

## 파스튜렐라 (A:3) 외막 단백질 H의 유전자 클로닝 · 발현 및 면역혈청 생산

김영환 · 황헌<sup>1</sup> · 이석찬 · 박은석<sup>2</sup> · 유선동<sup>2</sup> · 이정민 · 양주성 · 권무식\*  
성균관대학교 유전공학과, <sup>1</sup>성균관대학교 바이오 메카트로닉스과, <sup>2</sup>성균관대학교 약학과

**Molecular Cloning and Expression of a Gene for Outer Membrane Protein H in *Pasteurella multocida* (A:3) : Production of Antisera against the OmpH. Kim, Younghwan, Heon Hwang<sup>1</sup>, Sukchan Lee, Eun-Seok Park<sup>2</sup>, Sun-Dong Yoo<sup>2</sup>, Jeongmin Lee, Joo-Sung Yang, and Moosik Kwon\*.** Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon, 440-746, Korea, <sup>1</sup>Department of Bio-Mechatronic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon, 440-746, Korea, <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea – *Pasteurella multocida* is known to cause widespread infections in husbandry. To induce homologous and heterologous immunity against the infections, outer membrane proteins (OMPs) in the envelope of *P. multocida* are thought to be attractive vaccine candidates. Outer membrane protein H is considered as the major component of OMPs. In this study, a gene for OmpH was isolated from pathogenic *P. multocida* serogroup A. The gene was composed of 1,047 nucleotides coding 348 amino acids with signal peptide of 20 amino acids. The amino acid composition showed about 80 to 98 per cent sequence homologies among other 10 strains of *P. multocida* serogroup A, reported so far. A recombinant *ompH*, from which signal peptide was truncated, was generated using pRSET A to name “pRSET A/OmpH-F2”. The pRSET A/OmpH-F2 was well expressed in *E. coli* BL21(DE3). The truncated OmpH was purified using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) affinity column chromatography. Its molecular weight was registered to be 40 kDa on SDS-PAGE gel. In order to generate immunosera against the OmpH, 50 ug of the protein was intraperitoneally injected into mice three times. The anti-OmpH immunoserum recognized about  $5 \times 10^{-2}$  ng quantity of the purified OmpH. It can be used for an effective vaccine production to prevent fowl cholera caused by pathogenic *P. multocida* (Serogroup A).

**Key words:** *Pasteurella multocida* serogroup A, OmpH, outer membrane protein H, fowl cholera

그람 음성균인 *Pasteurella multocida*는 토끼의 코막힘, 소와 양, 염소에서의 폐렴, 닭의 가금콜레라, 그리고 돼지의 위축성 비염 등과 같은, 가축 산업에 큰 피해를 입힐 수 있는 동물 감염원이다[1, 2]. *Pasteurella multocida*에 의해 유발되는 질병에 대해서 그리 잘 연구되어 있지는 않으며, 현재 가축뿐 아니라 야생동물에까지 감염되어 심각한 문제를 유발하고 있다. 병원균은 A, B, D, E, F의 다섯 가지 serogroup으로 나뉘며[3], lipopolysaccharide antigen에 의해 16가지의 serotype으로 분류된다[4]. 각 serogroup과 질병의 발생에는 연관이 있다[5, 6]. 출혈성 패혈증은 serogroup B 또는 E와 관련이 있으며[7], 가금 콜레라는 serogroup A와 관련이 있다[5, 8]. 반면, 특정 *P. multocida* 중에서는 serotype이나 serogroup으로 분류되지 않는 것도 있다고 한다[9]. Serogroup A 균주는 항원에 의해 민감해진 적혈구 응집소에 의해서 분류된다고 한다[10].

그람 음성 미생물의 외막에서 발견되는 porin 단백질은 항

원으로써 높은 면역력을 가지고 있다고 알려져 왔다. 숙주 조직에서 저농도의 철분에 의해 발현된 면역 항원에 관한 *in vivo* 연구가 이전에 수행된 적이 있다. 철분은 미생물의 생장에 필수적이지만, *in vivo* 상에서는 숙주의 단백질과 결합하여 대부분 사용할 수 없게 된다. *P. multocida*와 같은 감염성 미생물은 이러한 철분 결핍을 극복하였다. 철분 제한 조건에 놓여진 미생물이 발현하는 단백질은 철분 요구성 외막 단백질이거나 혹은 또 다른 감염성 물질들이다[4]. *P. multocida*는 *in vivo*에서 철분을 필요로 하는 미생물이다. 이 균주가 철분 제한 조건에서 배양된다면 많은 수의 외막 단백질을 생산할 것이다[11, 12].

일반적으로, heat-killed 또는 formalin-killed whole cell 백신이 이러한 질병을 예방하는데 사용되어 왔다[9]. 현재에는 미생물 내에 존재하는 몇몇 구조 단백질의 면역력이 기대되고 있다[13]. 다소 모호하지만, *P. multocida*의 감염에 대한 면역화를 유발하는데 이러한 구조 단백질들이 이용되고 있다[14]. Louis Pasteur의 그람 음성 기생 미생물에 대한 면역화 실험 이후, 많은 미생물의 외막단백질들이 강력한 항원 물질로 작용한다는 것이 알려져 왔다. 특히 병원성 *P. multocida*의 외막단백질 중 하나인 OmpH는 면역에 관련

\*Corresponding author

Tel: 82-31-290-7861, Fax: 82-31-290-7870

E-mail: mskwon@skku.edu

한 강력한 항원 후보라고 생각되며, 가금 콜레라에 대한 백신으로써 작용할 것으로 기대되고 있다[2, 6].

*P. multocida*에 의해 유발된 피해는 축산업에 있어서 심각한 문제이다. 그러나 이에 상응하는 백신 개발은 미비한 실정에 있다. 이 연구는 *P. multocida* serogroup A에서 유래한 porin 단백질인 OmpH의 유전자를 클로닝하고 이를 *E. coli* 시스템에서 성공적으로 발현시켜, 쥐를 통한 면역학적인 검정에 목적을 두고 있다. 정제된 porin 단백질과 항체는 국내의 가금 콜레라에 대한 백신으로 이용할 수 있게 될 것으로 기대된다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

OmpH의 genomic DNA는 *Pasteurella multocida* serogroup A strain에서 분리되었으며, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 와 BL21(DE3)가 클로닝 및 발현을 위해 사용되었다. 사용된 배지는 Bacto™ brain-heart infusion(BHI)(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)이며, 5% sheep's blood가 포함된 BHI 한천배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양된 후 대량의 BHI 액체배지에서 동일조건으로 교반배양되었다[16]. *E. coli*는 클로닝을 위한 DH5 $\alpha$  strain과 단백질 발현을 위한 BL21(DE3)을 이용하였으며, 이 두 종류의 균주는 LB media (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.)에서 배양되었다.

### PCR

이미 밝혀진 *ompH* 유전자를 BLAST sequence database (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA)에서 검토하여 F1, R1과 특정 restriction enzyme site(*Bam*HI, *Kpn*I)를 포함하고 있는 F2, R2 프라이머를 제작하였다(Table 1). Template DNA는 BHI 배지에서 배양된 균주를 5분간 끓인 후 그 상층액을 5  $\mu$ l 사용했으며, 10 mM Tris-HCl(pH 8.4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>의 reaction mixtures 20  $\mu$ l, Super Taq DNA polymerase 1  $\mu$ l(SuperBio, Korea), 2 mM dNTP, primer 각각 10 pmol의 조성으로 수행되었다[17].

PCR machine은 PRIMUS 96(PEQLAB, Germany)을 사용하였으며, 95°C에서 5분 pre-heating 후, 95°C 1분, 56 30 초, 72°C 30초씩 35회 반복 후 마지막 elongation step을 72°C 3분 반응한 뒤 8°C에서 보관하였다.

### *ompH* 유전자의 클로닝

PCR로 증폭된 *ompH* 유전자를 0.8% agarose gel에서 gel extraction을 하여 추출한 뒤(Qiagen, USA) pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 T4 DNA ligase(Takara, Japan)를 이용하여 ligation하여 heat shock 방법에 따라 *E. coli*

DH5 $\alpha$  strain으로 형질전환하였다. 형질전환된 균주는 1.5% LB ampicillin(50 ug/ml) agar plate에서 배양된 후  $\alpha$ -complementation selection을 통하여 white colony만 선별하여 plasmid를 확보했다. 이 벡터를 이용하여 *ompH*-F2, -R2 프라이머로 PCR을 수행하였다. PCR strategy는 annealing temperature만 64°C인 것 외에는 모두 동일했다. PCR 산물은 다시 pGEM-T® easy vector에 sub-cloning되었다.

### 발현벡터 제작

Sub-cloning된 pGEM-T® easy/*ompH* 벡터와 pRSET A expression vector(Invitrogen)를 *Bam*HI과 *Kpn*I로 처리하여 pRSET A/*ompH*-F2 벡터를 제작했다. pRSET A vector는 6개의 histidine coding region을 N-terminal region에 가지고 있어서 단백질 정제 시 Ni-NTA resin을 이용하기에 용이한 벡터이다.

### OmpH 단백질 발현

pRSET A/*ompH* 벡터는 BL21(DE3) *E. coli* strain (Novagen, Germany)에 형질전환된 후, 1.5% LB agar plate에서 선별되었다. 생성된 콜로니는 ampicillin(50 ug/ml)이 첨가된 1/의 LB 배지에 접종하여 37°C 교반배양기에서 치수성장기(A<sub>600</sub> = 0.5, Ultrospec 2000, Pharmacia, USA)까지 배양되었다. OmpH 단백질의 발현은 34°C에서 0.5 mM의 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG) 유도한 후 강한 교반배양기에서 overnight 배양하여 이루어졌다. 대조군으로 사용하기 위하여 0 hr(IPTG induction 전)의 균주와 o/n(overnight 배양 후)의 균주를 1 ml씩 따로 준비하였다. Overnight 동안 배양된 균주는 10,000 g로 20분간 4°C에서 원심분리를 통하여 분리되었으며(J2-21M/E, Beckman, USA), 분리된 균주는 native condition에서 단백질을 분리하기 위해 균주 1그램 당 5 ml의 50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole로 구성된 pH 8.0의 lysis buffer에 녹여졌다. 현탁된 균주는 5초 burst, 9초 break 과정을 5분간 반복하여 sonication한 뒤 그 용해물을 10,000 g로 20분간 4°C에서 원심분리하여 상층액과 펠렛을 분리하였다. 분리된 펠렛은 지용성인 denaturing condition 단백질을 기타 물질과 분리해 내기 위해 100 mM의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM의 Tris-Cl, 8 M의 urea로 구성된 pH 8.0의 lysis buffer에서

Table 1. Primers design.

Isolation of <i>ompH</i> gene from genomic DNA
OmpH-F1: GTGATACTATGAAAAAGACAATCG(24 bp)
OmpH-R1: GATCCATTCCTTGCAACATATTGA(24 bp)
Construction of expression vector
OmpH-F2: GGATCCATGGCAACAGTTTACAAT(24 bp)
OmpH-R2: GATGGTACCAAAAATTAG AAGTGT(24 bp)

overnight 동안 교반된 후 10,000 g에서 20분간 4°C에서 원심분리하여 상층액을 획득하였다.

#### OmpH 단백질 정제

OmpH 단백질을 정제하기 위하여, nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin (Qiagen, Germany)을 사용하였다. Resin은 진공 수조에서 20분 동안의 가스 제거 과정을 거친 후 컬럼으로 옮겨, 10 ml의 denaturing condition lysis buffer로 중화시켰다. 분리된 denaturing condition OmpH 단백질 현탁액을 컬럼에 넣어주어 Ni-NTA resin과 발현된 OmpH 단백질이 결합될 수 있도록 6시간 가량 실온에서 반응시간을 두었다. Flow through (FT) 샘플을 받은 후, 컬럼에 5 ml 씩의 denaturing condition wash buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, pH 6.3)를 첨가하여 30분씩 총 3회 반응시켜 불필요한 단백질을 제거하였다. 마지막 단계로, 3 ml의 denaturing condition elution buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-Cl, 8M urea, pH 4.5)를 컬럼에 넣어 1시간 30분씩 총 2회 반응시켜, resin과 결합되어 있는 단백질을 분리하여 획득하였다. 이렇게 모아진 시료들의 band를 확인하기 위해, 샘플을 1% sodium dodecyl sulfate로 샘플링한 뒤, 1.5 mm의 spacer arms (Hoeffer Scientific, CA, U.S.A.)을 이용하여 제작된 12.5%의 polyacrylamide gel electrophoresis를 통하여 확인하였다. 5 volts/cm의 지속적인 전압을 공급한 뒤, Coomassie Brilliant Blue (0.1% coomassie blue, 40% methanol, 10% glacial acetic acid)에서 1시간동안 염색된 후 탈색용액(10% glacial acetic acid, 10% methanol)에서 12시간 동안 탈색과정을 거쳤다. 이 과정 동안, 8 M urea에 녹아 있는 용해물은 Econo-Pac 10DG disposable column (Bio-rad, USA)을 사용하여 phosphate buffered saline (PBS, Bioneer, Korea)로 용매를 교환 하였다. 이 시료는 12.5%의 SDS-PAGE를 통하여 정제의 순도를 확인하였다.

#### 재조합 OmpH 항원의 정량분석

PBS 용매로 교환된 OmpH 항원은 Bradford 분석으로 농도를 측정하였다. 200 µl의 Bradford assay solution (Bio-rad, U.S.A.)에 20 µl의 OmpH 항원을 첨가한 후 780 ul의 증류수를 넣어, 표준편차를 줄이기 위하여 96 well plate (Costar, Corning Co., NY, USA)에 200 µl의 샘플을 3 well에 분주해 주었다. 대조군으로는 bovine serum albumin (BSA, Sigma, U.S.A.)을 원액부터 1/2<sup>6</sup>의 농도까지 1/2씩 serial dilution하여 주고, 마지막 well은 PBS를 넣었다. UV 595 nm에서 농도를 측정했다.

#### Mouse에서 anti-OmpH 항체 생산

면역원으로써의 정제된 OmpH 단백질은 OmpH 면역혈청을 얻기 위하여 mouse에 주사하였다. 5에서 7주령 사이의

30마리의 female albino ICR 쥐를 10 마리씩 무작위로 3그룹으로 나누었다. 각 그룹별로 PBS(음성 대조군), formalin-killed cell(양성 대조군), OmpH 단백질을 각각 주사하였으며, cage 내부는 매주 청소하여 청결을 유지해 주었다[10].

각각의 쥐에서 전-면역 혈청을 분리하여 -80°C에서 보관해 두었다. 3일 후, 50 µl씩의 OmpH 항원과 동량의 Freund's Complete Adjuvant (FCA, Sigma, USA)을 복막내 주사(I.P.)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 혈액 응고를 유도한 뒤, 3000 rpm에서 20분간 원심분리를 통해 혈구 성분을 제거하여 1차 혈청을 획득하였다. 2차 immunization은 1차 immunization으로부터 10일 후에 실시하였으며, 역시 7일 뒤에 채혈을 실시하여 2차 혈청을 확보하였다[2].

#### ELISA test

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 ul씩 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 µl씩 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 ul씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응 시킨 후, 마찬가지로 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 µl씩 분주하여 넣은 후 빛을 차단한 곳에서 실온으로 약 30분간 반응시켜 2차 항체의 peroxidase에 의한 청색의 발색과정을 유도하였다. 이렇게 발색이 일어난 plate는 650 nm의 필터가 있는 ELISA 측정기로 흡광도를 측정하였다.

#### 유전자 등록

이 실험에서 획득하고 분석된 *ompH* 유전자는 2005년 5월, NCBI 데이터베이스에 DQ054529로 등록되었다.

결과 및 고찰

ompH 유전자의 클로닝과 분석

*P. multocida*의 genomic DNA로부터 ompH-F1과 -R1 프라이머를 사용하여 pGEM-T® easy vector로 클로닝 된 유전자는 1,047 bp로 밝혀졌다(Fig. 1). 유전자의 염기서열은 DNASTAR(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)라는 프로그램으로 분석되었으며(Fig. 2), 10 가지의 *P. multocida* 종 간의 염기서열의 유사성 검정은 BLAST sequence database를 통해 이루어졌다. 종 간의 유사성은 85%에서 90% 정도라는 것이 확인되었다(결과 미제시). 단백질 서열의 유사성 역시 BLAST를 통해 확인되었으며(Fig. 3), 단백질 서열 상의 두 부분이 가변성이 있음이 밝혀졌다. 이 부위는 종 간에 잘 보존되어 있으며, 이 두 부위가 porin 단백질을 백신으로써 효과적인 후보가 되게 한다고 알려져 있다[18].

pRSET A/ompH-F2 벡터의 발현 및 정제

제한효소 부위가 포함되어 제작된 ompH-F2와 -R2 프라이머를 이용하여 pGEM-T® easy/ompH 벡터에서 선도단백질을 제거한 987 개의 염기서열의 ompH 유전자를 증폭한 후 다시 pGEM-T® easy 벡터로 sub-cloning 하였다. 이 벡터를 BamHI과 KpnI로 절단하여 ompH 유전자를 분리함과 동시에, 2.9 kb의 pRSET A 벡터를 동일한 제한효소로 처리하여 선형가닥으로 준비하여 발현벡터를 제작했다(Fig. 4, 5). OmpH 항원의 과발현은 BL21(DE3) host에서 아주 잘 이루어졌다. 0.1 mM에서 1.0 mM까지 IPTG의 농도를 변화시켜가며 과발현을 유도한 결과, 가장 적합한 발현 조건은

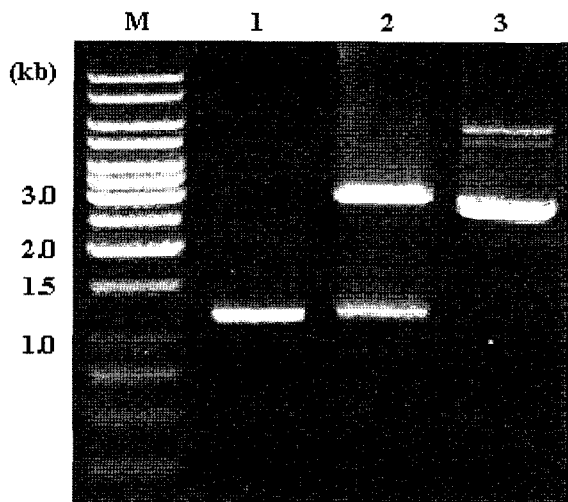


Fig. 1. PCR and TA-cloning of ompH from *Pasteurella multocida* A. Lanes M: 1 kb DNA ladder marker, 1: 1,047 bp of ompH PCR product, 2: OmpH by enzyme digestion with EcoR I restriction enzyme in pGEM-T® easy vector, 3: 4.0 kb of plasmid of ompH in pGEM-T® easy vector.

```

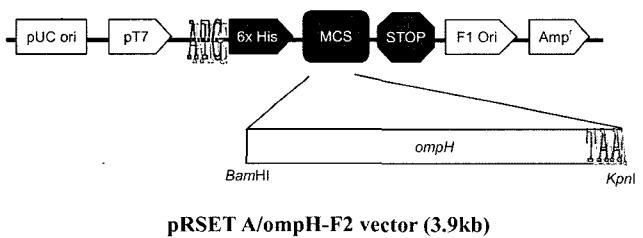
ATGAAAAAGACAATCGTAGCATTAGCAGTCGCAGCAGTAGCAGCAACTTCAGCAAAACGCA 60
M K K T I V A L A V A A V A A T S A N A
GCAACAGTTTACAATCAAGCGGTACAAAAGTTGATGTAACCGTTCTGTACGTTTACTT 120
A T V Y N Q D G T K V D V N G S V R L L
CTTAAAAAAGAAAAAGATACGCGTGGTATTAATTGATAACGGTTCACGCGTTCTTTTC 180
L K K E K D M R G D L I D N G S R V S F
AAAGCATCTCATGACTTAGGTGAAGCGTTAAGCGTATTAGGTATGCAGAACCTCGTTTT 240
K A S H D L G E G L S V L G Y A E L R F
AGTAAAGATGTGAAGATAAAGAGGGTAAAGTTAACCAACCAATCGGTAAACGAAGTCAT 300
S K D V K D K E G K V N Q P I G N E V H
GCTAAACGTCCTTATCGCGGTTTTGCGTATGAAGTTTTAGGTACATTAACCTTTTGGTAAC 360
A K R L Y A G F A Y E G L G T L T F G N
CAATTAACAATTGGTGATGATGTTGGTGTCTGATTACACTTATTTTAAACAGTGGTATC 420
Q L T I G D D V G V S D Y T Y F N S G I
AATGGCTACTTATTACTAGTGGTCAAAAAGCAATTAACCTCAAATCAGCAGAGTCAAC 480
N G V L I T S G Q K A I N F K S A E F N
GGTTTCACATTTGGTGGTGCATGTGTTCTCAGCGGTGCAACAAAGATGCATTACGT 540
G F T F G G A Y V F S G D A N K D A L R
GATGGTGCAGGTTTTCGTAGTAGCAGGTTTATACAACAGACAAATCGGTGATGTTGGTTTT 600
D G R G F V V A G L Y N R Q I G D V G F
GCATTGCAAGCAGGCTATAGCCAAAAATGTAAAACAGAAAAGTTGAACAACCTCAGCCT 660
A F E A G Y S Q K Y V G K V E Q P P
TTACCTCCTGGTCAAGTAGCGGTTCAAAGATGAAAAAGAAAAGCTTTCTTGGTCGGT 720
L P P G Q V E R F K D E K E K A F L V G
GCAGAATTATCGTACGCTGGTTTAGCGGTTGGTGTGACTGCACACAATCAAAGTGACT 780
A E L S Y A G L A L G D Y A Q S K V T
AACGTAGATGGTAAAAACGTGCACCTTGAAGTGGGTTAAACTATGACCTTAATGATAAA 840
N V D G K K R A L E V G L N Y D L N D K
GCGAAAAGTTATACAGACTTCATCTGGGAAAAAGAGGTCCTAAAGTGATGTTGAAAAG 900
A K V Y T D F I W E K E G P K G D V E R
ACTCGCAGTGTAGCTGATAGGTTTTGGTTACAACACTCACAAACAAGTTGAAACCTTTGTT 960
T R T V A V G F G Y K L H K Q V E T F V
GAAGTGCTTGGGGAAGAACAAAAGATGCAGATGTTAAACAACAAAAGATAATGATGTT 1020
E G A W G R T K D A D G K T T K D N V V
GGTACAGTTTACCGGTACACTCTAA 1047
G T G L R V H F *
    
```

Fig. 2. Nucleotide and amino acid sequences of the ompH from *Pasteurella multocida* A. The OmpH is composed of 1047 base pairs coding for 348 amino acid residues. Translation start codon is ATG, while the termination codon is TAA.

IPTG 0.5 mM을 첨가하여 34에서 분당 200회 회전하는 진탕배양기에서 배양하는 것임을 밝혀냈다. 약 40 kDa의 단백질이 확인되었으며, 이는 선도단백질이 절단된 inclusion body의 형태라고 유추되었다. Ni-NTA 친화 크로마토그래피를 수행한 후 그 단백질들의 분자량은 SDS-PAGE를 통해 확인되었다(Fig. 6). 면역성 실험에서 숙주 동물의 안전을 위해 3 ml의 eluent 단백질의 용매를 8 M urea에서 PBS로 교환해 주었다. 단백질의 농도는 Bradford 분석법으로 분석되어 약 500 µg/ml로 예측되었다. 대장균의 porin 유전자는 그 외인성 porin 단백질이 세포를 치사시킬 수 있는 경향을 가지고 있기 때문에 가끔씩 *E. coli*에서 클로닝이 어렵다. 비자기성 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. 만일 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. OmpH 단

	1										80									
OmpH_A	ATVYNQDGT	KVDVNGSVRL	LLKKEKDMRG	DLIDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSVLGYAELR	FSKDVK----	---DKEGKV-N												
OmpH_D	ATVYNQDGT	KVDVNGSVRL	ILKKEKDKRG	DLVDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSALAYAELR	FSTKEEVEV-	-TQNQ-KVVR												
Serotype6	ATVYNQDGT	KVDVNGSVRL	LLKKEKDKRG	DLIDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSALGYAELR	FSDDVK----	---DQDGNVVK												
Serotype7	ATVYNQDGT	KVDVNGSVRL	LLKKEKDKRG	DLIDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSALGYAELR	FSDDVK----	---DQDGNVVK												
Serotype8	ATVYNQDGT	TVDVNGSVRL	LLKKEKDMRG	DLIDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSALGYAELR	FSDDVK----	---DKDGNVVN												
Serotype9	ATVYNQDGT	KVDVNGSVRL	ILKKEKNERG	DLVDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSALAYAELR	FSTKEKVEVK	DTQNGQQVVR												
Serotype10	ATVYNQDGT	KVDVNGSVRL	ILKKEKDKRG	DLVDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSALAYAELR	FSKDVK----	---NKDGEVIK												
P-1059	ATVYNQDGT	KVDVNGSVRL	ILKKEKNERG	DLVDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSALAYAELR	FSKNEKVEVK	DAQNQ-QVVR												
P-1072	ATVYNQDGT	KVDVNGSVRL	ILKKEKDKRG	DLVDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSALAYAELR	FSTKEEVEV-	-TQNQ-QVVR												
P-1662	ATVYNQDGT	KVDVNGSVRL	ILKKEKNERG	DLVDNGSRVS	FKASHDLGEG	LSALAYAELR	FSTKEKVEVK	DTQNPQVVR												
	<u>81</u>										<u>160</u>									
OmpH_A	----QPIGNE	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFNS	GINGVLITSG	QKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
OmpH_D	KYKVERIGND	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFLG	GINN-LLSSG	EKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
Serotype6	----QPIGNE	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFNS	GINGVLITSG	QKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
Serotype7	----QPIGNE	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFNS	GINGVLITSG	QKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
Serotype8	----QPIGNE	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFNS	GINGVLITSG	QKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
Serotype9	TYEVEKIGND	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFLG	GINN-LLSSG	EKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
Serotype10	----QPIGNE	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFLG	GINN-LLSSG	EKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
P-1059	KYKVERIGND	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFLG	GINN-LLSSG	EKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
P-1072	KYKVERIGND	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFLG	GINN-LLSSG	EKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
P-1662	TYEVEKIGND	VHAKRLYAGF	AYEGLGTLTF	GNQLTIGDDV	GVSDYTYFLG	GINN-LLSSG	EKAINFKSAE	FNGFTFGGAY												
	<u>161</u>										<u>240</u>									
OmpH_A	VFSGDANKDA	LRDGRGFVVA	GLYNRQIGDV	GFAFEAGYSQ	KYVKQKVEQP	QPLPPGQVER	FKDEKEKAFI	VGAELSYAGL												
OmpH_D	VFSAGADKQA	ARDGRGFVVA	GLYNRKMGDV	GLALEAGYSQ	EYVTETA----	-----	-KQEKAKAFM	VGTELSYAGL												
Serotype6	VFSGDANKDA	LRDGRGFVVA	GLYNRQIGDV	GFAFEAGYSQ	KYVKQVDDSV	VP-----NK	EWDEKEKAFI	VGTELSYAGL												
Serotype7	VFSGDANKDA	LRDGRGFVVA	GLYNRQIGDV	GFAFEAGYSQ	KYVKQVDDSV	VP-----NK	EWDEKEKAFI	VGTELSYAGL												
Serotype8	VFSGDANKDA	LRDGRGFVVA	GLYNRQIGDV	GFAFEAGYSQ	KYVKQKVEQP	QPLPPGQVER	FKDEKEKAFI	VGAELSYAGL												
Serotype9	VFSADADKQA	PRDGRGFVVA	GLYNRKMGDV	GFALEAGYSQ	KYVTA-----	-----	-KQEKAKAFM	VGTELSYAGL												
Serotype10	VFSDDADKMG	LRDGRGFVVA	GLYNRKMGDV	GFAFEAGYSQ	KYVKQEVASV	LPAPSGSVTV	YKDEKEKAFM	VGAELSYAGL												
P-1059	VFSADADKQA	PRDGRGFVVA	GLYNRKMGDV	GFALEAGYSQ	KYVTA-----	-----	-KQEKAKAFM	VGTELSYAGL												
P-1072	VFSADADKQA	ARDGRGFVVA	GLYNRKMGDV	GFALEAGYSQ	KYVTETA----	-----	-KQEKAKAFM	VGTELSYAGL												
P-1662	VFSADADKQA	PRDGRGFVVA	GLYNRKMGDV	GFALEAGYSQ	KYVTV-----	-----	-KQEKAKAFM	VGTELSYAGL												
	<u>241</u>										<u>320</u>									
OmpH_A	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLNYDLN	DKAKVYTDFI	WEKEGPKGDV	ERTRTVAVGF	GYKLHKQVET	FVEGAWGRTK												
OmpH_D	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLNYDLN	DKAKVYTDLI	WAKKGPKGAT	TRDRAILGA	GYKLHKQVET	FVEGGWGRTK												
Serotype6	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLKYELN	DKAKVYTDFI	WAKEGPKGDT	DRTRKIAVGF	GYKLHKQVET	FVEGAWGRTK												
Serotype7	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLKYELN	DKAKVYTDFI	WAKEGPKGDT	DRTRKIAVGF	GYKLHKQVET	FVEGAWGRTK												
Serotype8	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLKYDLN	DKAKVYTDLI	WEKEGPKGDV	ERTRTVAVGF	GYKLHKQVET	FVEGAWGRTK												
Serotype9	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLNYDIN	DKAKVYTDLI	WAKKGPKGAT	TRDRSILGA	GYKLHKQVET	FVEGGWGREK												
Serotype10	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLNYDIN	DKAKVYTDLI	WAKEGPKGAT	TRDRSILGA	GYKLHKQVET	FVEGGWGREK												
P-1059	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLNYDIN	DKAKVYTDLI	WAKEGPKGAT	TRDRSILGA	GYKLHKQVET	FVEGGWGREK												
P-1072	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLNYDLN	DKAKVYTDLI	WAKKGPKGAT	TRDRAILGA	GYKLHKQVET	FVEGGWGRTK												
P-1662	ALGVDYAQSK	VTNVDGKKRA	LEVGLNYDIN	DKAKVYTDLI	WAKKGPKGAT	TRDRSILGA	GYKLHKQVET	FVEGGWGREK												
	<u>321</u>										<u>340</u>									
OmpH_A	DADGKTTKDN	VVGTVGLRVHF																		
OmpH_D	KAAGVTTKDN	KVGTVGLRVHF																		
Serotype6	DADGTTTKNN	VIGTVGLRVHF																		
Serotype7	DADGTTTKNN	VIGTVGLRVHF																		
Serotype8	DADGTTTKDN	VVGTVGLRVHF																		
Serotype9	DANGVTTKDN	VVGTVGLRVHF																		
Serotype10	DANGVTTKDN	VVGTVGLRVHF																		
P-1059	DANGVTTKDN	KVGTVGLRVHF																		
P-1072	NAAGVTTKDN	KVGTVGLRVHF																		
P-1662	DANGVTTKDN	VVGTVGLRVHF																		

**Fig. 3. Homology search of OmpH protein sequence with other *P. multocida* strains.** All amino acid sequence removed signal peptide at N-terminal region. Two regions are predicted as variable domains among or according to strains (underlined).



**Fig. 4. Expression vector construction.** pRSET A vector was used to express OmpH. Some 987 bp of *ompH* gene included in this vector was cloned using ompH-F2, -R2 primers.

백질의 성공적인 과발현을 위한 유전자 재조합 기작이 제시되었다(Fig. 4). 328개의 아미노산 염기서열로 이루어진 끝이 제거된 *ompH* 유전자의 ORF[987 bp; 20개의 선도단백질 서열을 제거한 후 종결코돈까지의 길이는 *Bam*HI과 *Kpn*I

의 절단부위를 포함하고 있는 *ompH*-F2와 -R2 프라이머를 이용하여 pGEM-T® easy/*ompH*로부터 증폭되었다. *ompH*-F2는 *Bam*HI(GGATCC) 인식부위가, -R2에는 *Kpn*I(GGATCC) 인식부위가 삽입되어졌다.

증폭된 유전자는 다시 pGEM-T® easy 벡터로 sub-cloning되어진 후, pRSET A와 함께 *Bam*HI/*Kpn*I으로 처리되어 접착성 말단으로 분리된 *ompH* 유전자와 pRSET A 벡터가 결합된 pRSET A/*ompH*-F2 벡터를 제작하여 클로닝했다. *E. coli* BL21(DE3)에서 발현된 재조합 OmpH 단백질은 40 kDa임이 1% SDS로 조성된 polyacrylamide gel(12.5%) 상에서 확인되었다(Fig. 6). 이는 328개 아미노산의 OmpH 단백질에 pRSET A 벡터에 존재하는 35 개의 아미노산이 더해져 363개의 아미노산으로 구성된 재조합 단백질이 발현되었기 때문이다. 재조합 OmpH 단백질의 발현은 IPTG

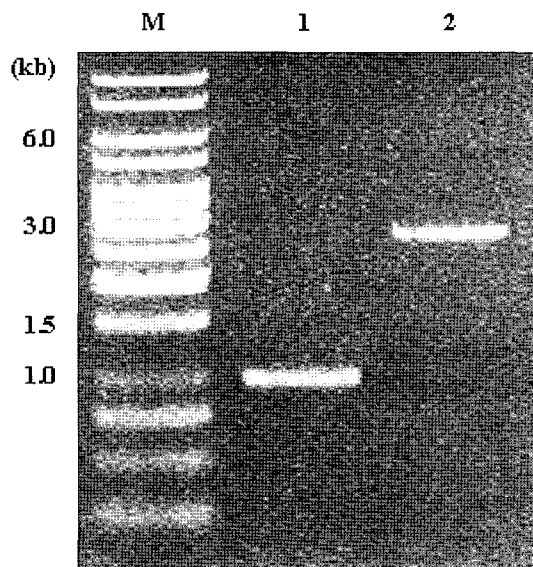


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis pattern of pRSET A vector (2.9 kb) and *ompH* (987 bp) deleted with the signal peptide sequence. Lanes M: 1 kb DNA ladder marker, 1: *ompH* amplified by *ompH*-F2, -R2 (deleted signal peptide), 2: pRSET A vector.

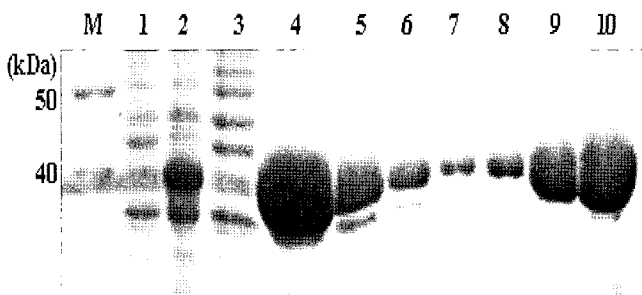


Fig. 6. Overexpression and purification of 40 kDa of OmpH. The *ompH* in pRSET A induced by IPTG (0.5 mM) in BL21 (DE3) host cell, overexpressed the protein, OmpH. Lanes M: high molecular weight protein marker, 1: pRSET A in *ompH* 0 hr, 2: pRSET A in *ompH* overnight, 3: native condition sample, 4: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

induction 이후 뚜렷하게 SDS-PAGE를 통하여 확인되었다. 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 외막단백질 중 하나인 OmpH는 면역에 관련한 강력한 항원 후보라고 생각되고 있다. 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 immunization을 수행함으로써 가능해 질 것이다.

Table 2. Evaluation of protection of the recombinant *OmpH* in mice.

Group	Antibody Titer
Not treat (PBS)	0.4065 (1/800 dilution)
Formalin-killed	0.3264 (1/1000 dilution)
OmpH	1.3080 (1/1000 dilution)

항-OmpH 항체 생산

1차 immunization이 수행된 지 10일 뒤 쥐에서 100 ul의 혈액을 얻었다. 전-면역 혈청은 immunization이 수행되기 이전에 미리 준비되었으며, 면역혈청의 역가는 ELISA로 측정되었다(Table 2). 획득된 혈청은 쥐에서 얼마나 많은 양의 항체가 생성되었는지를 측정하기 위한 1차 항체로 사용되었다. 음성 대조군인 PBS로 immunization된 쥐에서 1/800으로 희석된 면역 혈청의 역가는 0.4065로 측정되었다. 양성 대조군인 formalin-killed whole cell 혈청 중 1/1000으로 희석된 면역 혈청의 역가는 0.326이었다. 실험군인 OmpH 항원 면역 혈청 중 1/1000으로 희석된 면역 혈청의 역가는 1.308로 나타났다(Table 2). 양성대조군의 역가가 음성대조군의 역가보다 낮은 것은, 양성대조군의 1차 항원을 제작하기 위한 항혈청의 희석 농도를 음성 대조군의 희석농도인 1/1000보다 높은, 1/800으로 설정했기 때문이라고 추측된다. 각 대조군과 비교했을 때 OmpH 항원 면역 혈청의 역가가 1.308로 높게 나타난 것은 이 항원 단백질이 가금콜레라에 대한 백신으로 사용될 수 있을 것으로 생각할 수 있다. 더욱 확실한 결과를 확인하기 위해서, 면역화된 쥐에 병원균을 직접 주사하여 시간에 따른 생존률을 관찰하는 실험을 수행하는 것이 필요하다고 생각된다.

요 약

*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. 이 OmpH가 이번 연구에서 분리 및 정제되었다. 선도 단백질을 제거한 재조합 OmpH 단백질은 pRSET A 발현백터를 이용하여 40kDa로 발현되었으며, 친화성 크로마토그래피로 정제되었다. OmpH에 대한 면역혈청을 얻기 위해, 한 마리의 실험용 쥐에 한번에 50ug의 단백질을 복강 주사를 통해 2회에 걸쳐 주사했다. 항 OmpH 면역혈청의 역가는 ELISA로 측정되었다. 이번 실험에서 확인된 면역혈청의 증가는 OmpH 단백질이 병원성 파스퇴렐라 균이 일으키는 가금 콜레라를 예방하기 위한 백신의 강력한 후보임을 보여주고 있다.

## 감사의 글

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었습니다(KRF-2001-005-G00001).

## REFERENCES

- Miflin, J. K. and P. J. Blackall. 2001. Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 216-221.
- Lee, J., S. Kang, S. I. Park, H. J. Woo, and M. Kwon. 2004. 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.* **14**: 1343-1349.
- Rimler, R. B., and K. R. Rhoades. 1987. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 615-618.
- Adler, B., D. Bulach, J. Chung, S. Doughty, M. Hunt, K. Rajakumar, M. Serrano, A. Zanden, Y. Zhang, and C. Ruffolo. 1999. Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J. Biotechnol.* **73**: 83-90.
- Boyce, J. D. and B. Adler. 2001. Acapsular *Pasteurella multocida* B:2 can stimulate protective immunity against pasteurellosis. *Infec. Immun.* **69**: 1943-1946.
- Chung, J. Y., I. Wikie, J. D. Boyce, and B. Adler. 2005. Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1. *Vaccine* **23**: 2751-2755.
- Verma, R. and T. N. Jaiswal. 1998. Haemorrhagic septicaemia vaccines. *Vaccine* **16**: 1184-1192.
- Christensen, J. P. and M. Bisgaard. 1997. Avian Pasteurellosis: taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. *Avian Pathol.* **26**: 461-483.
- Rhoades, K. R. and R. B. Rimler. 1987. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Disease* **31**: 895-898.
- Jordan, R. W., T. D. C. Hamilton, C. M. Mayes, D. Patel, P. H. Jones, J. M. Roe, and N. A. Williams. 2003. Modulation of the humoral immune response of swine and mice mediated by toxigenic *Pasteurella multocida*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **39**: 51-59.
- Snipes, K. P., L. M. Hansen, and D. C. Hirsh. 1988. Plasma- and iron-regulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida*. *American J. Vet.* **49**: 1336-1338.
- Choi, K. K., S. K. Maheswaran, L. J. Felice, and T. W. Molitor. 1991. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* **28**: 75-92.
- Dabo, S. M., A. W. Confer, and R. A. Quijano-Blas. 2003. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* Serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial Pathogenesis* **35**: 147-157.
- Dacies, R. L., R. MacCorquodale, and S. Reilly. 2004. Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiol.* **99**: 145-158.
- Gatto, N.T., Dabo, S.M., Hancock, R.E., Confer, A.W., 2002, Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA-equivalent outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype A:3(Omp28). *Vet. Microbiol.* **87**: 221-235.
- Davies, R.L., R. MacCorquodale, and B. Caffrey. 2003. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. *Vet. Microbiol.* **91**: 169-182.
- Tavatabaei, M., Liu, Z., Finucane, A., Parton, R., Coote, J., 2002, Protective immunity conferred by attenuated *aroA* derivatives of *Pasteurella multocida* B:2 strains in a mouse model of hemorrhagic septicemia. *Infec. Immun.* **70**: 3355-3362.
- Hunt, M. L., B. Adler, and K. M. Townsend. 2000. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* **72**: 3-25.
- Uchida, C., Y. Kimura, S. Kubora, and O. Sasaki. 2003. Protective effect of *Pasteurella multocida* cell-free antigen and toxoid against challenge with toxigenic strains of *Pasteurella multocida* in mice. *J. Vet. Med. Sci.* **65**: 737-740.
- Pijoan, C., R. Morrison, and H. Hilley. 1983. Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 1074-1076.
- Ikeda, J. S. and D. C. Hirsh. 1988. Antigenically related iron-regulated outer membrane proteins produced by different somatic serotypes of *Pasteurella multocida*. *Infec. Immun.* **56**: 2499-2502.
- Srikumar, R., L. G. Mikael, P. D. Pawelek, A. Khamessan, B. F. Gibbs, M. Jacques, and J. W. Coulton. 2004. Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **150**: 1723-1734.
- Luo, Y., J. R. Glisson, M. W. Jackwood, R. E. W. Hancock, M. Bains, I. N. Cheng, and C. Wang. 1997. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene(*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. *J. Bacteriol.* **179**: 7856-7864.
- Borrathylbay, E., T. Sawada, Y. Kataoka, E. Okiyama, E. Kawamoto, and H. Amao. 2003. 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.* **97**: 215-227.

(Received Sep. 29, 2005/Accepted Dec. 16, 2005)