

포도상구균에서 분비하는 장내독소 B(SEB)에 대한 재조합 단백질을 이용한 면역특이적 난황항체 생산

이성^{1,a} · 이상래^{2,a} · 정경민¹ · 김정우^{1,†}

¹단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과, ²한국생명공학연구원 국가영장류센터

Production of Immunospecific Egg Yolk Antibody with Recombinant Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) Protein

Seong Lee^{1,a}, Sang-Rae Lee^{2,a}, Kyung Min Jung¹ and Jung Woo Kim^{1,†}

¹Department of Animal Resources and Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

²National Primate Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Cheongwon 363-883, Korea

ABSTRACT Staphylococcal enterotoxin B (SEB), which is a bacterial superantigen produced by *Staphylococcus aureus*, is associated with serious diseases, including food poisoning and atopic dermatitis. This study was performed to produce about 30 kDa of recombinant SEB protein and to immunize in chickens to acquire the specific egg yolk antibody (IgY) against the recombinant SEB. Chickens were immunized with the recombinant SEB intramuscularly in the breast muscle by injection 3 times at intervals of two weeks. Serum- and egg yolk-antibody titers of hens against SEB were highest at 4 weeks after first immunization. In western blot, anti-recombinant SEB IgY was reacted immunospecifically against the recombinant SEB and commercialized SEB. These results suggested that the recombinant SEB antigen could be used as an immunogen to elicit antibody (IgY) against SEB and the anti-recombinant SEB IgY could neutralized staphylococcal enterotoxin B effectively.

(Key words : recombinant SEB, IgY, immune reaction)

서 론

포도상구균 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)는 *Staphylococcus aureus*가 생산하는 슈퍼항원(superantigen)의 일종으로, 식중독은 물론, 아토피성 피부염 유발에 관여하는 등 심각한 질병 유발의 원인물질로 알려져 있다. 현재 아토피 피부염 치료방법으로 피부에 직접 바르는 부신피질 스테로이드 외용제나 항히스타민제제를 복용하는 방법, 면역적으로 접근하는 방법 등이 사용되고 있지만, 아직은 많은 부작용과 치료 효과가 완전치 못한 것으로 보고되고 있다 (Dorte et al., 1997; Lin et al., 2000; LeClare et al., 2002).

SEB를 비롯한 포도상구균 장내독소의 병리학적 증증 질환 유발 특성과 더불어 생물학적 무기로의 활용 가능성으로 인하여 예방 백신의 개발과 독소를 중화할 수 있는 치료제의 개발 필요성이 대두되어 왔다(LeClare et al., 2002).

난황항체(Egg yolk antibody, IgY)는 알의 난황 중에 이행된 모체의 항체를 말하는 것으로, 조류를 비롯한 알을 낳는 동물에서 어미가 획득한 면역항체를 새끼에게 전달하는 방법의 일환으로 알려져 있으며, 산란계를 이용한 난황항체를 사용시 생산성과 경제성이 높고, 그리고 포유류와의 종간 특이성으로 인한 교차반응이 적은 장점이 있어서, 최근 항체 생산은 물론 가축에서 감염성 질병 예방 및 치료 등에 이용하려는 시도가 많이 되고 있다(Kovacs-Nolan and Mine, 2004; Lee et al., 2009; Li et al., 2009). 더불어 가축의 사료 첨가제로 항생제를 사용하거나 질병 치료를 목적으로 사용되는 항생제의 오남용으로, 슈퍼박테리아 출현 등 항생제 내성균 문제가 심각해지고 있는 상황에서, 항생제를 대체하여 질병의 예방과 치료에서 탁월한 효과를 발휘하는 난황항체의 이용 가능성이 부각되고 있다(이희수 등, 2004; Kovacs-Nolan and Mine, 2004; Lee et al., 2009; Li et al., 2009; Mathew et al.,

^a The first and second authors are equally contributed in this work.

[†] To whom correspondence should be addressed : kijuw@dankook.ac.kr

2009). 특히 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 발열 독소인 SEB를 균체로부터 분비한다. 이 SEB는 염증반응을 매우 강하게 일으키고 조직 손상을 일어나게 한다. 특히 SEB는 아토피 환자의 세균성 2차 감염 원인뿐 아니라, 아토피 피부염의 원인으로 제시되고 있다(Lin et al., 2000; LeClare et al., 2002).

따라서, 본 연구는 아토피성 피부염 등을 유발하는 슈퍼항원으로 중요시되고 있는 SEB에 대한 예방 및 치료제 개발 연구의 일환으로, 재조합 SEB 단백질 면역원을 제조하고, 이를 산란계에 면역하여 획득한 SEB 독소에 대한 특이항체 (specific anti-SEB IgY)의 면역학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균주 확보 및 SEB 유전자 재조합

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, SA)은 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 사용하였다(ATCC 13566). SEB 유전자를 확보하기 위하여 황색포도상구균의 genomic DNA를 분리하고, 이를 주형으로 PCR(polymerase chain reaction)을 실시하였다. Genomic DNA의 분리는 DNeasy Tissue Kit(QIAGEN, USA)를 사용하였으며, 추출된 genomic DNA를 주형으로 *Bam*H I site가 포함된 SEB forward primer(5'-gga tcc gag agt caa cca gat c-3')와 *Sal* I site가 포함된 SEB reverse primer(5'-gtc gac ggt act cta taa gtg cc-3')를 사용하여 PCR을 수행하였다(95°C에서 1분간 denaturation, 54°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension, 30회 반복하였음).

증폭된 PCR product는 1% agarose gel에 전기영동을 실시하고, 목적 band를 잘라내어 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 클로닝한 다음 염기서열 분석을 의뢰(Macrogen, Korea)하여 확인하였으며, 확인된 클론을 선발하여 제한 효소인 *Bam*H I 과 *Sal* I 을 이용하여 6×His coding sequenc를 갖는 발현벡터인 pQE80L vector(QIAGEN, USA)에 다시 클로닝하고, 염기서열 분석을 의뢰(Macrogen, Korea)하여 확인을 하였다.

2. 재조합 SEB 단백질의 발현 및 분석

재조합된 pQE80L 발현 벡터를 함유하고 있는 competent cell M15을 취하여 5 mL의 LB broth(DUCHEFA, Netherland)에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 200 rpm으로 혼탕 배양을 실시한 다음, 100 mL의 LB broth에 배양액을 접종하여 흡광도(OD₆₀₀)가 0.5~0.6이 되도록 37°C에서 3시간 동안 200

rpm으로 혼탕배양을 하였다. 추가적으로 0.6 mM의 IPTG(Iso-propyl-β-D-thio-galactopyranoside, DUCHEFA, Netherland)를 첨가한 후 3시간 30분~4시간 동안 배양한 다음, 6,000 rpm, 10분간 4°C 원심분리하여 균체를 회수하였다.

재조합 단백질의 분리를 위하여 회수된 균체를 cell lysis buffer(100 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)를 첨가하여 재부유시키고, 최종 농도가 1 mg/mL이 되도록 lysozyme을 첨가하여 얼음 위에서 15분간 방치하였다. 이후 sonicator(BRANSON SONIFIER 450, Branson Ultrasonic, USA)를 이용하여 분쇄한 후 4°C, 10,000×g에서 20분 동안 원심분리를 실시해서 상청액과 침전물을 획득하여 재조합 단백질의 유무와 산란계 면역에 활용하였다.

재조합 SEB 단백질 발현 여부를 확인하기 위해 Western blot analysis를 실시하였다. 양성대조군으로 상업적으로 판매되고 있는 SEB 단백질(Staphylococcal Enterotoxin B Fragment(150-161), # S0812, Sigma, USA)과 음성대조군으로 발현벡터인 pQE80L vector를 이용하여 분석하였다. Western blot을 간략히 설명하면, SDS-polyacrylamide gel에서 각각의 샘플을 로딩하고 전기영동을 실시한 다음, Nylon membrane (Amersham Pharmacia Biosciences, UK)에 blotting시킨 후, 3% BSA/PBS로 실온에서 1시간 동안 blocking시켰다. 이후 membrane을 TBST(100 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)로 1회 washing하고, 1,000배(0.01 mg/mL) 희석한 anti-SEB monoclonal antibody(# S7965-35B, US Biological, USA)로 4°C에서 밤새도록 반응시킨 후 TBST로 3차례 washing 하였다. 여기에 secondary antibody로 alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-mouse IgG(Sigma, USA)를 20 mL의 TBST에 5,000배 희석하여 이 희석액을 membrane에 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. Membrane은 TBST로 3차례 각각 5분씩 washing하고, TNM(100 mM Tris-Cl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂)으로 1회 washing한 다음 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Amersham Pharmacia Bioscience, UK)와 NBT(nitro blue tetrazolium, Amersham Pharmacia Bioscience, UK)로 발색반응을 유도하였다.

3. 재조합 SEB 단백질의 정제

재조합 SEB 단백질을 QIAExpressionist Kit(QIAGEN, USA)를 사용하여 정제하였다. 1 L의 LB broth에 균을 배양하고 centrifugation한 후 균체를 확보하였고, sonicator로 회수된 균체를 분쇄하고 상청액만을 수거하여 상기 kit 내에 포함된 Ni-NTA agarose와 혼합한 후, 4°C에서 16시간 동안 혼탕 반응시켰다. 그 후 반응시킨 수용액을 정제용 필터가 장착된 5 mL

polypropylene tube에 부은 다음, 4 mL의 washing buffer (100 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)로 2회 세척하고, 500 μ L의 elution buffer(100mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 사용하여 4번씩 단백질을 용출시켜 정제된 재조합 SEB 단백질을 획득하였다. 또한 상기에서 획득한 정제된 재조합 SEB 단백질 농도 측정은 BCA 방법에 준하여 실시하였다(Smith et al., 1985).

4. 시험동물 및 면역방법

본 연구하기 위하여 28 주령 ISA-Brown계의 산란계를 이용하였다. 건강한 개체 10수를 시험동물로 공시하였다. 산란계는 개별 사육하였으며, 수행시험 전 기간 동안 일일 16시간 점등하였고, 온도는 22 \pm 2 $^{\circ}$ C로 유지하였고, 사료와 물은 자유섭식하였다. 실험장소는 단국대학교 생명자원과학부 실험동물사육동이며, 단국대학교 동물실험윤리위원회의 가이드라인에 따라 실험을 수행하였다.

산란계에 면역은 다음과 같이 실시하였다. 재조합 SEB 단백질을 0.15 M PBS에 유화시킨 0.5 mL를 동량의 Freund's adjuvant 혼합하여 충분히 교반한 다음 면역원으로 사용하였으며, 이를 산란계의 흉근 4군데에 각각 0.25 mL씩 근육주사를 실시하였다. 이러한 면역을 2주 간격으로 3회 수행하였다(김정우 등, 2000).

5. 혈청 및 난황에서 항체의 분리

혈청 항체가 측정을 위하여, 산란계의 날개정맥으로부터 혈액 2 mL를 채취하여 30분간 정치하여 응고시킨 다음, 3,000 rpm으로 원심분리하고 상층의 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 항체가 측정을 위한 실험에 사용하였다. 매일 수거된 계란으로부터 난황항체의 분리는 김정우 등(2000)의 방법에 따라 실시하였다. 채집한 난으로부터 난황만을 분리한 후 증류수(pH 5.0)로 10배 희석하고, 다시 희석액을 pH 5.0로 적정한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 24시간 동결하였다. 동결된 난황희석액을 해동시킨 다음, 15 $^{\circ}$ C, 10,000g로 30분간 원심분리를 실시하여 상층액을 수거하였고, 다시 수거액을 8 $^{\circ}$ C에서 Whatman No. 1으로 여과하여 수용성 난황항체를 분리하여 항체가 측정 시험에 사용하였다.

6. 혈청 및 난황 내 항체역가 측정

혈청과 난황으로부터 재조합 SEB 단백질에 대한 항체역가를 분석하기 위하여 면역전, 재조합 SEB 면역 후 2, 4 및 6 주차에 indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법으로 시험을 실시하였는데, 그 측정방법은 다음과 같다

(김정우 등, 2000). Carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 재조합 SEB 단백질을 5 μ g/ mL가 되도록 혼합한 다음, MicrotestIII flexible Assay plate(Falcon, USA)에 100 μ L씩 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 정치하였다. 항원이 피복된 plate를 PBS-T(0.02 M NaH₂PO₄, 0.13 M NaCl, 0.05 % Tween 20, pH 7.2)로 3회 세척하였으며, blocking buffer(5 % skim milk, pH 7.3, Difco, USA)를 175 μ L씩 분주하여 2시간 동안 25 $^{\circ}$ C에서 정치시켰다. Blocking buffer와 PBS-T를 동량으로 섞은 희석용액을 이용하여 측정에 이용될 면역한 산란계의 혈청과 난황을 각각 5,000배 희석하고, 다시 3배수씩 단계 희석하였으며, 이를 각 well에 100 μ L씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분간 반응시켰다. 2차 항체로는 alkaline phosphatase가 conjugation되어 있는 AffiniPure rabbit IgG anti-chicken IgY (Jackson, USA)를 5,000배로 희석하여 사용하였으며, 이를 각 well에 100 μ L씩 분주 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 이후 phosphate substrate tablets(*p*-nitrophenyl phosphate)(Sigma, USA)를 0.5 mM MgCl₂가 함유된 10% diethanolamine(pH 9.8) 용액에 용해시킨 기질을 plate에 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 발색반응을 시켰다. 5 M NaOH를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, Microplate reader(Molecular Devices; E Max)를 사용하여 405 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. 이 결과를 이용하여 항체가를 산출하였으며, 모든 실험은 3반복 실시하였다.

7. 난황 항체 특이성 분석

생산된 egg yolk antibody의 면역 특이성이 유무를 확인하고자 재조합 SEB protein 및 상업화된 SEB protein을 이용하여 Western blot analysis을 수행하였다. Western blot의 모든 방법은 상기과정과 동일하게 진행하였다. 동량의 단백질을 사용하였고, primary antibody로는 재조합 SEB를 산란계에 면역하여 획득한 난황항체를 10,000배 희석하여 사용하였고, secondary antibody로는 alkaline phosphatase conjugated anti-chicken IgY(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. USA)를 사용하였다.

결 과

1. SEB 유전자 확보 및 재조합 SEB 단백질 발현벡터 구축

SEB 유전자를 확보하기 위하여 PCR을 수행하여 목적한 783 bp의 밴드를 얻었고(Fig. 1A), 이를 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 *Bam*HI 과 *Sal* I의 제한효소 분석을 통하여 목적한

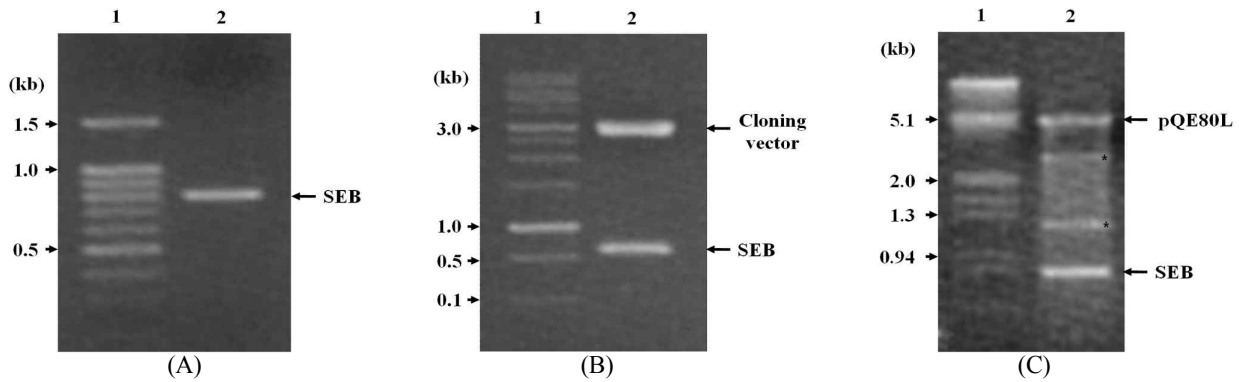


Fig. 1. Expression vector of SEB gene of *Staphylococcus aureus*. (A) 1% agarose gel electrophoresis of PCR product. Lane 1: 100bp DNA ladder; Lane 2: PCR product of SEB gene (783 bp). (B) 1% agarose gel electrophoresis of *Bam*H I and *Sal* I digested pGEM-T SEB cloning vector. Lane 1: 1kb DNA ladder; Lane 2: Enzyme digested cloning vector (~3 kb) and SEB gene. (C) 1% agarose gel electrophoresis of *Bam*H I and *Sal* I digested pQE80L SEB expression vector. Lane 1 is λ DNA *Hind* III/*Eco*R I size marker; Lane 2 is *Bam*H I/*Hind* III double digestion of subcloned SEB gene to pQE80L vector (5.5 kb). * Bands were digested incompletely.

유전자를 확인하였으며(Fig. 1B), 발현벡터인 pQE80L vector에 다시 클로닝한 다음 제한효소 분석을 통하여 목적인 SEB 유전자를 확인하였다(Fig. 1C). 최종적으로 염기서열 분석을 통하여 GenBank(M11118)에 등록되어 있는 SEB 유전자 서열과 100%의 homology를 가지는 것을 확인하였다.

2. 재조합 SEB 단백질의 발현 및 재조합 SEB 단백질 면역에 의한 특이 난황항체 생산 확인

pQE80L expression vector로 클로닝이 확인된 SEB 유전자의 단백질 발현을 확인하기 위하여 anti-SEB monoclonal antibody를 이용하여 Western blot을 실시하였다. Fig. 2(A)에 나타난 바와 같이, 상용화된 SEB와 재조합 SEB 유전자 발현 유도한 *E. coli*에서 추출한 단백질에서 약 30 kDa 크기의 SEB 단백질을 확인할 수 있었다. 반면에 pQE80L vector만을 이용하여 발현한 단백질의 경우 어떤 밴드도 검출되지 않았다.

또한 재조합 SEB 단백질을 산란계에 면역하여 얻어진 난황항체의 면역 특이성을 확인하기 위하여 난황항체를 이용하여 Western blot을 실시하였다. Fig. 2(B)에 나타난 바와 같이, 상용화된 SEB와 재조합 SEB 유전자 발현 유도한 *E. coli*에서 추출한 단백질에서 약 30 kDa 크기의 SEB 단백질을 확인할 수 있었다. 반면에 pQE80L vector만을 이용하여 발현한 단백질의 경우 어떤 밴드도 검출되지 않았다.

3. 산란계 혈청과 난황 내 재조합 SEB에 대한 항체 역가의 변화

재조합 SEB를 산란계에 2주 간격으로 3번 면역한 다음,

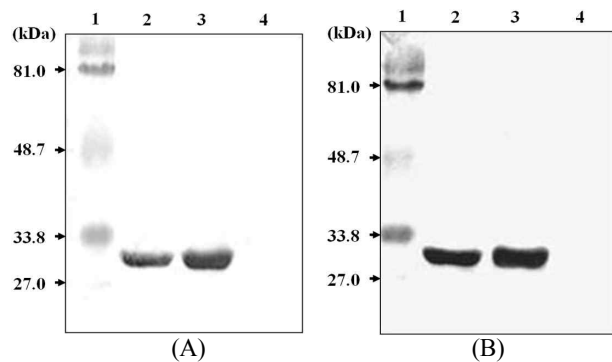


Fig. 2. Western blot analyses of recombinant SEB protein with anti-SEB monoclonal antibody (A) and egg yolk anti-SEB antibody derived from recombinant SEB-immunized chickens (B). Lane 1 is protein molecular weight marker; Lane 2 is commercialized SEB protein (~30 kDa) as positive control; Lane 3 is SEB gene containing pQE80L vector-expressed protein; Lane 4 is naïve pQE80L vector-expressed protein as negative control.

실험 0, 2, 4, 6 주차에 혈청 및 난황 내 항체역가를 측정된 결과, 혈청의 경우, 재조합 SEB 단백질의 면역을 시작한 이후 2주경부터 항체가가 증가하기 시작하여 4주경에 급격히 증가하여 최고의 항체가를 나타내다가, 6주경에 급격하게 감소하는 양상을 나타내었다(Fig. 3). 한편, 난황 내 재조합 SEB 특이 항체가는 면역 후 2주까지는 항체가의 변화가 뚜렷이 나타나지 않다가 4주경에 갑자기 최고가의 항체가를 나타내었으며, 6주경에는 비교적 서서히 항체가가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

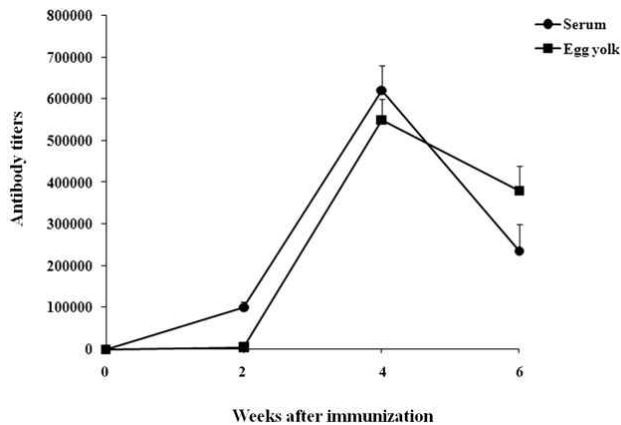


Fig. 3. Specific antibody titers of serum and egg yolk against SEB in recombinant SEB-immunized laying hens.

고찰

난황항체는 산란계의 난황 내 존재하는 항체로 종특이적 면역 체계의 차이로 인하여 다클론성 항체이면서 교차 반응이 적은 장점이 알려져 있다(Knecht et al., 1996; Kovacs-Nolan and Mine, 2004). 본 연구에서는 SEB 유전자를 이용한 재조합 단백질을 생산하고, 산란계에 면역을 실시하여 SEB 특이적인 난황항체를 생산하고자 하였다. 우선, 대장균에서 발현시킨 재조합 단백질이 anti-SEB monoclonal antibody와 특이적으로 반응한다는 것을 Western blot 실험을 통하여 확인하였으며(Fig. 2A), 이는 대장균에서 유도되어 발현된 단백질은 재조합 SEB 단백질이며 상용화된 SEB 단백질 대신에 면역원으로 활용 가능하다는 것을 나타내었다. 더불어, 재조합 SEB 단백질을 산란계에 면역하여 얻어진 난황항체가 재조합 SEB 단백질은 물론, 상용화된 SEB 단백질과 특이적으로 반응한다는 것이 확인되었다(Fig. 2B). 따라서, 본 연구에서 생산된 재조합 SEB 단백질에 대한 특이 난황항체를 이용할 경우, *S. aureus*에 의하여 생산되는 장내독소, 즉 SEB를 효과적으로 중화할 수 있을 것으로 기대된다.

산란계에서 재조합 SEB 항원을 접종한 후 혈청과 난황 내 항체역가를 측정된 결과, 혈청항체와 난황항체의 변화가 비슷한 양상을 보였으나 면역후 4~6주 경의 혈청항체의 감소폭이 난황항체보다 크게 나타났다(Fig. 3). 이와 같은 현상은 면역 직후부터 2주경까지 혈중에 형성된 항체가 4주 경에 난황으로 이전되어 축적됨으로써 나타나는 현상으로 추정된다(Bar-Joseph et al., 1980; Shimizu et al., 1988).

결론적으로 본 실험을 통하여, 식중독과 아토피성 피부염 등의 원인 물질로 알려진 SEB에 특이적인 난황항체를 생산

에 성공하였으며, 이러한 특이적인 난황항체는 식중독 및 아토피성 피부염의 예방 및 치료에 활용 가능할 것으로 사료된다.

적요

본 연구는 식중독은 물론, 아토피성 피부염의 원인물질로 알려져 있는 포도상구균 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 대한 특이 난황항체를 개발하고자 실험을 실시하였다. 우선, SEB 유전자를 클로닝한 다음, 대장균 발현시스템을 이용하여 약 30 kDa 정도의 재조합 SEB 단백질을 생산하였다. 재조합 SEB 단백질을 산란계에 2주 간격으로 3회 면역접종을 실시하고, 혈청 및 난황 내 항체가를 측정된 결과, 면역 후 4주경에 항체가가 최고치에 달하였으며, 산란계로부터 획득한 난황항체를 이용한 Western blot 결과, 재조합 SEB 단백질은 물론, 상용화 SEB 단백질과도 특이적으로 반응한다는 것을 규명하였다. 결론적으로, 식중독과 아토피성 피부염 등의 원인물질로 알려진 SEB에 특이적인 난황항체를 생산에 성공하였으며, 이러한 특이적인 난황항체는 식중독 및 아토피성 피부염의 예방 및 치료에 활용 가능할 것으로 사료된다.

(색인어 : 재조합 황색포도상구균 장내독소 B(SEB) 생산, IgY 항체 생산, 면역반응)

사사

이 연구는 2011년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었습니다.

인용문헌

- Bar-Joseph Md, Malkinson M 1980 Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA): a comparison of two plant viruses. *J Virol Methods* 1:179.
- Dorte N, Pedersen LJ, Skov PS, Vejlsgaard GL, Poulsen LK, Jarlov JO, Karlsmak T, Nolte H 1997 IgE-binding components of staphylococcal enterotoxins in patients with atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79:403-408.
- Knecht W, Kohler R, Minet M, Loffler M, 1996 Anti-peptide immunoglobulins from rabbit and chicken eggs recognize recombinant human dihydroorotate dehydrogenase and a

- 44-kDa protein from rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 236:609-613.
- Kovacs-Nolan J, Mine Y 2004 Passive immunization through avian egg antibodies. *Food Biotechnology* 18(1):39-62.
- LeClare RD, Hunt RE, Bavari S 2002 Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infect Immun* 70:2278-2281.
- Lee SH, Lillehoj HS, Park DW, Jang SI, Morales A, García D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Marrufo D, Lillehoj EP 2009 Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. *Vet Parasitol* 163(1-2):123-126.
- Li XY, Jin LJ, Uzonna JE, Li SY, Liu JJ, Li HQ, Lu YN, Zhen YH, Xu YP 2009 Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): *In vivo* evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Vet Immunol Immunopathol* 129(1-2):132-136.
- Lin YT, Shau WY, Wang LF, Yang YH, Hwang YW, Tsai MJ, Tsao PN, Chiang BL 2000 Comparison of serum specific IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins between atopic children with and without atopic dermatitis. *Allergy* 55:641-646.
- Mathew AG, Rattanabtimong S, Nyachoti CM, Fang L 2009 Effects of in-feed egg yolk antibodies on Salmonella shedding, bacterial antibiotic resistance, and health of pigs. *J Food Prot* 72(2):267-273.
- Shimizu M, Fitzsimmons RC, Nakai S 1988 Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J Food Sic* 53(5):1360-1366.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC 1985 Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- 김정우 김도균 김철 2000 장관독성 대장균 K99(F5)의 섬모 항원에 대한 특이 난황항체의 생산. *한국동물자원과학회지* 42:371-378.
- 이희수 김종만 우승룡 정병열 조운상 유한상 윤용덕 허원 문영식 오진식 2004 난황면역제를 이용한 개 주요 소화기 및 호흡기질병의 방제에 관한 연구 II. 난황면역제의 실험동물과 개에 있어서의 질병방제 효과. *대한수의학회* 44(3):415-420.
- (접수: 2012. 10. 15, 수정: 2012. 11. 26, 채택: 2012. 12. 4)