

대장균 O157:H7의 독소 생성 유전자의 변이에 의한 변성독소 생산 및 미량독소 검출을 위한 단클론성 항체생산 I. 독소 생성 유전자의 변이에 의한 변성독소의 발현.

김용환 · 강호조 · 김상현* · 이은주** · 차인호*** · 이우원***

경상대학교 수의과대학
*국립수의과학 검역원
**경기도 축산위생연구소
***부산시 보건 연구원
(2001년 5월 28일 게재승인)

Production of toxoid and monoclonal antibody by mutation of toxin gene from *Escherichia coli* O157: H7 for detection of low levels of the toxin I. Expression of toxoid by mutagenesis of verotoxin gene

Yong-hwan Kim, Ho-jo Kang, Sang-hyun Kim*, Eun-jo Lee**
In-ho Cha***, Woo-won Lee***

College of Veterinary Medicine, Gyengsang National University, Chinju 660-701, Korea

*National Veterinary and Quarantine Service, Anyang 430-016, Korea

**Kyonggi Livestock and Veterinary Research Institute, Uijeongbu 480-101, Korea

***Institute of Health and Environment Busan, Korea

(Accepted by May 28, 2001)

Abstract : Single base substitution and deletion mutation have been introduced into the verotoxin 2 (VT2)A subunit gene from O157:H7 isolates to reduce cytotoxicity of VT2 and the cytotoxicity between wild type toxin and mutant toxoid were compared. A M13-derived recombinant plasmid pEP19RF containing a 940bp *EcoRI-PstI* fragment of VT2A gene was constructed for oligonucleotide-directed mutagenesis. The double mutant pDOEX was constructed by point and deletion mutation of two different highly conserved regions of VT2A encoding active site cleft of enzymatic domain. The key residue, Glu 167(GAA) and the pentamer (WGRIS) consisting of the enzymatic domain were replaced by ASP(GAC) and completely deleted in nucleotide sequence analysis of mutant, respectively. In the comparison of vero cell cytotoxicity between wide type toxin and toxoid from mutant, the wild type toxin expressed cytotoxicity in dilution of 10^6 , but the toxoid from mutant did not show cytotoxicity to vero cells.

Key words : *E. coli* O157:H7, verotoxin 2 gene, enzymatic active domain, oligonucleotide directed mutagenesis, cytotoxicity.

서 론

장관출혈성 대장균 O157:H7은 Vero 독소를 생산하여

용혈성 요독증후군, 출혈성 결장염, 혈소판 감소증 및 자
만병 등을 유발한다^{1,2}. 1982년 미국 Oregon과 Michigan
주, 캐나다 Ontario 주에서 분쇄한 쇠고기 급식에 의한

이 논문은 1997 한국과학재단의 학술연구비(과제번호 971-0605-043-2)에 의하여 수행되었음

Address reprint requests to Dr. Yong-hwan Kim, College of Veterinary Medicine, Gyengsang National University, Chinju 660-701, Korea

출혈성 대장염 환자발생이 처음 보고된 이래, 육류 및 육가공품의 소비가 많은 서구 및 북미지역에서 매년 집단 발생하고 있다^{3,4}. 특히 1996년 일본에서 9,451명의 환자가 발생하여 12명이 사망하므로써 공중위생상 심각한 문제로 대두되고 있다⁵. 국내에서도 Cha와 Kim⁶이 소의 분변에서 원인균을 분리한 바 있으며, 미국산 수입 육에서도 분리되어 관계당국에서는 그 예방대책을 강화하고 있다.

Verotoxin 생성 대장균으로는 43종 이상의 혈청형이 알려져 있으며 이들 중 O157:H7 형이 VT 노출환자에서 분리율이 높으며 O157:H7에 속하지 않는 이종혈청형은 생화학적 또는 혈청학적인 marker가 없기 때문에 검출하기가 매우 어렵다¹. Knowalchuk *et al*⁷은 수종성 질환을 일으킨 돼지에서 분리한 대장균의 독소가 vero 세포주에 독성을 나타내어 이를 “Verotoxin” 이라 명명하였다.

Verotoxin(VT)은 Vero 및 Hella cell에 대한 세포독성 및 항원성의 차이에 따라 VT1, VT2 및 VT2e 등으로 구분며, MW 32 Kd의 A subunit와 MW 7.7 Kd 인 5개의 B subunit로 구성되어 있다^{17,19}. 이들은 숙주 세포내의 단백질 번역 과정에서 A subunit는 elongation factor I을 차단하므로써 protein 합성을 억제하며, B subunit는 독소와 receptor의 특이적인 결합 및 항체형성에 관여한다^{10,11}.

VT1, VT2의 구조유전자는 phage DNA에서, VT2e의 구조 유전자는 염색체에서 유래된 것으로 밝혀졌으며¹², *Shigella dysenteriae* type 1 및 *Shigella flexnari*의 DNA와 동질성이 있는 것으로 알려져 있다^{11,13}. Jackson *et al*¹⁴은 VT1과 VT2 유전자를 cloning 하여 염기 서열을 보고하였으며, Gyles *et al*¹² Weinstein *et al*¹⁵은 부종병에 감염된 돼지유래 대장균으로부터 VT2e 유전자의 염기서열을 보고한 바 있다. VT1과 VT2 유전자의 염기서열과 아미노산서열은 동질성이 높으며 VT2와 VT2e의 염기서열은 거의 유사하다고 한다^{12,14,15}. Frankel *et al*¹⁶은 아미노산의 결정형태 및 변이유발에 의한 분석으로, ricin 계와 ST A 사슬의 절편중에서 염기서열의 동질성이 현저한 2개 영역은 숙주세포의 28S rRNA와 결합하고, purin 기를 제거하는 각각의 작용에 필요한 부위라고 하였다. Jackson *et al*¹⁷은 Shigatoxin(ST)과 VT1A subunit의 아미노산 서열을 분석하여 2 영역에서 중요한 동질

성을 발견하고 이를 A-chain의 효소 활성부라고 하였다. 여러 연구자들은 이 2 영역의 효소활성부에 대한 유전자 부위에 변이를 유발하여 생산한 변성독소는 세포독성이 감소하였다고 한다^{18,19,20}. 그러나 현재까지 VT2의 효소활성 영역에 대한 결정구조는 동일계의 다른 독소(ricin A, ST 및 VT1)와 유사할 것으로 추정하고 있으나 정확히 밝혀진 바는 없다.

본 연구에서는 국내분리 대장균 O157:H7의 독소생성 유전자의 효소활성부에 대하여 변이를 유발하여 무독성 변성독소 생성균주를 선발하고 단클론성 항체 생산 및 백신개발을 위한 이용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

변이 도입용 Primer의 설계

(1) Point mutation을 위한 Primer

VT2 효소 활성 영역의 active-site cleft를 구성하는 첫 번째 영역의 아미노산중 핵심 잔기인 Glu167에 대한 위치특이적 변이 유발을 위하여 Glu 코돈염기 GAA를 Asp codon 염기 GAC로 치환되도록 19 mer 크기의 primer를 설계하였다.

(2) Deletion mutation을 위한 Primer

VT2 효소 활성 영역의 active-site cleft를 구성하는 두 번째 영역의 아미노산 5개(WGRIS)를 결손변이 시키기 위하여 결손될 아미노산 양쪽으로 각각 5개씩의 아미노산에 해당하는 염기서열을 직접 연결하는 primer를 구성하여 가운데 위치한 아미노산의 코돈염기 15개가 결손되도록 설계하여 한국생공에 의뢰 합성하였다.

변이 도입용 Vector의 작성

분리한 대장균 KSC109(O157:H7)의 VT2 유전자를 cloning 한 pKSC101을 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단한 940bp의 insert를 GeneClean II kit(Bio 101, CA)를 사용하여 agarose gel로부터 회수하고, 동일 제한 효소로 절단한 M13mp19에 삽입하여 재조합 plasmid pEP19RF를 작제하였다.

Site directed mutagenesis

pEP19RF template 100 ng에 20 pM의 mutation primer,

Table 1. Synthetic oligonucleotide used for site-directed mutation of VT2e gene

Primer	Sequence	Length (mer)	Used for
PF1	5' - C-ACA-GCA-GAC-GCC-TAA-CGC-3'	19	point mutation
PF2	5' - GAC-CTC-ACT-CTG-AAC-AAT-GTG-CTT-CCG-GAC-3'	30	deletion mutation

50 mM MgSO₄ 1 μl, PCR buffer 5 μl, dNTP 4.7 μl, Platinum Pfx DNA polymerase(Gibco-BRL, USA) 2.5 unit를 가하여 thermal cycler(Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 증폭하였다. PCR은 94°C에서 4분간 예열한 다음 94°C에서 40초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 68°C에서 5분간 extension을 한 과정으로 하여 15 cycle로 증폭하였다. 증폭산물은 전기영동하여 확인한 band를 agar gel로부터 회수하고 genclean kit (BIO 101, CA)를 사용하여 정제하였다. 정제한 DNA 20 μl에 Dpn 1 μl(10 u)를 가하여 37°C에서 2시간 반응시켜 변이가 도입되지 않은 상보적인 사슬을 분해하였다. 반응액 10 μl에 T4 DNA ligase 3 unit를 가하여 37°C에서 60분간 ligation 한 다음 JM109 competent cell에 형질 전환하였다.

Mutant VT2A subunit에 대한 염기서열 확인

JM109에 형질전환한 VT2A mutant의 mutation 유무를 확인하기 위하여 JM109에 M13K07 helper phage를 감염시켜 단일쇄 DNA(ssDNA)를 추출하였다. 이 ssDNA를 T7 sequencing kit(Pharmacia, USA)와 [³⁵S]dATP (Amersham, USA)를 이용하여 dideoxynucleotide chain termination 방법²¹으로 염기서열을 결정하였다.

변이 유전자의 발현

염기서열에 의하여 변이가 확인된 double mutant의 plasmid를 JM109에 형질전환 시킨 변이주를 DOMUT 109라고 명명하고, 충분한 발현을 유도하기 위하여 0.5% glucose와 100 μl/ml의 ampicillin을 첨가한 LB broth에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 다음 동일 배지에 배양액 1%를 접종하여 37°C에서 진탕배양하였다. 균의 농도가 600 nm 흡광도에서 OD 0.7이 되었을 때 lac promoter 유발물질인 IPTG를 최종농도가 0.5 mM이 함유되게 첨가하여 37°C에서 3시간 배양한 다음 상층액을 0.22 μm의 membrane으로 여과한 여액을 세포독성시험에 사용하였다.

세포 독성시험

Gentry와 Dalrymple²²의 방법에 따라 정제한 VT2와 변성독소를 계단 희석하여 96 well plate에 단층배양한 Vero cell에 접종하고 3일간 배양하면서 CPE를 관찰하여 50%의 세포를 사멸시키는 시료의 가장 높은 희석배수(CD₅₀)를 end point로 하여 VT의 활성을 결정하였다.

결 과

변이도입 vector의 작성

변이 도입용 플라스미드 pEP19 RF의 제작 : VT2 유

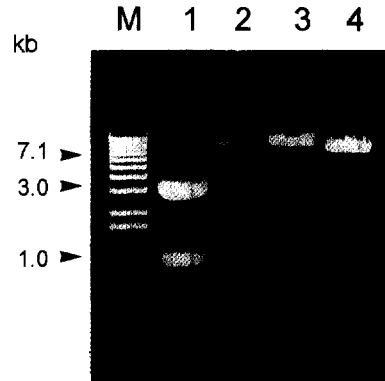


Fig 1. Agarose gel (1.0%) Electrophoresis pattern of pEP19RF products. Lane M : 1 kb marker (BRL, USA). Lane 1 : pKSC101/*EcoRI-PstI*. Lane 2 : M13mp19/*EcoRI-PstI*. Lane 3 : pEP19RF/*EcoRI*. Lane 4 : pEP19RF/*EcoRI-PstI*.

전자를 보유하고 있는 pKSC101(4.0 kb)을 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단하여 940 bp 단편을 추출한 후 동일제한 효소로 절단한 phage vector M13mp19에 삽입하여 변이도입용 플라스미드 pEP19RF를 제작한 결과는 Fig 1에서 보는 바와 같다. Lane 1은 pKSC101을 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단하여 전기 영동한 것으로 940 bp 크기의 단편을 확인하였다. M13mp19(7.2 kb) vector(Lane 2)에 940 bp의 insert를 삽입시켜 약 8.1 kb의 변이도입용 플라스미드 pEP19RF (lane 3)를 제작하고, 목적 유전자의 확인을 위하여 pEP19RF를 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단하여 insert의 존재를 확인하였다(lane 4).

Site directed mutagenesis

변이 도입용 플라스미드 pEP19RF에 인산화 한 point 및 deletion mutation primer를 annealing 시킨 후 Platinum Pfx DNA polymerase와 T4 DNA ligase를 가하여 변이도입 가닥이 template를 따라 완전히 중합되었을 때 ligation 되도록 반응시켜서 새로운 phage의 RF를 합성하고, 반응액 5 μl를 취하여 1% agrose gel에서 전기영동한 결과 약 8.1 kb의 새로 중합된 DNA band가 확인되었다(Fig 2).

Phage RF를 분리하여 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단하여 전기영동한 결과 Fig 3에서 보는 바와 같이 약 7.2 kb의 phage vector와 변이 도입을 유도한 940 bp의 insert가 확인되었다.

Mutant VT2A subunit에 대한 염기서열 확인

Phage를 함유하는 배양 상층액을 PEG 용액으로 침전 원심하여 ssDNA를 추출하고, 변이도입 여부를 확인하기 위하여 Sanger *et al*²¹의 dideoxy-chain termination 방

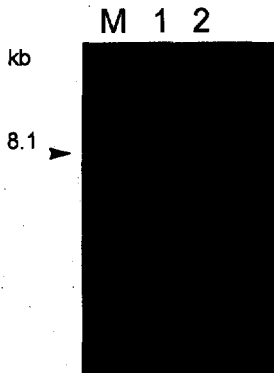


Fig 2. Newly synthesized and ligated DNA products. Lane 1 : M13mp18 ssDNA (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) as a control. Lane 2 : The product of DNA polymerization and ligation with pEP19RF template and mutagenic primer. Lane M : 1 kb size Marker (BRL, USA).

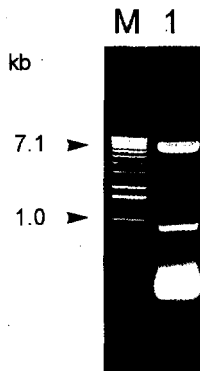


Fig 3. Agarose gel(0.1%) electrophoresis pattern mutated new phage clone. Lane M : 1 kb marker(BRL, USA). Lane 1 : Double mutated new phage clone/*EcoRI-PstI*.

범으로 point mutation이 일어난 phage DNA의 염기서열 영역을 확인한 결과, VT2의 효소 활성 영역의 active-site cleft를 이루는 첫번째 영역의 아미노산들 중 key residue로 추정되는 Glu167의 코돈 GAA가 GAC(Asp)로 치환되어 있었다(Fig 4). 또한 Deletion mutation을 유도한 phage DNA의 염기서열 영역을 확인한 바, VT2의 효소 활성 영역의 active-site cleft를 이루는 두번째 영역의 아미노산 5개(Trp202, Gly203, Arg204, Ile205, Ser206) 전부가 wild type에 비해 결손되어 있었다(Fig 5).

Vero cell에 대한 세포독성

VT2A 유전자 변이주 DOMUT 109를 배양하여 IPTG (최종 농도 1 mM) 유도로 변이 유발한 독소 단백질을 발현시킴과 동시에 wild type VT2의 재조합 균주

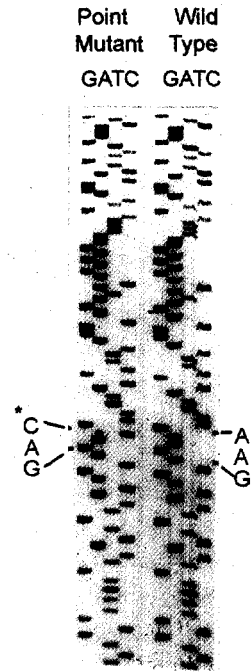


Fig 4. DNA Sequence analysis of point mutated region in VT2A gene.

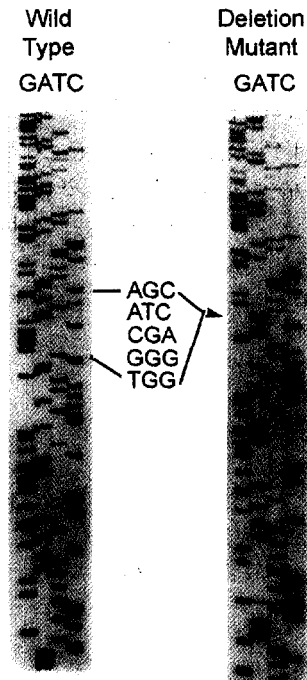


Fig 5. DNA Sequence analysis of deletion mutated region in VT2A gene.

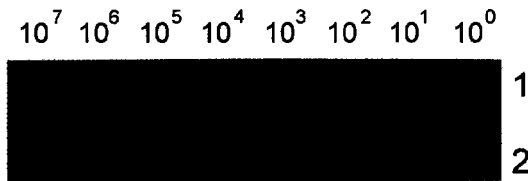


Fig. 6 Comparison of cytotoxicity between wild type VT2 and its mutants on vero cells. Row 1 : Wild type VT2 from KSCR 109, Row 2 : Culture supernatant from DOMUT109.

KSCR105를 동일 조건으로 발현시켰다. 각 상층액을 회수하여 Vero cell에 대한 세포독성을 비교한 바 Fig 6에서 보는 바와 같이 wild type의 배양 여액은 10⁶ 희석액에서 세포 독성을 나타낸 반면 변이주의 배양 여액은 세포독성을 인정할 수 없었다.

고 찰

Verotoxin family와 같은 효소활성을 나타내는 독소는 castor seed의 독소인 ricin과 Shigella dysenteriae type I의 독소인 Shiga toxin이 알려져 있다¹¹. 이들 독소들의 공통적인 효소 활성은 RNA N-glycosidase로서, 진핵 세포의 ribosome에 있는 28S rRNA loop에서 adenine 염기 하나만을 가수분해 시켜 헤리하르프씨 진핵세포의 단백질 번역기구에 관련된 elongation factor 들이 정상적으로 ribosome에 결합하는 것을 방해하여 단백질 합성을 차단한다^{22,23}.

Deresiewicz *et al*²⁴은 X-ray crystallography를 이용하여 Shiga toxin family에 속하는 독소들의 3차원적인 구조를 분석한 결과, Shiga toxin, Shiga-like toxin 및 ricin에는 효소단백질의 active-site cleft를 구성하는 특이적 아미노산들이 공통적으로 존재함을 보고하였다. VT1과 STs의 active-site cleft를 구성하는 아미노산들은 단순 polypeptide 구조상 두 영역에 나뉘어져 있으나, 단백질 번역 후 수식과 단백질의 접힘(folding)이 일어나면 3차원적인 구조로 바뀌어 하나의 효소활성 영역을 이루며 독립적 또는 상호 보완적으로 효소활성 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다^{17,24,25}.

Active-site cleft를 구성하는 아미노산들은 각 toxin 유형의 A subunit에 두 영역으로 나누어져 잘 보존되어 있으며, 첫 번째 보존영역은 Glutamic acid 167부터 Phenylalanine 171까지이고, 두 번째 보존영역은 Tryptophan 202 부터 Serine 206까지라고 하였다²⁴. Hovde *et al*¹³은 첫 번째 보존영역의 Glu167이 VT1에서 효소활성 기능에 중요한 아미노산 잔기라고 보고하였으며, Frankel *et al*¹⁹과 Yamasaki *et al*²⁰은 첫 번째 보존영역에서 Arg170

도 중요한 역할을 한다고 보고한 바 있다. 또한 Jackson *et al*¹⁷은 Shiga toxin의 A subunit에서 두 번째 보존영역의 pentamer(WGRLS)에 대한 deletion mutation을 유발하여 holotoxin의 assembly와 면역원성의 변화없이 Vero cell에 대한 cytotoxicity를 완전히 소실시킬 수 있었다고 하였다.

본 실험에서는 국내 분리군 O157 H:7의 VT2 gene을 cloning 한 pKS101을 사용하여 독소단백질의 active site cleft를 구성하는 첫 번째 보존영역과 두 번째 보존영역에 해당하는 염기서열 부위에 point 및 deletion mutation을 유발하였다. 변이 유전자를 발현시켜 변성독소를 생산하여 vero 세포에 대한 세포 독성의 상실 여부를 검사하여 단클론성 항체생산을 위한 항원재료로서의 사용 가능성을 검토하였다.

pKS101을 제한효소로 절단한 940bp의 VT2A gene을 vector M13mp19에 삽입하여 변이도입용 플라스미드 pEP19RF를 제작하였다. pEP19RF template에 mutagenic primer를 annealing 시킨 다음 DNA 중합효소와 ligase를 가하여 point 및 deletion (double) mutation이 유발된 새로운 phage RF를 합성하였다. Double mutation이 일어난 phage DNA의 염기서열 부분을 Sanger *et al*²¹의 dideoxy-chain termination 방법으로 확인한 결과 VT2 효소활성 영역의 active-site cleft를 이루는 첫 번째 영역의 핵심 잔기 아미노산 Glu 167 코돈 GAA가 GAC(Asp)로 치환되어 있었으며, 두 번째 효소활성영역 아미노산 5개 (Trp202~Ser206)가 wild type에 비하여 결손되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Kim 등²⁶의 VT2A gene의 염기치환에 의한 변이유발의 결과와 일치하였다.

Hovde *et al*¹³은 VT1A, Jackson *et al*¹³은 VT2A subunit gene의 첫 번째 효소활성 영역에 대하여 point mutation을 유발하여 생산한 변성독소는 wild type에 비하여 vero 세포에 대한 세포독성이 1,000배 정도 감소하였다고 한다. VT2A subunit의 두 번째 효소활성영역에 deletion mutation을 유발하여 Kim 등²⁶은 3,000배 정도 세포독성의 감소를 보고하였으며, Jackson *et al*¹⁷은 세포독성이 거의 소실되었다고 하였다. 본 실험에서 VT2 subunit gene의 효소활성영역에 대하여 point 및 deletion mutation을 유발한 double mutant에서 생산한 변성독소는 vero 세포에 대한 세포독성을 인정할 수 없었다. 이러한 결과는 VT2A subunit gene의 변이를 유발한 여러 연구자들의 성적보다 우수하였으며, Jackson *et al*¹⁷이 deletion mutation을 유발한 성적과 유사하였다. 그러나 효소활성 부 2 영역 모두 변이를 유발하므로 더 안정성이 있는 변성독소를 생산할 수 있으리라 생각된다.

이상과 같은 결과를 통하여 볼 때 VT2에 있어서도 다른 VT 및 ST family 들과 마찬가지로 효소활성 영역에

active-site cleft가 존재하며, 이를 구성하는 아미노산들에 대한 point 및 deletion mutation의 유도가 효과적으로 수행되었음을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 이들 변이 VT2 유전자에서 발현된 단백질은 VT2의 미량독소의 검출과 진단에 필요한 monoclonal antibody 생산 및 백신개발을 위한 재료로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

분리균 O157:H7의 vero 독소 생성 유전자의 효소활성부 2 영역에 대하여 site-directed mutagenesis를 유발하고 변이주에서 생산한 변성독소의 vero 세포에 대한 독성 감소 정도를 wild type과 비교한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

분리균 O157:H7의 vero 독소 유전자를 클로닝한 pKSC101을 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단한 940bp의 단편을 M13mp19에 삽입하여 변이도입용 vector pEP19RF를 제작하였다. pEP19RF temperate에 mutagenic primer를 annealing 하여 PCR 반응으로 효소활성부 2 영역에 대하여 point 및 deletion mutation을 유발하였다. Double mutation을 유발한 Phage DNA의 염기서열을 분석한 결과 첫 번째 영역 핵심잔기 아미노산 Glu167 코돈 GAA가 GAC(Asp)로 치환되어 있었으며, 두 번째 효소활성 영역 아미노산 5개(Trp202~Ser206)에 대한 코돈 염기 15개가 결손되어 있었다. 야외주와 변이주의 vero 세포에 대한 세포독성을 비교한 바 야외주의 배양여액은 10^6 희석액에서 세포독성을 나타내었으나, 변이주의 배양여액은 세포독성이 인정되지 않았다.

참고문헌

- Karmali MA. Infection by verocytotoxin producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol Rev.* 2:15-38, 1989.
- O'Brien AD, Holmes Rk. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev.* 51:206-220, 1987.
- Doyle MP. *Escherichia coli* and its significances in foods. *Intern J food Microbiol.* 12:289-301,1991.
- Read SC, Glyles CL, Clarke RC, et al. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork and chicken in southwestern Ontario. *Epidemiol Infect.* 105:11-20,1990.
- Michino H, Araki K, Mianamis, et al. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai city, Japan, associated with consumption of white radish sprout. *Am J epidemiol.* 50:787-796, 1999.
- Cha IH, Kim KS, Kim SH, et al. Molecular cloning and expression of Shiga-like toxin II gene(St-II) from an isolate of healthy Korean native bovine feces, *Escherichia coli* KSC109. *J Microbiol.* 34:151-157, 1996.
- Konowalchuk J, Dickie N, Stavric. S. Veroreponse to cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immune* 18:775-779.
- Strockbine NA, Marques LRM, Newland JW, et al. Two toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect Immun.* 53:135-140, 1986.
- Margues LRM, Peiris, JSM, Cryz SJ, et al. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol Letts.* 44:33-38, 1987.
- O'Brien AD and LaVeck GD. Immunological and cytotoxic activities of *Shigella dysenteriae* I (Shiga) and shiga-like toxins. *Infect Immun.* 35:1151-1154, 1982.
- Saxena SK, O'Brien AD and Ackerman EJ. Shiga-like toxin II variant and ricin are all single-site RNA N-glycosidase of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 264:596-601,1989.
- Gyles CL, DeGrandis SA, Mackenzie C, et al. Cloning and nucleotide analysis of genes determining verotoxin production in a porcine edema disease isolates of *Eschrichia coli*. *Microb Pathog.* 5:419-426,1988.
- Hovde CJ, Calderwood SB, Mekalonos JJ, et al Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. *Proc Natl Sci USA.* 85:2568-2572, 1985.
- Jackson MP, Neil RJ, O'Brien HD, et al. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for shiga-like toxin II encoded by bacteriophage from *Eschrichia coli* 933. *FEMS Microbiol Letts.* 44:109-114, 1987.
- Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, et al. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol.* 170:4223-4230, 1988.
- Frankel A, Schlossman D, Welsh P, et al. Selection and characterization of ricin toxin A-chain mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 9:415-520, 1989.
- Jackson MP, Deresiewicz RL, Calderwood SB. Mutational analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin II enzymatic subunit. *J Bacteriol.* 172:3346-3350, 1990.
- Schlossman D, Withers D, Welsh P, et al. Role of glutamic acid 177 of ricin toxin A chain in enzymatic inactivation of ribosome. *Mol Cell Biol.* 9:5012-5021, 1989.
- Frankel A, Welsh P, Richardson J, et al. Role of arginine 180 and glutamic acid 177 of ricin toxin A chain in enzymatic inactivation of ribosomes. *Mol Cell Biol.* 10:6257-6263, 1990.
- Yamasaki S, Furutani M, Ito K, et al. Importance of arginine at position 170 of the A subunit of Verotoxin I Produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for

- toxin activity. *Micorb Pathog*, 11:1-9, 1991.
21. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74:5463-5467, 1977.
 22. Gentry MK, Dalrymple JM. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *J Clin Microbiol*, 12:361-366, 1980.
 23. Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase activity of ricin A chain. *J Biol Chem*, 262:8128-8130, 1987.
 24. Deresiewicz RL, Calderwood SB, Robertus JD, *et al.* Mutation affection the activity of the Shiga-like toxin I A-chain. *Biochemistry*, 31:3272-3280, 1992.
 25. Ready MP, Kim Y, Robertus JD. Site-directed mutagenesis of ricin A-chain and implication of the mechanism of action. *Proteins Struct Funct Genet*, 10:270-278, 1991.
 26. Kim YH, Kim SH, Cha IH, *et al.* Site specific and deletion mutagenesis for two regions of verotoxin 2A gene encoding enzymatically active domain. *Korean J Vet Res*, 37(3):541-546, 1997.