

Salmonella Gallinarum 세포외막단백질의 프로테오믹 분석 및 닭에서의 방어능 효과

선지선 · 조영재 · 장주현¹ · 강정무¹ · 한장혁¹ · 한태욱*

강원대학교 수의과대학, 강원대학교 동물의학종합연구소, ¹주요고려비엔피 기술연구소

Proteomic Analysis and Protective Effects of Outer Membrane Proteins from *Salmonella* Gallinarum in Chickens

Jisun Sun, Youngjae Cho, Joo-Hyun Jang¹, Zheng-Wu Kang¹, Jang-Hyuk Han¹, and Tae-Wook Hahn*

College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Medicine,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹KBNP Technology Institute, KBNP Inc., Yesan 340-860, Korea

Abstract

Salmonella Gallinarum (SG) is known as an important pathogen that causes fowl typhoid in chickens. To investigate SG outer-membrane proteins (OMPs) as a vaccine candidate, we used proteomic mapping and database analysis techniques with extracted OMPs. Also, extracted OMPs were evaluated in several aspects to their safety, immune response in their host and protective effects. Our research has established a proteomic map and database of immunogenic SG-OMPs used as inactive vaccine against salmonellosis in chickens. A total of 22 spots were detected by 2-dimensional gel electrophoresis and immunogenic protein analysis. Eight spots were identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and peptide mass fingerprinting (PMF) and categorized into four different types of proteins. Among these proteins, OmpA is considered to be an immunogenic protein and involved in the hosts' immune system. To estimate the minimum safety dose in chickens, 35 brown layers were immunized with various concentrations of OMPs, respectively. Consequently, all chickens immunized with more than a 50 µg dose were protected against challenges. Moreover, intramuscular administration of OMPs to chickens was more effective compared to subcutaneous administration. These results suggest that the adjuvanted SG-OMP vaccine not only induces both the humoral and cellular immune response in the host but also highly protects the hosts' exposed to virulent SG with 50 µg OMPs extracted by our method.

Key words: *Salmonella* Gallinarum, outer membrane proteins (OMPs), proteomic analysis, protective effects, OMP vaccine

서 론

Salmonella Gallinarum(SG)은 가금티푸스를 유발하는 원 인체로서 1992년 국내 발생 이래 산발적으로 꾸준한 발생 을 해오고 있어 양계산업에 경제적 손실을 유발한다(Clarke and Gyles, 1993). 숙주 특이성을 지닌 SG의 경우 닭에서 병원성이 높아 심한 임상증상을 동반한 폐사로 피해를 유발하는 반면 광범위한 숙주영역을 가진 *Salmonella* Enteritidis(SE)의 경우 닭 자체에는 큰 피해를 일으키지 않으나

감염된 육류 섭취로 인해 사람에게 감염되어 식중독을 유발하므로 공중보건학상 피해를 일으킨다(Eswarappa *et al.*, 2009; Ewing, 1986). 일반적으로 숙주특이성을 지닌 살모넬라 혈청형의 경우 병원체 관리 및 질병근절이 광범위숙주영역을 가진 혈청형보다 용이하나 SG의 경우 포유동물에 감염이 되기 때문에 특히 양계장의 설치류에도 감염이 되어 포획 및 개체관리가 어려운 설치류의 특성상 이로 인한 전파가 잘 일어나 근절은 더욱 어려운 상황이다(Popoff *et al.*, 2004).

SG의 근절을 위해 생균백신인 SG 9R백신과 불활화 백신 등의 보급으로 2000년대 초반부터 발생보고가 급격히 감소되어 현재에는 산발적인 발생만 보고되고 있다(Babu *et al.*, 2003). 그러나 SG 9R의 경우 체내 면역반응을 유

*Corresponding author: Tae-Wook Hahn, College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea. Tel: 82-33-250-8671, Fax: 82-33-244-2367, E-mail: twhahn@kangwon.ac.kr

발하기는 하나 생균백신의 약독화 기전이 밝혀지지 않은 관계로 병원성의 복원 가능성 및 숙주내 간과 비장 등의 실질장기에 병변이 보고됨에 따라 선진국에서는 사용이 극히 제한적이거나 사용을 금지하고 있다(Silva *et al.*, 1981; Smith, 1969; Wigley *et al.*, 2005). 그러나 우리나라를 포함한 여러 개발도상국에서는 SG의 야외균주가 기존 항생제에 대해 저항성을 보임에 따라 항생제의 사용을 제한하고 있기 때문에 상기에 언급된 부작용이 있음에도 불구하고 SG 9R을 가금티푸스의 예방책으로 사용하고 있어 안전성 및 방어능이 보장된 대체 백신의 개발이 필요하다. 또한 선진국의 경우 SE에 의한 식중독은 주로 가열하지 않은 계란에서 유래하는 것으로 규명되어있고 1985년에서 1999년 사이에는 사람에서 SE의 식중독의 80%가 계란에서 유래하는 것으로 보고되었다(Guard-Petter, 2001; Valiente Moro *et al.*, 2009). 따라서 사람에서의 살모넬라에 의한 식중독 발생을 근절시키기 위해 효과적인 생균백신을 닭에 접종하여 계란, 계육을 통해 전파되어 사람에게 이행되는 것을 차단함과 동시에 SG를 예방하여 양계농가의 경제적인 손실을 줄여야 한다.

살모넬라는 일반적으로 숙주동물의 림프구나 대식세포에서 생존하는 증식특성상 세포매개성 면역에 의해 방어가 되기 때문에(Collins and Campbell, 1982; Lillehoj, 1991) 여러 방법을 이용한 백신이 연구 중에 있으며 특히 병원성 유전자를 소실시켜 약독화된 생균백신은 그 효과가 불활화백신보다 뛰어나지만(Babu *et al.*, 2003) 이러한 생균백신의 경우 독력의 회복과 숙주내 병변을 유발할 가능성 등 안전성에 관한 문제가 제기될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 안전성도 높고 방어능도 뛰어나다고 보고된(Lee *et al.*, 2007) 불활화백신을 이용하여 SG 야외균주에 대한 방어능을 조사하였다. 불활화백신은 균 전체를 불활화시키는 대신, 살모넬라의 세포외막단백질(outer membrane proteins, OMPs)만을 추출한 후 세포매개성면역 유발을 보조할 수 있는 부형제(adjuvant)와 함께 백신을 제조하였다. OMPs의 경우 세포매개성 면역을 활성화시키는 immunodominant proteins으로서 보고되고 있으며(Lee *et al.*, 2010; Meenakshi *et al.*, 1999) Bouzoubaa (1987) 등은 가금티푸스 예방을 위해 OMPs 항원이 생균백신 제제로 사용되어지고 있는 SG 9R백신보다 안전성이거나 방어능이 뛰어난 것을 입증하였다. 그러므로 본 실험에서는 그 효과를 재증명함에 있어서 기존 논문보다 OMPs의 수율향상을 위한 OMPs 추출방법의 변화에 초점을 맞추었다. 또한 추출된 OMPs를 구성하고 있는 면역원성 단백질들의 분석을 위해 이차원 전기영동 후 SG 항혈청을 이용하여 immunoblot assay 및 peptide mass fingerprinting (PMF) 분석방법을 사용하여 단백질 동정을 실시하였다.

재료 및 방법

균 배양

OMP 분리를 위한 후보 균주로는 본 연구팀의 선행연구 결과를 토대로 2000년에 강원도 원주에 위치한 농장의 산란계에서 분리된 SG 분리균주를 사용하였으며 이 균주의 유전형은 *Xba*I와 *Spe*I의 제한효소를 이용한 PFGE type에서 국내분리주 중 대표적인 PFGE type인 A type을 보인 균주였다(Seo *et al.*, 2006). SG균주는 Tryptic soy broth (BD Difco, USA) 액체배지에서 18시간, 37°C에서 배양하여 13,000 rpm으로 20분간 4°C에서 원심분리한 후 침전된 균을 OMPs 추출을 위해 사용하였다.

OMPs 추출

SG OMPs의 대량 추출과 추출방법에 따른 비용절감을 위해 추출방법을 단순화시켰다. 위로부터 침전된 SG 균체를 Macfarland No. 10에 맞추어 재부유하였다. 추출방법은 변형된 Barenkamp의 방법(Barenkamp *et al.*, 1981)에 따라 부유된 균체를 초음파분쇄기(SLTt, USA)를 이용하여 균의 세포외막을 분쇄시킨 후에 원심분리기를 이용하여 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 OMP성분을 포함한 상층액을 수집하여 OMP 백신으로 사용하였다.

이차원 전기영동(2-Dimensional gel electrophoresis)

변형된 Rabilloud의 방법(1998)에 따라 일차적으로 isoelectric focusing(IEF)를 위하여 IPG strips은 7 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1% dithiothreitol(DTT), 1% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12~16시간 정도 reswelling되었다. Strip 당 시료는 각각 200 µg씩을 사용하였으며, Amersham Biosciences사의 Multiphore II system을 이용하여 제조회사의 사용매뉴얼을 준수하여 20°C에서 IEF를 수행하였다. IEF 조건은 150 V에서 3,500 V까지의 도달시간을 3시간 되게 하였으며, 3,500 V에서 26시간 지속되도록 하여 최종적으로 96 kVh가 되도록 설정하였다.

이차적으로 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)을 수행하기 전에 IPG strips을 1% DTT가 함유된 equilibration buffer(50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 세척하였으며, 곧바로 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10분간 더 세척하였다. Equilibration이 완료된 strip을 SDS-PAGE gels(20×24 cm, 10~16%) 위에 배열시키고, Hoefer DALT 2D system(Amersham Biosciences, USA)을 이용하여 20°C에서 최종적으로 1.7 kVh가 되게 전개하였다. 이차원 전기영동이 완료된 이차원 젤의 단백질은 도연염색을 실시하여 단백질 spot을 확인하였다.

Immunoblot assay 및 peptide mass fingerprinting(PMF)
 이차원전기영동은 하나의 샘플을 동시에 2번 실시하여 처음의 것은 도염색하고, 다른 하나는 immunoblot assay를 위해 PVDF membrane(Amersham Pharmacia Biotech, USA)에 transfer시켰다. Immunoblotting assay는 Wu의 방법(2002)을 수정하여 실시하였다. 즉, membrane은 TBS-T(50 mM Tris-Cl pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.5% Tween 20)에 5% fetal bovine serum을 넣어 1시간 37°C에서 반응 후 차례대로 SG백신균주를 2주 간격으로 2회 접종하여 얻은 항혈청을 1:100으로 희석하여 2시간 37°C에서 반응시키고 anti-chicken IgG는 1:1000의 비율로 1시간, 37°C에서 반응 후 최종적으로 항원항체결합체는 3,3'-diaminobenzidine tetrahydro-chloride(DAB)에 의해 반응시켜 염색하였다. 반응한 spot들은 도염색으로 시각화된 spot들과 비교 후 trypsin을 처리한 후 Mass spectrometry로 질량분석 후에 얻어진 각 단백질의 고유한 peak값으로 PMF(peptide mass fingerprinting)에 의해 분석되어 NCBI database에 근거한 아미노산 염기서열에 의해 고유 단백질로 동정되었다.

백신의 제조

추출한 crude outer membrane protein에 0.3%(v/v) formalin을 첨가한 후 37°C에서 3일간 불활화하였으며 BCA™ protein assay kit(Thermo Scientific, USA)를 이용하여 outer membrane protein의 정량 측정 후 protein 농도를 10,000 µg/mL로 조정하여 냉장 보관하면서 시험백신을 제조하였다. 부형제(adjuvant)는 ISA70를 사용하여 60%(v/v)로 농도 조절하여 OMP백신과 혼합하여 각각의 백신량으로 조절하고 나머지는 인산완충액(phosphate buffered saline)로 채운 후, T. K. HOMO mixer mark II(IKA, Japan)를 이용하여 20-30분간 부형제와 OMP 백신을 인산완충액에 혼합하여 사용하였다.

닭에서의 백신효과

SG에 감수성이 높은 2주령의 갈색 산란계를 이용하여 1) 항원 농도별, 2) 접종 경로별, 3) 접종횟수로 각각 나누어 시험백신의 방어효과 및 항체 형성능을 조사하였다. 1) 항원의 농도는 한 그룹당 5수로 하여 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3 µg의 양으로 접종한 후, 2주 뒤 공격접종을 실시하였으며 2) 접종 경로는 근육주사와 피하주사로 나누었다. 3) 접종횟수는 백신 1회 접종 및 2회 접종그룹으로 나누는 뒤 각각의 백신 접종이 끝난 시점을 기준으로 2주 뒤 공격접종을 하였다.

통계처리

OMP 백신의 교차반응 확인을 위해 부검 후 실질장기에서 검출된 공격접종균주의 CFU에 대한 통계학적 유의성은 one-way Anova test를 이용하여 $p < 0.05$ 이하의 유의

성만을 통계학적 차이로 인정하였다(Lee *et al.*, 2007).

결 과

추출된 OMP의 프로테오믹스 분석

추출된 OMP의 등전점 및 분자량으로 전개하여 OMP의 구성성분 중 어떠한 단백질이 숙주 체내의 면역유발과 관련이 있는지 알아보기 위해 실시한 프로테오믹스 분석에서 2차원 전기영동 후 도염색을 한 결과 22개의 spot이 관찰되었다(Fig. 1A). PDQuest software에 의해 map에 나타난 22개의 spot들을 분석하여 보면 대부분의 단백질들은 10~15 kDa와 30~45 kDa 사이, 등전점은 4~8 범위 내에 분포되어 있는 것을 확인하였다. 이러한 spot을 바탕으로 immunoblotting assay를 위해 SG 항혈청에 반응시킨 결과 총 9개의 spot에서만 항원-항체반응이 일어났다(Fig. 1B).

9개의 spot을 단백질 동정을 위해 PMF 분석을 실시한 결과 1개의 spot만을 제외하고 나머지 8개의 spot이 모두 동정되었다(Table 1). 그 중에서 4개의 isoform을 가진 단백질인 OMP channel protein이 가장 빈도 높게 동정되었으며 outer membrane protein A와 DNA starvation and

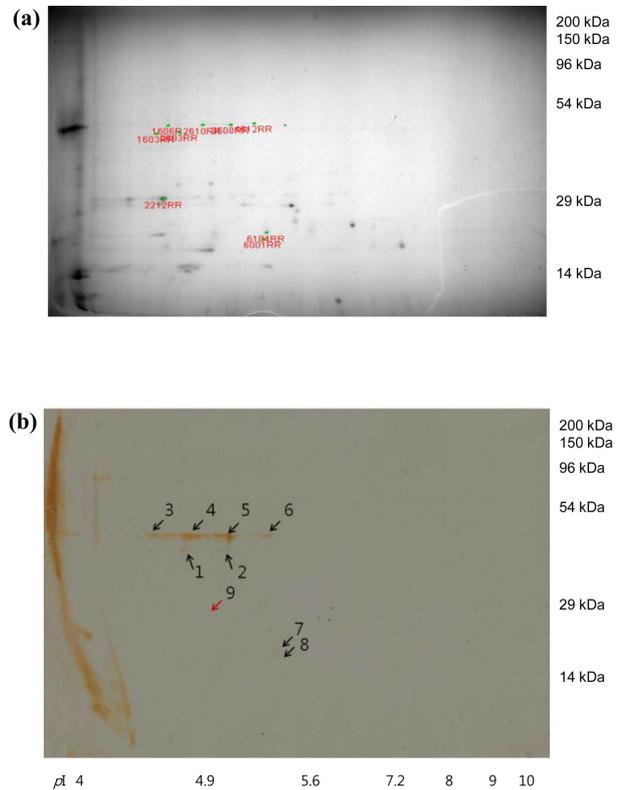


Fig. 1. Matched silver stained 2-DE gel (A) and immunoblotted membrane (B). A total of nine spots were detected by antiserum and matched with silver stained gel. Indicated the no.1 to 8 spots were identified proteins by PMF but the no. 9 spot indicated non-identified proteins on the immunoblot membrane. The numbered protein names are listed in Table 1.

stationary phase protection protein이 각각 2개의 isoform을 갖고 있었다.

접종량에 따른 방어효과

SG 세포외막단백질을 이용한 서브유닛백신의 효과적인 접종량을 결정하기 위해 각 군은 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3 µg/1 dose 및 흉부근육으로 투여되었으며 2주 뒤 공격 접종을 실시하여 2주간 생존율을 관찰하였다. 그 결과 백신비접종군이 보인 20%의 생존율에 비해 25 µg 이상의 용량에서는 모두 100%의 생존율을 보이며 백신의 효능을 입증하였다(Table 2). 그러나 공격접종 2주 뒤 생존개체를 대상으로 병리조직을 관찰한 결과 25 µg 용량을 접종한 군

에서는 심장결절 및 간의 심한 종대, 충혈, 황색 변화 및 청동색으로 변한 육안 병변을 확인할 수 있었으며(data not shown) 50 µg 이상에서는 간의 미미한 종대만 관찰되어 50 µg 이상의 SG OMP 용량이 숙주 체내에서 충분한 백신 효과 및 안전성을 보이는 것으로 나타났다.

접종경로에 따른 방어효과

투여에 따른 부작용은 최소로 하되 백신의 효과를 유발하기에 적절한 투여경로를 찾기 위해 두 군으로 나누어 한 군은 흉부근육에 투여를 하고 다른 한 군은 피하에 접종하였다. 각 군은 다시 OMP 접종량 별로 200, 100, 50, 25 µg으로 나누어 투여 경로별에 따른 생존율 및 적정량

Table 1. The profiles of detected and identified OMPs by peptide mass fingerprinting (PMF)

Spot No.	NIBI GI	Protein name	Gene symbol	pI	MW (KDa)	Main function
1	gi/42528870	Outer membrane protein A	ompA	5.19	34.56	Cell envelope
2	gi/42528870	Outer membrane protein A	ompA	5.6	37.61	Cell envelope
3	gi/205354102	OMP channel protein	tolC	4.59	49.62	Efflux system
4	gi/205354102	OMP channel protein	tolC	4.78	49.37	Efflux system
5	gi/205354102	OMP channel protein	tolC	4.94	49.35	Efflux system
6	gi/205354102	OMP channel protein	tolC	5.36	49.35	Efflux system
7	gi/16759749	DNA starvation and stationary phase protection protein	dps	5.73	19.21	Superoxide production
8	gi/16759749	DNA starvation and stationary phase protection protein	dps	5.73	18.71	Superoxide production

Table 2. The Survival rate and pathologic lesions for three different tests

Group	Vaccine dose			Vaccination route			Vaccination frequency	
	Treatment ^c	Survival rate ^d	Pathologic Lesion	Treatment	Survival rate	Pathologic lesion	Treatment	Survival rate
I	A ^a	200 µg	100 (5/5)	Mild liver enlargement				
	B ^b				200 µg	100 (5/5)	Mild liver enlargement, pericarditis	200 µg
II	A	100 µg	100 (5/5)	Mild liver enlargement				
	B				100 µg	100 (5/5)	Liver enlargement, liver white spots	100 µg
III	A	50 µg	100 (5/5)	Mild liver enlargement				
	B				50 µg	80 (4/5)	Severe hepatomegaly, liver congestion, yellowish liver	50 µg
IV	A	25 µg	100 (5/5)	Mild liver enlargement				
	B				25 µg	60 (3/5)	Severe hepatomegaly, liver congestion, pericardial effusion	(-)
V	A	12.5 µg	80 (4/5)	Severe hepatomegaly, lever congestion, yellowish liver	(-)	20 (1/5)	Severe hepatomegaly, cardiac endocarditis, pericardial effusion	
VI	A	6.3 µg	80 (4/5)	Severe hepatomegaly, lever congestion, yellowish liver				
VII	A	(-)	20 (1/5)	Severe hepatomegaly, pericarditis, pericardial effusion				

In vaccine dose test, ^a group A was injected to thoracic muscle and ^b group B was injected via subcutaneous route.

In vaccination frequency test, ^a group A means 1st vaccination and ^b group B means 1st and boost vaccination (3 weeks interval).

^c Treatment (OMP dose/ chicken); ^d survival rate (survival/ tested).

을 재평가하였다. 그 결과 근육 접종시에는 모든 OMP의 용량에서 100%의 생존율을 보인 반면 피하접종의 경우 200, 100 μg 에서만 100%의 생존율을 보이고, 50 μg 과 25 μg 에서는 각각 80%, 60%의 생존율을 보여 생존율측면에서 볼 때 근육접종 경로가 효과적인 투여경로로 확인되었다 (Table 2). 또한 육안병변에서도 피하접종의 경우 20 μg 에서 심장 외막염 및 심장결절을 보였으며 그 이하의 OMP 농도에서도 근육접종보다 간 및 비장의 종대가 심각하게 관찰되었다.

접종횟수에 따른 방어효과

백신접종 횟수에 따른 방어효과를 평가하기 위해 갈색산란계 35수를 1회 백신접종군과 2회 백신접종군으로 나누어 실험하였으며 1차 백신과 2차 백신 사이의 기간은 3주로 하였고, 흉부근육으로 투여되었으며 OMP 용량은 각각 200, 100, 50 μg 으로 평가하여 결과를 Table 2에 나타내었다. 생존율에서는 1회 백신 접종군과 2회 접종군 모두 각각의 OMP용량에서 100%의 생존율을 나타내었다. 게다가 육안병변의 차이도 1회 백신접종군의 200 μg 에서 보여진 간의 미약한 종대 및 황색변화가 2회 백신접종군의 같은 용량의 OMP 접종군에서도 똑같이 관찰됨에 따라 백신의 투여횟수에 따른 백신의 효능이나 숙주체내의 반응은 크게 차이를 나타내지 않았다.

고 찰

살모넬라는 약 2,500개의 혈청형으로 이루어져있으며 숙주영역이 광범위한 혈청형과 숙주영역이 좁은 혈청형으로 구분할 수 있는데 숙주영역이 좁으며 양계산업에 있어 경제적 피해를 일으키는 SG와 넓은 숙주영역을 가지며 사람에게 계육, 계란 등을 통해 식중독을 유발하는 SE(Barrow *et al.*, 1994)를 동시에 효과적으로 예방하기 위해 SG의 세포외막단백질만을 추출하여 불활화 백신을 제조하여 효능 및 안전성을 검증하였다. 특히 세포내 기생세균이 살모넬라 방어를 위해 요구되는 세포매개성면역은 부형제를 사용하여 그 효과를 보강하였다.

SG를 방어할 수 있는 서브유닛인 세포외막단백질의 구성 단백질 중 면역원성을 띄는 단백질을 규명하기 위해 실시한 프로테오믹스에서 3가지의 단백질을 동정할 수 있었다. 3가지 단백질 중 outer membrane protein A의 경우, 이미 많은 연구논문에서 이 단백질을 전사시키는 유전자인 *ompA*가 숙주체내에서 T cell 반응 및 세포매개성면역을 자극시킨다고 보고되어지고 있다(Cordwell, 2006; Lee *et al.*, 2007). 그러므로, OMP가 불활화 백신의 서브유닛으로 사용될 경우 숙주의 면역체계를 유발할 수 있을 것이며, 본 연구에서 수행한 OMP 추출방법 또한 OmpA 단

백질의 수율을 최대화하여 숙주의 체내 면역반응을 일으킬 수 있는 충분한 양의 단백질을 얻을 수 있을 것이다.

세포외막단백질을 이용한 불활화 단백질의 백신효과는 이미 여러 논문에서 그 효과를 증명하고 있으나, 가장 큰 문제점은 면역반응에 도달하는 단백질 양의 제한이었다 (Meenakshi *et al.*, 1999). 따라서, 본 연구에서는 강하고 지속적으로 면역반응을 유지시키며 체액성 및 세포매개성 면역반응까지 유발시키는 효과적인 부형제를 사용함으로써, 최소한의 OMP양으로도 높은 생존율을 유지할 수 있었다. 접종량 결정 실험에서 50 μg 이상의 OMP 농도가 숙주체내에서 뚜렷한 임상증상을 나타내지 않으면서도 100%의 생존율을 보였으며, 근육접종경로가 피하보다 백신접종부위의 부작용이 관찰되지 않으면서 간이나 비장의 실질장기에 나타나는 종대가 적게 관찰되었다.

결 론

갈색계에 감염되어 큰 경제적 손실을 유발하는 SG의 감염을 효과적으로 방어하기 위해 균의 세포외막단백질을 항원으로 이용하여 백신을 제조하였다. 백신의 구성 단백질 확인을 위해 프로테오믹 분석을 실시하였으며 분석 후 이를 실험동물에 투여하여 백신의 효능평가를 실시한 결과 다음의 결과를 얻을 수 있었다.

세포외막단백질을 구성하고 있는 면역원성단백질은 Outer membrane protein A(OmpA), OMP channel protein, DNA starvation and stationary phase protein, 3가지 단백질로 구성되어 있으며 이 단백질 중 OmpA의 경우 숙주면역반응을 촉진시킨다고 알려져 있다.

닭에 부형제와 OMP백신을 혼합하여 백신을 투여한 경우 최저 농도 50 μg 에서 100% 생존율의 효과를 나타내었으며 접종 경로는 근육접종이 피하접종보다 접종부위의 부작용이나 실질장기 미치는 영향이 적은 것으로 관찰되었다.

백신의 접종 횟수는 1회접종군과 2회접종군의 결과적인 차이가 없었다. 그러므로, 1회접종만으로도 충분한 숙주의 면역 반응이 일어날것으로 예상되어진다.

세포외막단백질을 이용한 백신의 효능은 이미 여러 차례 다른 논문에서 보고되었지만 본 실험의 경우 백신으로 사용될 세포외막단백질을 프로테오믹적 접근을 이용하여 그 성분단백질을 조사하여 백신의 면역반응을 *in vitro*로 증명하였다.

본 실험의 OMP 추출방법에 따른 OMP 분리량은 15 mL 배양 시 10 mg이었으며 이는 대량으로 단백질을 추출하여 수율 향상을 위한 문제점을 개선하였다. 또한 기존에 보고된 숙주의 면역반응유발을 위한 용량보다 훨씬 더 적은 용량으로도 같은 효과를 보였다는 점에서 양계농가에 가급티푸스 예방에 기여할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부와 한국산업기술진흥원의 지역산업 기술개발사업으로 수행된 연구결과이며 아울러 강원대학교 동물의학융합연구소의 기술적 지원에 의해 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

- Babu, U., Scott, M., Myers, M. J., Okamura, M., Gaines, D., Yancy, H. F., Lillehoj, H., Heckert, R. A., and Raybourne, R. B. (2003) Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **10**, 39-44.
- Barrow, P. A., Huggins, M. B., and Lovell, M. A. (1994) Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infect. Immun.* **62**, 4602-4610.
- Bouzoubaa, K., Nagaraja, K. V., Newman, J. A., and Pomeroy, B. S. (1987) Use of membrane proteins from *Salmonella Gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avian Dis.* **31**, 699-704.
- Clarke, R. C. and Gyles, C. L. (1993) *Salmonella*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animal. Gyles, C. L., and Thoen, C. O. (eds). 2nd ed, Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 199-153.
- Collins, F. M. and Campbell, S. G. (1982) Immunity to intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **3**, 5-66.
- Cordwell, S. J. (2006) Technologies for bacterial surface proteomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 320-329.
- Eswarappa, S. M., Janice, J., Balasundaram, S. V., Dixit, N. M., and Chakravorty, D. (2009) Host-specificity of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: Insights from comparative genomics. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 468-473.
- Ewing, W. H. (1986) Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed, Elsevier Science Publishing, NY, pp. 247-318.
- Guard-Petter, J. (2001) The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environ. Microbiol.* **3**, 421-430.
- Lee, H. S., Lim, S. K., Cho, Y. S., Joo, Y. S., Kim, J.H., and Kim, J. M. (2007) Protective effects of mix-crude outer membrane protein *Salmonella* vaccine against salmonellosis in chickens and pigs. *Korean J. Vet. Res.* **42**, 147-155.
- Lee, J. S., Jung, I. D., Lee, C. M., Park, J. W., Chun, S. H., Jeong, S. K., Ha, T. K., Shin, Y. K., Kim, D. J., and Park, Y. M. (2010) Outer membrane protein a of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates dendritic cells and enhances Th1 polarization. *BMC Microbiol.* **15**, 263-270.
- Lillehoj, H. S. (1991) Cell-mediated immunity in parasitic and bacterial diseases. In: Avian cellular immunology. Sharma, J. M. (ed) CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 155-181.
- Meenakshi, M., Bakshi, C. S., Butchaiah, G., Bansal, M. P., Siddiqui, M. Z., Singh, V. P. (1999) Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with *Salmonella* Enteritidis. *Vet. Res. Commun.* **23**, 81-90.
- Popoff, M. Y., Bockemuhl, J., and Gheesling, L. L. (2004) Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* **155**, 568-570.
- Rabilloud, T., Kieffer, S., Procaccio, V., Louwagie, M., Courchesne, P. L., Patterson, S. D., Martinez, P., Garin, J., and Lunardi, J. (1998) Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: Toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis* **19**, 1006-1014.
- Seo, Y. S., Lee, S. H., Shin, E. K., Kim, S. J., Jung, R., Hahn, T. W. (2006) Pulsed-field gel electrophoresis genotyping of *Salmonella* Gallinarum and comparison with random amplified polymorphic DNA. *Vet. Microbiol.* **115**, 349-357.
- Silva, E. N., Snoeyenbos, G. H., Weinack, O. M., and Smyser, C. F. (1981) Studies on the use of 9R strain of *Salmonella* Gallinarum as a vaccine in chickens. *Avian Dis.* **25**, 38-52.
- Smith, I. M. (1969) Protection against experimental fowl typhoid by vaccination with strain 9R reconstituted from the freeze-dried state. *J. Comp. Pathol.* **79**, 197-205.
- Valiente Moro, C., De Luna, C. J., Tod, A., Guy, J. H., Spargano, O. A., and Zenner, L. (2009) The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): A potential vector of pathogenic agents. *Exp. Appl. Acarol.* **48**, 93-104.
- Wigley, P., Hulme, S., Powers, C., Beal, R., Smith, A., and Barrow, P. (2005) Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterize immunity to fowl typhoid in the chicken. *BMC Vet. Res.* **12**, 2-7.
- Wu, M., Stockley, P. G., and Martin, W. J. 2nd. (2002) An improved western blotting technique effectively reduces background. *Electrophoresis* **23**, 2373-2376.

(Received 2012.10.5/Revised 2013.3.21/Accepted 2013.3.28)