



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0004539
(43) 공개일자 2017년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2006.01) G01N 33/535 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56911 (2013.01)
C12Q 1/689 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0095014
(22) 출원일자 2015년07월03일
심사청구일자 2016년06월24일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김석
경상남도 진주시 천수로 30, 102동 802호 (주약동, 한보은빛마을아파트)
(74) 대리인
최규환

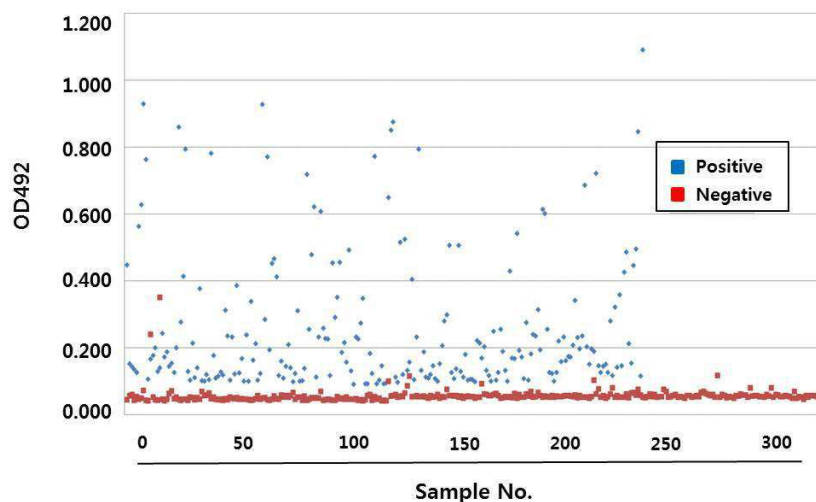
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 브루셀라 어보투스 균주 유래의 다중 재조합 외막단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 브루셀라 어보투스 균주 유래의 다중 재조합 외막단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에서는 브루셀라 감염증의 발병 여부를 진단하는 방법을 개발하고자 브루셀라 어보투스 균주로부터 유래된 다중 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 이용하여 고민감도 혈청진단법(ELISA)을 분석하였다. 그 결과, TAT(Tube agglutination test) 양성 및 음성 혈청에 대하여 민감도, 특이도, 정확도가 92.67%, 98.66% 및 96.04%를 보여, 종래의 진단 방법보다 민감도, 특이도 및 정확도가 더 높은 것으로 확인되었다. 따라서, 이를 이용하여 브루셀라 감염혈청으로부터 브루셀라 감염증의 발병 여부를 더 효과적으로 진단할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 33/535 (2013.01)

G01N 2800/26 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-0680

부처명 농림축산부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 생명산업기술개발

연구과제명 고면역원성 숙주특이 항원을 이용한 브루셀라 진단법

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.10 ~ 2015.08.09

명세서

청구범위

청구항 1

브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 다중 재조합 외막단백질(Outer membrane protein, Omp)을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증(Brucellosis) 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 재조합 외막단백질은 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28의 조합인 것을 특징으로 하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28은 각각 서열번호 1, 3 및 5의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 코딩하는 유전자는 각각 서열번호 2, 4 및 6의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28은 면역원성을 갖는 것을 특징으로 하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28이 각각 동일한 농도 비율로 혼합된 것을 특징으로 하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 브루셀라 감염증이 발병된 가축에서 브루셀라 균의 감염여부를 검출하기 위한 진단용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 브루셀라 균의 감염여부를 검출하기 위한 진단용 키트.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물 또는 제7항에 따른 키트를 이용하여 가축의 브루셀라 감염증을 진단하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 진단은 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)를 통해 수행하는 것을 특징으로 하는 가축의 브루셀라 감염증을 진단하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 브루셀라 어보투스 균주 유래의 다중 재조합 외막단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증

진단용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 다중 재조합 외막단백질(Outer membrane protein, Omp)을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증(Brucellosis) 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 브루셀라 감염증이 발병된 가축에서 브루셀라 균의 감염 여부를 검출하기 위한 진단용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 가축의 브루셀라 감염증을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 브루셀라 감염증은 대표적인 인수공통 전염병(인체; 4군 법정전염병, 가축; 2종 법정전염병)의 하나이며 국내는 물론 전 세계적으로 공중보건학적, 경제학적 심각한 문제를 야기한다고 알려져 있다. 최근 국내에서 본 감염증이 인체와 가축에서도 폭발적인 증가를 보이고 있어, 국민적 관심사는 물론 이에 대한 대책이 시급한 실정이다.
- [0003] 브루셀라 감염증을 유발하는 브루셀라 균은 *Brucella abortus*(소), *B. melitensis*(양, 염소), *B. canis*(개), *B. ovis*(양), *B. suis*(돼지) 등이 알려져 있는데, 이들은 모두 인체에 감염하여 심각한 질병을 초래할 수 있고, 국내에서는 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*)가 높은 비율을 차지하는 것으로 알려져 있다. 상기 브루셀라 감염증이 발병되면, 인체에 감염될 경우 10% 미만의 치사율을 보이고, 지속적 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 심내막염, 뇌척수염, 관절염 등 중증 질병으로 진행하게 되며, 감염된 동물에서 보이는 증상은 특별한 외부 증상이 없이 암컷에서의 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 유산과 수컷에서 고환염, 기형정자 등으로 인한 불임을 유발한다고 알려져 있다. 상기 브루셀라 균은 세포 내에서 증식하며 발병을 일으키기 때문에 인체 감염의 경우 짧게는 수주에서 길게는 수년간의 항생제 치료가 필요하며, 다량의 항생제 복용으로 인한 후유증 등으로 인하여 치료 방법에 대한 개선이 시급한 실정이며, 완치로 판단되었어도 수년 이내에 재발되는 경우가 많아 지속적 관찰이 요구되고 있다. 그러나, 소에 브루셀라 감염증이 발병된 경우, 특별한 증상 없이 장기간 동안 보균자로 유지하면서, 지속적으로 브루셀라 균을 외부로 배출하므로, 조기진단에 어려움이 있을 뿐만 아니라 브루셀라 균의 세포 내 탐식 기전 및 세포 내 증식 기전에 대한 연구결과가 많지 않아 상기 질환의 근절이 어렵다는 문제가 있다. 또한, 브루셀라 균이 체내에 감염된 경우에도 면역원성이 낮아서 면역세포가 형성되기 어렵기 때문에 백신 개발에 대한 연구도 미미한 실정이다.
- [0004] 특히, 소에서 브루셀라 감염증이 발병된 경우, 소의 신체 각 부위(특히 간, 비장, 임파절, 혈액 등)에서 균이 높은 농도로 존재하게 되며, 우리나라의 식문화 특성상 육회, 간, 비장, 위 등을 날것으로 섭취하는 경향이 높아 브루셀라 균에 대하여 심각하게 노출되어 있고, 이에 대한 국가적 대책 마련이 시급한 실정이다. 브루셀라 균을 검출하여 브루셀라 감염증의 발병 여부를 확인하고 있으나, 지금까지 알려진 방법으로는 민감도가 낮아서 검출효율이 매우 낮기 때문에, 새로운 진단법의 개발이 요구되고 있으며, 이를 위한 연구도 활발히 진행되고 있다.
- [0005] 한편, 한국등록특허 제0424137호에는 브루셀라 RB51균의 8kDa 항원 및 이것의 정제방법, 그 항원을 이용하여 브루셀라 RB51의 항체를 검출하는 방법에 대해 개시되어 있고, 한국등록특허 제1270662호에는 브루셀라 어보투스의 26kDa 재조합 항원 단백질 및 LPS를 이용한 진단 키트에 대해 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 브루셀라 어보투스 균주 유래의 다중 재조합 외막단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 브루셀라 감염증의 발병 여부를 진단하는 방법을 개발하고자 브루셀라 어보투스 균주로부터 유래된 다중 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 이용하여 고민감도 혈청진단법(ELISA)을 분석하였다. 그 결과, TAT(Tube agglutination test) 양성 혈청 및 음성 혈청에 대하여 민감도, 특이도 및 정확도가 92.67%, 98.66% 및 96.04%을 보여, 종래의 진단방법보다 민감도, 특이도 및 정확도가 더 높은 것으로 확인되었다. 따라서, 이를 이용하여 브루셀라 감염혈청으로부터 브루셀라 감염증의 발병 여부를 더 효과적으로 진단할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 다중 재조합 외막단백질(Outer membrane protein, Omp)을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증(Brucellosis) 진단용 조

성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 브루셀라 감염증이 발병된 가축에서 브루셀라 균의 감염여부를 검출하기 위한 진단용 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 가축의 브루셀라 감염증을 진단하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 브루셀라 감염증의 발병 여부를 진단하는 방법을 개발하고자 브루셀라 어보투스 균주로 부터 유래된 다중 제조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 이용하여 고민감도 혈청진단법(ELISA)을 분석하였다. 그 결과, TAT(Tube agglutination test) 양성 혈청 및 음성 혈청에 대하여 민감도, 특이도 및 정확도가 92.67%, 98.66% 및 96.04%을 보여, 종래의 진단방법보다 민감도, 특이도 및 정확도가 더 높은 것으로 확인되었다. 따라서, 이를 이용하여 브루셀라 감염혈청으로부터 브루셀라 감염증의 발병 여부를 더 효과적으로 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 브루셀라 어보투스 균주 유래의 제조합 외막단백질(Outer membrane protein, Omp) Omp 10, Omp 19 및 Omp 28의 발현 및 면역원성 규명 결과를 나타낸 것이다. (A)는 제조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28의 발현을 나타낸 SDS-PAGE 사진으로, M은 크기 마커; 레인 1은 pCold 벡터; 2는 제조합 Omp 10; 3은 제조합 Omp 19; 4는 제조합 Omp 28을 나타낸 것이며; (B)는 브루셀라 감염혈청과 제조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 면역반응시킨 결과를 나타낸 면역블롯 사진으로, M은 크기 마커; 레인 1은 pCold 벡터; 2는 제조합 Omp 10; 3은 제조합 Omp 19; 4는 제조합 Omp 28 나타낸 것이며; (C)는 브루셀라 비감염혈청과 제조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 면역반응시킨 결과를 나타낸 면역블롯 사진으로; M은 크기 마커; 레인 1은 pCold 벡터; 2는 제조합 Omp 10; 3은 제조합 Omp 19; 4는 제조합 Omp 28을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 3 μ g/ml의 제조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 단독으로 처리한 것과 이들을 1:1:1의 농도(w/v)비로 혼합 처리(Combi 1)한 것의 ELISA 분석결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml 및 3 μ g/ml의 제조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 1:1:1의 농도(w/v)비로 혼합 처리하였을 때의 ELISA 분석결과를 나타낸 것이다. Combi 1은 1 μ g/ml의 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 혼합; Combi 2는 2 μ g/ml의 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 혼합; Combi 3은 3 μ g/ml의 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 혼합한 것을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 1 μ g/ml의 제조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 혼합 처리하여 고민감도 혈청진단법(ELISA)을 통하여 민감도, 특이도 및 정확도를 나타낸 결과이다. Positive는 TAT 양성혈청; Negative는 TAT 음성혈청을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 다중 제조합 외막단백질(Outer membrane protein, Omp)을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증(Brucellosis) 진단용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에 따른 제조합 외막단백질(Outer membrane protein, Omp) Omp10, Omp19 및 Omp28의 범위는 서열번호 1, 3 및 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환, 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1, 3 및 5로 표시된 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1, 3 및 5로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[0014] 본 발명의 유전자는 제조합 외막단백질(Outer membrane protein, Omp) Omp10, Omp19 및 Omp28을 암호화하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 2, 4 및 6으로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 2, 4 및 6의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90%

이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

- [0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28은 면역원성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 조성물은 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28이 동일한 농도로 혼합된 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명에서 용어, "브루셀라 감염증(Brucellosis)"이란, 다양한 브루셀라 균의 감염에 의하여 발병되는 전염병을 의미하는데, 인체에 감염될 경우 10% 미만의 치사율을 보이고, 지속적 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 심내막염, 뇌척수염, 관절염 등 중증 질병으로 진행하게 되며, 감염된 동물에서 보이는 증상은 특별한 외부 증상이 없이 암컷에서의 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 유산과 수컷에서 고환염, 기형정자 등으로 인한 불임을 유발한다고 알려져 있다.
- [0018] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 진단은 브루셀라 감염증의 발병 여부를 확인하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 브루셀라 감염증이 발병된 가축에서 브루셀라 균의 감염여부를 검출하기 위한 진단용 키트를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 키트에서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 키트에서, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 키트에서, 본 발명의 키트는 DNA 칩 분석법을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수도 있다. DNA 칩 분석용 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA로 부착되어 있는 기관 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수도 있다. 또한, 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수도 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 키트에서, 본 발명의 키트는 제조함 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28의 수준을 측정하기 위한 ELISA 키트 또는 단백질 칩 분석용 키트가 될 수 있는데, 상기 키트는 특별히 이에 제한되지 않으나, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기 기질은 특별히 이에 제한되지 않으나 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 특별히 이에 제한되지 않으나 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 특별히 이에 제한되지 않으나 FITC(fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine B isothiocyanate) 등이 될 수 있고, 발색 기질액은 특별히 이에 제한되지 않으나 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸벤지딘)가 사용될 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 가축의 브루셀라 감염증을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 본 발명의 브루셀라 감염증 진단용 조성물 또는 키트는 항원-항체 결합 반응, 또는 단백질-리간드 결합반응을 통하여 결합반응을 정량 또는 정성적으로 분석함으로써 가축의 브루셀라 감염증을 진단할 수 있으며, 상기 결합 반응은 통상의 효소면역분석법(ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay), 방사능면역분석법(RIA, radioimmunoassay), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 형광면역법, 효소기질발색법, 항원-항체 응집법 등의 방법을 이용하여 측정할 수 있으며, 바람직하게는 효소면역분석법(ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0027] 재료 및 방법

[0028] 1. 공시균주

[0029] 본 발명에서 사용된 균주는 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 544 균주를 농림축산검역검사본부에서 분양받아 공시하였으며, 재조합 외막단백질 발현을 위해 *E. coli* DH5 α (Invitrogen)를 이용하였다. 브루셀라 균은 브루셀라 액체 배지(BD, USA)에 배양하였으며, *E. coli* 균은 LB 배지(BD, USA)에서 37℃ 온도로 밤새동안 진탕배양을 수행하였다. 고체 배지의 경우, 같은 종류의 액체 배지에 1.5%(w/v) agar(Takara, Japan)를 첨가하였으며, 필요에 따라 암피실린(100 μ g/ml)을 첨가하였다.

[0030] 2. 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28 제조

[0031] 브루셀라 균의 총 게놈 DNA는 밤새동안 배양된 브루셀라 균 배양액 5ml을 원심분리하여, bacteria genomic DNA purification kit(Intron, Korea)를 이용하여 정제하였다. 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주 유래의 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28의 제작을 위하여, 상기 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 암호화하는 유전자를 찾아, 프라이머를 제작한 후 PCR을 이용하여 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28 유전자를 증폭하였다. PCR에 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같다. 증폭된 각각의 유전자는 pCold 벡터(Takara, Japan)에 삽입한 후 유전자 발현을 위해 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하였으며, 각각의 유전자가 삽입된 플라스미드의 염기서열을 통해 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28 유전자를 확인하였다.

표 1

[0032] 본 발명에 사용된 프라이머

프라이머 이름	서열번호	정방향(5'-3')프라이머 염기서열	서열번호	역방향(5'-3')프라이머 염기서열
Omp 10	7	AGCAGAATTCATGAAACGCTTCCGCA	8	ATTACTGCAGTCAGCCGCGTTGC
Omp 19	9	AGCAGGATCCATGGGAATTTCAAAGC AAG	10	ATACTGCAGTCAGCGCAGCAGCG
Omp 28	11	GATCGGATCCAACACTCGTGCTAGCAA TTTT	12	GATCAAGCTTTTACTTGATTCAAAAA CGAC

[0033] 3. 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28 정제

[0034] 암피실린(100 μ g/ml)이 포함된 LB 배지 1 l에 0.4mM IPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside)를 가하여 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28 유전자가 삽입된 플라스미드를 함유한 대장균을 15℃에서 24시간 동안 진탕배양하였다. 그 후, 배양된 세균배양액을 원심분리(5,000rpm, 20분간)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 원심분리된 세균은 50ml의 히스텔론 버퍼 세트(Histalon buffer set, Takara, Japan)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 재조합 외막단백질을 정제하였다.

[0035] 4. SDS-PAGE 및 면역블롯팅(Immunoblotting)

[0036] SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 방법은 림 등(Lim et al., 2012)의 방법을 참고하여 수행하였다. 간단히 설명하면, 정제된 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 램리 샘플 버퍼(Laemmli sample buffer)에 넣고 100℃에서 10분간 가열처리한 후 SDS-PAGE를 수행하였고, 그 후 이모빌론-P 멤브레인(Immobilon-P membranes, Milipore, USA)을 이용하여 트랜스퍼(transfer)하였다. 그 후, 멤브레인은 1% BSA(bovine serum albumin)을 이용하여 블로킹(blocking)하고, 농림축산검역검사본부에서 분양받은 브루셀라 어보투스(*B. abortus*) 비감염혈청과 감염혈청을 이용하여 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 통하여

재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28의 면역원성을 규명하였다. 그 결과는 엑스-레이필름(X-ray film, Fuji, Japan) 현상을 통하여 면역반응 여부를 확인하였다.

[0037] **5. 간접효소면역측정법(Indirect ELISA)**

[0038] ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)에 사용된 혈청은 2006-2014년도에 채집된 국내 한우혈청을 이용하였다. 사용된 혈청은 시험관응집반응(tube agglutination test; TAT)을 통하여 브루셀라 감염 여부를 측정하였고, 양성혈청은 232개, 음성혈청은 298개로 총 530개를 사용하였다. ELISA 측정을 위해 사용된 플레이트(Maxibinding, SPL Life Sciences)에 50 μ l의 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28(각각 3-9 μ g/ml)을 각각 포스페이트 코팅 버퍼(phosphate coating buffer, 0.1M, pH 9.6)에 혼합하여, 4℃에서 24시간 동안 코팅하였고, 그 후 200 μ l의 0.5% PBS-T를 이용하여 3회 세척한 후 200 μ l의 블로킹 버퍼(5% skim milk in PBS-T)를 이용하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 또한, 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 1:1:1의 농도(w/v)비로 혼합하여 상기 같은 방법으로 코팅하였다. 플레이트는 반응이 끝난 후에 200 μ l의 0.5% PBS-T를 이용하여 3회 세척한 후 혈청을 블로킹 버퍼에 1:200배로 희석하여 4℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 플레이트는 0.05% PBS-T를 이용하여 4회 세척을 수행하였고, 100 μ l의 HRP-conjugate protein G를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 플레이트는 0.05% PBS-T를 이용하여 5회 세척을 수행하였고, 100 μ l의 OPD(O-phenylenediamine)를 첨가하여 15분간 실온에서 반응한 후 492nm에서 ELISA reader(BioTek, Korea)를 이용하여 반응값을 측정하였다. 이에 더하여, 컷 오프 값(cut off value)은 브루셀라 음성 혈청값의 평균에 두 배를 곱한 값으로 설정하였다.

[0039] **실시예 1. 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28의 발현 및 면역원성 규명**

[0040] 본 결과를 통해 브루셀라 균의 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28 유전자는 pCold 플라스미드에 클로닝되어 유전자 염기서열을 통해 확인되었으며, 대장균에 형질전환한 후 IPTG에 의해 발현이 되었다. 발현된 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28은 SDS-PAGE를 통하여 약 70, 79 및 88 kDa 크기로 확인이 되었으며(도 1A), 정제과정을 거쳐 분리된 재조합 단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28의 면역원성을 규명하기 위하여, 브루셀라 감염 우 혈청을 이용하여 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행한 결과, SDS-PAGE에서 발현된 재조합 외막단백질과 동일한 사이즈로 특이적인 면역반응이 확인되었다(도 1B).

[0041] **실시예 2. 다중 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 이용한 고민감도 ELISA법 분석**

[0042] 발현된 각각의 재조합 외막단백질을 혈청학적 진단법에 응용하기 위하여, 시험관응집반응(tube agglutination test, TAT)에서 판정된 대표적인 양성혈청 76개(TAT 400; 24, 200; 24, 100; 24)와 음성혈청 24개를 이용하여 ELISA를 수행해본 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 3 μ g/ml의 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 단독으로 처리하였을 때보다 3 μ g/ml의 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 혼합 처리하였을 때, 더 높은 민감도를 보였다(도 2).

[0043] 다음으로, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml 및 3 μ g/ml의 재조합 외막단백질 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 1:1:1의 농도(w/v)비로 혼합 처리하였을 때의 고민감도 혈청진단법(ELISA)을 수행한 결과, 3 μ g/ml의 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 혼합 처리하였을 경우, 가장 우수한 결과를 나타냈지만, TAT 양성 혈청값을 비교했을 때, 1 μ g/ml의 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 혼합 처리하였을 때와 큰 차이를 보이지 않았다(도 3). 또한, 재조합 외막단백질의 정제에 소요되는 비용 등을 고려해 봤을 때, 1 μ g/ml의 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 1:1:1의 농도(w/v)비로 혼합하여 수행하는 것이 바람직한 것으로 확인되었다.

[0044] 따라서, 본 결과를 토대로 1 μ g/ml의 Omp 10, Omp 19 및 Omp 28을 1:1:1의 농도(w/v)비로 혼합하여 고민감도 혈청진단법(ELISA)을 수행한 결과, TAT 양성혈청(232개) 및 음성혈청(298개)에 대하여 민감도, 특이도 및 정확도는 각각 92.67%, 98.66% 및 96.04%로 확인되었다(도 4 및 표 2).

표 2

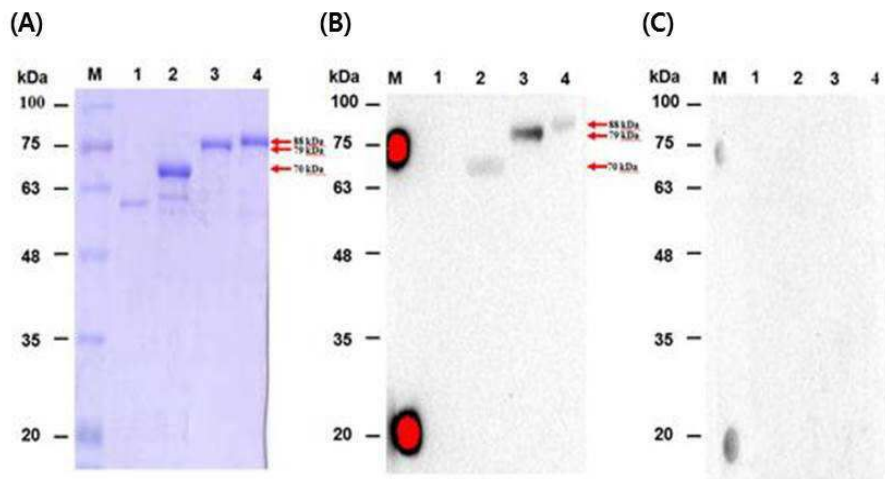
[0045] 표준 TAT(tube agglutination test)와 비교한 다중 재조합 rOmp 항체 기반 ELISA의 분석능 평가결과

ELISA	TAT	
	양성(n=232)	음성(n=298)
음성	17	294
양성	215	4

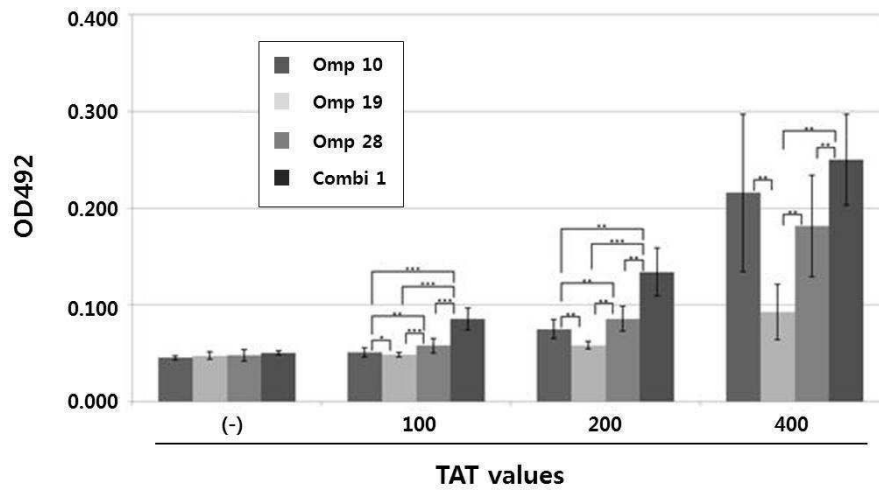
[0046] 민감도 215/232=92.67%, 특이도 294/298=98.66%, 정확도 509/530=96.0%

도면

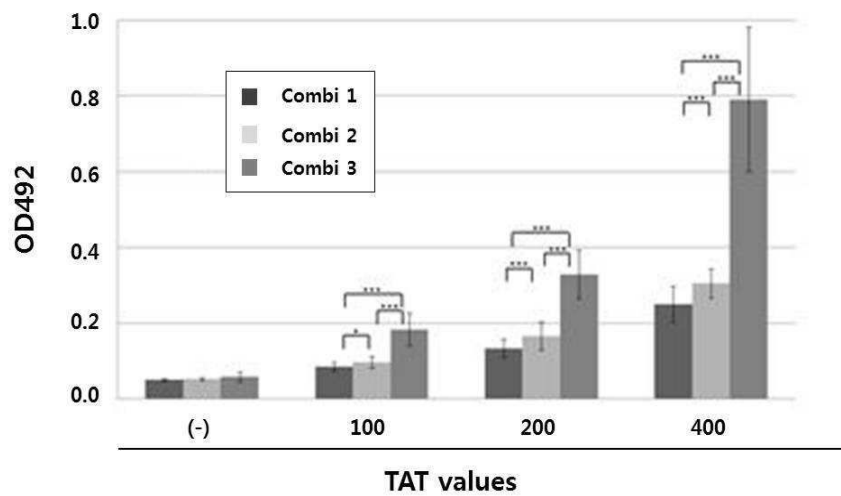
도면1



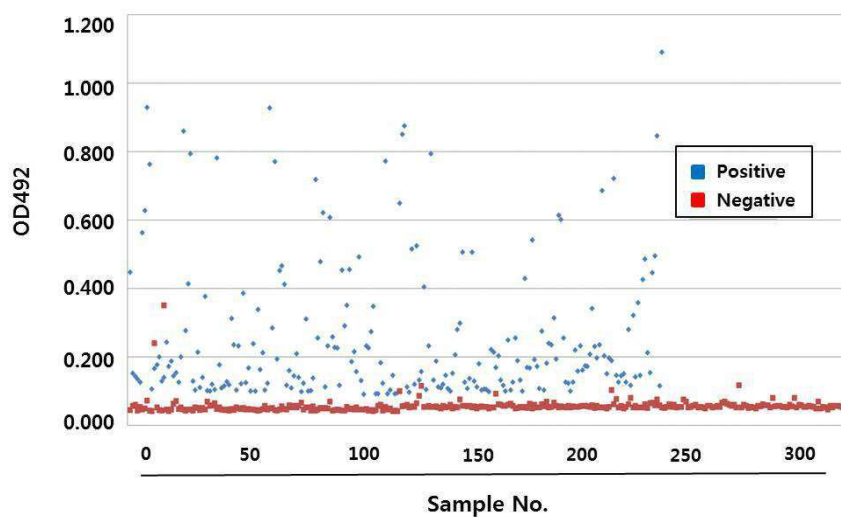
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Composition for diagnosis of brucellosis comprising multiple recombinant outer membrane protein derived from *Brucella abortus* as effective component and uses thereof
- <130> PN15094
- <160> 12
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 126

<212> PRT

<213> Brucella abortus

<400> 1

Met Lys Arg Phe Arg Ile Val Ala Pro Leu Ala Leu Met Ser Leu Ala

1 5 10 15

Leu Ala Ala Cys Glu Thr Thr Gly Pro Gly Ser Gly Asn Ala Pro Ile

20 25 30

Ile Ala His Thr Pro Ala Gly Ile Glu Gly Ser Trp Val Asp Pro Asn

35 40 45

Gly Ile Ala Ser Ser Phe Asn Gly Gly Ile Phe Glu Thr Arg Thr Thr

50 55 60

Asp Thr Asn Glu Lys Leu Ala Glu Gly Asn Tyr Leu Tyr Leu Ser Pro

65 70 75 80

Gln Leu Val Glu Ile Asn Met Arg Ser Ile Val Arg Gly Thr Thr Ser

85 90 95

Lys Val Asn Cys Ala Leu Val Ser Pro Thr Gln Leu Asn Cys Thr Ser

100 105 110

Ser Ala Gly Ser Arg Phe Ser Leu Thr Arg Arg Asn Ala Gly

115 120 125

<210> 2

<211> 381

<212> DNA

<213> Brucella abortus

<400> 2

atgaaacgct tccgcatcgt tgcccccttc gcactcatgt cgcttgcgct ggctgcttgc 60

gaaacaacag gcccgggcag cggcaatgcc ccgatcatag cccatacccc tgccggcata 120

gaaggaagct gggtcgatcc gaatggcatc gcttctcat tcaatggcgg catctttgaa 180

acccgcacca ccgacaccaa cgaaaagctg gcggaggcca actatctcta cctgtcgccg 240

caactcgttg aaatcaacat gcggtcctatc gtgcgcggca ccacctgaa ggtaaattgc 300

gcactggttt cgccgacgca acttaactgc acctctcgg ccggttcgcg cttctcgctc 360

acccgccgca acgccggctg a 381

<210> 3

<211> 177

<212> PRT

<213> Brucella abortus

<400> 3

Met Gly Ile Ser Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Ala Ala Ala Gly Ile

1	5	10	15
Val	Leu	Ala	Gly
Cys	Gln	Ser	Ser
Arg	Leu	Gly	Asn
Leu	Asp	Asn	Val
20	25	30	
Ser	Pro	Pro	Pro
Pro	Pro	Ala	Pro
Val	Asn	Ala	Val
Pro	Ala	Gly	Thr
35	40	45	
Val	Gln	Lys	Gly
Asn	Leu	Asp	Ser
Pro	Thr	Gln	Phe
Pro	Asn	Ala	Pro
50	55	60	
Ser	Thr	Asp	Met
Ser	Ala	Gln	Ser
Gly	Thr	Gln	Val
Ala	Ser	Leu	Pro
65	70	75	80

Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Asp	Leu	Thr	Pro	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Val	Trp
85	90	95													
Asn	Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Gln	Ser	Cys	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Gln	Thr
100	105	110													
Lys	Tyr	Gly	Gln	Gly	Tyr	Arg	Ala	Gly	Pro	Leu	Arg	Cys	Pro	Gly	Glu
115	120	125													
Leu	Ala	Asn	Leu	Ala	Ser	Trp	Ala	Val	Asn	Gly	Lys	Gln	Leu	Val	Leu
130	135	140													
Tyr	Asp	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly	Gln

145	150	155	160
Gly	Arg	Phe	Asp
Gly	Gln	Thr	Thr
Gly	Gln	Ala	Val
Thr	Leu	Ser	
165	170	175	
Arg			

<210> 4

<211> 534

<212> DNA

<213> Brucella abortus

<400> 4

atgggaattt caaaagcaag tctgtcagc ctgcggcgg ctggcattgt cctggccggg	60
tgccagagct cccggcttgg taatctgat aatgtttgc ctccgccgc gcctgcaccg	120
gtcaatgctg ttccggcagg cacggtgcag aaaggcaatc ttgattctcc cacacaattc	180
cccaatgcgc cctccacgga tatgagcgcg caatccggca cacaggtcgc aagcctgccg	240
cctgcatccg caccggacct gacgccggc gccgtggctg gcgtctggaa cgcctcgctt	300
ggtggtcaga gctgcaagat cgcgacgccg cagaccaa atggccaggg ctatcgcgca	360
ggcccgctgc gctgccccg tgaactggct aatcttgct cctgggccgt caatggcaag	420
caactcgctc ttacgatgc gaacggcgg acggttgct cgctctattc ttcaggacag	480
ggccgcttcg atggccagac caccggcggg caggccgtga cgctgtcgcg ctga	534

<210> 5

<211> 250

<212> PRT

<213> Brucella abortus

<400> 5

Met Asn Thr Arg Ala Ser Asn Phe Leu Ala Ala Ser Phe Ser Thr Ile

1 5 10 15

Met Leu Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Ala Phe Ala Gln Glu Asn Gln

20 25 30

Met Thr Thr Gln Pro Ala Arg Ile Ala Val Thr Gly Glu Gly Met Met

35 40 45

Thr Ala Ser Pro Asp Met Ala Ile Leu Asn Leu Ser Val Leu Arg Gln

50 55 60

Ala Lys Thr Ala Arg Glu Ala Met Thr Ala Asn Asn Glu Ala Met Thr

65 70 75 80

Lys Val Leu Asp Ala Met Lys Lys Ala Gly Ile Glu Asp Arg Asp Leu

85 90 95

Gln Thr Gly Gly Ile Asp Ile Gln Pro Ile Tyr Val Tyr Pro Asp Asp

100 105 110

Lys Asn Asn Leu Lys Glu Pro Thr Ile Thr Gly Tyr Ser Val Ser Thr

115 120 125

Ser Leu Thr Val Arg Val Arg Glu Leu Ala Asn Val Gly Lys Ile Leu

130 135 140
 Asp Glu Ser Val Thr Leu Gly Val Asn Gln Gly Gly Asp Leu Asn Leu
 145 150 155 160
 Val Asn Asp Asn Pro Ser Ala Val Ile Asn Glu Ala Arg Lys Arg Ala
 165 170 175
 Val Ala Asn Ala Ile Ala Lys Ala Lys Thr Leu Ala Asp Ala Ala Gly
 180 185 190
 Val Gly Leu Gly Arg Val Val Glu Ile Ser Glu Leu Ser Arg Pro Pro
 195 200 205

Met Pro Met Pro Ile Ala Arg Gly Gln Phe Arg Thr Met Leu Ala Ala
 210 215 220
 Ala Pro Asp Asn Ser Val Pro Ile Ala Ala Gly Glu Asn Ser Tyr Asn
 225 230 235 240
 Val Ser Val Asn Val Val Phe Glu Ile Lys
 245 250

<210> 6

<211> 753

<212> DNA

<213> Brucella abortus

<400> 6

atgaacactc gtgctagcaa ttttctcgca gcctcatitt ccacaatcat gctcgtcggc 60

gctttcagcc tgcccgttt cgacaggag aatcagatga cgacgcagcc cgcgcgcatc 120

gccgtcaccg gggaaggcat gatgacggcc tcgccgata tggccattct caatctctcg 180

gtgctacgcc aggcaaagac cgcgcgcgaa gccatgaccg cgaataatga agccatgaca 240

aaagtgtctg atgcatgaa gaaggccggc atcgaagatc gcgatctcca gacaggcggc 300

atcaatatcc agccgattta tgtctatcct gacgacaaga acaacctgaa agagcctacc 360

atcacggct attctgtatc caccagtctc acggttcgcg tgcgcgaact ggccaatgtt 420

ggaaaaattt tggatgaatc cgtcacgctc ggtgttaatc agggcgggtga tttgaacctg 480

gtcaatgata atccctccgc cgtgatcaac gaggcgcgca agcgcgcagt ggccaatgcc 540

attgccaagg cgaagacgct tgccgacgct gcaggcgtgg ggcttggccg tgtggtggaa 600

atcagtgaac tgagccgccc gcccatgccg atgccaattg cgcgcgga gttcagaacc 660

atgctagcag ccgcaccgga caattccgtg ccgattgccg caggcgaaaa cagctataac 720

gtatcgggtca atgtcgtttt tgaaatcaag taa 753

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

agcagaattc atgaaacgct tccgca 26

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

attactgcag tcagccggcg ttgc 24

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

agcaggatcc atgggaattt caaaagcaag 30

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

atactgcagt cagcgcgaca gcg 23

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gatcggatcc aacactcgtg ctagcaattt t 31

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gatcaagctt ttacttgatt tcaaaaacga c 31