

자돈 설사병 방지를 위한 경구백신용 형질전환 당근 개발

이영선 · 황철호*
단국대학교 생명자원과학부

Development of Transgenic Carrot Oral Vaccine to Protect against Diarrhea of Piglets

LEE, Young-Sun · HWANG, Cheol-Ho*

School of Bioresource Sciences, Dankook University, Chonan 330-714, Korea

ABSTRACT We are trying to develop a transgenic carrot with aims of production and delivery of oral vaccine against microbial enteropathogen using a K88ac pilin gene. A K88ac antigen (pilin) gene was isolated by PCR from the K88ac genomic DNA. The pilin gene was constructed in pGA748 and introduced via *Agrobacterium tumefaciens* to the explants of carrot hypocotyl and then 494 transgenic lines were established. The amounts of the K88ac antigen produced in each of the cell lines were determined by western and two elite cell lines (M1-17, Y14-1) were selected based on higher levels of expression of the antigens as well as rate of cell growth and efficiency of embryogenesis. In order to test an immunization induced by oral administration of the transgenic carrot, serum of the mice fed with the carrot vaccine were tested in ELISA. It turned out that the mice fed with 3 g of transgenic carrot showed a similar level of antibody compared to those applied with 10 μ g of the purified recombinant pilin protein. Besides, various clinical responses were measured after challenging with ETEC K88ac strain to the piglets experiencing an oral immunization with the transgenic carrot. The piglets fed with carrot vaccine showed a lower level of diarrhea in fecal score compared to those fed with non-transgenic carrot. A higher level of increase in weight of the piglets fed with the transgenic carrot vaccine was observed comparing to those fed with non-transgenic carrot as control.

Key words : Edible vaccine, ETEC, pilin gene, transgenic carrot

서 론

기존의 대장균 재조합 백신은 병원체의 오염을 근본적으로 배제하는 생산방법으로 안전하고, 생산비용이 저렴하며, 최적의 발현을 위한 유전학적 지식 및 돌연변이를 활용한 발현 벡터 체계가 완비되어 저비용 투입 대량생산에 적합하기 때문에 가장 바람직한 형태의 백신으로 여겨진다 (Isaacson 1985; Moffat 1998). 그러나 위와 같은 장점에도 불구하고, 번역 후 변형되는 일부 동식물 단백질의 경우 대장균과의 변형

체계의 차이로 인해 발현 단백질의 면역성이 저하되기도 하며, 재조합 대장균 백신의 경구투여시 장의 비우호적 조건에 의해 단백질이 파괴되어 비실용적이다 (Amanda and Charles 2000; Tacker and Mason 1999; Moffat 1998). 따라서 식물과 같은 고등생물의 발현체계를 이용할 경우 생물간의 차이에 따른 면역성 저하문제가 해결될 수 있으며, 함께 공급되는 식물조직에 의해 항원이 위장의 적대적 조건들을 회피할 수 있게 한다는 점에서 매우 효율적이다 (Kong 2001). 식물에서의 항원 생산은 생산비용 및 효율성에서 대장균에 못지 않고, 병원체에서 항원으로 작용하는 일부의 단백질만을 발현시키기 때문에 병원균과의 오염 가능성이 배제되어 안전하며 식물체 자체를 먹는 것으로 이루어지는 접종방법으로 인해 순수분리

*Corresponding author Tel 041-550-3626 Fax 041-553-1618

E-mail sfeho@dankook.ac.kr

등에 소요되는 비용이 절감되고 예방 목적의 이용에 수월하다 (Dupont 1999).

이러한 점에서 식물체를 이용한 재조합 경구백신의 개발이 활발해지는 추세이다. 이미 감자에서 cholera toxin B (Arakawa et al. 1998), LT-B (Mason et al. 1998; Haq and Mason 1995), hepatitis virus (Nemchinov 2000; Richter 2000; Thanavala 1995), Norwalk virus (Mason and Ball 1996; Mason and Lam 1992)에 대한 항체를 생산하여 그 효능을 확인한 바 있고, 이어서 토마토, 마나나 등에서 식물 유래 식물 백신을 생산하고 있으며 멀지 않아 성공적인 임상실험결과를 통하여 실용화가 가능할 것으로 보인다.

양돈산업의 대규모 집단사육 추세에 따라 돼지의 설사병은 양돈장에서 가장 흔하고 또 문제시되는 질병으로 대두되고 있다. 최근 우리 나라에서도 돼지의 설사병 발생이 증가하여 어린 자돈의 설사로 인한 폐사 및 성장지연으로 사육농가에 경제적으로 커다란 손실을 초래하고 있는 실정이다. 특히 병원성 대장균에 의한 설사병은 우리 나라의 거의 모든 사육농가에서 발생되는 질병으로 알려져 있으며 국내 대장균 설사 증 중 가장 기본적인 발병 원인균들은 K항원성으로 알려져 있다. 이를 예방 및 치료하기 위하여 많은 항생제를 사용하고 있지만 항생제 오·남용시 어린 돼지에게 내성 및 체내에 잔류될 가능성이 있기 때문에 현재 세계적으로 항생제 투여에 많은 제한을 두고 있다 (Kunin 1993). K항원은 돼지 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)로서 pilin이라는 특별한 surface antigen을 가지고 있어 숙주세포의 장 점막 표면 수용체에 특이적으로 결합한 후 병원균의 집단화를 용이하게 해 주고, enterotoxin을 분비함으로써 설사를 일으킨다 (Mooi et al. 1982). 따라서 장 표면에 특이적으로 결합하는 표면 항원인 pilin protein이 포함된 식물 조직 투여시 일차적으로 수동 면역을 유도하여 병독성 대장균과 장 점막 표면 수용체와의 특이적 경쟁을 유발시켜 병독성 대장균의 결합 및 증식을 막을 수 있다 (Herbers and Sonnewald 1999). 또한 이차적으로 다량으로 공급된 pilin protein은 소장외 Peyer's patch 등의 Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT)를 통해 상피세포를 통과하여 림프조직으로 이동하고, 면역반응을 유도하여 분비된 S-IgA이 병독성 대장균의 pilin protein에 달라붙어 장 점막의 수용체와의 결합을 막는 능동면역이 가능하다. 이러한 두 가지 방식의 설사병 방어 기작을 통해 초기의 특이적 결합을 억제 (anticolonization)하여 병독성 대장균에 의한 설사병 발생을 억제할 수 있다.

따라서 본 연구는 자돈의 장 상피세포에 특이적으로 달라붙은 후 증식하여 독소를 생성하며 장상피를 자극시킴으로써 설사를 야기시키는 장내 병독성 박테리아균의 부착용 단백질을 당근에 도입하여, 설사병 방지에 사용되는 항생제를 대체하는 고부가가치 복합사료첨가제 생산을 위한 당근개발을 목적으로 한다.

재료 및 방법

재료

실험 재료는 단국대학교 생명자원과학부 육종번식학 실험실에서 분양 받은 *E. coli* K88ac를 사용하였으며, 당근 품종은 대풍5촌 (D; 중앙종묘), 만산5촌 (M; 중앙종묘), 조춘5촌 (J; 중앙종묘), 여름5촌 (Y; 서울종묘), 한여름5촌 (H; 농우종묘)을 사용하였다.

식물형질전환을 위한 pilin 유전자 벡터 구축

K88ac pilin gene (adhesion gene, gb|M25302)의 염기배열을 바탕으로 primer (5': GTGGATATCAAGGGGTTTA, 3': CATGCTAGGTTTCAGCGGAGC)를 제작한 후 genomic DNA PCR [template 1 ng, 1x reaction buffer, 0.2 mM dNTP, 100 pmol 5' primer, 100 pmol 3' primer, Taq polymerase 10 u (Bionix); 94°C 7분, 94°C 1분, 57°C 1분, 72°C 1분, 72°C 5분, 30 cycles]을 수행하여 870 bp의 해당 유전자를 분리하였다. PCR cloning된 pilin gene은 식물형질전환용 vector인 pGA 748에 구축하였고 Freeze-thaw 방법 (Gelvin et al. 1988)을 통하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환하였다.

당근형질전환

Thomas 등 (1989)의 방법에 준하여 당근형질전환을 수행하였다. 당근 종자는 70% 에탄올에 30초간 4회, 상업용 표백제 (유한락스) 용액에 20분간 표면 살균하고 멸균증류수로 3회 수세한 후 0.7% phytoagar (Duchefa) 고체배지에 치상하여 25°C 암조건에서 2주간 발아시켰다. 얻어진 배축은 0.25~0.5 cm 간격으로 자른 후 MS⁺ 배지 [5 mg/L 2,4-D, 3% sucrose가 첨가된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)]에서 2일간 80 rpm에서 진탕하였다. 2일간 M9 배지 (Manistis et al. 1982)에서 키운 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA 4404를 MS⁺ 배지에 resuspension시킨 것과 2일간 진탕한 당근 배축을 암조건에서 10분간 공동배양한 후 식물절편을 air dry하여 MS⁺ 배지에서 2일간 25°C, 80 rpm 암조건에서 배양한 후 carbenicillin 400 mg/L와 kanamycin 100 mg/L이 포함된 MS⁺ 고체배지 (0.7% agarose)에서 형질전환된 개체만을 선별하여 얻어진 캘러스는 MS⁻ 배지 (2,4-D를 제거하고 2.5% sucrose가 첨가된 MS 배지)에 치상하여 식물체 재분화를 유도하였다.

Pilin 재조합 단백질 생산 및 polyclonal 항체 생산

E. coli 재조합 백신으로 이용하고, western과 ELISA 분석을 통한 pilin 단백질 발현 유무와 정도를 확인하기 위하여 *E. coli* expression system인 pET32 vector에 sub-cloning한 후

pilin 단백질을 대량 발현시켰다. 형질전환된 cell은 OD₆₀₀에서 0.6이 될 때까지 키운 후 4°C에서 16시간 보관한 다음 새로운 배지에 재접종하여 OD₆₀₀값이 0.4~0.6이 되면 최종농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 넣고 1시간 동안 키워서 thioredoxin과 결합된 pilin 단백질을 대량발현시켰다. pET system manual (Novagen)의 insoluble protein 추출 방법에 의하여 단백질을 추출한 후 SDS-PAGE하여 원하는 단백질 band를 homogenizer로 곱게 분쇄하고 diffusion buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1% SDS)에 넣어 4°C에서 16시간 이상 진탕하여 gel로부터 단백질을 추출하였다. 4°C, 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만을 회수하였고 4배의 acetone을 넣어 -20°C에서 16시간 이상 침전시킨 후 다시 원심분리하여 얻어진 pellet을 PBS (Phosphate-Buffer Saline) buffer에 녹였다.

Polyclonal antibody를 생산하기 위하여 *E. coli*에서 발현시킨 100 µg의 pilin 단백질을 Freund's adjuvant (Gibco)를 22G needle에 연결된 주사기에 넣어 섞은 후 토끼의 피하에 2주 간격으로 3회 주사한 후 심장 채혈하였고 얻어진 혈청은 동결 건조하여 -70°C에서 보관하였다.

식물단백질 추출과 western 분석

당근 유식물체 0.1 g을 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 동량의 2x protein sample buffer (0.125 M Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, 0.0025 g Brilliant Blue R)를 넣고 다시 homogenization하였다. 30초 간격으로 vortexing과 ice에 두는 과정을 5회 반복한 후 4°C, 12000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액만을 회수하고 -20°C에 보관하였다.

추출된 당근 total protein은 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동한 후 Trans-Blot Cell (Bio-Rad)을 이용하여 70V에서 2시간 동안 nitrocellulose membrane (S&S)에 blotting하였다. Membrane은 TBST (100 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 10분간 washing시키고 TBST에 5% nonfat dry milk가 포함된 용액으로 45분간 blocking하였다. Primary antibody는 pilin 단백질을 주사한 토끼로부터 얻은 pilin polyclonal antibody를 1:2,500의 비율로 TBST용액에 희석하여 30분간 반응하였고, secondary antibody는 anti-rabbit IgG-AP conjugate (Promega)를 1:7,500의 비율로 TBST 용액에 희석하여 사용하였다. 반응이 끝난 membrane은 AP system (Promega; NBT, BCIP)을 사용하여 상온 압조건에서 발색반응을 수행하였다.

형질전환 식물조직 내 발현된 pilin 단백질의 정량을 위해 BCA 방법 (Sigma)으로 정량된 재조합 pilin을 포함한 western 분석 결과를 MelaniIII program (Genebio)으로 비교하였다.

백신 당근의 쥐 임상시험

Mouse는 21일령된 specific pathogen free (SPF) BALB/c (대한바이오링크)를 사용하였으며, 시험재료는 형질전환 당근, 비형질전환 당근, 재조합 pilin 항원을 유지사료 (삼양) 및 녹말과 혼합 후 pelleting하여 40°C incubator에서 3일간 건조하였다.

경구 투여 12시간 전에 음식을 시킨 후 negative control로서 비형질전환 당근 5 g, positive control로서 재조합된 pilin 항원 10 µg, 실험구로 항원 과발현 계통 (M1-17)과 저발현 계통 (Y19-2)의 형질전환 당근 조직을 1 g, 3 g, 5 g씩 투여하였다. 5반복으로 0일, 7일, 14일, 21일 경구 투여하였으며 투여 후 28일에 심장 채혈하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Coligan 등 (1992)의 Indirect ELISA 방법에 준하여 분석하였다. 순수분리한 pilin 단백질을 10 µg/mL가 되도록 carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)에 희석하여 microplate (Costar® 3590 96 well assay plate)에 100 µg씩 넣어 4°C에서 16시간 이상 coating하였다. Coating된 plate는 PBST (0.15 M PBS, 0.05% Tween 20)로 3회 washing한 후 PBST에 5% nonfat dry milk가 포함된 용액을 200 µL씩 분주하여 실온에서 2시간 동안 blocking하였다. PBST로 7회 washing 후 획득된 항원형질을 dilution buffer로 희석하여 37°C에서 2시간 반응시켰고, secondary antibody는 anti-mouse IgG-AP conjugate (Promega)를 1:5,000의 비율로 PBST에 희석하여 사용하였다. 반응이 끝난 plate는 NPP (p-nitrophenyl phosphate, phosphate substrate tablet, Sigma) substrate buffer를 사용하여 15분~30분간 상온 압조건에서 발색반응을 수행한 후 5 M NaOH를 사용하여 반응을 억제시키고 microtiter plate reader (V-max, Molecular Devices)로 405 nm에서 조사하였다.

백신 당근의 K88ac 접종에 따른 자돈 방어실험

21일령 된 3원 교잡종 (Duroc×Yorkshire×Landrace) 자돈을 사용하였으며, 동결건조된 형질전환 당근과 비형질전환 당근은 투여사료의 2%, 1 mg의 재조합 pilin 항원을 사료에 첨가하여 14일간 자유채식시켰다. 5반복으로 하여 0일, 7일, 14일, 21일, 28일에 혈액을 채취하여 ELISA를 수행하였으며 14일간 처리사료를 급여한 후 모든 돼지에게 장독성 대장균 K88 (5×10⁸ cfu/mL)을 2 mL씩 8시간 간격으로 경구로 공격 접종하여 설사를 유발시켰다 (Figure 1). ETEC K88ac를 공격 접종한 후 2일과 4일째 되는 날에 Sherman 등 (1983)의 방법에 의하여 fecal score (정상적인 분 : 0, 연변 : 1, 묽은 설사 : 2 그리고 심한 설사 : 3)를 측정하였으며, 자돈 보호 효과의 정량적 판정을 위하여 평균 일당 증체량 [average daily gain

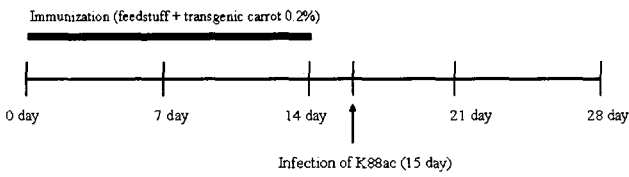


Figure 1. Schematic diagram showing the schedule of clinical test of piglet.

(ADG): {(시험종료일 체중 - 시험개시일 체중)/시험기간}/ 마리수를 측정하였다.

결과 및 고찰

K88ac pilin gene의 분리와 식물형질전환 vector 구축

E. coli K88ac로부터 PCR을 통해 870 bp의 K88ac pilin gene을 분리하였다 (결과 미제시). 얻어진 유전자는 sequencing을 통하여 DNA 수준에서 K88ac pilin gene (adhesion gene) 과 100%의 homology를 확인하였다. 또한 K88의 다른 serotype인 K88ab, K88ad pilin gene과 아미노산 배열 수준에서 95% 이상의 상동성을 확인함으로써 K88ac pilin gene으로부터 유래된 경구백신이 K88ab 및 K88ad 병원체 대항백신으로서 이용이 가능할 것으로 판단되었다. 또한 K88ac pilin gene의 codon usage를 확인한 결과 당근에서 고 빈도로 사용되어지는 codon으로 구성되어 있어 K88ac pilin gene이 당근 내에서 높은 수준으로 발현될 수 있을 것으로 판단하였다.

분리된 유전자는 CaMV 35S promoter에 의해 지속적 발현이 가능한 pGA748에 크로닝하여 binary vector system을 구축하였으며, 이를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켰다 (Figure 2).

***Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 당근 형질전환 및 품종별 형질전환 효율 분석**

pGApili를 포함하는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 5품종 당근의 배축 절편과 공동배양 후, 선발배지로부터 494개의 형질전환된 캘러스 세포주를 얻었다. 본 실험에서 사용한 당근 품종에 따른 형질전환율은 조춘5촌, 여름5촌, 한여름5촌, 대풍5촌, 그리고 만산5촌의 순으로 높았으며 1년간의 계대배양을 통한 세포주의 퇴화율 및 안정적 체세포배 발생률을 비교할 때 여름5촌, 조춘5촌, 대풍5촌, 만산5촌, 그리고 한여름5촌의 순으로 우수하였다 (Table 1).

재조합 pilin 단백질 생산 및 polyclonal 항체생산

Pilin 단백질을 pET32 *E. coli* expression system을 이용하여

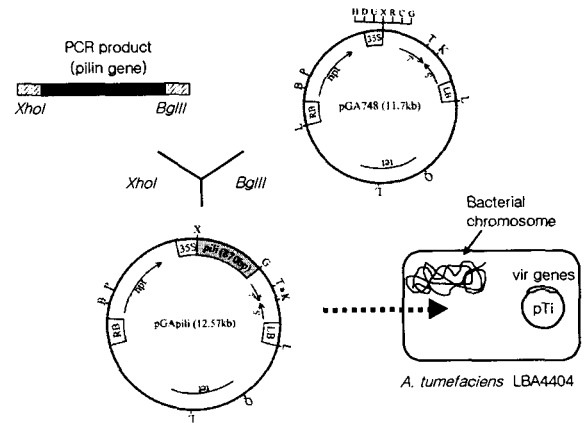


Figure 2. Schematic diagram showing the construction of pGApili from a ligation of a *XhoI* and *BglII* fragment of pilin into pGA748 and pGApili transformed in the *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. B; *BamHI*, C; *Clal*, D; *Scal*, G; *BglII*, H; *HindIII*, K; *KpnI*, L; *Sall*, M; *SmaI*, P; *PstI*, Q; *SmaI*, R; *EcoRI*, S; *SacI*, T; *SstI*, U; *MluI*, X; *XhoI*

발현시킨 결과 IPTG처리 1시간 후 thioredoxin (17.38 kDa)과 결합한 46.03 kDa의 K88ac pilin 단백질이 전체단백질의 30%를 차지하였다. 발현시킨 단백질은 gel elution한 후 토끼의 피하에 주사하여 antiserum을 제작하였다. 재조합 pilin 백신을 대량 생산하기 위하여 insoluble protein 추출방법을 사용하여 K88ac pilin 단백질이 70% 이상이 되도록 추출하고 대량 발현시킨 단백질은 PBS에 녹인 후 BCA방법으로 단백질 양을 측정하여 경구 투여시켰다.

형질전환 당근 분석 및 과발현 세포주 선발

항생제 저항성을 통해 선발된 세포주 중 체세포 배발생 단계에 있는 54계통을 대상으로 한 PCR을 통해 조사 세포주의 97%에서 pilin 유전자 도입을 확인하였다 (Figure 3). 유전자 도입이 확인된 당근 유식물체의 pilin 단백질 발현을 확인하기 위하여, 대조구와 형질전환체의 전체 단백질을 추출한 후 제작된 pilin polyclonal antibody를 이용하여 western을 시행하

Table 1. Efficiencies in transformation and maintenance of cell line among different cultivars of carrot.

Cultivars of carrot	Percentage of resistant callus appeared per tissue transformed	Number of cell lines maintained
Daepung5chon	13.0	120
Hanyeoreum5chon	14.0	17
Jochun5chon	21.5	142
Mansan5chon	6.4	39
Yeoreum5chon	19.4	176

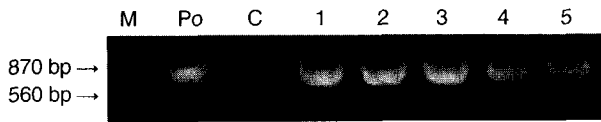


Figure 3. Confirmation of the pilin gene introduced in transgenic carrot cells by PCR. The transgenic carrot cells show an expected band of 870 bp. M; *HindIII* marker, Po; pilin gene of K88ac cloned in T-vector as a positive control, C; nontransgenic carrot, 1; J1-15, 2; M1-17, 3; Y7-1, 4; Y14-1, 5; Y19-22



Figure 4. Western analysis of the pilin proteins from transgenic carrot with pilin antiserum. Po; recombinant pilin antigen. C; nontransgenic carrot, 1; J1-15, 2; M1-17, 3; Y7-1, 4; Y14-1, 5; Y19-22

였다. 그 결과 J1-15, M1-17, Y7-1, Y14-1 4계통에서 28.9 kDa의 band를 확인할 수 있었으며 MelanieIII program을 통한 분석을 통해 0.1~4 µg/g 범위의 농도로 pilin 단백질의 축적을 확인하였다 (Figure 4). 이들 세포주 중에서 J1-15가 가장 많은 항원 발현을 보였으나 정상 식물체로 분화가 되지 않아 백신식물 개발을 위해서는 부적합하였다. 따라서 백신식물 재선에 활용될 세포주를 선발하기 위하여, 식물조직 내 발현되어 축적된 병원균 항원의 양과 식물체 수준에서의 성장속도 및 정상 발육을 기준으로 비교적 우수한 M1-17과 Y14-1을 선발하여 대량생산 체계를 구축하였다.

쥐에 대한 백신 당근 경구 투여시 면역반응

쥐를 대상으로 당근 경구 투여시 상응하는 항체 생성과 이를 위한 최적 항원농도 등의 지표를 파악하기 위하여, 1주 간격으로 pilin 단백질 과발현 형질전환 당근 (M1-17) 및 저발현 형질전환 당근 (Y19-22)과 비형질전환 당근, 대장균에서 생산한 재조합 pilin 백신을 4회 경구 투여한 후 채취한 혈청을 ELISA 분석하였다. 자유채식 그룹 내의 5마리 개별 쥐의 차이를 고려하여 최고 및 최저치의 결과를 제외한 3마리의 평균값을 취하였을 때, 형질전환 당근 (Y19-22, M1-17) 3g 투여시 10 µg의 재조합 pili 백신을 경구 투여한 것에 비해 다소 높은 항체 생성을 나타냈으며 5g 경구 투여시 저발현 계통인 Y19-22은 투여량이 많아짐에 따라 항체 생성이 더 이상 유의적으로 증가하지 않았다. 따라서 3g의 분량이 본 실험에 사용한 쥐에게 면역 유도를 위한 적정량으로 확인하여 후속되는 자돈실험에 사용할 경구백신의 양을 정하는 데에 활용하였다 (Figure 5).

백신당근 투여시 자돈 증체량과 병원균 공격 접종시 임상결과

당근백신의 투여를 통한 설사병으로부터의 자돈 보호 효과

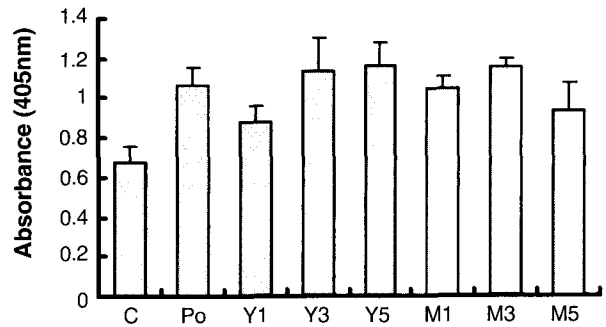


Figure 5. Results from ELISA measuring the amounts of pilin antibody in mice serum at 28 days after feeding with the transgenic oral vaccine carrots. C; nontransgenic carrot, Po; recombinant pilin antigen (*E. coli*), Y1; Y19-22, 1 g, Y3; Y19-22, 3 g, Y5; Y19-22, 5 g, M1; M1-17, 1 g, M3; M1-17, 3 g, M5; M1-17, 5 g.

를 정상적으로 판정하기 위해 당근백신을 급여한 14일 동안, 각 처리구 간 평균 일당 증체량 (ADG)을 조사하였다. 그 결과, 형질전환 당근백신 섭취시 비형질전환 당근을 투여하거나, 재조합 백신을 투여한 자돈에 비해 평균 60g 이상 높은 차이를 보였다. 이는 이유 후의 생육이 가장 왕성한 시기에 자돈 설사병이 미치는 영향을 반영한 것으로 형질전환당근의 투여를 통해 증체량을 유지해 준 것으로 생각된다 (Table 2).

또한 시험사료를 14일간 연속 급여한 후, 장독성 대장균 K88ac (5×10^9 cfu/mL)을 2 mL씩 8시간 간격으로 경구로 공격 접종한 후 2일과 4일에 Sherman 등 (1983)의 방법에 의하여 fecal score (정상적인 분 : 0, 연변 : 1, 묽은 설사 : 2, 심한 설사 : 3)를 측정하였다 (Table 3). 측정한 결과 비형질전환 당

Table 2. Effects of recombinant carrots on average daily gain (ADG) in piglets¹.

	Nontransgenic carrot	Transgenic carrot	<i>E. coli</i> recombinant	SE ²
ADG (g)	250 ^b	326 ^a	261 ^{ab}	28

¹ Fifteen pigs with an average initial body weight of 4.97±0.19 kg (SD).

² Pooled standard error.

^{ab} Means in the same row with different superscripts differ (P < 0.10).

Table 3. Clinical response of 36 days old pigs after challenge with ETEC K88 strains.

	No. of pigs	No. of pigs with diarrhea occurring	
		2 days	4 days
Nontransgenic carrot	5	1 (3) ¹	1 (3)
Transgenic carrot	5	0 (0)	0 (0)
<i>E. coli</i> recombinant	5	0 (0)	0 (0)

¹ At day 15 after the onset of the experiment, all pigs were challenged orally with ETEC K88 at a dose of 5×10^9 cfu/mL.

² Fecal score is the mean fecal consistency score: 0, normal; 1, soft feces; 2, mild diarrhea; 3, severe diarrhea. Values in brackets represent mean fecal score.

근을 섭취한 대조구 1마리에서 fecal score 3 level의 심한 설사가 발생하였고, 다른 처리구에서는 설사가 유도되지 않았다. 위 실험에서 관측한 증체량의 차이를 고려해 볼 때 외관상 측정된 설사의 정도 외에 내부적으로 소화기관에 미치는 영향의 차이가 존재할 것으로 생각된다. 특별히 설사 정도가 낮은 이유는 본 실험에서 돼지의 다양한 평가를 위해 2주간 사육하는 과정에서 발생한 돼지의 성숙도로 인한 것으로 여겨진다.

적 요

병독성 대장균 (K88ac)의 pilin gene을 분리하여 이를 당근에 도입한 후 이의 발현을 유도하여 자돈 설사병 예방 및 치료를 위한 당근경구백신 개발을 목적으로 하였다. 형질전환을 통해 494 세포주를 확립하였고, western 분석을 통하여 0.1~4 µg/g의 pilin 단백질 발현을 확인하였으며 백신식물 생산에 적합한 세포주 2종 (M1-17, Y14-1)을 선발하여 포장생산 및 임상실험에 적용하였다. 쥐를 대상으로 당근 경구 투여시 병원균 항체 생성 여부와 면역 유도를 위한 최적 농도 지표를 파악하기 위하여 1주 간격으로 형질전환 당근 1g, 3g, 5g을 경구투여 한 결과 백신 당근 3g 투여시 10 µg의 재조합 pilin 백신을 경구 투여한 것에 비해 다소 높은 항체 생성을 나타냈으며 3g의 분량이 쥐 면역 유도를 위한 적정량으로 확인하였다. 자돈에 대한 백신당근 경구 투여시 자돈 설사병 보호 효과를 정량적으로 구명하기 위하여 분석한 자돈의 일당 증체량은 형질전환 당근 투여시 평균 60g 이상 더 높은 증체량을 보였으며, 질병방제 효과를 구명하기 위하여 장독성 병원균을 인위 접종한 결과 대조구에서만 fecal score 3의 심각한 설사를 확인하였다. 본 연구를 통해 개발된 당근백신은 효율적 투여방법 등에 대한 후속 실험을 통하여 산업적 이용 가능성이 탐색될 예정이다.

사사 - 본 연구는 바이오그린21사업이 지원하는 "가축의 세균성 질병 방지용 형질전환 당근을 이용한 식용백신 생산 및 실용화 연구" 결과의 일부로 이루어졌음.

인용문헌

- Amanda MW, Charles JA (2000) Plants for delivery of edible vaccine. *Curr Opin in Biotech* 11:126-129
- Arakawa T, Chong DKX, Langridge WHR (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotech* 16:292-297
- Coligan JE, Frusseek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W (1992) *Current protocols in immun.* NIH pp. 2.0.1-22
- Dupont M (1999) Edible Vaccines. http://campus.fortunecity.com/sociology/729/edible_vaccines.htm
- Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (1988) *Plant molecular biology.* Kluwer academic Publishers A3/7
- Haq TA, Mason HS (1995) Oral immunization with recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716
- Herbers K, Sonnewald U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Curr Opin Biotech* 10:163-168
- Isaacson RE (1995) Development of vaccines for bacterial diseases using recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 298:714-716
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11539-11544
- Kunin CM (1993) Resistance to antimicrobial drugs; a worldwide calamity. *Ann. Intern. Med* 118:557-561
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York
- Mason HS, Arntzen CJ (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends Biotech* 13:388-392
- Mason HS, Ball JM (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5335-5340
- Mason HS, Lam DMK (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11745-11749
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16:1336-1343
- Moffat AS (1998) Exploring transgenic plants as a new vaccine source. *Science* 268:658-660
- Mooi FR, Wouters C, Wijffjes A (1982) Construction and characterization of mutants impaired in the biosynthesis of the K88ac antigen. *J Bact* 150:512-521
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
- Nemchinov LG, Liang TJ (2000) Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus. *Arch Virol* 145:2557-2573
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotech* 18:1167-1171
- Sherman DM, Acres SD, Sadowski PL, Springer JA, Bray B, Raybould TJG, Muscoplat CC (1983) Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. *Infect Immun* 42:656-658

Tacker CO, Mason HS (1999) A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Micro Infect* 1:777-783
Thanavala Y (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3358-

3361

Thomas JC, Gultinan MJ, Bustos S, Thomas T, Nessler C (1989) Carrot (*Daucus carota*) hypocotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 8:354-357

(접수일자 2002년 11월 8일)