

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0053475 (43) 공개일자 2014년05월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 1/21</i> (2006.01) <i>C12N 1/36</i> (2006.01) <i>A61K 39/112</i> (2006.01) <i>C12N 15/74</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0119410 (22) 출원일자 2012년10월26일 심사청구일자 없음 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도	(71) 출원인 강원대학교산학협력단 강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동) 건양대학교산학협력단 충청남도 논산시 대학로 121 (내동) (72) 발명자 한태욱 서울특별시 광진구 광나루로56길 29, 7동 301호 (구의동, 현대프라임아파트) 이준행 서울특별시 강남구 삼성로 649, 2동 408호(삼성동, 상아아파트) (74) 대리인 위병갑

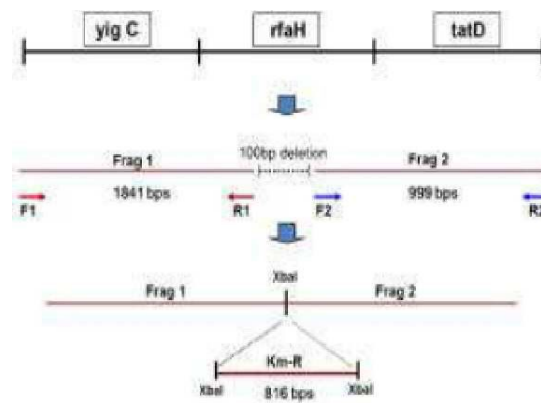
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **rfaH 결손형 살모넬라 티피뮤리움 균주 및 상기 균주를 이용한 식중독 예방 백신 조성물**

(57) 요약

본 발명은 *rfaH* 유전자의 일부가 결손된 살모넬라 티피뮤리움 균주 및 이를 이용한 식중독 예방용 백신 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 전사조절자인 *rfaH* 유전자를 일부 결손시킴으로써, 살모넬라 티피뮤리움 균주의 감염능, 세포내 생존율, 인간혈청 저항성, 스와밍 모빌리티를 감소시키고, 항미생물 펩타이드에 대한 취약성을 증가시킨 약독성 살모넬라 티피뮤리움 균주를 제공할 수 있으며, 이러한 살모넬라 티피뮤리움 균주는 다양한 축산물의 예방 및 치료용 백신으로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C1006899-01-03

부처명 교과부

연구사업명 기본연구지원사업 (협동)

연구과제명 식중독 발생감소를 위한 *Salmonella Typhimurium*의 예방백신개발

기 여 율 1/1

주관기관 강원대학교 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

유전자 *rfaH*가 돌연변이된 살모넬라 티피뮤리움 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

돌연변이된 *rfaH* 유전자의 염기서열은 서열번호 1인 것을 특징으로 하는 살모넬라 티피뮤리움 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 살모넬라 티피뮤리움 균주는 파지 타입이 U302인 살모넬라 엔테리카 세로바 티피뮤리움(*salmonella enterica serovar Typhimurium*)인 것을 특징으로 하는 살모넬라 티피뮤리움 균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주가 약독화된 것을 특징으로 하는 살모넬라 티피뮤리움 균주.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 약독화는 세포내에 존재하는 항미생물 펩타이드에 대한 취약성 증가에 기인하는 것을 특징으로 하는 살모넬라 티피뮤리움 균주.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항미생물 펩타이드는 폴리믹신 B(Polymyxin B)인 것을 특징으로 하는 살모넬라 티피뮤리움 균주.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 살모넬라 티피뮤리움 균주 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 식중독 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 8

살모넬라 티피뮤리움(파지 유형 U302)으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계(a);

상기 게놈 DNA로부터 *rfaH* 유전자를 증폭시키는 단계(b);

상기 *rfaH* 유전자의 일부를 절손시키고, 항생제 저항성 마커를 삽입시키는 단계(c);

상기 *rfaH* 일부 절손 유전자를 벡터에 삽입시키는 단계(d);

상기 벡터를 대장균에 형질전환시키는 단계(e);

상기 형질전환된 대장균과 살모넬라 티피뮤리움 균주를 접합시키는 단계(f);

상기 살모넬라 티피뮤리움 중 *rfaH* 돌연변이형 균주를 선별하는 단계(g);를 포함하는 것을 특징으로 하는 *rfaH* 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 *rfaH* 유전자의 일부를 결손시키기 위하여 서열번호 2 내지 5의 프라이머를 사용하여 중합연쇄반응을 이용하는 것을 특징으로 하는 *rfaH* 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 선별단계는 LB 배지에서는 생존하고 M9 배지에서는 사멸하는 살모넬라 티피뮤리움 균주를 선택하는 것을 특징으로 하는 *rfaH* 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 *rfaH* 유전자의 일부가 결손된 살모넬라 티피뮤리움 균주 및 상기 균주를 이용하여 식중독을 예방하기 위한 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 살모넬라는 형태학적 또는 생리학적으로 대장균과 유사하지만 의학상의 편의를 위해 K. Kauffmann 등의 제창에 의해 독립된 속 (genus)으로 분류되었다. 살모넬라는 1885년 Salmon과 Smith가 돈콜레라로 죽은 돼지에서 살모넬라 코레라에수이스(*Salmonella choleraesuis*)를 최초로 분리 보고한 이래, 장염과 위장염 환자 및 각종 질병을 가진 동물로부터 분리되었다. 또한 닭을 비롯한 소, 돼지, 염소, 개, 고양이 등의 건강한 동물과 환경물에서도 분리되었는데, 살모넬라 속 균은 현재까지 2,500여종 이상의 혈청형이 보고된 실정이며 동물에 따른 숙주 특이성이 있는 균종(예를 들면 사람에서의 *S. Typhi*, 소에서 *S. Dublin*, 돼지에서의 *S. Choleraesuis*, 닭에서의 *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*)과 숙주 특이성이 없는 균종(*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* 등)으로 크게 구분 지을 수 있고, 이 중 축산물을 통해 사람의 식중독을 일으키는 혈청형은 후자에 해당한다.

[0003] 살모넬라는 국내에서는 이질을 일으키는 쉬겔라(*Shigella*)와 함께 가장 많은 환자수를 발병하게 하는 병원균으로, 살모넬라에 오염된 양식 동물의 유통을 통해 인체에 전염될 수 있는 매우 위험한 세균이다. 살모넬라는 그람음성 간균으로 포자는 형성하지 않으며, 다양한 동물에서 기생균으로 발견되고 있다.

[0004] 살모넬라 감염증은 몇 가지 형태로 발생하지만 식중독 및 장염 형태가 가장 일반적인 증상이다. 과거 국내의 식중독 원인은 쉬겔라(*Shigella*)에 의한 것이 주를 이루었으나, 최근에는 살모넬라에 의한 식중독 발생율이 점차 증가하고 있는 추세이며, 단체 급식의 증가로 그 심각성이 계속 커지고 있다. 2000년도 식중독 환자의 원인균을 조사한 보고에 의하면, 2,500여 건 이상이 살모넬라에 의한 식중독으로 조사되었는데, 이는 포도상 구균(약 1,000여건), 비브리오(약 200여건) 등 다른 식중독 원인균에 비교하여서도 월등히 높은 비율을 차지하고 있는 것이다.

[0005] 한편, 살모넬라 식중독의 원인 혈청형에 따른 분포를 보면 1996년부터 2005년까지의 서울지역 사람에게서 분리된 살모넬라 혈청형 중 *S. Enteritidis*가 차지하는 비율이 42%로서 살모넬라에 의한 식중독의 거의 절반을 차지하고 있으며, *S. Typhimurium*이 그 다음 순위를 차지하고 있다(표 1 참조).

표 1

[0006] <1996년부터 2005년까지의 서울 지역에서 발생한 식중독 환자에서 분리한 살모넬라 혈청형 분포>

Serotype	No. of Isolates										Total (%)
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
<i>S. Enteritidis</i>	12	10	51	135	58	32	60	10	7	41	416 (42.0)
<i>S. Typhimurium</i>	7	7	18	42	10	3	8	12	1	7	115 (11.6)
<i>S. Typhi</i>	10	15	73	51	19	50	10	4	14	10	256 (25.9)

Other <i>Salmonella</i>	6	8	18	57	18	9	58	7	7	14	202 (20.4)
Total	35	40	160	285	105	94	136	33	29	72	989

[0007] 또한, 질병관리본부에서 조사한 사람에서 발견된 살모넬라 혈청형의 전국적 분포를 보면 *S. Enteritidis*가 가장 높고 그 다음으로는 *S. Typhimurium*이 차지하는 것으로 나타나 서울지역과 동일한 분포양상을 보이고 있다.

[0008] 한편, 축산물에서의 살모넬라 혈청형 검출율은 축종에 따라 차이가 있는데, 국내의 경우 축종에 대한 살모넬라 혈청형의 체계적인 분포율은 아직 보고된 바 없다. 네덜란드의 경우 사람에서는 예전에는 장티푸스의 원인체인 *S. Typhi*가 가장 많이 분리되었으나 1980년대부터는 *S. Typhimurium* 또는 *S. Enteritidis*가 가장 많이 분리되고 있다(표 2). 또한, 돼지에서는 *S. Typhimurium*이 가장 많이 분리되고 있고, 소에서도 숙주특이성이 높은 *S. Typhimurium*과 *S. Dublin*이 가장 많이 분리되며 *S. Enteritidis*는 검출율이 비교적 낮다. 닭의 경우는 *S. Enteritidis*가 가장 많이 분리되고 *S. Typhimurium*의 경우 분리율이 6번째를 차지하고 있다고 한다. 흥미로운 것은 사람에서는 *S. Enteritidis*의 검출율이 살모넬라 혈청형 중 수위를 차지하나 닭에서 가장 높은 검출율을 보이고, 소와 돼지에서는 *S. Typhimurium*이 수위를 차지하고 있다는 것이고, 이러한 결과는 나라별로 유사한 양상을 보이고 있다.

표 2

[0009] <1984년부터 2001년까지 네덜란드에서 가장 많이 분리된 살모넬라 혈청형>

Source	Serotype	Data for isolates from indicated period					
		1996-2001		1990-1995		1984-1989	
		% (no.)	Rank	% (no.)	Rank	% (no.)	Rank
Human	Typhimurium	32.0 (4,470)	2	33.1 (5,666)	2	57.2 (16,049)	1
	Enteritidis	43.6 (6,097)	1	33.8 (6,642)	1	5.4 (1,526)	2
Pig	Typhimurium	66.4 (2,384)	1	75.7 (2,378)	1	66.0 (2,197)	1
	Enteritis	-	>10	-	>10	-	>10
Chicken	Typhimurium	5.3 (336)	6	14.3 (2,669)	3	26.1 (5,170)	1
	Enteritidis	20.3 (1,290)	1	15.0 (2,802)	2	5.5 (1,088)	6
Cattle	Typhimurium	32.9 (702)	2	31.9 (1,670)	2	53.1 (1,706)	1
	Enteritidis	-	>10	-	>10	-	>10

[0010] 세계보건기구(WHO)에서는 1988년부터 축산물 유래 살모넬라에 대한 식중독 발생을 억제시키기 위해서는 효과적인 생균백신을 대상 동물에 접종할 것을 권장하고 있다. 특히 *S. Typhimurium*은 축종에 관계없이 분리율이 수위를 차지하고 있어, *S. Enteritidis*와 더불어 축산물에 전파되어 사람에게 식중독을 일으키는 가장 빈번하고 중요한 살모넬라 혈청형이므로, 이에 대한 효과적인 생균 백신을 개발할 필요성이 있다.

[0011] 축산물 안전성을 담보하기 위하여 항생제 치료보다는 산업동물에 대한 살모넬라의 예방으로 백신 사용이 필수 불가결한 요소라 할 것이다. 백신은 불활화 백신과 생균 백신으로 나눌 수 있지만 살모넬라가 일반적으로 세포 매개성 면역에 의해 방어되기 때문에 전 세계적으로 생균백신의 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이고, 불활화 백신의 경우는 야외 병원성 살모넬라가 실질장기에 침투되는 것을 방어할 수는 있어 생독백신 후 고면역유도를 위한 보강접종으로 사용하고 있다. 따라서, *S. Typhimurium*은 사람의 식중독을 저감화 시키는 방안으로 축산 식품으로 이용하는 돼지, 닭, 소에 있어 반드시 개발해야 하는 예방백신이며 축종에 관계없이 사용할 수 있는 시장성이 큰 백신 품목이므로, 식중독 예방을 최소화하고 국민보건 증진을 위해 개발 필요성이 절실히 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) 1. Gonzalo Rojas, Soledad Saldias et al. 2001. The *rfaH* gene, which affects lipopolysaccharide synthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhi, is differentially expressed during the bacterial growth phase. FEMS Microbiology Letters 204 123-128.

(비특허문헌 0002) 2. Javier Santander, Wei Xin, Zhao Yang, Roy Curtiss. 2010. The aspartate-semialdehyde dehydrogenase of *Edwardsiella ictaluri* and its use as balanced-lethal system in fish vaccinology. PLoS One. 2010 Dec 29;5(12):e15944.

(비특허문헌 0003) 3. Kang HY, Dozois CM, Tinge SA, Lee TH, Curtiss R 3rd. 2002. Transduction-mediated transfer of unmarked deletion and point mutations through use of counterselectable suicide vectors. J Bacteriol. Jan;184(1):307-12.

(비특허문헌 0004) 4. Gahring, L. C., F. Heffron, B. B. Finlay, and S. Falkow. 1990. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. Infect. Immun. 58: 443-448

(비특허문헌 0005) 5. Nagy G, Danino V, Dobrindt U, Pallen M, Chaudhuri R, EmL, Hinton JC, and Hacker J. 2006. Down-regulation of key virulence factors makes the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *rfaH* mutant a promising live-attenuated vaccine candidate. Infect Immun. 2006 Oct;74(10):5914-25.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 살모넬라 티피뮤리움 균주를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 이용한 식중독 예방 백신을 제공하는 것이다

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유전자 *rfaH*가 돌연변이 된 살모넬라 티피뮤리움 균주를 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 돌연변이 된 *rfaH* 유전자의 염기서열은 서열번호 1인 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 살모넬라 티피뮤리움 균주는 파지 타입이 U302인 살모넬라 엔테리카 세로바 티피뮤리움(*salmonella enterica* serovar Typhimurium)인 것을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 균주가 약독화된 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약독화는 세포내에 존재하는 항미생물 펩타이드에 대한 취약성 증가에 기인하는 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항미생물 펩타이드는 폴리믹신 B(Polymyxin B)인 것을 특징으로 한다.

[0022] 또한, 본 발명은 살모넬라 티피뮤리움 균주 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 식중독 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 살모넬라 티피뮤리움(파지 유형 U302)으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계(a); 상기 게놈 DNA로부터 *rfaH* 유전자를 증폭시키는 단계(b); 상기 *rfaH* 유전자의 일부를 절손시키고, 항생제 저항성 마커를 삽입시키는 단계(c); 상기 *rfaH* 일부 절손 유전자를 벡터에 삽입시키는 단계(d); 상기 벡터를 대장균에 형질전환시키는 단계(e); 상기 형질전환된 대장균과 살모넬라 티피뮤리움 균주를 접합시키는 단계(f); 상기 살모넬라 티피뮤리움 균주 중 *rfaH* 돌연변이형 균주를 선별하는 단계(g);를 포함하는 것을 특징으로 하는 *rfaH* 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주 제조방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *rfaH* 유전자의 일부를 절손시키기 위하여 서열번호 2 내지 5의 프라이머를 사용하여 중합연쇄반응을 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 선별단계는 LB 배지에서는 생존하고 M9 배지에서는 사멸하는 살모넬라 티피뮤리움 균주를 선택하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명은 *rfaH* 유전자 일부가 결손된 신규한 살모넬라 티피뮤리움 균주를 제공함으로써, 다양한 가축에 식중독을 일으킨다고 보고되는 살모넬라 티피뮤리움의 약독화 백신으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 *rfaH* 유전자가 결손된 벡터를 제조하기 위한 전략적 도식을 나타낸다.

도 2는 공여 벡터인 pMEG375 및 인서트인 Frag 1+KM+Frag 2을 보여주는 DNA 전기영동 사진이다.

도 3은 *rfaH* 유전자가 일부 결손된 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주를 확인하기 위한 PCR 결과이다.

도 4는 *rfaH* 유전자가 일부 결손된 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주를 확인하기 위한 또 다른 PCR 결과이다.

도 5는 *rfaH* 유전자가 일부 결손된 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주를 확인하기 위한 시퀀싱 결과이다.

도 6(a)는 LB 배지에서 키운 야생형과 *rfaH* 돌연변이 균주의 성장곡선(순차적으로 O.D. 값, CFU/ml, CFU/ml의 log 값)을 비교한 것이다.

도 6(b)는 M9 배지에서 키운 야생형과 *rfaH* 돌연변이 균주의 성장곡선(순차적으로 O.D. 값, CFU/ml의 log 값)을 비교한 것이다.

도 7(a)는 야생형과 *rfaH* 돌연변이 균주의 세포내 생존율을 비교한 그래프이다.

도 7(b)는 야생형과 *rfaH* 돌연변이 균주의 감염율을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 유전자 *rfaH*가 돌연변이된 살모넬라 티피뮤리움 균주에 관한 것이다.

[0029] 유전자 발현은 전사인자라는 단백질에 의해 조절된다. 인간에게 알려진 모든 세균은 NusG라는 전사인자를 가지는데, 이는 세균의 거의 모든 유전자의 발현을 조절한다. 따라서 NusG가 없으면 세균은 생존할 수 없다. 한편, 진화과정에서 NusG 유전자가 전문화된 결과 RfaH 전사인자가 등장하게 되었는데, RfaH는 NusG와 달리 소수의 유전자 발현만을 조절한다. 그러나, 대장균과 같은 세균의 감염성을 결정하는 유전자의 발현은 RfaH의 조절을 받는다.

[0030] RfaH 단백질은 그람음성세균의 전사조절인자로, RfaH에 의존하는 다양한 오페론들이 확인되고 있다. RfaH에 의해 영향을 받는 모든 유전자는 세포막 외부의 요소들을 코딩하며, 이 요소들은 세균의 독성(감염성)과 관련이 있는 것으로 보고된다. 예를들면, 협막(capsule)과 LPS(lipopolysaccharide)의 경우 세균을 숙주의 방어 메커니즘으로부터 지켜주며, 헤민 수용체(hemin receptor)의 경우 감염에 필수적인 물질을 공급해 주고, 알파-용혈소(α -hemolysin)의 경우는 세포독소로 작용한다.

[0031] RfaH 유전자는 불활성화되어 있고, 세균의 적당한 표적 서열을 찾았을 때 선택적으로 활성화되는 것으로 알려졌다. 즉, 이러한 유전자들은 병원성 세균으로 하여금 숙주를 감염시키게 하고, 동시에 이 세균을 숙주의 면역반응으로부터 보호하는 역할을 하며, 절대적으로 필요한 상황이 아니라면 RfaH의 활동은 가급적 억제되어 있는 것으로 관찰된다.

[0032] 본 발명자들은 상기와 같이 숙주 세포의 감염시 숙주의 면역반응과 밀접한 관계가 있는 전사 조절자인 *RfaH* 유전자를 돌연변이화 하여 약독화된 살모넬라 티피뮤리움 생균 백신을 제조하고자 본 발명을 계획하게 되었다.

[0033] 본 발명자들은 *RfaH* 유전자를 돌연변이화 하기 위하여 RfaH 유전자 중간의 약 100bp 정도를 결손시키고, 그 중앙부에 Kanamycin cassette를 삽입함으로써, RfaH의 기능은 상실하되, 선별 마크로써 항생제 Kanamycin을 사용할 수 있도록 하였다.

[0034] 돌연변이형을 만들기 위한 *RfaH* 유전자는 살모넬라 티피뮤리움(파지 타입 U302) 게놈 DNA로부터 얻을 수 있었고, 이들 유전자를 PCR을 이용하여 돌연변이화 시키고, pGEMT-T easy vector에 클로닝 한 후, 공여 벡터인 pMEG 375 벡터에 다시 클로닝하여 살모넬라 티피뮤리움과 접합(conjugation)하였다.

[0035] 상기와 같이 제조된 살모넬라 티피뮤리움 돌연변이형은 야생형과 비교할 때 성장율, 감염능, 세포내 생존율에서 현저한 차이를 나타내었다. 즉, 돌연변이형의 성장율은 야생형에 비하여 현저히 감소하였고, 이러한 경향은 LB 배지에 비해 M9 배지에서 더 현격한 차이를 나타내었다(도 6). 또한, 감염능에 있어서도 차이가 있었는데, 야생

형이 돌연변이형보다 훨씬 뛰어난 감염능을 나타내었고, 세포내 생존율에 있어서도 야생형이 돌연변이형에 비하여 생존능이 강한 것으로 나타났다(도 7).

[0036] 또한, 본 발명자들은 상기 돌연변이형 균주가 인간 혈청에 대한 저항력, swarming mobility, 항미생물 펩타이드에 대한 저항성도 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었는데(표 3), 이를 통하여 본 발명자들은 *rfaH* 유전자 일부가 결손된 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주가 약독화된 균주임을 알 수 있었고, 이를 이용한 살모넬라 티피뮤리움 균주 유래의 다양한 질환에 대한 백신으로의 활용 가능성을 예상할 수 있었다.

표 3

Strain	Serum resistance(%)	Swarming motility(cm)	MIC of Polymyxin B (μg/ml)
ST-wild type	100.3±0.48	4.97±0.15	4.8
ST- <i>rfaH</i> Del.	0	0.6	0.64

[0038] 상기 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주에서 *rfaH* 돌연변이를 나타내는 염기서열은 서열번호 1과 같을 수 있다. 또한 상기 서열번호 1의 돌연변이형 유전자를 만들기 위하여 서열번호 2 내지 5의 프라이머를 사용할 수 있다. 물론, *rfaH* 돌연변이형은 상기 서열번호 1 외에도 그 기능을 상실할 수 있는 다양한 방식으로 변형하여 사용할 수 있을 것이고, 돌연변이형 유전자를 제조하기 위한 프라이머도 상기 서열번호 2 내지 5의 프라이머 이외의 방식으로 변형하여 사용 가능할 것이다.

[0039] 본 발명에서 균주는 살모넬라 티피뮤리움 균주로 파지 타입은 U302가 바람직하나, 그 이외의 파지 타입에도 변형 실시할 수 있을 것이다.

[0040] 본 발명에서 상기 돌연변이 된 살모넬라 티피뮤리움 균주 및 약제학적으로 허용되는 담체는 식중독 예방 백신 조성물로 활용 가능하다.

[0041] 본 발명의 백신 조성물이 면역 반응을 일으킬 수 있는 숙주 동물은 인간, 닭, 오리, 꿩, 칠면조 등의 가금류, 돼지, 염소, 양, 소, 개, 고양이 등을 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 백신은 약독화된 생독 백신 또는 사독 백신, 서브유닛 백신(subunit vaccine), 합성 백신(synthetic vaccine) 또는 유전공학 백신(genetic engineering vaccine)일 수 있으나, 효과적인 면역 반응을 유도하는 생독 백신이 바람직하다.

[0043] 본 발명에서 사용된 용어 "생독 백신"이란 살아있는 균의 활성성분을 포함하는 백신을 의미한다. 또한 용어 "약독화된(attenuation)"이란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고 면역 체계만을 자극해서 면역성을 유도하는 것을 의미한다. 균의 약독화는 자외선(UV) 조사, 약품처리 또는 시험관 내 고차 연속 계대배양에 의해 달성될 수 있다. 약독화는 또한 명확한 유전 변화를 만듦으로써, 예를 들어 독성을 제공하는 것으로 알려진 유전자 서열의 특정 결실 또는 균주의 계능 내로의 서열의 삽입에 의해 달성될 수 있다.

[0044] 용어 "사독 백신"이란 불활화 백신 또는 사균 백신이라고도 하며, 죽은 균을 포함한 백신이다..

[0045] 용어 "서브유닛 백신"은 균의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원 성분만을 추출하여 제조한 백신으로, 균의 방어에 필요한 항원 부위에 대해서만 면역형성을 유도함으로써 부작용을 최소화할 수 있다.

[0046] "유전공학 백신"은 균의 병원성을 일으키는 특이 유전자를 변형하거나 제거한 것일 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 백신은 숙주동물에 발생하는 살모넬라 균 이외의 균에 의해 발생하는 질병을 예방하기 위하여 사용되는 다른 백신의 제조에 사용되는 불활화된 균체들 또는 항원들과 혼합하여 식중독을 포함한 다른 질병들을 함께 예방할 수 있는 혼합 또는 복합 백신으로 사용될 수 있다. 용어 "혼합 백신"이란 서로 다른 바이러스 백신을 함께 사용한 백신을 말한다.

[0048] 본 발명의 백신 조성물은 나출된(naked) 핵산 조성물들도 포함할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 핵산은 본 발명의 돌연변이형 *RfaH* 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 핵산 백신접종 방법들은 업계에 공지되어 있는 방법을 통해 실시할 수 있다. 예를 들어, 미국등록특허 제6,063,385호 및 제6,472,375호에 설명되어 있다. 상기 핵산은 플라스미드 또는 유전자 발현 카세트(expression cassette)의 형태일 수 있다. 일 실시예에서, 상기 핵산은 동물에 투여되는 리포솜에 둘러싸여진 채로 제공된다.

- [0049] 또한, 본 발명의 백신 조성물을 추가적으로 용매, 면역증강제(adjuvant) 및 부형제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 용매로는 생리식염수 또는 증류수가 있으며, 면역증강제로는 프레운즈(Freund's) 불완전체 또는 완전체 어쥬번트, 알루미늄 하이드록사이드 겔과 식물성 및 광물성 오일 등이 있으며, 부형제로는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드 또는 알루미늄 포타슘 실페이트가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자가 기술자에게 잘 알려진 백신 제조에 사용되는 물질을 더 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 백신 조성물을 경구형 또는 비경구형 제제로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 비경구형 제제인 주사액제로 제조하며, 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 비강 또는 경막외(eidural) 경로로 투여할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 용어 "예방"이란 조성물의 투여에 의해 살모넬라 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어 "치료"란 조성물의 투여에 의해 살모넬라 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0052] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체의 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로, 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] <실시예 1>
- [0055] 살모넬라 티피뮤리움 *rfaH* 돌연변이형 제조
- [0056] 1-1. 사용 균주 및 플라스미드
- [0057] *rfaH* 유전자를 돌연변이화하고자 하는 균주로서 살모넬라 티피뮤리움[*Salmonella typhimurium*(ST15, phage type : U302), ATCC, USA]를 사용하였고, *rfaH*를 돌연변이화 하기 위해 접합(conjugation)되는 부분(*rfaH* 100bp deletion fragment)을 클로닝하기 위한 균주로는 *Escherichia coli* DH5a(Real Biotech Co., Taipei, Taiwan)을 사용하였으며, 살모넬라 티피뮤리움[*Salmonella typhimurium*(ST15, phage type : U302)]과 접합하는 공여 균주(donor strain)는 *Escherichia coli* X7213(ATCC, USA)을 사용하였다. *rfaH*의 100bp가 결손된 deletion fragment를 제조하기 위해 사용된 벡터는 pGEMT-T easy vector (Progma, Maison, USA)이고 접합을 위해 사용된 벡터는 suicide vector인 PMEG 375(Progma, Maison, USA) 이다.
- [0058] 1-2. 배지
- [0059] 박테리아를 배양하기 위해 사용된 영양 배지는 저염 LB(Bacto-trypton 10g/L, Bacto-yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L)로 박테리아는 LB에서 37℃, 230rpm의 조건으로 배양하였다. *rfaH* 유전자의 재조합 확인용 배지로는 M9 minimal media(12.8g/L NaH₂PO₄·7H₂O, 3g/L KH₂PO₄, 0.5g/L NaCl, 1g/L NH₄Cl, 20%(w/v) glucose)를 사용하였다.
- [0060] 1-3. *rfaH* 유전자 결손 클로닝
- [0061] 실험방법은 선행문헌 2, 3에 서술된 방법을 참조하였다. 살모넬라 티피뮤리움(ST15, phage type :U302)으로부터 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit(INTRON, Sungnam, Korea)를 사용하여 제조자 방식에 따라 염색체 DNA를 추출한 후, PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 *rfaH* 유전자를 살모넬라 티피뮤리움의 염색체 DNA에서 증폭시켰다. 이 경우, 접합 유무를 확인하기 위하여 선별 마커인 카나마이신 카세트(Kanamycin cassette)를 넣

고 제한효소 부위를 추가한 프라이머는 Cosmo Genetech Co.(seoul, Korea)에서 제작하였다. 프라이머는 하기 표 4와 같고, PCR 조건은 하기 표 5와 같다.

표 4

<PCR에 사용한 프라이머>

Primer Name	Sequence
F1	AAA GAG CTC TTA TTT AAA GAT AGC CAG CTC
R1	AAA TCT AGA ATC AAA TTC AAC GAA CAG ATA
F2	AAA TCT AGA ATC AGC TTT CTA TCT ACA AGC
R2	AAA GCA TGC ATG TTT GAT ATT GGC GTT AAT
KF	AAA TCT AGA ATG AGC CAT ATT CAA CGG GA
KR	AAA TCT AGA CCA ATT CTG ATT AGA AAA AC

표 5

<PCR 반응 조건>

94℃	5min	30 cycle
94℃	1min	
60℃	1min	
72℃	1min	
72℃	10min	

상기 프라이머를 이용하여 PCR 한 결과, *rfaH* 100bp 결손된 두 개의 PCR 산물을 얻었다(Frag 1 및 Frag 2, 도 1 참조). 이 중 Frag 1을 pGEM-T easy vector(Promega, Madison, USA)에 SalI과 XhoI을 이용하여 삽입하고 서열분석(Solgent Co.[Taejon, Korea])을 맡겨 클로닝 여부를 확인하였다. 확인된 Frag1+T-vector에 Frag2를 다시 XbaI과 SphI를 이용하여 추가로 삽입하였으며, 상기 Fragment 사이에는 pS43-Km3에서 XbaI을 처리하여 얻은 Kanamycin cassette를 삽입하였다. 그 이후 공여 벡터인 pMEG375 vector에 상기 Frag1+KM+Frag2 인서트를 SalI과 SphI을 이용하여 클로닝 하였다.

1-4. 선별과정

본 발명자들은 상기 클로닝된 *Escherichia coli* X7213 (Diaminopimelic(DAP) 요구주)/ pMEG375(AMP)+ Frag1 + KM + Frag2 과 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella Typhimurium*)을 접합(conjugation)시킨 후 DAP를 넣지 않은 플레이트(with AMP)에서 첫 번째 선별(selection) 과정을 거치고, 이 때 얻어진 콜로니(colony)를 새로운 플레이트에 스트리킹(streaking)하여 분리시켰다. 완전히 분리된 콜로니(colony)를 LB 액상배지(without AMP)에서 48h동안 배양시켜 LB+sucrose+KM 플레이트에서 두 번째 선별(selection) 과정을 진행하였다. 이 후, LB+sucrose+KM 플레이트에 생성된 콜로니(colony)를 M9 배지 및 LB 배지를 이용하여 다시 선별하였다. 즉, LB에서는 자라고 M9에서는 자라지 않는 콜로니(colony)를 다시 선별하였다.

최종적으로 선별된 10개의 콜로니(colony)를 PCR로 확인 해 본 결과 *rfaH* 유전자가 결손된 2 개의 ST-*rfaH* De1(M4, M8)을 발견하였다. 이들 균주의 *rfaH* 유전자 결손을 확인하기 위하여 KF와 R2 프라이머를 이용한 PCR을 수행한 결과 예상된 크기인 1815bp의 PCR 산물을 얻을 수 있었다(도 3).

상기 선별된 균주의 *rfaH* 유전자 결손을 추가적으로 확인하기 위하여, F1과 KR 프라이머를 이용하여 PCR한 결과 예상 크기인 2657 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었고, KF와 R2 프라이머를 이용하여 PCR한 결과 예상 크기인 1815 bp를 확인할 수 있었다(도 4). 마지막으로 DNA 서열분석을 통하여, 본 발명자들이 원하는 바대로 도 1에 도시된 것과 같이 *rfaH* 유전자가 결손된 것을 확인하였다(도 5).

<실시예 2>

야생형과 돌연변이형의 성장율 비교

- [0071] 본 발명자들은 *rfaH* 결손된 살모넬라 티피뮤리움 균주를 제작할 때, 상기 기재된 바와 같이 LB 배지에서는 성장하되, M9 배지에서는 성장하지 않도록 선별하였다. 즉, 감염능과 관련된 유전자의 돌연변이형은 영양분이 풍부한 배지에서는 자라지만, 최소배지인 M9 배지에서는 생합성 경로의 이상으로 방향족 아미노산(aromatic amino acid) 또는 이들의 전구체(*p*-amino benzoic acid or 2,3-dihydroxy benzoic acid)의 추가 없이 자라지 못하기 때문에, 감염능과 관련된 *rfaH* 유전자가 결손된 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주는 M9 배지에서 성장할 수 없는 점에 기인하여 본 실험을 기획하였다.
- [0072] 본 발명자들은 상기 균주들의 성장상(growth phase)을 통하여 돌연변이형의 백신으로서의 유용성을 시험해보고자 하였다.
- [0073] 실험방법은 선행문헌 1을 참고하였는데, 즉, LB 배지에서 키운 야생형과 *rfaH* 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주를 각각 1:1000 비율로 LB 배지와 M9 배지에 접종하여 교반 배양하였다(37℃, 230 rpm). 균주의 성장율을 파악하기 위하여, 시간별로 spectrometer(SmartSpec™ 3000, Bio-Rad, USA)를 이용하여 OD값과 CFU/ml 값을 측정하였다.
- [0074] 그 결과, LB배지에서 성장율을 비교하여 볼 때, *rfaH* 돌연변이형은 야생형에 비해 120분과 270분 사이에서 성장률이 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이와 같은 결과는 M9 배지에서 자란 균주에서 더 극명하게 나타났다(도 6 참조).
- [0075] <실시예 3>
- [0076] 야생형과 돌연변이형의 감염능 및 생존율 비교
- [0077] 3-1. 감염능 비교
- [0078] 본 발명자들은 야생형 및 *rfaH* 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주의 백신으로서의 이용 가능성을 확인하기 위하여 세포 감염능을 비교해 보고자 하였다.
- [0079] 즉, 본 발명자들은 마우스 대식세포주(mouse macrophage cell line)인 Raw 264.7(ATCC) 세포를 24-well에 5×10^4 cells/well로 깔아주고 18h동안 10% FBS(WISENT INC)가 포함된 DMEM(Dulbeccos Modified Eagle Medium, Gibco)에서 배양하였다.
- [0080] 야생형과 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주는 모두 Agar 플레이트에서 24시간 동안 배양한 후, 멸균된 이쑤시개로 콜로니(colony)를 따서 10% FBS가 포함된 DMEM에 풀어주고 OD 540nm에서 CFU를 측정하여 2×10^7 CFU/ml 이 되도록 희석하였다.
- [0081] 상기 Raw 264.7(ATCC) 세포가 배양된 well을 10% FBS가 포함된 DMEM으로 두 번 세척한 후, 상기 희석된 살모넬라 균주가 포함된 배지를 0.5ml씩 각 well에 분주하고, 1시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 교반없이 배양하였다. 모든 well에서 배지를 제거하고 멸균된 PBS로 두 번 세척한 후, 100 µg/ml 겐타마이신(gentamicin)과 10% FBS가 포함된 DMEM을 0.5ml씩 첨가하였다. 겐타마이신(gentamicin) 처리하고 1시간이 지난 후 0.5ml 증류수로 용해하여 적절히 희석하고 플레이팅(plating)하였다. 한편, 겐타마이신(gentamicin)이 포함된 배지에서 계속 배양한 후 18h 혹은 24h째 0.5ml 증류수로 용해한 후 적절히 희석하여 플레이팅(plating)하였다.
- [0082] 그 결과, 야생형에 비해 *rfaH* 결손형에서 세포 내 생존율이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(도 7a 참조).
- [0083] 3-2. 세포 내 생존율 비교
- [0084] 본 발명자들은 또한 *rfaH* 결손 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주의 백신 활용 가능성을 파악하기 위하여 야생형 및 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주의 세포내 생존능을 비교해 보고자 하였다.
- [0085] 이를 위해 본 발명자들은 선행문헌 4와 같은 방법을 이용하였는데, 우선 마우스 대식세포주인 Raw 264.7(ATCC)을 24-well에 5×10^5 cells/well로 분주하고, 16h동안 10% FBS(WISENT INC)가 포함된 DMEM(Dulbeccos Modified Eagle Medium, Gibco)에서 배양하였다. 야생형과 *rfaH*가 결손된 돌연변이형 모두 37℃에서 16시간동안 배양하여 stationary phase로 만든 후, PBS로 세척하였으며, DMEM 배지를 사용하여 희석시켰다. 희석된 상기 균주를 세포에 첨가하여 세포내로 침입시키기 위해 1h동안 방치한 후, 모든 well에서 배지를 제거하고 PBS로 두 번 세척하였고, 세포외에 남아있는 박테리아를 죽이기 위해 40/ml 겐타마이신(gentamicin)과 10% FBS가 포함된 DMEM

을 0.5ml 넣어주었다. 젠타마이신(gentamicin) 처리 후 1시간 경과하면 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 세포 내에 존재하는 박테리아를 방출시키기 위해 2분동안 10% Triton X-100이 포함된 PBS를 처리하였다. 방출된 박테리아의 CFU를 측정하기 위해 적절히 희석하여 플레이팅 하였다. 그 이후에 세포내 리플리콘(intracellular replicon)을 결정하기 위하여 젠타마이신(gentamicin)이 포함된 배지에서 계속 배양한 후 6h 혹은 24h째에 2분동안 10% Triton X-100이 포함된 PBS를 처리하여 용해한 후 적절히 희석하여 플레이팅 하였다. 데이터는 초기 CFU값을 기준으로 배수로 표현하였고, 3번의 독립적인 실험을 시행하였다.

[0086] 그 결과, 본 발명자들은 야생형에 비해 *rfaH* 돌연변이형의 세포 내 생존율이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었고(도 7a), 약독화된 균주로 백신 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

[0087] <실시예 4>

[0088] 혈청 저항성, swarming mobility, 항미생물 펩타이드 저항성 비교

[0089] 4-1. 혈청 저항성

[0090] 본 발명자들은 *rfaH*가 결손된 살모넬라 티피뮤리움 균주의 인체 내 면역 체계의 민감도를 확인하기 위하여 혈청 저항성을 확인해 보기로 하였다.

[0091] 본 실험을 위해 선행문헌 5의 실험방법을 참고하였는데, LB 배지에 키운 야생형과 *rfaH*결손 돌연변이형 균주를 각각 식염수로 세척하고 식염수로 cells/ml로 희석하였다. 희석된 균주 200 μ l를 48 well에 넣고 같은 부피의 20% pooled human serum(Sigma)을 추가한 후 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양하였다. 그 후, 적절하게 희석하여 적절한 배지에 플레이팅 하고, CFU/ml로 측정하여 %로 수치를 나타내었다.

[0092] 그 결과, 야생형은 인간 혈청에 포함된 면역체계에 대한 저항성이 증가한 반면(100.3 ± 0.48), *rfaH* 결손 돌연변이형은 콜로니가 전혀 형성되지 않아, 인간 혈청에 존재하는 면역체계에 의해 모두 소멸하는 것으로 확인되었다(표 3 참조).

[0093] 4-2. swarming mobility test

[0094] 본 발명자들은 세균 표면에 존재하는 LPS는 *rfaH*에 의해 그 합성이 조절되는데, 이들 LPS는 인간에게 면역반응을 일으키고 살모넬라균의 swarming mobility에 영향을 준다는 점에 기인하여, swarming mobility를 실험해 보았다.

[0095] 실험방법은 선행문헌 5를 참고하였다. swarming motility는 0.5% glucose(Sigma), 0.6% agarose(BactoTM)를 포함한 LB 고체 plate에서 시행하였다. 미리 agar plate에 키워놓은 야생형과 *rfaH* 결손 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주를 세척하고 식염수를 이용하여 cells/ml로 희석하였다. 희석된 균주 6 μ l를 0.5% glucose와 0.6% agarose가 포함된 agar plate 가운데 부분에 작은 물방울 모양으로 loading한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 8시간 동안 배양한 후 콜로니(colony)의 반경을 측정하였다.

[0096] 그 결과 본 발명자들은 야생형은 4.97 ± 0.15 cm의 콜로니 반경인데 반하여, 돌연변이형은 0.6 cm의 콜로니 반경을 나타내며, 돌연변이형의 swarming mobility가 야생형에 비하여 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(표 3).

[0097] 4-3. 항미생물 펩타이드 저항성 비교

[0098] 본 발명자들은 항미생물 펩타이드인 폴리믹신 B(polymyxin B)에 대한 야생형 및 돌연변이형 살모넬라 티피뮤리움 균주의 저항성을 비교해 보고자 하였다.

[0099] 폴리믹신 B는 토양 중 호기성균이 생성하는 항생물질로, 폴리펩티드 구조를 가지며 항균 스펙트럼이 좁고 그람 음성균에만 작용하는 특성을 지닌다.

[0100] 본 발명자들은 선행문헌 5에 기재된 방법을 참고하여 본 실험을 시행하였는데, 폴리믹신 B(Sigma)를 0.1에서 100mg/ml까지 serial dilution 한 뒤, 10^6 cells/ml로 희석된 균주에 처리한 후 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양하였다. 일반적인 ELISA를 이용하여 optical density를 측정하였고 억제 역치값은 OD₅₅₀에서 0.1로 하였다. 이 평가는 3

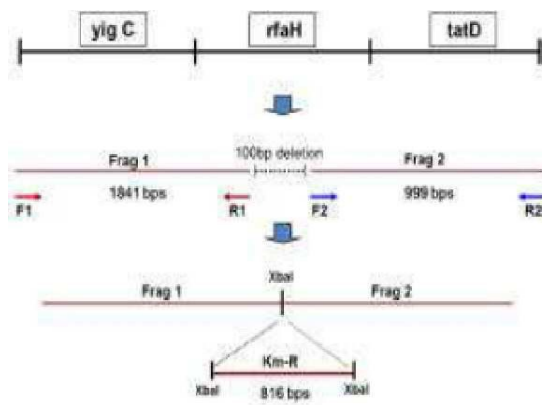
변 반복되었다.

[0101] 그 결과, 본 발명자들은 야생형의 MIC(minimum inhibitory concentration)은 4.8 ug/ml로 0.64ug/ml을 나타내는 돌연변이형과 큰 차이를 보임을 확인할 수 있었다. 즉, 야생형에 비해 돌연변이형 균주가 항미생물 펩타이드에 취약성이 훨씬 증가하는 것으로 확인할 수 있었는데, 이를 통해 돌연변이형 균주의 백신 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

[0102] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

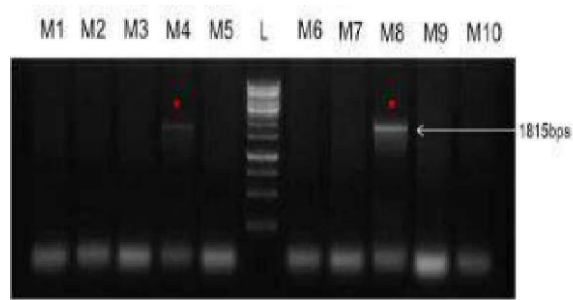
도면1



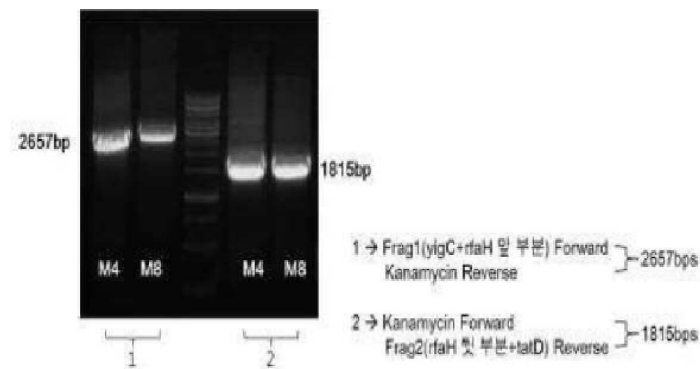
도면2



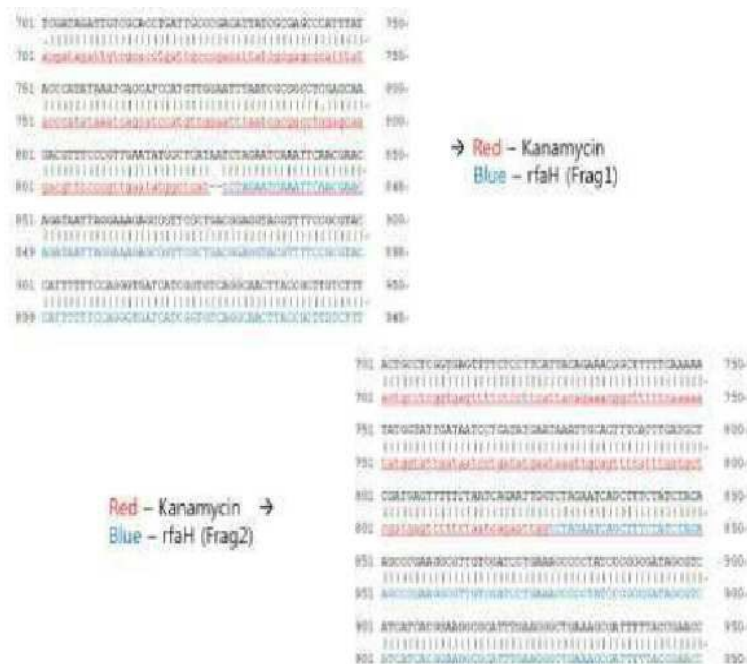
도면3



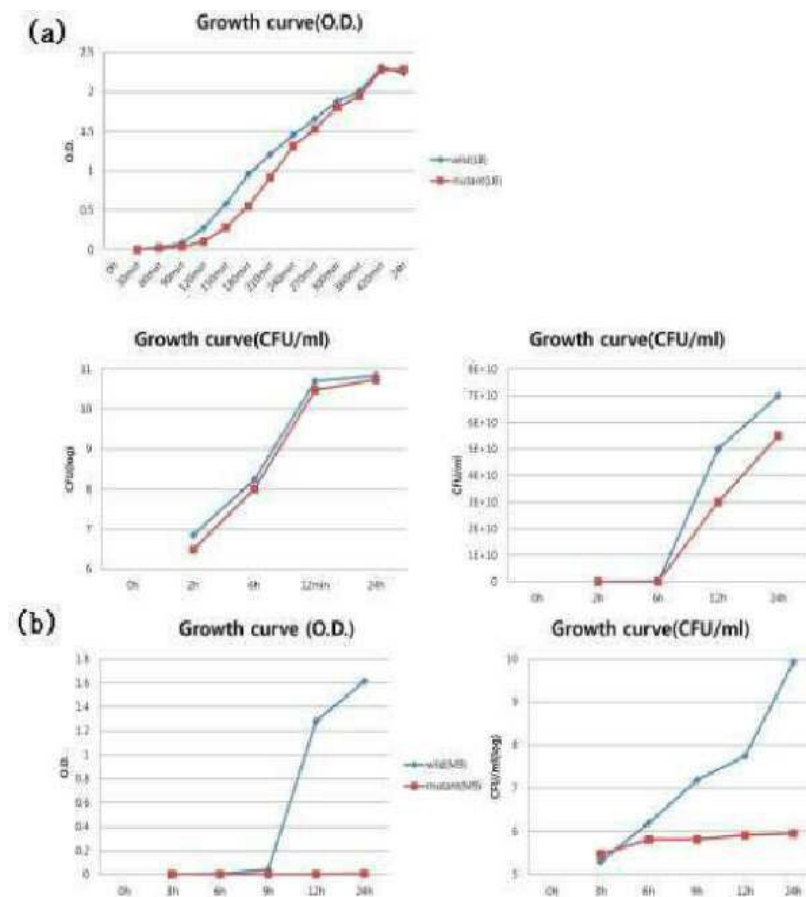
도면4



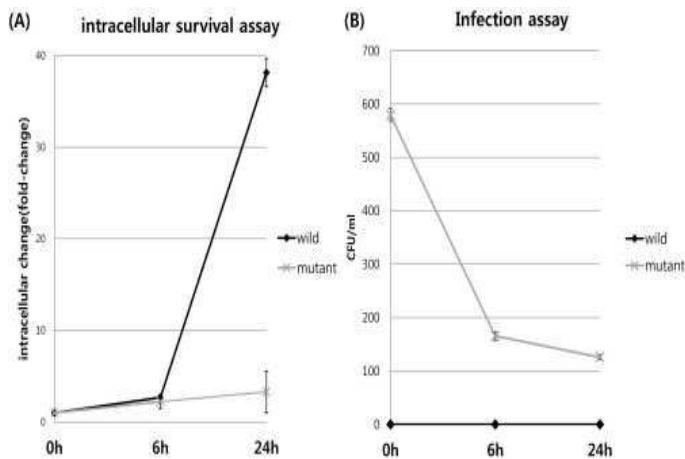
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> KNU-Industry Cooperation Foundation
KONYANG UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION GROUP
- <120> rfaH mutated Salmonella typhimurium and a composition for food poisoning prevention using the same
- <130> PN1209-459

<160> 1
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 1242
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mutated rfaH gene sequence which is aquired from samonella
 typhimurium and mutated to contain restriction enzyme site and
 kanamycin sequence in the middle of the gene

<400> 1
 atgcaatcct ggtatttact gtactgcaaa cgcgggcaac ttcagcgtgc tcaggaacac 60
 ctcgaaagac aagcggtaag ttgcctgaca ccgatgatca ccctggaaaa aatggtacgc 120
 ggaaaacgta ccttcgtcag cgaaccgctc tttcctaatt atctgttcgt tgaatttgat 180
 tctagaatga gccatattca acgggaaacg tcttgctcga ggccgcgatt aaattccaac 240
 atggatgctg atttatatgg gtataaatgg gctcgcgata atgtcgggca atcaggtgcg 300
 acaatctatc gattgtatgg gaagcccgat gcgccagagt tgtttctgaa acatggcaaa 360
 ggtagcgttg ccaatgatgt tacagatgag atggtcagac taaactggct gacggaattt 420

 atgcctcttc cgaccatcaa gcattttatc cgtactcctg atgatgcatg gttactcacc 480
 actgcatgcc ccgggaaaaac agcattccag gtattagaag aatatcctga ttcaggtgaa 540
 aatatgttg atgcgctggc agtgttccctg cgcgggttgc attcgattcc tgtttgaat 600
 tgtcctttta acagcgatcg cgtatttcgt ctcgctcagg cgcaatcacg aatgaataac 660
 ggtttggttg atgcgagtga ttttgatgac gagcgtaatg gctggcctgt tgaacaagtc 720
 tggaaagaaa tgcataagct tttgccattc tcaccggatt cagtcgtcac tcatggtgat 780
 ttctcacttg ataaccttat tttgacgag gggaaattaa taggttgtat tgatgttga 840

 cgagtcggaa tcgcagaccg ataccaggat ctgccatcc tatggaactg ctcggtgag 900
 ttttctcctt cattacagaa acggcttttt caaaaatatg gtattgataa tcctgatatg 960
 aataaattgc agtttcattt gatgctcgat gagtttttct aatcagaatt ggtctagaca 1020
 gctttctatc tacaagcccc aaggcgttgt cgatcctgaa acccctatc ccggcgatag 1080
 cgtcatcatc acggaaggcg catttgaagg gctgaaagcg atttttaccg aaccggatgg 1140
 cgaaacgcgt tcgatgttac tgcttaattt actcaataaa gaagtgaagc agagcgtaaa 1200
 aaacaccggt tttcgcaaga tttaggtttt cgcaagattt ag 1242