 OmpH 항원과 동량의 Freund's Complete Adjuvant(FCA; Sigma, USA)을 복막내 주사(IP)하였다. 동시에 양성 대조군으로써, 영양배지에 도달했을 때 활성이 검증되지 않은 *P. multocida*의 formalin-killed whole cell을 FCA와 동량 혼합하여 주사하였다 [6]. 음성 대조군 역시 PBS와 동량의 FCA의 혼합물을 주사하였다. 1주일 후 모든 쥐에서 eye-bleeding을 통해 각 마리당 100 µl 가량의 전혈을 확보하여, 4°C에서 6시간 보관하며 혈액응고를 유도한 뒤, 3000 rpm에서 20분간 원심분리를 통해 혈구 성분을 제거하여 1차 혈청을 획득하였다. 2차 면역화는 1차 면역화로부터 10일 후에 실시하였으며, 역시 7일 뒤에 채혈을 실시하여 2차 혈청을 확보하였다 [23].

### ELISA

Immunoglobulin G의 역가는 ELISA를 통해 측정되었다. 정제된 5 ml의 OmpH 재조합 단백질을 coating buffer와 혼합하여 96 well plate에서 각 well 당 100 µl씩 넣어 준 뒤 37°C에서 1시간 반응시켰다. Polyxyethylene sorbitan monolaurate가 0.05% 혼합된 PBS(PBST; Tween-20, Dae-Jung, Korea)를 200 µl씩 사용하여 각 well의 세척 과정을 거친 후, PBST에 3%의 BSA를 첨가한 용액을 각 well 당 200 µl씩 분주하여 4°C에서 16시간 반응시켰다. 1차 항체를 제작하기 위해 1%의 BSA가 녹아

있는 PBS와, 1/1000으로 희석된 항혈청을 혼합한 뒤, 각 well 당 100 µl 씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 200 µl의 PBST로 5회 세척하여 주었다. 단, 전-혈청 시료는 1/100으로 희석하여 사용하였다. 2차 항체로는, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma, USA)를 PBST와 함께 1/10,000으로 희석한 시료를 각 well 당 100 µl 씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 5회 세척하였다. 마지막 단계로, dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹아 있는 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) 시약을 phosphate-citrate buffer와 1:10의 비율로 혼합한 뒤, 각 well 당 10 µl 씩 분주하여 넣은 후 30분 간 반응시킨 뒤 흡광도를 650 nm에서 측정하였다.

### Vaccination

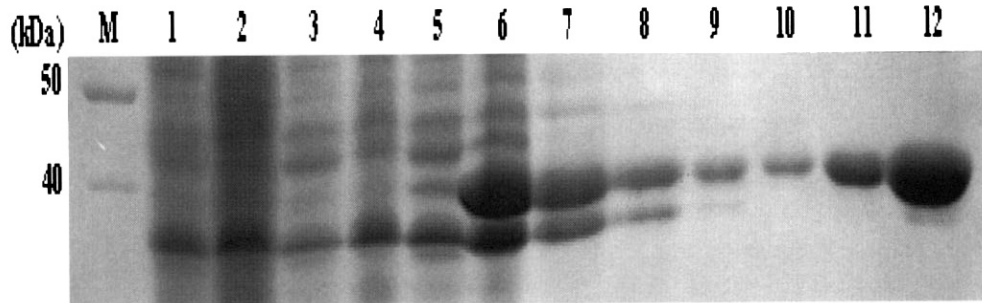
활성을 가지고 있는 *P. multocida*의 lethal dose 100% (LD<sub>100</sub>)의 조건을 설정하기 위해, 면역화되지 않은, wild 상태의 25마리의 쥐를 무작위로 5개 cage로 나눈 후, 각 cage의 쥐에 A<sub>410</sub>에서 3.4, A<sub>600</sub>에서 7.0의 A value를 나타내는 활성이 있는 균주를 200 µl, 100 µl, 50 µl, 25 µl, 12.5 µl씩 I.P.로 주사하여 3일동안 경과를 지켜보았다. OmpH로 면역화된 정도를 알아보기 위해, 앞서 항체를 생산했던 네 그룹의 쥐에 LD<sub>100</sub>의 양만큼 활성이 있는 균주를 주사하여 7일간 관찰한 뒤, 생존 여부를 확인하여 보았다.

## 결 과

### 가금콜레라 ompH 재조합유전자 클로닝 및 재조합 OmpH 분리

우리나라에서 발견된 가금 콜레라 발병 균 (*Pasteurella multocida* A:3)의 ompH 유전자를 분리·정리하여 보니, 기존에 보고된 종의 DNA 염기 구성과 동일하지 않았다. 이 ompH 유전자는 1,047 bp이며, DNA 염기서열을 DNASTAR(Dnastar, USA)로 분석하여, 종 간의 유사성이 85%에서 90%라는 것을 확인하였다 [34]. 이 ompH 유전자는 2005년 5월, NCBI 데이터베이스에 **DQ054529**로 등록되었다. 이 유전자가 coding한 단백질 서열의 유사성은 BLAST를 통해 결정되었으며, 단백질 서열 상의 두 부분이 가변성이 있음이 밝혀졌다. 이 부위들은 strains 간에 큰 가변성을 보이고 있으며 [31], porin 단백질을 백신으로써 효과적인 후보가 되게 한다고 알려져 있다 [10, 13, 15].

이 OmpH를 면역원으로 사용하여, 가금콜레라 백신 생산 여부를 고찰하기 위하여, 20개의 선도단백질을 암호화한 DNA sequences 부위가 제거된(truncated-recom-



**Fig. 1.** Overexpression and purification of 40 kDa of OmpH. The ompH in pRSET A induced by IPTG (0.5 mM) in BL21 (DE3) host cell, overexpressed the protein, OmpH. Lanes M: high molecular weight protein marker, 1: BL21 (DE3) only 0 hr, 2: BL21 (DE3) only overnight, 3: pRSET A vector only in BL21 (DE3) 0 hr, 4: pRSET A vector only in BL21 (DE3) overnight, 5: native condition sample, 6: denaturing condition sample, 7: flow through, 8: 1<sup>o</sup> washing sample, 9: 2<sup>o</sup> washing sample, 10: 3<sup>o</sup> washing sample, 11: 1<sup>o</sup> elution sample, 12: 2<sup>o</sup> elution sample.

**Table 1.** Evaluation of protection of recombinant OmpH in mice

Immunogen	Dilution factor	Post-antiserum titer
Not treat (PBS)	1/800	0.4065 ± 0.015
Formalin-killed	1/1000	0.3264 ± 0.041
OmpH	1/1000	1.3080 ± 0.135

binat *ompH* DNA) 절편을 PCR 방법으로 증폭한 후, pRSET A expression vector에 sub-cloning 하였다. 이 재조합 DNA clone을 *E. coli* BL21(DE3) strain에서 성공적으로 발현 시키었다(Fig. 1). 이를 위한 다양한 실험 조건은 다음과 같았다. 과 발현을 위하여, IPTG 농도를 다섯(0.1 mM-1.0 mM 사이) 종류로 분류한 후, induction을 28°C, 30°C, 34°C, 37°C의 각기 다른 온도에서 수행한 결과, IPTG 0.5 mM, 34°C에서 12시간 배양했을 때 가장 많이, 과 발현된다는 것을 밝히었다. 예상대로 Mr 40 kDa의 OmpH 단백질이 발현되었으며, Ni-NTA 친화 크로마토그래피를 통해 순수한 OmpH 를 분리 정제하였다.

#### 항-OmpH 항 혈청 생산

면역화된 쥐에서 획득된 항-혈청을 ELISA 검정을 통하여 확인한 결과, OmpH로 면역화된 쥐의 역가가 1.308로 나타나, PBS를 사용한 음성대조군과 formalin-killed whole cell을 이용한 양성대조군의 역가보다 높은 수치를 나타냄이 이전 실험에서 확인되었다(Table 1).

#### Lethal Dose 100 결정 및 Challenge Test

면역화된 쥐에 대해, 그 면역화 정도를 검증하기 위한 목적으로 활성이 있는 생균을 농도별로 주사하여 LD<sub>100</sub>값을 얻어내었다. 5마리의 쥐가 들어 있는 5개 cage에 생균을 각각 200 μl, 100 μl, 50 μl, 25 μl, 12.5 μl로 주사한 뒤 관찰한 결과, 주사한 지 2일째까지는 모든 쥐가 살아있었으나, 3일째에 25 μl 와 12.5 μl의 cage를 제외하고 모두 사망하였다(Table 2).

OmpH로 면역화된 실험군과 양성, 음성대조군 및 어떠한 처리도 되지 않은 대조군을 포함한 4개의 그룹 중 앞의 3개의 그룹에 생균을 25 μl 씩 주사하여 7일 동안 관찰하였다. 그 결과, 음성대조군에서는 Day1에 12마리, Day2에 3마리, Day3에 3마리, Day4에 1마리씩 사망

**Table 2.** Dose dependently survival rate of mice infected with live-pathogen, *P. multocida* (A : 3)

Group	A		Dose (μl)	Survival rate (%)				
	A <sub>410</sub>	A <sub>600</sub>		Alive No.	Day0	Day1	Day2	Day3
Gp I	3.4	7.0	200	0/5	100	100	0	0
Gp II	3.4	7.0	100	0/5	100	100	0	0
Gp III	3.4	7.0	50	0/5	100	100	0	0
Gp IV	3.4	7.0	25	1/5	100	100	20	20
Gp V	3.4	7.0	12.5	1/5	100	100	20	20

**Table 3.** Survival patterns of mice (n = 80) challenged with *P. multocida* (A : 3)

Group	Name Sample	Number of challenged mice	Number of alive mice						
			Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7
Gp I	PBS	20	8	5	2	1	1	1	1
Gp II	Formalin-killed	20	12	8	3	2	2	2	2
Gp III	OmpH	20	18	14	14	14	14	14	14
Gp IV	Not challenged	0	20	20	20	20	20	20	20

한 것으로 관찰되었고 양성대조군에서는 Day1에 8마리, Day2에 4마리, Day3에 5마리, Day4에 1마리씩 사망한 것으로 관찰되었으며, 실험군인 OmpH immunized cage에서는 Day1에 2마리, Day2에 4마리가 사망하였다 (Table 3).

## 고 찰

Porin의 대표 단백질 OmpH는 그들 구성 polypeptide의 두 부분이 가변성이 있음이 밝혀졌다. 이 부위는 종간에 큰 가변성을 보이고 있으며 [31], porin 단백질을 백신으로써 효과적인 후보가 되게 한다고 알려져 있다 [10, 13, 15].

대장균의 porin 유전자는 그 외인성 porin 단백질이 세포를 치사시킬 수 있는 경향을 가지고 있기 때문에 가끔씩 *E. coli*에서 클로닝이 어렵다. 비-자기성 porin 단백질은 그 세포 내에서 삼투압적 불균형을 유도하여, 본래 존재하고 있던 porin 단백질을 제거해 버리거나, *E. coli* 외막 단백질 본래의 형태를 변화시키기도 한다. 또한, OmpH의 선도단백질은 재조합 OmpH 단백질의 targeting과 관련이 있어, 숙주세포인 *E. coli* BL21(DE3)의 치사를 유도한다고 알려져 있다. 반일 선도단백질을 유전자 차원에서 제거 한다면, OmpH 단백질의 세포 외막으로의 이동이 저해될 것이며, 결과적으로 숙주세포에 OmpH 단백질이 무해하게 될 것이다. 즉, 선도단백질이 없는 OmpH 단백질은 세포질에 존재하게 될 것이며 이것으로 인해 *E. coli* 외막에는 아무런 변화가 나타나지 않을 것이다. 현재, 여러 종의 *P. multocida*에서 다양한 OmpH가 분리되어 심각한 질병에 대한 예방 실험에 이용되고 있다. 특정 혈청학적 종류는 심각한 pasteurellosis의 원인을 밝히는 재료로 사용되고 있으며, 이종간 교차 면역 반응도 회복기의 혈청으로 인식이 가능한 혈청-특이적 항원으로 면역화를 시도함으로써 가능해 질 것이다.

Louis Pasteur가 수행했던, *P. multocida*와 같은 그람 음성 기생 미생물의 감염에 대한 면역화 실험 이후, 많은 미생물의 외막단백질들이 강력한 항원 물질로 작용한다는 것이 알려져 왔다. 특히 *P. multocida*의 외막단백

질 중 하나인 OmpH는 면역에 관련한 강력한 항원 후보라고 생각되고 있다 [10, 15, 31]. 재조합되어 발현된 OmpH 항원을 인위적으로 면역화시킨 쥐를 통한 면역화 검정 실험을 위해 2회에 걸쳐 immunization을 수행했으며, 각 단계마다 쥐의 혈청을 획득하여 ELISA를 통해 항체 생산 정도를 확인하였다. 생성된 항체가 실제로 *P. multocida*에 대한 면역효과가 있는지를 확인하기 위해서 활성을 가지고 있는 생균을 주사하여 확인할 수 있다. 생균의 주사 농도를 결정하기 위해서, 모든 쥐를 치사시킬 수 있는 양, 즉 lethal dose 100(LD<sub>100</sub>)을 측정하였다. 적정 치사량을 찾기 위하여 A<sub>410</sub>에서 3.4의 값을 나타내는 균주를 용량을 달리 하여 주사한 결과 25 µl에서 1마리가 살아남았고 50 µl에서는 모두 죽었음을 확인했다. 이 결과를 토대로, lethal dose 100%에 근접한 수치인 25 µl를 LD<sub>100</sub>으로 결정하게 되었다. 이렇게 결정된 dose를 실험군 및 대조군에 적용하여 challenge test를 수행한 결과, OmpH로 면역화를 유도했던 그룹에서는 70% 가량 생존한다는 것이 관찰되었고, PBS만 투여했던 음성 대조군에서는 앞서 예상했던 것과 같이 1마리가 생존한다는 것이 확인되었다. 반면 양성대조군의 사망 패턴을 관찰해 본 결과, 최종적인 사망 수는 동일하게 나타났다. 이 결과에서는 현재 시판되고 있는 백신과 동일하게 10%의 formaldehyde로 처리하여 직접 제작한 formalin-killed whole cell 백신의 면역학적 효과를 관찰하지 못했으며, 이는 다른 실험자들이 이전에 수행하여 보고했던 결과와 비교했을 때 실험적인 오차에 그 원인이 있을 것으로 생각된다. 이상의 결과는 이전 실험에서 보고된 바 있는 ELISA 역가와 비교해 보았을 때 OmpH로 면역화된 쥐에서 면역 효과가 나타남을 확인할 수 있으며, 그람 음성균의 OmpH 단백질은 면역 효과가 있음이 검증되었으며, OmpH 단백질은 효과적인 백신의 후보로 생각할 수 있음이 재확인되었다.

## 결 론

*Pasteurella multocida* 균은 광범위한 질병을 야기시키는 악성 감염원으로 알려져 있다. 그람 음성균의 동종

및 이종간에 의한 감염에 대한 강력한 백신 후보 물질로써 OmpH라고 불리는 porin 단백질이 고려되어 왔다. 이번 연구에서 선도 단백질을 제거한 재조합 OmpH 단백질이 과발현 및 정제되었다. OmpH에 대한 면역성을 검정하기 위해, 한 마리의 실험용 쥐에 한번에 50 µg의 단백질을 복강 주사를 통해 2회에 걸쳐 주사하여 면역력을 갖게 하였다. 활성이 있는 생균의 적절한 치사량을 직접 농도별로 주사하여 확인한 뒤, 실험군 및 대조군에게 주사하여 면역화된 정도를 검정하였다. 이전에 수행되어 보고된 바 있는 항 OmpH 면역혈청의 역가와 비교하여 생균이 주사된 쥐의 생존 패턴을 비교하여 보았다. 이번 실험에서 확인된 쥐의 생존 패턴으로 미루어볼 때 OmpH 단백질이 병원성 파스튜렐라 균이 일으키는 가금 콜레라를 예방하기 위한 백신의 강력한 후보임을 보여주고 있다.

## 감사의 글

이 논문은 “2005 국고특성화사업(교육인적자원부) 인력지원(김영환, 권무식)”으로 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. Adler B, Bulach D, Chung J, Doughty S, Hunt M, Rajakumar K, Serrano M, Zanden A, Zhang Y, Ruffolo C. Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. J Biotechnol 1999, **73**, 83-90.
2. Ali HA-H, Sawada T, Noda K. Protectivity of an immunoaffinity-purified 39kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* in mice. J Vet Med Sci 1994, **66**, 1603-1604.
3. Borrathylbay E, Sawada T, Kataoka Y, Okiyama E, Kawamoto E, Amao H. Capsule thickness and amounts of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlate with their pathogenicity for chickens. Vet Microbiol 2003, **97**, 215-227.
4. Boyce JD, Adler B. Acapsular *Pasteurella multocida* B:2 can stimulate protective immunity against pasteurellosis. Infect Immun 2001, **69**, 1943-1946.
5. Carter GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. Adv Vet Sci Comp 1967, **11**, 321-379.
6. Chung JY, Wikie I, Boyce JD, Adler B. Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1. Vaccine 2005, **23**, 2751-2755.
7. Christensen JP, Bisgaard M. Avian pasteurellosis: taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. Avian Pathol 1997, **26**, 461-483.
8. Choi KK, Maheswaran SK, Felice LJ, Molitor TW. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 1991, **28**, 75-92.
9. Dacies RL, MacCorquodale R, Reilly S. Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. Vet Microbiol 2004, **99**, 145-158.
10. Davies RL, MacCorquodale R, Caffrey B. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. Vet Microbiol 2003, **91**, 169-182.
11. Dabo SM, Confer AW, Quijano-Blas RA. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* Serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. Microb Pathog 2003, **35**, 147-157.
12. Gatto NT, Dabo SM, Hancock RE, Confer AW. Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA-equivalent outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype A:3(Omp28). Vet Microbiol 2002, **87**, 221-235.
13. Heddleston KH, Gallagher JE, Rebers PA. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis 1972, **16**, 925-936.
14. Hopkins BA, Huang THM, Olson LD. Differentiating turkey postvaccination isolants of *Pasteurella multocida* using arbitrarily primed polymerase chain reaction. Avian Dis 1998, **42**, 265-274.
15. Hofacre CL, Glisson JR. A serotypic survey of *Pasteurella multocida* isolated from poultry. Avian Dis 1986, **30**, 632-633.
16. Hunt M, Adler B, Townsend KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 2000, **72**, 3-25.
17. Ikeda JS, Hirsh DC. Antigenically related iron-regulated outer membrane proteins produced by different somatic serotypes of *Pasteurella multocida*. Infect Immun 1988, **56**, 2499-2502.
18. Jordan RW, Hamilton TDC, Mayes CM, Patel D, Jones PH, Roe JM, Williams NA. Modulation of the humoral immune response of swine and mice mediated

- by toxigenic *Pasteurella multocida*. FEMS Immunol Med Microbiol 2003, **39**, 51-59.
19. **Jeanteur D, Lakey JH, Pattus F.** The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. JMMB 1991, **5**, 2153-2164.
  20. **Lee J, Kang S, Park SI, Woo HJ, Kwon M.** Molecular Cloning and Characterization of the Gene for Outer Membrane Protein H in *Pasteurella multocida* (D:4) Isolate from Pigs exhibiting Symptoms of Atrophic Rhinitis in Korea. J Microbiol Biotechnol 2004, **14**, 1343-1349.
  21. **Luo Y, Glisson JR, Jackwood MW, Hancock REW, Bains M, Cheng IN, Wang C.** Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. J Bacteriol 1997, **179**, 7856-7864.
  22. **Miflin JK, Blackall PJ.** Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. Lett Appl Microbiol 2001, **33**, 216-221.
  23. **Pijoan C, Morrison R, Hilley H.** Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter. J Clinical Microbiol 1983, **17**, 1074-1076.
  24. **Rimler RB, Rhoades KR.** Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. J Clin Microbiol 1987, **25**, 615-618.
  25. **Rhoades KR, Rimler RB.** Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. Avian Dis 1987, **31**, 895-898.
  26. **Snipes KP, Hansen LM, Hirsh DC.** Plasma- and iron-regulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida*. Am J Vet 1988, **49**, 1336-1338.
  27. **Srikumar R, Mikael LG, Pawelek PD, Khamessan A, Gibbs BF, Jacques M, Coulton JW.** Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiology 2004, **150**, 1723-1734.
  28. **Stull TL, Lipuma JJ, Edlind TD.** A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988, **157**, 280-286.
  29. **Tavatabaei M, Liu Z, Finucane A, Parton R, Coote J.** Protective immunity conferred by attenuated *aroA* derivatives of *Pasteurella multocida* B : 2 strains in a mouse model of hemorrhagic septicemia. Infect Immun 2002, **70**, 3355-3362.
  30. **Vasfi Marandi M, Mittal KR.** Role of outer membrane protein H (OmpH)- and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. Infect Immun 1997, **65**, 4502-450831.
  31. **Uchida C, Kimura Y, Kubora S, Sasaki O.** Protective effect of *Pasteurella multocida* cell-free antigen and toxoid against challenge with toxigenic strains of *Pasteurella multocida* in mice. J Vet Med Sci 2003, **65**, 737-740.
  32. **Verma R, Jaiswal TN.** Haemorrhagic septicemia vaccines. Vaccine 1998, **16**, 1184-1192.
  33. **Yang Y, Thoma WR, Chong P, Loosmore SM, Klein MH.** A 20-kilodalton N-terminal fragment of the D125 protein contains a protective epitope (s) against *Haemophilus influenzae* type a and type b Infect Immun 1998, **66**, 3349-3354.
  34. **Kim Y, Hwang H, Lee S, Park E, Yoo S, Lee J, Yang J, Kwon M.** Molecular cloning and expression of a gene for outer membrane protein H in *Pasteurella multocida* (A : 3): Production of antisera against the OmpH. Korean J Microbiol Biotechnol 2005, **33**, 274-280.