

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0041663 (43) 공개일자 2009년04월29일
(51) Int. Cl. <i>C07K 14/35</i> (2006.01) <i>C07K 1/14</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2007-0107293 (22) 출원일자 2007년10월24일 심사청구일자 2007년10월24일	(71) 출원인 대한민국(관리부서 : 농림수산식품부 국립수의과학검역원) 경기 안양시 만안구 안양6동 480 (72) 발명자 조윤상 서울 양천구 신정3동 743-2번지 현대6차아파트 104동 401호 이상은 경기 과천시 과천동 513-5번지 202호 (74) 대리인 황이남	

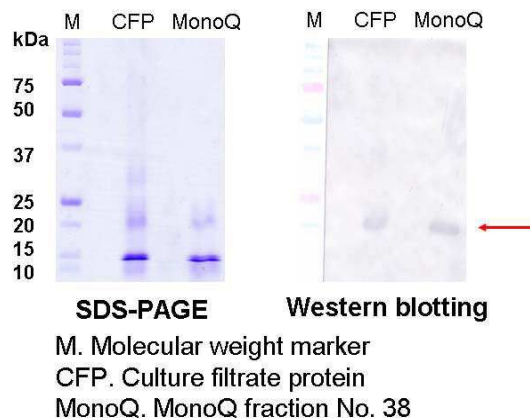
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 우결핵균 특이단백질 및 그 정제방법

(57) 요약

본 발명은 우 결핵균 항체에 특이적으로 반응하는 단백질 및 그 정제 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 우 결핵균 단백질 중 우결핵균 감염 혈청에 대한 항체 특이 단백질 및 그 정제 방법에 관한 것이다. 본 발명은 우결핵균의 혈청학적 진단 기술을 향상시킴으로써 우결핵의 확산방지를 도모할 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

고영준

경기 안양시 만안구 안양6동 미주아파트 A동 303호

조동희

경기 수원시 장안구 율전동 장안아파트 나동 412호

이향심

서울 마포구 공덕2동 foal안 공덕4차 405동 1303호

황인영

경기 안양시 만안구 안양6동480번지 국립수의과학
검역원

남향미

경기 성남시 분당구 정자2동 느티마을 3단지아파트
311동 404호

허은정

서울 서초구 방배동 구 삼호아파트 3동 506호

김종만

경기 의왕시 오전동 233 신미주아파트 102동 605호

정석찬

경기 군포시 산본동 삼환아파트 839

특허청구의 범위

청구항 1

우 결핵균인 마이코박테리움 보비스의 단백질 중 서열 1, 서열 2 및 서열 3으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 우 결핵균 항체에 특이적으로 반응하는 단백질.

청구항 2

살균 처리한 우 결핵균 마이코박테리움 보비스 배양 상등액의 단백질을 침전시키는 단계;

상기 단백질을 음이온 교환수지 크로마토그래피로 분획하는 단계; 및

상기 단백질 분획을 우결핵균 감염 혈청과 반응시켜 결합하는 단백질을 선별하는 단계를 포함하는 우결핵균 단백질 중 항체특이 단백질만을 정제하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 우 결핵균 항체에 특이적으로 반응하는 단백질 및 그 정제 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 우 결핵균 단백질 중 우결핵균 감염 혈청에 대한 항체특이 단백질 및 그 정제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 우결핵은 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) 감염에 의해 일어나는 인수공통전염병이다. 마이코박테리움 보비스는 마이코박테리움 튜버클로시스균 - 마이코박테리움 튜버클로시스, 마이코박테리움 보비스, 마이코박테리움 아프리카눔, 마이코박테리움 마이크로티 - 에 속하며, 마이코박테리움 튜버클로시스균중 가장 숙주범위가 넓은 균종으로 알려져 있다. 축산선진국의 우결핵 청정국 지위를 획득은 우결핵 피내검진 후 살처분 정책을 성공적으로 수행한 결과이다. 우리나라도 축산선진국과 마찬가지로 피내검진 후 살처분하는 정책을 펴고 있다 [재검토를 위해 Rua-Domenech 일행, 2006 참조].
- <3> 우결핵 발생은 전 세계적으로 발생하고 있고, 피내검진 후 살처분 정책을 시행하고 있는 축산선진국에서는 최종적으로 야생동물 결핵 통제가 난제로 되어 있다. 한편, 우결핵의 주 원인균인 마이코박테리움 보비스에 의한 사람 감염이 여러 나라에서 보고되고 있어 인수공통전염병으로서 방제에 더욱 노력을 경주할 필요성이 있다 [재검토를 위해 Theon 일행, 2006 참조]. 국내 우결핵은 양성우 살처분 정책의 지속적인 수행에도 불구하고 매년 0.15% 내외의 발생률을 보이고 있다. 즉, 연간 45만 여두의 피내검진 후 600여두가 양성으로 판정되어 살처분되고 있다.
- <4> 우결핵 발생으로 인해 양성개체 살처분에 따른 경제적 손실은 개체 살처분, 살처분 보상금 지급, 매물, 양성농장우 이동제한 등에 따른 경제적 손실이 국가 경제적 및 농업 경제적 측면에서 막대하다. 한편, 국가 간 무역장벽이 없어지고 무한 경쟁시대에 돌입된 지금, 소 농가의 경쟁력 제고를 통한 수출활로 개척이 국내 축산업의 진흥을 위해 필요한 당면과제가 되었다. 이런 차제에, 우결핵 발생국이라는 사실은 큰 걸림돌로 작용하게 될 것이다. 따라서 우결핵 청정국 지위를 획득하여 소 및 소유래 축산물의 수출 길을 열어 국내 축산업 진흥을 위한 노력을 경주해야 할 것이다.
- <5> 우결핵균인 마이코박테리움 보비스는 우유, 축산물, 직접 접촉 등을 통하여 사람 감염을 일으키기 때문에 이를 방제하기 위해 동물에서 우결핵을 검진하여 양성우를 살처분하는 강력한 정책을 펴고 있는 것이며, 앞으로도 동물의 결핵 방제노력은 계속되고 더욱 강화되어야 할 것이다.
- <6> 현재 우결핵을 방제하기 위한 노력은 주로 결핵양성개체를 피내검사로 색출하여 살처분하는 것과 도축장에서의 결절병변검사를 통한 결핵의 진단이다. 한편, 결핵을 예방하기 위한 백신개발에 관해서도 산업동물이 아닌 주로 야생동물 방제사업의 일환으로 시도되고 있다. 따라서, 우결핵방제있어 우결핵의 진단은 가장 중요한 항목이다.
- <7> 우결핵 검진에 활용되고 있는 피내검사법의 표준화와 진단 특이성과 민감성을 개선하기 위해 진단액이 개량되어 왔다. 특히, 특이성을 개선하기 위해 조형결핵균유래의 단백질 진단액과 피내검사를 비교하는 비교피내검사법이

개발되어 1차 검사 또는 2차 확진검사에 활용하고 있다. 한편, 이와 유사하게 감염개체의 우결핵 특이항원에 대한 세포성 면역반응 결과 생성되는 감마인터페론양을 측정비교함으로써 우결핵을 진단하는 방법이 비교적 최근에 도입되어 단일피내검사에 의한 비특이반응을 줄일 수 있는 방법으로 활용되고 있다 [재검토를 위해 Rua-Domenech 일행, 2006 참조]. 하지만, 피내검사는 개체별 검사를 시행하여 대량신속 검사가 어렵고, 진단법 특성상 개체의 보정이 필요하며, 3일후 다시 보정해야 하는 진단시술상의 어려움이 있고, 시술상 접종량, 접종부위 상태 등에 의한 진단 오차가 발생할 소지가 있는 단점이 있다. 감마인터페론검사법은 개체당 검사비용이 너무 높고, 검사할 수 있는 시설과 숙련도가 요구되는 실험이라는 점이 단점이다. 이에 혈청을 이용한 항체검사법의 개발을 통하여 대량의 시료를 신속하게 스크리닝하고 우균에 대한 항체수준을 평가함으로써 우균의 결핵균 노출 여부를 판정할 수 있는 보조진단법의 개발이 요구되는 실정이다. 이러한 혈청학적 진단법의 개발을 통하여 우균의 스크리닝 검사를 신속적이고 객관적으로 수행할 수 있을 것으로 사료된다.

<8> 우결핵의 진단은 자연형과민반응에 기초한 피내검진으로 양성우를 색출하여 살처분하고 있다. 우결핵균에 감염된 개체는 주로 세포성 면역반응 - 탐식세포, T세포 -에 의한 일련의 반응에 의해 생체를 방어하는 것이 우선하기 때문에 이와 관련된 세포성 면역반응이 주요 면역반응을 이룬다. 이에 반해 체액성 면역 반응, 즉, 항체가 생산되어 방어하는 면역반응은 우결핵균 감염에 따른 개체의 방어기작에 있어 큰 역할을 하지 못하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 그 면역반응의 크기도 미미한 것으로 알려져 있다 [재검토를 위해 Rua-Domenech 일행, 2006 참조]. 그러나, 감염된 개체에서 우결핵균의 증식이 허용되고 병리발생이 점점 진행되어감에 따라 체액성면역반응이 점점 더 증가하게 되며, 이와 상대적으로 세포성 면역반응은 점점 소실되어가는 면역반응 특징을 보인다. 세포성 면역반응과 체액성 면역반응의 차이로 말미암아, 우결핵의 진단은 시기별로 진단법간 진단효율의 차이를 보일 수밖에 없는 형편이다 [재검토를 위해 Rua-Domenech 일행, 2006 참조]. 따라서, 세포성 면역반응에 기초한 피내검진법을 보완할 수 있는 체액성면역반응에 기초한 진단법의 개발이 필요하며, 많은 연구자들이 피내검진법을 보완할 수 있는 항체검사법을 개발해왔다. 더욱이, 우결핵의 전파를 방지한다는 취지에서 볼 때도 우결핵균의 배설이 왕성해 지는 시기인 우결핵 중·후기에 우결핵 감염개체를 용이하게 색출할 수 있는 혈청검사법의 활용도가 제고될 수 있다. 한편, 감염후기 개체에 나타날 수 있는 피내진단에 대한 무반응우의 출현은 혈청검사법으로 보완해 나갈 수 있다 [재검토를 위해 Rua-Domenech 일행, 2006 참조]. 유효한 혈청검사법이 개발된다면, 추적조사에서 우균의 대량 스크리닝 검사, 진단비용의 절감 등의 효과를 가져올 수 있다. 또한, 피내진단에 의한 검진이 어려운 동물종에 대한 혈청학적 진단법의 적용은 동물에서 우결핵의 방제를 위해 좋은 효과를 낼 수 있을 것으로 사료된다. 뉴질랜드의 경우, 주머니쥐가 우결핵의 전염체로 작용하며, 이에 대해 주머니쥐 혈청 결핵진단을 위한 ELISA를 개발하였다 [재검토를 위해 Buddle 일행, 1995 참조].

<9> 개발된 우결핵 혈청학적 진단법으로써, ELISA 시험법에 연구되어졌던 대표적인 천연항원은 PPD (purified protein derivative), MPB70, Antigen 85 complex, 88-kDa protein, MPT32, MPB83 등을 들 수 있다 [재검토를 위해 Abou-Zeid 일행, 1987; Lilenbaum 일행, 2001; Lim 일행, 1999; Samanich 일행, 2000; Rua-Domenech 일행, 2006; Lightbody 일행, 2000 참조].

<10> 또한, ELISA 시험법에 연구되어졌던 대표적인 재조합 단백질 항원은 MPB70, 88-kDa protein, antigen 85C, MPT32 등이다 [재검토를 위해 Samanich 일행, 2000; Lightbody 일행, 2000 참조]. 또한, 면역크로마토그래피를 이용한 키트로써 우결핵 혈청검사를 실시한 예도 있다 [재검토를 위해 Palmer 일행, 2006 참조].

<11> 그러나, 이러한 혈청검사법에 의한 우결핵 진단법 개발은 공인진단법으로서 야외적용에 앞서 특이적이고 민감한 방법으로서의 개선이 요구되고 있다. 따라서 우결핵에 특이적이고 민감한 진단항원을 찾아내어 이를 혈청 검사법으로 개발하는 노력을 계속해야 할 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<12> 본 발명의 목적은 우 결핵균 항체에 특이적으로 반응하는 단백질 및 그 정제 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<13> 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 우 결핵균인 마이코박테리움 보비스의 단백질 중 서열 1, 서열 2 및 서열 3으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 우 결핵균 항체에 특이적으로 반응하는 단백질을 제공한다.

<14> 본 발명은 살균 처리한 우 결핵균 배양 상등액의 단백질을 침전시키는 단계; 상기 단백질을 음이온 교환수지 크

로마토그래피로 분획하는 단계; 및 상기 단백질 분획을 우결핵균 감염 혈청과 반응시켜 결합하는 단백질을 선별하는 단계를 포함하는 우결핵균 단백질 중 항체특이 단백질을 정제하는 방법을 제공한다.

효 과

<15> 본 발명을 통하여 우결핵균의 단백질 중 우결핵 감염혈청에 특이적으로 반응하는 단백질 및 그 정제방법을 제공함으로써 우결핵균 단백질 중 특이항원으로 구성된 우결핵 항체진단법에 활용되는 효과를 기대할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<16> 본 발명에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

<17> 우결핵의 진단은 우결핵균에서 유래한 단백질 항원을 피내에 접종하여 지연형 과민반응 정도로 우결핵 감염 여부를 판단하고 있다. 그러나 기존 우결핵의 진단은 개체별 피내접종과 72시간 후 지연형과민반응 관찰 등 검사 노동력과 검사시간이 길다는 단점이 있었다. 한편, 피내검사는 T세포 특이적 면역반응을 관찰하는 것으로서 우결핵균 감염에 따른 면역반응특성상 중·후기보다는 감염 초기에 우결핵을 진단하는 데는 우수한 진단법이기는 하나, 우결핵균이 호흡기 또는 소화기 계통으로 배설되어 타개체로의 전파위험성이 커지는 우결핵 중·후기에는 피내진단에 의한 진단에서 의음성으로 나타날 수 있다는 단점을 안고 있다. B 세포에 의한 우결핵 특이항체 형성은 감염 초기에는 미약한 반면, 감염 후기로 진행될수록 일반적으로 높아진다고 알려져 있다.

<18> 본 발명은 우결핵 감염에 따른 면역반응특성을 고려한 우결핵 특이항체검사에 이용할 단백질항원을 찾아내고 그 정제방법을 개발하고자 하였다. 정제된 항원을 우결핵 항체검사에 이용한다면, 우결핵 대량 신속 스크리닝 검사와 우결핵 감염 후기에서 피내진단에 의한 의음성 반응을 극복하는 효과를 가져 올 수 있다.

<19> 본 발명은 우결핵균 마이코박테리움 보비스의 단백질항원 중 우결핵균 감염우 양성혈청에 특이적으로 반응하는 단백질항원에 관한 것으로서 기존의 우결핵 진단에 이용하고 있는 원인균 분리와 특이유전자 검색의 시간적인 제약성과 대량 스크리닝 검사법으로서의 한계점을 극복하고자 우결핵균의 단백질 항원 중 우결핵균 양성혈청에 특이적으로 반응하는 항원을 찾아내고, 그 순수정제방법을 개발하여 우결핵 진단을 위한 대량의 시료를 고속으로 스크리닝 진단할 수 있는 기법 개발에 활용할 특이단백질 항원의 정제기법을 찾아내고자 하였다.

<20> 본 발명은 살균 처리한 우 결핵균 마이코박테리움 보비스 배양 상등액의 단백질을 침전시키는 단계; 상기 단백질을 음이온 교환수지 크로마토그래피로 분획하는 단계; 및 상기 단백질 분획을 우결핵균 감염 혈청과 반응시켜 결합하는 단백질을 선별하는 단계를 통해 우결핵균 단백질 중 항체특이 단백질을 정제할 수 있다.

<21> 본 발명은 상기에서 얻어진 단백질분획 중에서 우결핵균의 주요 단백질 항원들을 1차원 전기영동한 후, 우결핵균 감염우 혈청을 반응시켜, 면역특이적으로 반응하는 단백질 항원을 발견할 수 있다. 이들 면역특이단백질 항원들을 이온교환크로마토그래피를 이용하여 분획하는 것이 바람직하다. 상기에서 분획된 단백질항원들 중 우결핵균 감염혈청에 면역특이반응을 보인 분획을 찾아낼 수 있다.

<22> 본 발명은 우 결핵균 항체에 특이적으로 반응하는 3종류의 단백질을 정제한 후, 서열 1, 서열 2 및 서열 3으로 이루어진 특이단백질 각각의 아미노산 서열을 분석하였다.

<23> 우결핵 특이단백질항원과 그 정제방법을 활용하여 우결핵 항체검사법의 개발로 우결핵 대량 신속검사와 기존 우결핵 피내진단을 보완할 수 있을 것으로 기대된다.

<24> 본 발명은 우결핵의 전파방지를 위해 신속 정확한 진단기법을 개발함으로써 우결핵의 확산방지를 도모할 수 있다. 또한, 본 발명은 우결핵의 항체진단법 개발을 위한 특이단백질에 대한 아미노산 정보를 제공하며, 그 정제방법에 대한 정보를 제공함으로써 우결핵 항체진단법 개발에 이용할 수 있다.

<25> 이하 본 발명의 내용을 실시예에 의해 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<26> [실시예 1] 사용 균주 및 배양조건

<27> 우결핵균으로서는 *Mycobacterium bovis* AN5 (ATCC 35726)를 사용하였다. 동결건조되어 냉동보관(-70℃)되어 있던 균주를 Lowenstein-Jensen 사면배지(LJ, Lowenstein-Jensen medium base (Difco Co.) 37.2g, D.W. 600ml, whole eggs 1,000ml)에 접종하여 37℃에서 8주간 배양한 균대를 스파툴라 루프(spatula loop)로 소톤(Sauton) 배지(asparagine 4.8g, citric acid 2.4g, MgSO₄ 0.6g, K₂HPO₄ 0.6 g, ferric ammonium citrate 0.06g,

glycerine 72ml, ZnSO₄ 0.0096g, CuSO₄ 0.0012g, ammonia water 2.70ml, DW 1,200ml, pH 7.2)를 10ml씩 소분한 배양액의 액면에 균체를 부유시켜 37℃에서 8주간 배양하여 종균주로 하였다.

- <28> 종균주는 니아신 테스트(niacin test), 질산 환원 테스트(nitrate reduction test), 카탈라아제 테스트(catalase test), Tween 80 가수분해 테스트(hydrolysis test)의 생화학시험과 PCR (polymerase chain reaction; 중합효소연쇄반응)에 의한 IS6110과 IS1081의 특이유전자를 검사하여 동정하였다. 10ml의 소톤(Sauton) 배지에 배양된 종균주를 100ml씩 소분한 Sauton 배지 액면에 다시 계대하여 37℃에서 8주간 배양하였다.
- <29> 1. 니아신 테스트(niacin test), 질산 환원 테스트(nitrate reduction test), 카탈라아제 테스트(catalase test), Tween 80 가수분해 테스트(hydrolysis test)의 생화학시험
- <30> 1) 니아신 테스트 (niacin test)
- <31> LJ 사면배지에 3주 동안 배양하고 뚜렷이 배양된 균을 사용하였다. 2ml 멸균 증류수를 사면배지의 표면에 첨가하고 주사침으로 사면배지를 찌른 후, 사면배지를 37℃, 2시간 동안 정치하여 배양하였다.
- <32> 상기 배양 용액 1ml를 취하여 시험샘플로 사용하였다. 니아신 테스트 키트 (HiMedia, India)의 Part A 1ml을 Part B 1ml에 첨가한 후, 시험샘플 1ml을 주사기로 시약 (Part A + Part B)에 첨가하였다. 5분 내에 노란색으로 변하면 양성이며, 우결핵균은 5분 내에 노란색으로 변화하지 않는 니아신 음성임을 확인하였다.
- <33> 2) 질산 환원 테스트 (nitrate reduction test)
- <34> 3주 동안 배양된 균으로 실험하였다. 한 루프의 배양균을 질산 환원 테스트 키트 (HiMedia, India)의 R056에 무균적으로 풀고 잘 섞어, 37℃ 항온수조에서 2시간 배양한 후, 0.1N HCl 200μl를 첨가하였다. 질산 환원 테스트 키트 (HiMedia, India)의 R060 300μl를 배양된 R056에 무균적으로 첨가한 후, 30-60초 내에 빨간 색으로 변하면 양성이며, 우결핵균은 색깔변화가 없는 음성임을 확인하였다.
- <35> 3) 카탈라아제 테스트(catalase test)
- <36> 카탈라아제 테스트 키트 (HiMedia, India)의 카탈라아제 버퍼 R057 0.5ml에 시험균주를 풀었다. 시험균주가 담긴 튜브를 항온수조에 68℃, 20분간 놓은 후, 항온수조에서 튜브를 꺼내 실온에 식혔다. 신선한 카탈라아제 시약 R058 0.5ml을 첨가한 후, 20분 동안 용액의 표면에 기포생성유무를 관찰하였다. 기포가 생성되면 양성이며, 우결핵균은 기포가 생성되지 않는 음성임을 확인하였다.
- <37> 4) Tween 80 가수분해 테스트(hydrolysis test)
- <38> 0.067M phosphate buffer (pH 7) 100ml과 Tween 80 0.5ml, 0.1% 수용성 neutral red를 순서대로 섞고 121℃, 10분간 멸균시키고 갈색병에 담아 4℃에 보관하면서 기질로 사용하였다. 기질이 담겨진 튜브에 3mm의 균괴를 풀고 37℃에서 배양하였다. 1일, 5일, 10일째에 기질 튜브가 분홍색 또는 빨간색으로 변하는 지를 관찰하였다. 10일후에도 색깔변화가 없으면 음성이며, 우결핵균이 이에 해당됨을 확인하였다.
- <39> 2. IS6110과 IS1081의 특이유전자
- <40> 1) IS6110과 IS1081은 마이코박테리움 보비스를 유전자적으로 특이검색하기 위한 부위이다. 상기 유전자 유무를 확인함으로써 마이코박테리움 보비스로 동정할 수 있다. 상기 유전자의 염기서열은 각각 서열 4(IS6110: Mb2838c) 및 서열 5(IS1081: Mb2540c)에 나타내었다(<http://genolist.pasteur.fr/BoviList/>).
- <41> 3. 프라이머를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction; 중합효소연쇄반응)에 의한 IS6110과 IS1081의 특이유전자를 검사하였다.
- <42> IS6110에 대한 PCR 조건은 다음과 같다.
- <43> 98℃, 10분간 predenaturation하였으며, 95℃, 45초; 60℃, 45초; 72℃, 45초의 중합효소연쇄반응을 30회 반복 수행 후, 72℃, 7분간 final extension을 실시하였다.
- <44> IS1081에 대한 PCR 조건은 다음과 같다.
- <45> 95℃, 5분간 predenaturation하였으며, 95℃, 1분; 60℃, 1분; 72℃, 1분의 중합효소연쇄반응을 35회 반복 수행 후, 72℃, 10분간 final extension을 실시하였다.

- <46> 상기 유전자 IS6110과 IS1081에 대한 PCR에 사용한 프라이머 염기서열은 다음과 같다.
- <47> IS6110 PCR: 581bp
- <48> Primer F : 5' - GGACAACGCCGAATTGCG - 3'
- <49> Primer R : 5' - TAGGCGTCGGTGACAAAGGCCAC - 3'
- <50> IS1081 PCR: 317bp
- <51> Primer F: 5' - AAGCGAGCTGAACGCGCACTG - 3'
- <52> Primer R: 5' - TGGATGCCCAGGATCTCTCGG - 3'
- <53> [실시예 2] 단백질 추출 및 침전
- <54> 상기 실시예 1에서 8주간 배양한 균액의 잡균오염 유무를 육안 및 항산성 염색으로 확인하여 오염 여부를 확인한 후, 배양된 균액을 잘 흔들어 균막을 배지 중에 완전히 가라앉혀 진탕부유시키고 100℃ 증기압에서 3시간 동안 살균하였다. 살균된 것을 실온에서 냉각한 후 60mesh 동망으로 여과하고 이어서 여과지로 여과하여 투명한 황갈색의 액체를 12,000rpm, 30분간 원심침전 시켰다. 그 상층액에 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)가 85% 되게 용해시켜 단백질을 침전시킨 다음, 10,000 μ g에서 10분간 원심침전 하여 2부피의 멸균 PBS에 재부유하여 멸균 PBS로 투석막(MWCO 3,500)을 이용하여 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 제거하였다. 투석 후 BCA 단백질 분석 키트(BCA protein assay kit, Pierce Co.)로 단백질 농도를 측정한 다음, 진공원심농축기를 이용하여 건조시켜 정제에 공시하였다.
- <55> [실시예 3] 특이단백질 정제
- <56> 상기 실시예 3에서 건조시킨 단백질을 음이온 교환수지 크로마토그래피인 MonoQ HR5/5과 FPLC system을 이용하여 분획하였다. 이를 위하여 건조된 단백질을 버퍼 A (30mM Tris-HCl w/ 2% butanol, pH 8.8)에 9.5mg/ml 농도로 재부유하였다. 유속을 분당 1ml로 하였으며, 바이알(vial)당 1ml을 분획하였다. 6번 분획부터 26번 분획까지 20개 분획은 NaCl 농도를 0에서 1M까지 직선성으로 경사를 주었고, 26번 분획부터 31번 분획까지 5개 분획은 1M에서 2M까지 직선성으로 경사를 주었다.
- <57> 도 1은 우결핵균 단백질 중 음이온 크로마토그래피 MonoQ HR 5/5에 의한 분획을 나타낸 것이다.
- <58> [실시예 4] 특이단백질 조사 및 동정
- <59> 상기 실시예 3에서 음이온 교환수지 크로마토그래피를 이용한 우결핵균 단백질 분획중 체액성 면역 특이 단백질이 포함된 분획을 알아보고자 각 분획중 280nm에서 흡광도가 관찰된 분획들을 1차원 전기영동하고 코마시 블루(Coomassie blue)로 단백질을 염색하여 단백질의 1차원 패턴을 관찰하였고, 1차원 전기영동 후 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 단백질을 전이(transfer)한 다음, 우결핵균 감염 혈청과 반응시켜 결합하는 단백질을 찾아내었다(도 2).
- <60> 도 2는 면역특이단백질을 조사하기 위하여 단백질 분획의 1차원 전기영동 사진(왼쪽), 우결핵균 감염 혈청에 의한 웨스턴블롯(오른쪽) 결과를 나타낸 것이다.
- <61> 도 3은 우결핵균 단백질항원(CFP)과 정제단백질(MonoQ.)의 전기영동상(왼쪽) 및 면역블롯팅(오른쪽)을 나타낸 것이다.
- <62> [실시예 5]
- <63> 우결핵균의 단백질중 음이온 교환수지인 MonoQ 분획에서 특이적인 반응을 보인 단백질을 동정하고자 1차원 전기영동하고 코마시 블루(Coomassie blue)로 염색된 SDS-PAGE 겔에서 특이적인 반응을 보인 분획 18, 19 및 20번의 단백질 밴드부위를 절단하였다. 절단한 겔에 트립신(trypsin)을 처리하고 분해된 펩타이드(peptides)를 추출한 다음, 이를 ESI-MS/MS type의 질량분석기인 LTQ (ThermoFinnigan Co.)와 생물정보학 프로그램인 MASCOT과 NCBI의 데이터베이스(database)에 의해서 단백질을 동정하였다. 그 결과 우결핵의 항체진단에 사용할 수 있는 특이 단백질로써 MPB70(mycobacterial protein of BCG 70; 서열 1), CFP21(culture filtrate protein 21; 서열 2) 및 Thioredoxin(서열 3)의 아미노산 서열을 확인하였다.

<64> <표 1> 동정된 단백질

Protein Name	Mass (Da)	Score by MASCOT	동정된 Peptides수
MPB70	16365	257	2
CFP21	21782	145	3
Thioredoxin	23218	124	4

<66> [참고자료]

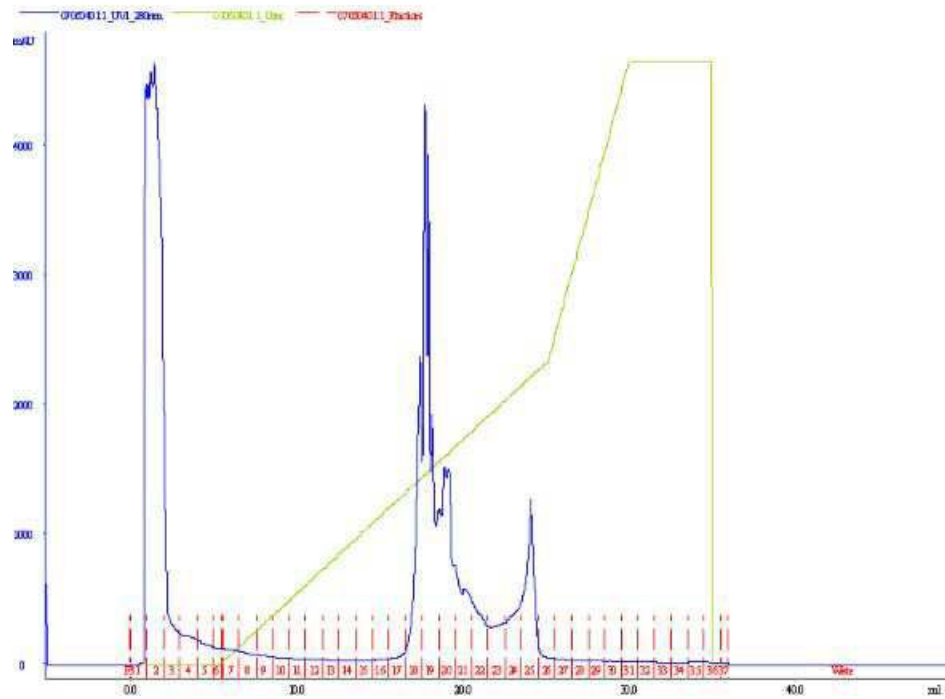
- <67> 1. Thoen, C., LoBue, P. and de Kantor, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microb*, 2006, 112, 339-345.
- <68> 2. Buddle, B.M., Nolan, A., McCarthy, A.R., Heslop, J., Aldwell, F.E., Jackson, R. and Pfeiffer, D.U. Evaluation of three serological assays for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in brushtail possums. *New Zealand Veterinary Journal*, 1995, 43, 91-95.
- <69> 3. Abou-Zeid, C., Harboe, M., and Rook, G.A.W. Characterization of the secreted antigens of *Mycobacterium bovis* BCG: Comparison of the 46-kilodalton dimeric protein with proteins MPB64 and MPB70. *Infection and Immunity*, 1987, 55, 3213-3214.
- <70> 4. Lilenbaum, W., Pessolani, M.C.V. and Fonseca, L.S. The use of Ag85 complex as antigen in ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. *J. Vet. Med. B*, 2001, 48, 161-166.
- <71> 5. Lim, J.H., Park, J.K., Jo, E.K., Song, C.H., Min, D., Song, Y.J. and Kim, H.J. Purification and immunoreactivity of three components from the 30/32-kilodalton antigen 85 complex in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 1999, 67, 6187-6190.
- <72> 6. Samanich, K.M., Keen, M.A., Vissa, V.D., Harder, J.D., Spencer, J.S., Belisle, J.T., Zolla-Pazner, S., and Laal, S. Serodiagnostic potential of culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2000, 7, 662-668.
- <73> 7. de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, r-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 2006, 81, 190-210.
- <74> 8. Lightbody, K.A., McNair, J., Neill, S.D., Pollock, J.M. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunised and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Veterinary Microbiology*, 2000, 75, 177-188.
- <75> 9. Palmer, M., Waters, W.R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*, 2006, 112, 181-190.

도면의 간단한 설명

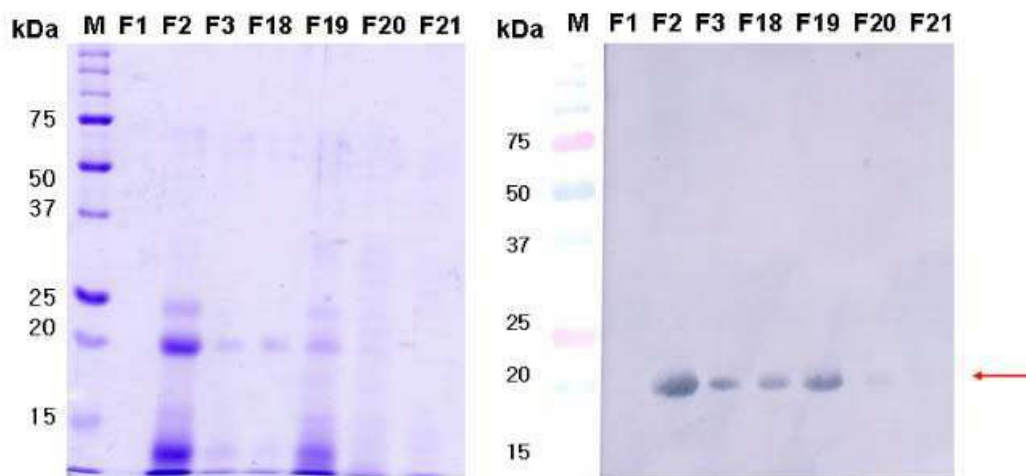
- <76> 도 1은 우결핵균 단백질 중 음이온 크로마토그래피 MonoQ HR 5/5에 의한 분획을 나타낸 것이다.
- <77> 도 2는 면역특이단백질을 조사하기 위하여 단백질 분획의 1차원 전기영동 사진(왼쪽), 우결핵균 감염 혈청에 의한 웨스턴블롯(오른쪽) 결과를 나타낸 것이다.
- <78> 도 3은 우결핵균 단백질 항원(CFP)과 정제단백질(MonoQ.)의 전기영동상(왼쪽) 및 면역블롯팅(오른쪽)을 나타낸 것이다.

도면

도면1



도면2

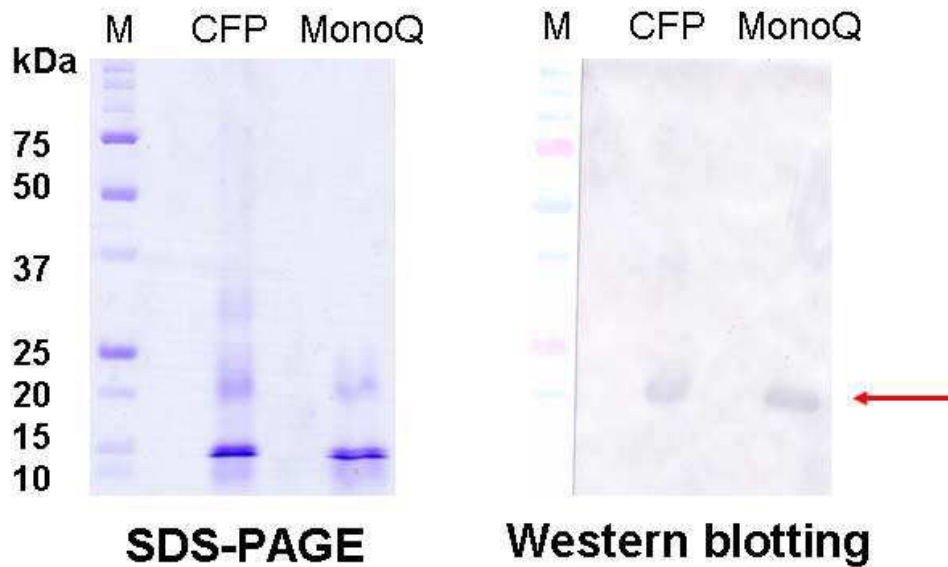


M. Molecular weight marker (BioRad Co.)

F1. fraction 1, F2. fraction 2, F3. fraction 3, F18. fraction 18

F19. fraction 19, F20. fraction 20, F21. fraction 21

도면3



M. Molecular weight marker
 CFP. Culture filtrate protein
 MonoQ. MonoQ fraction No. 38

서열 목록

<110> National Veterinary Research Quarantine Service
 <120> Protein antigen for diagnosis of Bovine tuberculosis and its purification method

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 193

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

<400> 1

Met Lys Val Lys Asn Thr Ile Ala Ala Thr Ser Phe Ala Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Ala Val Ala Val Ser Pro Pro Ala Ala Ala Gly Asp
 20 25 30

Leu Val Gly Pro Gly Cys Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Asn Pro Thr Gly
35 40 45

Pro Ala Ser Val Gln Gly Met Ser Gln Asp Pro Val Ala Val Ala Ala
50 55 60

Ser Asn Asn Pro Glu Leu Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Ser Gly Gln
65 70 75 80

Leu Asn Pro Gln Val Asn Leu Val Asp Thr Leu Asn Ser Gly Gln Tyr
85 90 95

Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Ala Ala Phe Ser Lys Leu Pro Ala Ser
100 105 110

Thr Ile Asp Glu Leu Lys Thr Asn Ser Ser Leu Leu Thr Ser Ile Leu
115 120 125

Thr Tyr His Val Val Ala Gly Gln Thr Ser Pro Ala Asn Val Val Gly
130 135 140

Thr Arg Gln Thr Leu Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Thr Gly Gln Gly
145 150 155 160

Asn Ser Leu Lys Val Gly Asn Ala Asp Val Val Cys Gly Gly Val Ser
165 170 175

Thr Ala Asn Ala Thr Val Tyr Met Ile Asp Ser Val Leu Met Pro Pro
180 185 190

Ala

<210> 2
<211> 217
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

<400> 2
Met Thr Pro Arg Ser Leu Val Arg Ile Val Gly Val Val Val Ala Thr
1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly Arg Ala Ala His Ala

20 25 30
 Asp Pro Cys Ser Asp Ile Ala Val Val Phe Ala Arg Gly Thr His Gln
 35 40 45
 Ala Ser Gly Leu Gly Asp Val Gly Glu Ala Phe Val Asp Ser Leu Thr
 50 55 60
 Ser Gln Val Gly Gly Arg Ser Ile Gly Val Tyr Ala Val Asn Tyr Pro
 65 70 75 80
 Ala Ser Asp Asp Tyr Arg Ala Ser Ala Ser Asn Gly Ser Asp Asp Ala
 85 90 95
 Ser Ala His Ile Gln Arg Thr Val Ala Ser Cys Pro Asn Thr Arg Ile
 100 105 110
 Val Leu Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Thr Val Ile Asp Leu Ser Thr
 115 120 125
 Ser Ala Met Pro Pro Ala Val Ala Asp His Val Ala Ala Val Ala Leu
 130 135 140
 Phe Gly Glu Pro Ser Ser Gly Phe Ser Ser Met Leu Trp Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Ser Leu Pro Thr Ile Gly Pro Leu Tyr Ser Ser Lys Thr Ile Asn Leu
 165 170 175
 Cys Ala Pro Asp Asp Pro Ile Cys Thr Gly Gly Gly Asn Ile Met Ala
 180 185 190
 His Val Ser Tyr Val Gln Ser Gly Met Thr Ser Gln Ala Ala Thr Phe
 195 200 205
 Ala Ala Asn Arg Leu Asp His Ala Gly
 210 215

<210> 3
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 3
Met Gln Ser Arg Ala Thr Arg Arg Ser Gly Ala Leu Thr Met Arg Arg
1 5 10 15
Leu Val Ile Ala Ala Ala Val Ser Ala Leu Leu Leu Thr Gly Cys Ser
20 25 30
Gly Arg Asp Ala Val Ala Gln Gly Gly Thr Phe Glu Phe Val Ser Pro
35 40 45
Gly Gly Lys Thr Asp Ile Phe Tyr Asp Pro Pro Ala Ser Arg Gly Arg
50 55 60
Pro Gly Pro Leu Ser Gly Pro Glu Leu Ala Asp Pro Ala Arg Ser Val
65 70 75 80
Ser Leu Asp Asp Phe Pro Gly Gln Val Val Val Val Asn Val Trp Gly
85 90 95
Gln Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ala Glu Val Ser Gln Leu Gln Arg Val
100 105 110
Tyr Asp Ala Thr Arg Gly Ala Gly Val Ser Phe Leu Gly Ile Asp Val
115 120 125
Arg Asp Asn Asn Arg Gln Ala Pro Gln Asp Phe Ile Asn Asp Arg His
130 135 140
Val Thr Tyr Pro Ser Ile Tyr Asp Pro Ala Met Arg Thr Leu Ile Ala
145 150 155 160
Phe Gly Gly Lys Tyr Pro Thr Ser Val Ile Pro Ser Thr Leu Val Leu
165 170 175
Asp Arg Gln His Arg Val Ala Ala Val Phe Leu Arg Glu Leu Leu Ala
180 185 190
Ala Asp Leu Gln Pro Val Val Glu Arg Val Ala Glu Glu Glu Pro Ser
195 200 205
Gly Arg Ala Pro Val Gly Ala Gln
210 215

<210> 4
 <211> 1237
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 4
 aagcgcttgc ggcgggacaa cgccgaattg cgaaggcgga acgcgatttt aaagaccgcg 60
 tcggctttct tcgcggcga gctcgaccgg ccagcacgct aattaccggg ttcacgcgcg 120
 atcatcaggg ccaccgcgag ggccccgatg gtttgcggtg gggtgtcgag tcgacatgca 180
 cacagctgac cgagctgggt gtgccgatcg ccccatcgac ctactacgac cacatcaacc 240
 gggagcccag ccgccgcgag ctgcgcgatg gcgaactcaa ggagcacatc agccgcgtcc 300
 acgccgcaa ctacggtgtt tacggtgcc gcaaagtgtg gctaaccctg aaccgtgagg 360
 gcatcgaggt ggccagatgc accgtcgaac ggctgatgac caaactcggc ctgtccggga 420
 ccaccgcggg caaagccgcg aggaccacga tcgctgatcc ggccacagcc cgtcccgcg 480
 atctctcca gcgccgttc ggaccaccag cacctaaccg gctgtgggta gcagacctca 540
 cctatgtgtc gacctgggca gggttcgcct acgtggcctt tgtcaccgac gcctacgctc 600
 gcaggatcct gggctggcgg gtcgcttcca cgatggccac ctccatggtc ctcgacgca 660
 tcgagcaagc catctggacc cgccaacaag aaggcgtact cgacctgaaa gacgttatcc 720
 accatacgga taggggatct cagtacacat cgatccggtt cagcgagcgg ctgcccagg 780
 caggcatcca accgtcggtc ggagcggtcg gaagctccta tgacaatgca ctagccgaga 840
 cgatcaacgg cctatacaag accgagctga tcaaaccgg caagccctgg cggtcacatg 900
 aggatgtcga gttggccacc gcgcgtggg tcgactggtt caaccatcgc cgcctctacc 960
 agtactgagg cgacgtcccg ccggtcgaac tcgaggtgc ctactacgt caacgccaga 1020

gaccagccgc cgctgaggt ctcagatcag agagtctccg gactcaccgg ggcggttcac	1080
cccagagagg gacggaaact cggggagccg atcagcgacc accgcaccct gtcagtcgtc	1140
agacccaaaa ccccagagg ggacggaaac cttcagcacc accatcatcc ggcgcctcag	1200
ctcagcatgt cgtcagaccc aaaaccccgaggaggga	1237
<210> 5	
<211> 1648	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium bovis	
<400> 5	
ttttcgaact ctcttaacac ggcatcgtga gacctaaccg cagccagcat ctttgccttg	60
tagtcatcgg cgcgaggtta cgtccagggg tgtggtgtac gggcaggtaa ggccggtggg	120
cgtgtcgtag ccagtagtg ggcggtcatc gcgtgatcct tcgaaacgac cagcaaaagt	180
caatcgaagg aaatgacgca atgacctctt ctcatttat cgacaccgag cagcttctgg	240
ctgaccaact cgacagggcg agcccggatc tgtgcgcggg gctgctctcg acgttcatcg	300
cgccttgat gggggctgaa gccgacgcc tgtgcggggc gggctaccgc gaacgcagcg	360
atgagcggtc caatcagcgc aacggctacc gccaccgtga tttcgacacc cgtgccgcaa	420
ccatcgacgt cgcgatcccc aagctgcgcc agggcagcta tttcccgac tggtgctgc	480
agcggcgcaa gcgagctgaa cgcgcactga ccagcgtggg ggcgacctgc tacctgctgg	540
gagtatccac tcgccgatg gagcgctgg tcgaaacact tgggtgaca aagctttcca	600
agtcgcaagt gtcgatcatg gccaaagagc tcgacgaagc cgtagaggcg tttcggaccc	660
gcccgtcga tgccggcccc tataccttcc tcgccgccga cgccttggtg ctcaaggctc	720
gcgaggcagg ccgctcgtc ggagtgcaca ccttgatcgc caccggcgtc aacgccgagg	780

gctaccgaga gatcctgggc atccaggtca cctccgccga ggacggggcc ggctggctgg	840
cgttcttcgg cgacctgggc gcccgcggcc tgtccggggt cgcgtgggc accagcgacg	900
cccacgccgg cctgggtggc gcgatcggcg ccacctgcc cgcagcggcc tggcagcgct	960
gcagaacca ctacgcagcc aatctgatgg cagccacccc gaagccctcc tggccgtggg	1020
tgcgcacct gctgcactcc atctacgacc agcccagcg cgaatcagtt gttgcccaat	1080
atgatcgggt actcgacgct ctgaccgaca aactccccgc ggtggccgag cacctcgaca	1140
ccgccgcac cgacctgtg gcgttcaccg ccttcccaa gcagatctgg cgccaaatct	1200
ggtccaacaa cccccaggaa cgctcaacc gagaggtacg acgccgaacc gacgtcgtgg	1260
gcatcttccc cgaccgcgc tcatcatcc gcctcgtcgg agccgtctc gccgaacaac	1320
acgacgaatg gatcgaagga cggcgtacc tgggcctcga ggtcctcacc cgagcccag	1380
cagcactgac cagcaccgaa gaaccgcga agcagcaaac caccaacacc ccagcactga	1440
ccacctagac tgccaccga aggatcacgc gaggaacctt cactcgtaca ccacgtcct	1500
ggccttggcc cggcgcggtc cagcgcagcg tggagtctgt ccaccgtctc gcccacacgg	1560
atgcggacct cctcttcgtg gtcttcgcc atcttgaccg gctggccttg gtgctcgtta	1620
cagatcgcac agcgcaccc acggacga	1648