



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0095855
(43) 공개일자 2014년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A61K 39/112 (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0008755
(22) 출원일자 2013년01월25일
심사청구일자 2013년01월25일

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
주식회사 고려비엔피
충청남도 예산군 신암면 추사로 235-9
(72) 발명자
한대욱
서울 광진구 광나루로56길 29, 7동 301호 (구의동, 현대프라임아파트)
방일수
경기 성남시 분당구 서판교로 73, 1005동 201호 (판교동, 판교원마을10단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

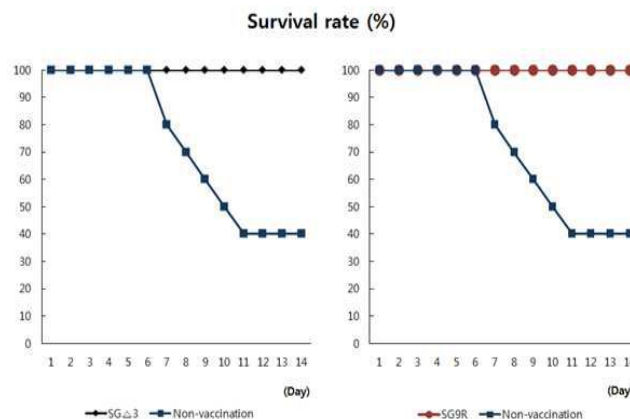
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 가금 티프스 예방용 백신 조성물

(57) 요약

본 발명은 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 가금 티프스 예방용 백신 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 균주는 SG 생균백신 용 균주의 특정유전자가 결손된 지속 감염능 결손 변이주로서, 생균 백신으로 사용 시, 기존에 사용되고 있는 백신보다 부작용이 적고 안전성이 뛰어나며 방어능이 우수하여 가금 티프스 예방용 백신 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

한장혁

경기 수원시 팔달구 경수대로642번길 24-6, (우만동)

장주현

경기 안산시 상록구 삼리로 23, 103동 401호 (사동, 상록마을아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 70008491

부처명 지식경제부

연구사업명 지역산업기술개발

연구과제명 융합신기술을 이용한 Salmonella Gallinarum백신개발

기 여 율 1/1

주관기관 주식회사 고려비엔피

연구기간 2010.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

ssrAB, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella Gallinarum*) 균주(기탁번호: KCTC 12324BP).

청구항 2

ssrAB, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella Gallinarum*) 균주(기탁번호: KCTC 12324BP)를 유효성분으로 포함하는 가금 티프스 예방용 백신 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 가금은 닭, 오리, 메추리, 거위 또는 칠면조인 것을 특징으로 하는 가금 티프스 예방용 백신 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 백신 조성물은 애주번트를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 가금 티프스 예방용 백신 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 애주번트는 프로인트 완전애주번트, 프로인트 불완전애주번트, 사포닌, 미네랄 젤 에컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 에컨대 리소레스틴, 플루론 폴리올다중음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키흐림펫 헤모시아닌 및 디니트로페놀로 이루어진 군 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 가금 티프스 예방용 백신 조성물.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 백신 조성물은 근육, 피하, 복강, 정맥, 경구, 진피, 안구 및 뇌 내 경로로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 경로를 통해 투여될 수 있는 것을 특징으로 하는, 가금 티프스 예방용 백신 조성물.

청구항 7

ssrAB, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella Gallinarum*) 균주(기탁번호: KCTC 12324BP)를 유효성분으로 포함하는 가금 티프스 예방용 사료 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 가금은 닭, 오리, 메추리, 거위 또는 칠면조인 것을 특징으로 하는 가금 티프스 예방용 백신 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 가금 티프스 예방용 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사람의 식중독 원인의 가장 중요한 원인체인 살모넬라균은 1886년 수의세균학자 Salmon에 의해 처음으로 분리 보고된 이후, LPS(lipopolysaccharide)의 O-항원과 편모 단백질(H-antigen)에 대한 혈청학적 반응에 따라 현재까지 약 2,500종이 넘는 혈청형이 보고되어 있다. 지구 환경 거의 모든 동식물에 살모넬라균이 분포되어 있지

만 (Nolan et al. 1991, Poppe et al. 1992), 지금까지 자연계에서 발견된 살모넬라균 중 절반 이상은 조류에서 분리된 것이며 *Salmonella* spp. 의 보균숙주로서 조류의 역할이 중요한 것으로 추정되고 있다.

[0003] 그 중에서도 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella* Gallinarum, SG)은 가금티푸스를 유발하는 원인체로서 1992년 국내 발생 이래 산발적으로 꾸준한 발생을 해오고 있어 양계산업에 경제적 손실을 유발한다(Clarke and Gyles, 1993). 숙주 특이성을 지닌 살모넬라 갈리나룸은 닭에서 병원성이 높아 심한 임상증상을 동반한 폐사로 피해를 입힌다. 일반적으로 숙주특이성을 지닌 살모넬라 혈청형의 경우, 병원체 관리 및 질병근절이 광범위숙주영역을 가진 혈청형보다 용이하나, 살모넬라 갈리나룸의 경우에는 포유동물에 감염이 되고, 특히 양계장의 설치류에도 감염이 되기 때문에 포획 및 개체관리가 어려운 설치류의 특성상 이로 인한 전파가 잘 일어나 근절은 더욱 어려운 상황이다(Popoff et al., 2004).

[0004] 살모넬라 갈리나룸의 근절을 위해 생균백신인 SG 9R백신과 불활화 백신 등의 보급으로 2000년대 초반부터 발생 보고가 급격히 감소되어 현재에는 산발적인 발생만 보고되고 있다(Babu et al., 2003). 그러나 SG 9R의 경우 체내 면역반응을 유발하기는 하나 생균백신의 약독화 기전이 밝혀지지 않아 병원성의 복원 가능성 및 숙주 내 간, 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 살모넬라 갈리나룸의 야외균주가 기존 항생제에 대해 저항성을 보임에 따라 항생제의 사용마저도 제한하고 있기 때문에, 상기에 언급된 부작용이 있음에도 불구하고 SG 9R을 가금티푸스의 예방책으로 사용하고 있어, 이를 대체할 만한 안전성 및 방어능이 보장된 새로운 백신의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

[0005] 따라서, 본 발명자들은 한국 가금류에 감염되어 가금티푸스를 유발하는 살모넬라 갈리나룸의 생균백신인 SG 9R 균주로부터, 특정 유전자들을 제거한 균주를 제조하고, 이를 백신으로 사용한 결과, 살모넬라 갈리나룸에 대한 방어력이 우수함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella* Gallinarum) 균주(기탁 번호: KCTC 12324BP)를 제공하기 위함이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 가금 티프스 예방용 백신 및 사료 조성물을 제공하기 위함이다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명은 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella* Gallinarum) 균주(기탁 번호: KCTC 12324BP)를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 가금 티프스 예방용 백신 및 사료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸 균주를 포함하는 백신 조성물은 SG 생균백신 용 균주의 특정유전자가 결손된 지속 감염능 결손 변이주로서, 생균 백신으로 사용 시, 기존에 사용되고 있는 백신보다 부작용이 적고 안전성이 뛰어나며 방어능이 우수하여 가금 티프스 예방용 백신 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 SG△3 균주에 대하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 도이다(래인 M:marker; 래인 1~6: 형질전환 균주; 래인 wt: 야생형; 야생형의 예상된 사이즈:2476bps; 돌연변이주(+km):1959bps(래인 1); 돌연변이주(+Cm):1459bps(래인 6))

도 2는 닭의 간 및 비장에서, 본 발명의 약독화된 살모넬라 갈리나룸 SG△3 균주의 농도별 증식 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 약독화된 살모넬라 갈리나룸 SG△3 온도 변이 균주의 비장 또는 간의 체중 무게 비율을 나타낸 도이다.

도 4는 살모넬라 갈리나룸 균을 닭에 공격 접종 후, 본 발명의 약독화된 살모넬라 갈리나룸 SG△3 균주 및 SG9R 균주의 증식성을 나타낸 도이다.

도 5는 살모넬라 갈리나룸 균을 닭에 공격 접종 후, 본 발명의 약독화된 살모넬라 갈리나룸 SG△3 균주 및 SG9R 균주의 비장 또는 간의 체중 무게 비율을 나타낸 도이다.

도 6은 살모넬라 갈리나룸 균을 공격 접종 후, 본 발명의 약독화된 살모넬라 갈리나룸 SG△3 균주 및 SG9R 균주의 비장 또는 간에서 CFU 수치를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*) 균주를 제공한다.
- [0013] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명에 따른 균주는 *pkD3*와 *pkD4*의 트랜스백터를 이용하여 유전자를 삽입시키는 상동 재조합(homologous)방법을 이용하여 기존의 공지 균주인 SG97 균주에 병원성 유전자들 (*ssrAB*, *rpoS*, *hmp*)을 순서대로 제거한 것을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명에서, "SG△1"은 *ssrAB*를 제거한 것이고, SG△2는 *ssrAB* 및 *rpoS*, SG△3은 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp*의 세개의 유전자를 제거한 균주이고, 상기 SG△3 균주를 SG97△*ssrAB::△rpoS::△hmp* 라 명명하여, 생명공학 연구원에 2012년 11월 28일 기탁하여, KCTC 12324BP의 기탁번호를 수여받았다.
- [0016] 또한, 본 발명은 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella Gallinarum*) 균주를 유효 성분으로 포함하는 가금 티프스 예방용 백신 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 균주는 SG 생균백신 용 균주의 특정유전자가 결손된 지속 감염능 결손 변이주로서, 생균 백신으로 사용 시, 기존에 사용되고 있는 백신보다 부작용이 적고 안전성이 뛰어나며 방어능이 우수하여 가금 티프스 예방용 백신 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 백신 조성물은 추가로 약리학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 백신에 적합한 담체는 기술분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 단백질, 설탕 등을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 상기의 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액, 및 에멀전일 수 있다. 비-수용액 담체의 예는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올리에이트를 들 수 있다. 수용액 담체는 식염수 및 완충배지를 포함하는, 물, 알콜/수용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 담체는 염화 나트륨 용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스 및 염화나트륨, 유산처리 링거 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥주사용 담체는 예컨대 링거 텍스트로오스를 기본으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양 보충제 등을 포함한다. 방부제 및 기타 첨가제 예컨대 예를 들면 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등과 같은 것이 추가로 존재할 수 있다. 바람직한 방부제는 포르말린, 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B를 포함한다.
- [0019] 또한, 상기 백신 조성물은 애주번트를 추가로 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 애주번트는 면역반응의 향상 및/또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 칭하는 것으로 임의의 흡수-촉진제를 포함한다. 허용 가능한 애주번트는 프로인트 완전애주번트, 프로인트 불완전애주번트, 사포닌, 미네랄 젤 예컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 예컨대 리소레시틴, 플루론 폴리올다중음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키흐림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀, 등을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다. 바람직한 애주번트는 Fort Dodge Animal Health의 METASTIM 애주번트이다.
- [0021] 본 발명의 목적을 위한 백신조성물의 투여량은 체중 1kg 당 0.01ml 내지 1ml, 바람직하게는 체중 1kg당 0.2ml 내지 0.4ml인 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명의 백신 조성물은 근육, 피하, 복강, 정맥, 경구, 진피, 안구 및 뇌 내 경로를 통해 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여가 바람직하다.

- [0023] 본 발명에서 가금은 닭, 오리, 메추리, 거위 또는 칠면조를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 또한, 본 발명은 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp* 유전자가 결손된 약독화 된 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella Gallinarum*) 균주를 유효성분으로 포함하는 가금 티프스 예방용 사료 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 당해 기술분야에 공지된 일반적인 사료 성분을 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 사료 조성물은 곡물 가루, 당질, 비타민, 아미노산, 단백질, 지질, 광물질 등을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 사료 조성물에는 곡물 및 곡물 부산물이 사용될 수 있는데, 예컨대 평지씨, 면실, 대두, 밀기울, 미강, 탈지강, 맥강, 옥수수겨, 맥아근, 대두피, 감자 전분, 고구마 전분, 옥수수 전분, 커피박, 잠사, 잠분, 해조분, 타피오카, 대두박, 면실박, 임자박, 채종박, 아마박, 호마박, 옥수수글루텐, 밀글루텐, 낙화생박, 야자박, 해바라기씨박, 주정박, 옥수수배아박, 고추씨박, 장유박, 맥주박 중에서 하나 또는 2종 이상이 혼합될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 사료 조성물은 수용성 및 수불용성 모노사카라이드, 디사카라이드 및 폴리사카라이드와 같은 당 및 복합 탄수화물을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 당질로서 보다 상세하게는, 포도당, 만노오스, 프룩토오스, 백당, 맥아당, 셀로비오스, 젖당, 트레할로오스, 멜리비오스, 라피노오스, 에스크린, 살리신, 아미그달린, 만니톨, 솔비톨, 소르보스, 멘티토오스 등을 들 수 있으며, 당밀, 자당 뿐만 아니라 올리고당도 병용하여 이용할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 사료 조성물에 포함될 수 있는 임의의 아미노산 성분에는 아르기닌, 히스티딘, 이소로이신, 로이신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 티로신, 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산나트륨, 글리신, 프롤린, 세린, 시스테인, 및 이들의 동족체, 및 이들의 염이 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 사료 조성물에 임의로 첨가할 수 있는 비타민에는 티아민·HCl, 리보플라빈, 피리독신·HCl, 니아신, 니아신아미드, 이노시톨, 엽화콜린, 판토텐산칼슘, 바이오틴, 폴산, 아스코르브산, 및 비타민 A, B, K, D 및 E 등이 있다. 이 중, 특히 비타민 A, 비타민 B군 및 비타민 E는 항산화 물질로도 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 사료 조성물에 포함될 수 있는 지방산은, 예를 들어, 대두유, 평지씨유, 옥수수유, 홍화유, 해바라기유, 라이스유, 비프스테이크 식물유, 달맞이꽃유, 유리지치유, 아마인유 등의 식물유, 및 가다랭이, 고등어, 정어리 등의 어유 및 각종 미생물 유래의 트리글리세라이드 등의 유지를 가수 분해 처리함으로써 획득할 수 있다. 그리고, 상기에서 얻어지는 지방산의 금속염으로서 지방산의 칼슘염 및 마그네슘염 또한 포함될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 사료 조성물에는 사장석, 벤토나이트, 맥반석 등 공지의 바이오세라믹 물질이 소량 첨가되어 항균 기능 등을 배가시킬 수 있다.
- [0032] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0033] **실험예 1. SG(*Salmonella Gallinarum*) 공격균주의 병원성 확인(LD₅₀산출) 시험**
- [0034] SG 공격균주의 병원성을 확인하기 위하여, SG 공격균주를 Tryptic soy broth에 배양하여 OD(650nm)값을 측정한 결과 6시간 배양액의 OD(650nm)값은 1.16이고 생균수는 2.4×10^9 CFU/ml이었다. 공격용 SG 배양액을 원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 까지 희석하여 살모넬라 음성 종계균으로 확인된 종계유래 3주령 산란계 60마리를 사용하여 각각의 희석배수별로 10마리 씩 경구로 0.5ml씩 투여하고 격리사육장치(Isolator)에서 2주간 사육하면서 폐사여부를 관찰하였고, 이의 결과를 표 1에 나타내었다.
- [0035] 표 1에 나타난 바와 같이, 결과를 이용하여, LD₅₀ 값을 $1.2 \times 10^{5.8}$ CFU/0.5ml로 정하였다.

표 1

희석배수	생균수(CFU/ml)	접종 수	접종방법	폐사수/접종수	폐사율
원액	2.4×10^9	10	경구, 0.5ml	10/10	100%

10^{-1}	2.4×10^8	10	경구, 0.5ml	10/10	100%
10^{-2}	2.4×10^7	10	경구, 0.5ml	6/10	60%
10^{-3}	2.4×10^6	10	경구, 0.5ml	6/10	60%
10^{-4}	2.4×10^5	10	경구, 0.5ml	4/10	40%
10^{-5}	2.4×10^4	10	경구, 0.5ml	0/10	0%

[0037] 실시예 1: 본 발명의 SG 복합돌연변이 균주의 제작

[0038] Wanner 방법에 의한 Red lamda 재조합 방법을 이용하여 병원성 유전자를 제거하였다. 보다 구체적으로 재조합 방법은 pKD3와 pKD4의 트랜스백터를 이용하여 유전자를 삽입시키는 상동재조합(homologous) 방법을 이용하였다. 재조합 후 유전자가 제거되고 그 자리를 대체하는 항생제 카세트(antibiotic cassette)를 pcp20 백터를 사용하여 제거할 수 있는 장점이 있기 때문에 여러 유전자를 제거할 수 있었다. 기존의 공지 균주인 SG97 균주에 병원성 유전자들 (*ssrAB*, *rpoS*, *hmp*)을 순서대로 제거하였으며, "SG Δ 1"은 *ssrAB*를 제거한 것이고, SG Δ 2는 *ssrAB* 및 *rpoS*, SG Δ 3은 *ssrAB*, *rpoS* 및 *hmp*의 세개의 유전자를 제거한 균주이고, 상기 SG Δ 3 균주를 SG97 Δ *ssrAB::\Delta**rpos::\Delta**hmp* 라 명명하여, 생명공학 연구원에 2012년 11월 28일자로 기탁하여, KCTC 12324BP의 기탁번호를 수여받았다. 상기 SG Δ 3 균주가 제조되었는지 확인하기 위하여 재조합 후 선택적 배지(항생제가 포함)에서 자란 클로니(clony)를 대상으로 PCR을 실시하였고, 상기 PCR 수행의 결과를 도 1에 나타내었다.

[0039] 도 1에 나타난 바와 같이, 실험결과 pKD3(cm^R)과 pKD4(km^R)을 삽입한 재조합과정에서 모두 변이주를 얻을 수 있었으며 야생형과 비교한 결과 정확한 크기를 보임을 확인하였다.

[0040] 실시예 2: 본 발명의 균주의 약독화 실험.

[0041] SG Δ 3 균주 및 상기 균주의 부모 균주(야생형)를 2주령의 갈색계 닭에 접종하여 실질장기의 CFU(clony forming unit) 비교를 통하여 약독화 여부를 확인하였다. 보다 구체적으로 농도별 약독화 검증을 위해서 돌연변이의 농도는 10^6 및 10^8 CFU/ml의 두 조건으로 실험하였고, 사용된 닭은 백색계보다 SG에 민감성이 있는 갈색계를 이용하여 실험하였다. 각 균을 LB(Lutina-bernati) 액상배지에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 진탕 배양 후, PBS(phosphate buffered saline)로 세척 후 농도를 조절하여 부유시킨 균액을 2주령의 닭에 경구투여의 방식으로 접종하였다(표 2에 SG Δ 3 균주 및 야생형에서 균 투여 농도 투여 경로 및 이용한 닭의 수를 나타냄). 이 후, 닭의 간과 비장에서의 CFU 양을 측정하였다. 결과를 도 2에 나타내었다.

표 2

[0042]

	농도(CFU/ml)	투여 경로	그룹
SG Δ 3 (low cont.)	10^6	경구 투여	5
SG Δ 3 (high cont.)	10^8	경구 투여	5
야생형(Wild type)	10^8	경구 투여	5

[0043] 도 2에 나타난 바와 같이, 야생형에 비해 본 발명의 약독화된 균주 접종군은 CFU 양이 99.9% 이상 감소된 결과를 보였고, 비장의 경우도 마찬가지로 99% 감소됨을 확인하였다. 또한, 데이터에는 나타나지 않았지만 비장의 경우, 야생형 접종군에서는 SG병변의 전형적인 특징인 청동색의 간과 비장 종대를 모든 개체에서 볼 수 있었으며, 약독화된 균 접종군에서는 간과 비장종대는 육안으로 확인하기 어려울 만큼 정상개체와 비슷함을 확인하였다.

[0044] 실시예 3: 본 발명의 SG Δ 3 온도 변이주 제작 및 약독화 실험

[0045] SG Δ 3의 온도민감성 돌연변이주를 만들어서 야생형(부모 균주)과 비교함으로써 숙주 내의 병원성을 확인하였다.

[0046] 보다 구체적으로, 온도 변이주는 세균이 생존할 수 있는 고온(37℃)에서는 활성이 없고, 저온(28℃)에서만 활성을 보이도록 변이시킨 균주이다. 특정 유전자를 제거한 후, 약독화된 균주를 화학적 변이를 일으키는 물질, NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 사용하여 특정한 표현형으로 변화시켰다. 페니실린 G 및 D-사이클로세린 2가지 항생제를 사용하여 배지에서 균을 37℃에 일정 시간 배양시킨 후, 세척하여 28℃에 한천배지에서 배양하였다. 균을 배양시킨 뒤, 형성된 클로니를 무작위로 하나씩 선택하여 한천배지에 200~300개의 복제본(replica)을 만들어 28℃에서만 증식됨을 확인하기 위하여 37℃와 28℃에서 배양하였다. 배양된 레플리카 중 저온(28℃)에서만 활성을 보인 균을 선택하여, 5단계의 계대배양을 거친 후, 그 균의 야생형(부모 균주)과 비교를 위해 두 균을 10배 희석한 균액을 한천배지(agar plate)에 도말하여 37℃에 배양 시키고, 10⁷까지 희석한 균액을 28℃에서 배양한 후, 형성된 클로니를 이용하여 CFU를 측정하였다. 37℃에서 균이 자라지 않고 28℃에서 균이 많이 자란 샘플과, 37℃에서 균이 조금 자라고 28℃에서 균이 많이 자란 샘플 중 1가지를 선택하여 온도변이주 생균백신으로 사용하였다. 약독화 실험을 위해, SG△3의 온도 변이주 (SG△3 + TS strain)가 2주령의 갈색계 닭에 피하투여의 방식으로 각각 5 × 10⁷과 9 × 10⁷의 농도로 접종하였다(표 3에 실험 조건을 나타냄). 상기 균주들을 접종한 닭에서 체중대비 간, 비장의 무게 비율을 도 3에 나타내었다.

표 3

	농도 (CFU/ml)	투여경로	그룹
SG△3 + TS	5 × 10 ⁷	피하 투여	4
야생형(Wild type)	9 × 10 ⁷	피하 투여	4

[0048] 도 3에 나타난 바와 같이, 야생형 및 변이주를 투여한 닭 간에 유의적인 차이를 보임으로써, 변이주가 숙주의 실질장기에 미치는 영향이 감소했음을 확인하였다.

[0049] 또한, 야생형의 경우, 간에서는 평균 4.6 × 10⁷, 비장에서는 8.4 × 10⁷ cfu/g이 검출되었으나, 변이주는 간, 비장에서 어떠한 균도 검출되지 않았다(26℃ 및 36℃ 모두).

[0050] 실시예 4: 본 발명의 SG△3 돌연변이주의 방어력 확인

[0051] 방어력 검증을 위해 실시예 1에서 제조한 SG△3와 현재 상용화되어 있는 생균백신제제인 SG9R을 양성대조군으로 하여 실험을 수행하였다. 2주령의 갈색계에 각 변이주를 접종한 후에 2주 뒤 2차 접종을 실시하고, 2주 뒤 공격접종을 실시하였으며, 공격접종 후 2주 내로 폐사하지 않은 개체는 부검을 실시하였다. 접종경로별 생존율, 비장 및 간의 체중 무게 비율 및 장기 내 집락수를 측정하여 방어력을 검증하였다. 생존률을 도 4에 나타내었고, 비장 및 간의 체중 무게 비율을 도 5에 나타내었고, 장기 내 집락수를 도 6에 나타내었다.

[0052] 도 4에 나타난 바와 같이, 공격 접종 7일 후, 백신을 처리하지 않은 그룹에서 2마리의 폐사를 시작으로 총 6마리가 부검 전에 폐사하였으나, 본 발명의 약독화된 균주를 투여한 군에서는 폐사개체가 나오지 않음을 확인하였다.

[0053] 상기 생존율(%)확인을 통해 현재 상용화되어 있는 SG9R 백신과 비교하여 보았을 때 약독화 균주 또한 숙주 내에서 일정이상의 면역반응을 유도하고 있으며, 공격접종 후에도 안정된 생존율을 보이고 있음을 확인하였다.

[0054] 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 공격접종 2주 후, 생존한 개체를 대상으로 한 부검결과, 백신을 접종하지 않은 개체에서는 전형적인 SG 병변인 청동색 간과 비장종대를 확인할 수 있었다.

[0055] 또한, 종대된 크기를 체중의 비율과 비교한 결과, SG9R과 통계적인 유의성(p<0.05)을 보임으로써 SG9R의 실질장기에 미치는 백신으로서의 안전성을 확인 하였다. 비장 병변의 경우, 실시예 1에서 제조한 SG△3 백신을 투여한 군과 투여하지 않은 군과 통계적 유의성이 없었고, 수치상으로는 간에서는 백신을 투여하지 않은 군과 현저한 차이를 보였고, 비장종대에서는 다소 차이가 있는 것을 확인하였다.

[0056] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 약독화가 되었음에도 불구하고, SG 변이주는 숙주실질장기 내에 침투할 수 있음을 확인하였다. 그러나, 제거된 유전자에 의해 숙주 내에서 백신을 처리하지 않은 군과 비교하여 현저히 낮은 수의 CFU를 보이고 있음을 확인하였다. 공격집중군주에 대한 간과 비장에서 CFU 확인결과, 본 발명의 변이주를 백신군주로 한 군과 SG9R의 양성 대조군과 유사한 결과가 얻어지는 것으로 보아 본 발명의 변이주는 집중군주에 대해 방어능이 있음을 확인하였다.

수탁번호

[0057]

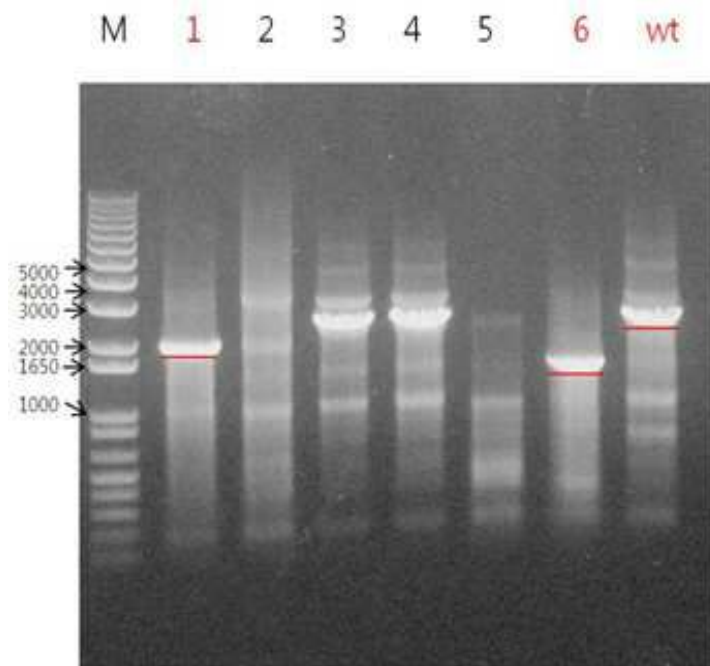
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12324BP

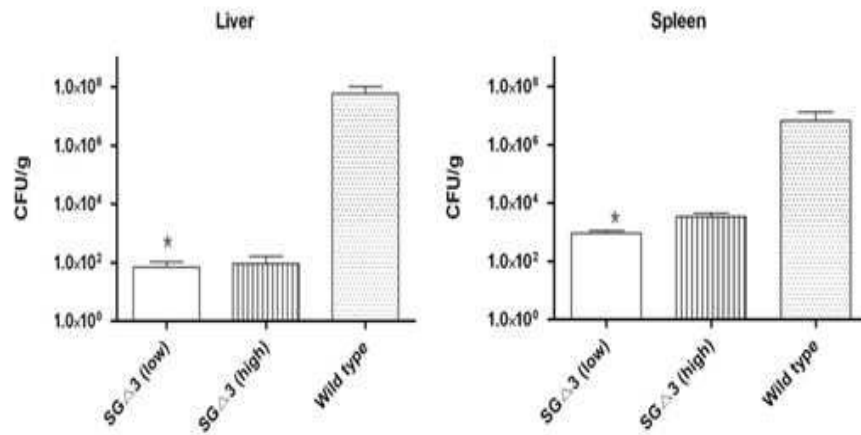
수탁일자 : 20121128

도면

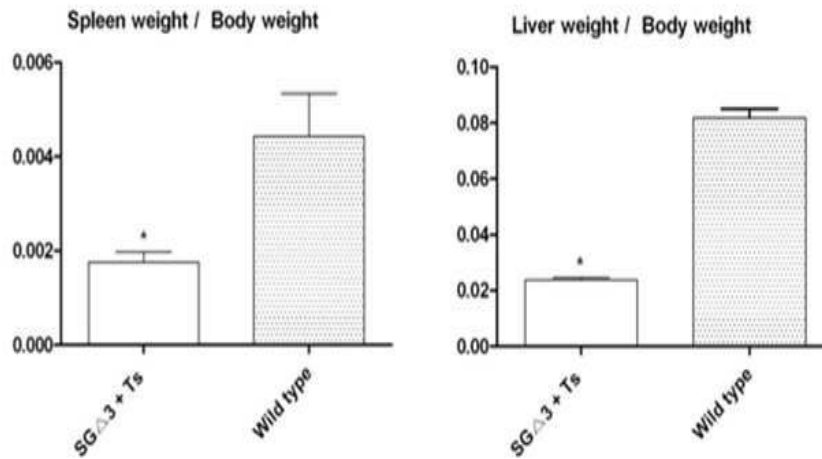
도면1



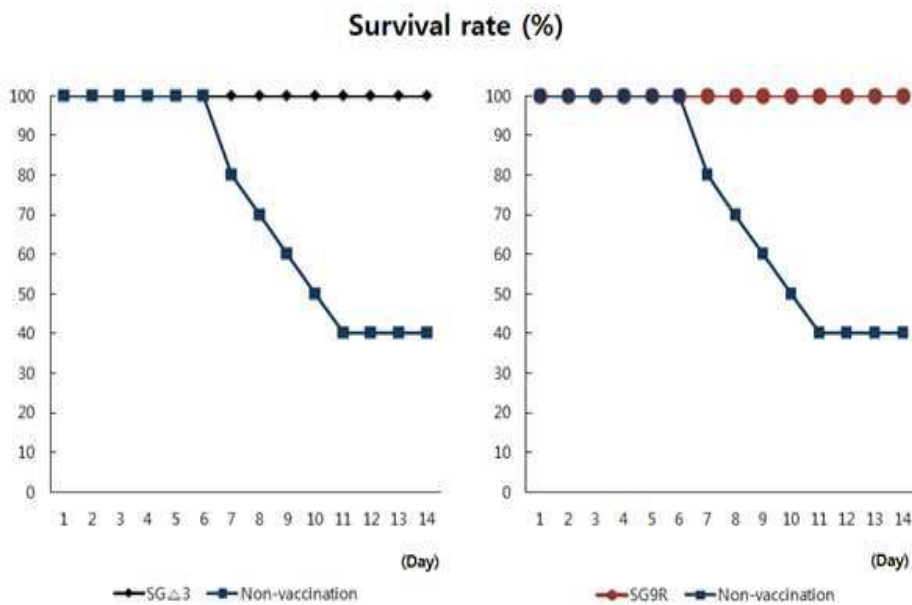
도면2



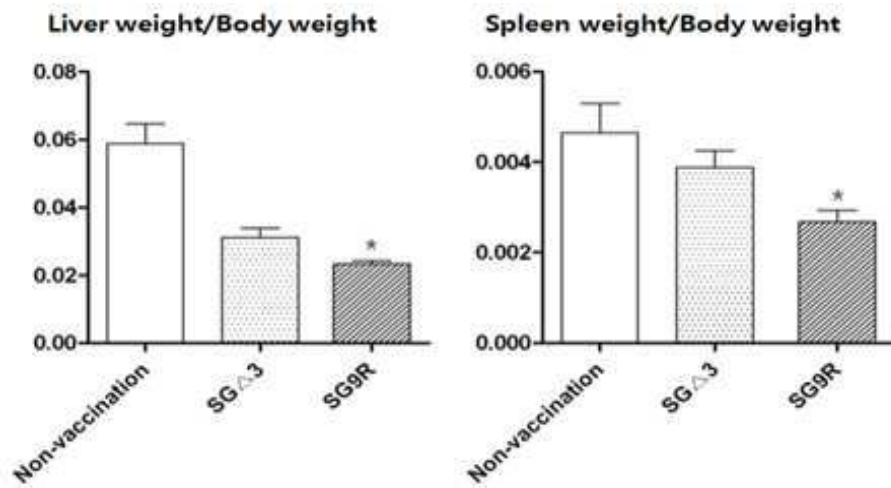
도면3



도면4



도면5



도면6

