

면역체 분석을 위한 탄저균 유전자 발현 라이브러리의 구축

박문규¹ · 정경화¹ · 김연희² · 이기은² · 채영규^{1*} · 윤장원^{1**}

¹한양대학교 분자생명과학부, ²국립보건원 감염병연구센터

[#]현재소속: 중앙대학교 의과대학 중개시스템생체학 연구소

Construction of the Genomic Expression Library of *Bacillus anthracis* for the Immunomic Analysis

Moon Kyoo Park¹, Kyoung Hwa Jung¹, Yeon-Hee Kim², Gi-eun Rhee², Young Gyu Chai^{1*},
and Jang W. Yoon^{1**}

¹Division of Molecular and Life Sciences, Hanyang University, Ansan 426-791, Republic of Korea

²Center for Infectious Disease Research, National Institute of Health, Seoul 122-701, Republic of Korea

^{*}Present address: Department of Microbiology and Research Institute for Translational System Biomics,
Chung-Ang University College of Medicine, Seoul 156-756, Republic of Korea

(Received January 11, 2010/Accepted March 8, 2010)

As the causative agent of Anthrax, *Bacillus anthracis* causes an acute fatal disease in herbivores such as cattle, sheep, and horses as well as humans. The therapeutics and prevention of anthrax currently available are based on antibiotics and the live attenuated vaccine strains, which may be problematic due to the emergency of antibiotic resistant strains or residual virulence in those vaccine strains. Therefore, it has been required to develop novel therapeutics and vaccines which are safer and applicable to humans. Recently, the development of the multivalent vaccine targeting both spores and vegetative cells of *B. anthracis* along with anthrax toxin has been reported. In our attempts to screen potential candidates for those multivalent vaccines, the whole genomic expression library of *B. anthracis* was constructed in this study. To the end, the partial digests of the genomic DNA from *B. anthracis* (ATCC 14578) with *Sau3AI* were ligated with the inducible pET30abc expression vectors, resulting in approximately 1×10^5 clones in *E. coli* BL21(DE3). The redundancy test by DNA nucleotide sequencing was performed for the randomly selected 111 clones and found 56 (50.5%) *B. anthracis* genes, 17 (15.3%) vector sequences, and 38 (34.2%) unknown genes with no sequence homology by BLAST. An inducible expression of the recombinant proteins was confirmed by Western blot. Interestingly, some clones could react with the antiserum against *B. anthracis*. These results imply that the whole genomic library constructed in this study can be applied for analyzing the immunomes of *B. anthracis*.

Keywords: *B. anthracis*, genomic expression library, immunome

탄저균(*Bacillus anthracis*)은 그람 양성균의 비운동·비용혈성을 특징으로 하는 아포 형성 간균이다. 탄저(Anthrax)의 원인균으로서, 특히 초식동물인 소, 양, 말 등에서 급성의 폐사성 질병을 일으키며, 감염동물로부터 배출된 아포를 통하여 사람에게 전파되는 것으로 알려져 있다(10, 16). 2001년 미국에서 탄저아포가 바이오테러에 이용되었으며, 5명의 사망자를 포함하여 22명의 사상자가 발생하였음이 보고된 바 있다(11). 탄저

균은 pXO1과 pXO2로 명명된 2종의 병원성 플라스미드를 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. pXO1은 칼슘-칼모듈린(calmodulin) 의존성 아데닐산 시클라아제(adenylate cyclase) 활성화에 의하여 피부부종을 유발하는 edema factor (EF, 89 kDa)와 Mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs)의 활성을 저해하여 치사를 유발하는 lethal factor (LF, 90 kDa), 그리고, 숙주 표적세포 표면에 존재하는 수용체(TEM8과 CMG2)에 결합하여 EF와 LF를 세포 내부로 이동시키는데 관여하는 protective antigen (PA, 83 kDa)을 암호화하고 있는 반면(4, 15, 17), pXO2는 백혈구 등의 탐식작용으로부터 탄저균을 보호하는 역

* For correspondence. (J.W. Yoon) E-mail: jwy706@gmail.com; Tel: +82-2-822-5685; Fax: +82-2-822-5685 (Y.G. Chai) E-mail: ygchai@hanyang.ac.kr; Tel: +82-31-400-5513; Fax: +82-31-406-6316

할 수 수행하는 헵막(poly-D-glutamic acid capsule) 생성에 관여하는 *capABC* 유전자를 암호화하고 있다(6, 8). 따라서, 병원성 탄저균으로부터 이들 2종의 플라스미드에 대한 실험적 결손유도는 현저한 병원성의 저하를 초래하게 된다(14).

현재 탄저치료는 ciprofloxacin, doxycycline, penicillin 등과 같은 항생제 사용을 기반으로 하고 있으나, 질병의 초기 진단이 필수적이며 해당 약제에 대한 내성 획득이 문제시 될 수 있다. 탄저 예방백신의 경우, 병원성 플라스미드를 제거한 약독화 생균 백신 혹은 PA를 토대로 한 cell-free subunit 백신이 현재 사용 혹은 개발 중에 있으나(7, 9, 13), 약독화 생균 백신에 존재하는 잔류 병원성, 수평 유전자 획득기전에 의한 백신주의 병원균으로의 복귀, 그리고 제한된 면역반응 유도 등이 사회적으로 문제시 되고 있다(2). 따라서, 인체에 적용 가능하며 보다 안전한 탄저백신을 개발하기 위한 노력이 지속되고 있으며, 최근 탄저균 아포 및 영양세포, 그리고 독소성분에 대한 동시 면역을 유도할 수 있는 다가 후보백신 혹은 직접적인 독소활성 억제제(inhibitors) 개발 등에 대한 연구가 진행되고 있다(1, 3, 20). 효율적인 탄저후보백신의 개발을 위하여, 새로운 면역원의 발굴은 필수적이며, 특히 *in vivo*-induced 탄저균 항원의 발굴은 매우 중요한 과정이다. 본 연구에서는, 면역체(immunome) 분석을 통하여(5, 12, 19) 탄저균에 존재하는 새로운 면역원성 항원의 발굴을 위한 첫 단계로서, 대장균 유래의 탄저균 전장유전자 발현 라이브러리(whole genomic expression library) 구축을 시도하였다. 구축된 유전자 발현 라이브러리에 대하여 무작위 DNA 염기서열분석을 통하여 클론 중복성을 조사하였고, 단백질 유도발현 여부를 확인하였음은 물론, 탄저균 항형질을 이용한 colony blot을 통하여 양성반응을 보이는 클론이 존재함을 확인하고자 하였다. 본 연구에서 제시된 결과는, 구축된 탄저균 유전자 발현 라이브러리가 향후 새로운 *in vivo*-induced 면역원을 탐색하기 위한 탄저 면역체(immunome) 분석에 적용될 수 있음을 암시한다.

재료 및 방법

사용된 균주, 플라스미드 및 배양조건

탄저균(ATCC 14578) 게놈 DNA를 이용한 전장유전자 발현 라이브러리 구축을 위한 플라스미드 및 숙주균주로서 pET30abc (Novagen, Germany)와 대장균 BL21(DE3) (Novagen) 혹은 DH5 α 를 사용하였다. 모든 대장균주는 Luria-Bertani (LB) 액체 배지(tryptone, 10 g; yeast extract, 5 g; NaCl, 5 g; DW, 1 L)에서 유지 및 배양하였고, 필요한 경우 항생제로서 ampicillin (100 μ g/ml)을 첨가하여, 37°C에서 250 rpm으로 진탕 배양하였다. 고형배지 제조를 위하여, 동일한 액체배지 성분에 1.5% (w/v) agar를 첨가하였으며, 단백질 유도발현을 위하여 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 사용하였다.

전장유전자 발현 라이브러리 벡터의 준비

플라스미드 pET123abc는 HiYield™ Plasmid Mini kit (Real Biotech Corporation, Taiwan)를 이용하여 분리·정제하였다.

총 5 μ g의 pET30abc를 *Bam*HI 제한효소(20 unit)로 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 다음, 자가 접합(self-ligation)을 방지하고자 10 unit의 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase; New England Biolaboratory, USA)로 37°C, 30분 동안 반응하였다. 1% 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동한 후, 벡터 플라스미드를 Gel Extraction kit (Real Biotech Corporation)를 사용하여 추출하였다. 이후 탈인산화(dephosphorylation)되지 않은 벡터 플라스미드를 제거하기 위하여 T4 ligase (New England Biolaboratory)로 4°C에서 16시간 동안 자가접합시킨 후, 1% 아가로스겔에 전기영동하여 자가 접합되지 않은 벡터만을 Gel Extraction kit (Real Biotech Corporation)를 이용하여 회수하였다.

탄저균 게놈 DNA의 전처리 및 준비

질병관리본부로부터 분양받은 탄저균(ATCC 14578) 게놈 DNA 1 μ g을 2⁰에서 2⁸ unit이 되도록 이진희석한 *Sau*3AI 제한효소를 가지고, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이후, 1% 아가로스겔 상에서 제한효소에 의해 최적의 부분절단(partial digestion) 양상을 보여준 농도를 결정하였다. 확립된 조건하에서 부분절단된 DNA 절편을 1% 아가로스겔 전기영동 후, 0.5-1.5 kb와 1.5-3.0 kb에 해당하는 2개의 부위를 Gel Extraction kit (Real Biotech Corporation)를 이용하여 회수 및 농축하여, 라이브러리 구축에 사용하였다.

유전자 발현 라이브러리 구축 및 평가

준비된 벡터와 삽입유전자 절편은 1:10 농도 비율(25 ng 벡터 : 250 ng 삽입유전자 절편)로 섞어 T4 ligase (10 units)를 사용하여 4°C에서 16시간 반응시켰고, 이후 대장균 DH5 α 에 25 μ FD, 200 W, 2.5 kV 그리고 200 ohm의 조건을 가지고 electroporation을 실시하여 접합된 플라스미드를 도입하였다. 도입 후, 균주들은 kanamycin (30 μ g/ml)이 첨가된 LB 고형배지에 도말하여 37°C에서 18-24시간 배양하였다. 배양된 클론들을 모두 회수한 후, 분획하여 -80°C에 보존하였다. 임의로 선발된 클론들에 대하여 T7 promoter/T7 terminator primers를 사용한 colony PCR을 실시하여 삽입절편의 존재를 확인하였다. PCR은 95°C에서 3분간 열처리한 후, 95°C에서 1분, 62°C에서 1분, 72°C에서 3분간 반응을 30회 반복하고, 최종적으로 72°C에서 10분간 수행하였다.

이후, -80°C에 보관된 분획으로부터 플라스미드를 추출한 후, 상기에 기술된 조건에 따라 electroporation을 실시하여 발현 대장균주인 BL21(DE3)에 도입하였다. 선택배지를 통해 선발된 유전자 발현 라이브러리 클론들을 회수하여 -80°C에 보관하였으며, 분획 중 무작위로 선발된 111개의 클론에 대하여 클론 중복성을 분리된 플라스미드에 존재하는 삽입절편의 염기서열 분석을 통하여 확인하였다. 염기서열분석은 마크로젠 (Macrogen, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 분석된 염기서열 정보는 BLAST 탐색을 통하여 동정하였다.

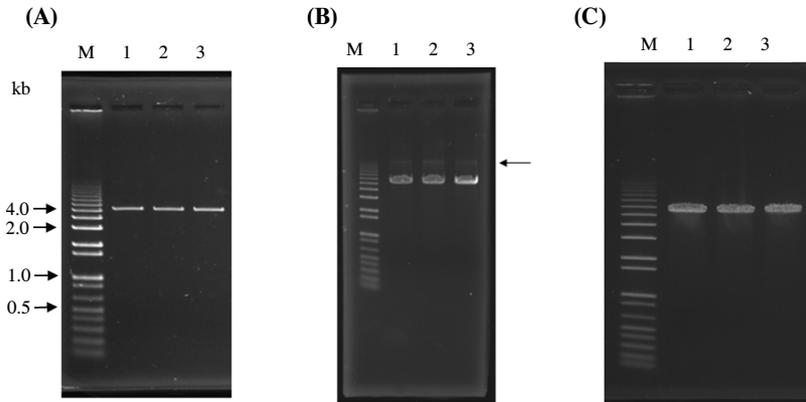


Fig. 1. Preparation of the *Bam*HI-digested and dephosphorylated pET30abc vectors. (A) The *Bam*HI-digested pET30abc vectors were dephosphorylated by calf intestinal alkaline phosphatase. (B) The *Bam*HI-digested and dephosphorylated pET30abc vectors were self-ligated by T4 ligase at 4°C for 16 h and analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. The arrow indicates the self-ligated plasmids. (C) The *Bam*HI-digested and dephosphorylated pET30abc vectors were purified and concentrated from the agarose gel using Gel Extraction kit. Lanes: M, 1-kb plus-DNA ladder (Invitrogen, USA); 1, pET30a; 2, pET30b; 3, pET30c.

라이브러리로부터 탄저균 유전자산물의 유도발현 및 면역원성 확인

구축된 전장유전자 발현 라이브러리로부터 탄저균 유전자산물의 발현 여부를 확인하고자, -80°C에 보관되어 있는 유전자 발현 라이브러리의 분획 일부를 ampicillin이 함유된 4 ml의 LB 배지에 접종한 후, 1 mM IPTG를 첨가하여 단백질의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가한 뒤 3시간 동안 추가 배양하였고, 배양액은 2× Laemmli sample buffer에 희석하여 95°C에서 10분 동안 단백질 변성시킨 후, 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다. 분리된 단백질은 0.45 μm PVDF membrane (Immobilon P; Millipore, USA)에 semi-dry transfer system (Bio-Rad, USA)을 사용하여 전이시켰고, 5% (w/v) bovine serum albumin을 이용하여 blocking을 수행하였다. 1차 및 2차 항체로서 anti-histidine 항체(IG THERAPY, Korea)와 Horse radish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG 항체(Pierce, USA)를 각각 1:5,000, 1:20,000으로 희석하여 사용하였고, ECL™ Plus Western blotting Detection kit (GE Healthcare Life Sciences, USA)를 사용하여 발현된 단백질을 검출하였다. Colony blot은 임의로 선발된 96개의 개별 clones에 대하여, 불활화된 비병원성 탄저 포자에 대한 기니픽 항혈청(질병관리본부)을 가지고 Bio-Dot® microfiltration system (Bio-Rad)을 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

전장유전자 발현 라이브러리 구축을 위한 pET30abc 벡터의 준비

pET30abc 발현벡터는 T7 promoter에 의해 전사 조절되며 3가지의 가능한 reading frame으로 삽입 유전자의 발현을 극대화 할 수 있다. 탄저균 게놈 DNA로부터 선발된 유전자의 효율적인 cloning을 위하여, pET30abc 발현벡터는 두 개의 연속적인 실험 과정을 거쳐 정제 농축하였다. 먼저 5 μg의 *Bam*HI-

digested pET30abc 벡터를 Calf intestinal alkaline phosphatase 로 dephosphorylation 시킨 후 1% 아가로즈 겔로부터 회수하였고(Fig. 1A), 회수된 벡터는 T4 ligase를 이용하여 자가 접합 처리하였다. Dephosphorylation 되지 않은 벡터는 자가접합하며, 이러한 결과산물을 1% 아가로즈 겔 전기영동에 의해 분리하였을 때, DNA 위상학적 차이에 의해 자가 접합된 벡터는 선형(linearized) 벡터보다 천천히 이동함을 확인하였고(Fig. 1B, arrow), 겔로부터 선형 벡터만을 회수하였다(Fig. 1C). 이렇게 준비된 벡터는 50 ng/μl로 정량화하였으며, 대장균에 도입하였을 때 10개 미만의 자가 접합 클론들을 생산하였다(자료 미제시).

탄저균 게놈 DNA에 대한 *Sau*3AI 제한효소 처리반응의 최적화

탄저균 게놈 DNA는 0.5-1.5 kb와 1.5-3.0 kb에 해당하는 유전자 절편을 최적으로 생산하는 제한효소의 농도 및 반응 조건을 알아내기 위하여, 1 μg의 게놈 DNA를 연속 2진 희석시킨 *Sau*3AI 제한효소로 반응시킨 후, 1% 아가로즈겔 전기영동을 통하여 절단양상(restriction profile)을 확인하였다(Fig. 2A). Figure 2A에서 보듯이, 각각 0.5-1.5 kb와 1.5-3.0 kb에 해당하는 유전자 절편산물들은 제한효소를 32(2⁵)배 희석하여 반응하였을 때 가장 최적의 유전자 절편을 산생하였다. 따라서 모든 게놈 DNA 삽입유전자 절편은 이러한 조건 하에서 제한효소 처리하였으며, Fig. 2B는 이렇게 회수된 유전자 절편을 아가로즈겔로부터 분리·회수되었음을 보여주고 있으며, 회수된 삽입유전자들은 100 ng/μl의 농도로 정량화하였다.

유전자 발현 라이브러리 구축 및 검증

구축된 전장유전자 발현 라이브러리의 일부 클론들에 대하여 colony PCR을 수행한 결과, 대부분의 클론들이 0.5-3.0 kb에 해당하는 삽입유전자를 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이들 클론을 포함하는 -80°C 분획으로부터 분리된 플

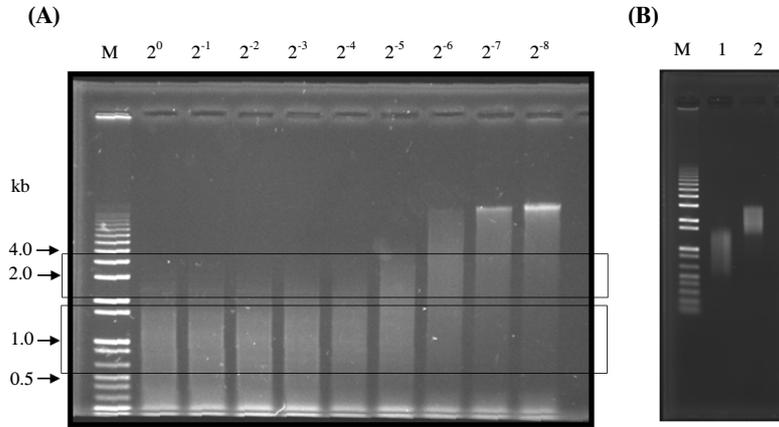


Fig. 2. Preparation of the *Sau3AI*-derived *B. anthracis* genomic DNA fragments. (A) Optimization of the partial digestion of the *B. anthracis* genomic DNAs with *Sau3AI* serially diluted by 2-folds. (B) Fractionation of the 0.5-1.5 kb fragments (lane 1) and the 1.5-3.0 kb fragments (lane 2). Lane M, 1-kb plus-DNA ladder (Invitrogen).

라즈미드는 IPTG 첨가에 의해 단백질 유도발현이 가능하며, 프로테아제(protease)가 결핍된 대장균 BL21(DE3)에 도입하였고, 그 결과물인 클론들을 유전자 발현 라이브러리로서 수집하였다. 본 연구에서 약 10^5 개의 유전자 발현 라이브러리를 구축할 수 있었고, 클론 중복성을 확인하기 위하여 이들 중 111개의 무작위 클론들로부터 분리된 플라스미드에 대한 삽입유전자의 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석결과, 111개 중 56개(50.5%)가 탄저균 유전자로 확인되었으며, 17개(15.3%)는 벡터 유전자였고, 38개(34.2%)는 BLAST 탐색에서 일치하는 서열을 찾지 못하였다(Table 1). 확인된 탄저균 유전자는 D-alanine carrier protein, oligopeptide ABC transporter protein, pXO1 유래 유전자, transcription terminator, transcription activator, Methenyl-tetrahydrofolate cyclohydrolase, sensor histidine kinase/permease, pyruvate kinase, ComG

operon protein, 그리고 neutral protease 등 이었다(Table 2).

전장유전자 발현 라이브러리에서 유도 발현된 단백질의 존재 확인

구축된 전장유전자 발현 라이브러리는 histidine 에피토프이 아미노 말단(N terminus)에 부착된 탄저균 재조합단백질을 발현하므로, IPTG를 첨가하여 단백질을 유도 발현시킨 후 anti-histidine에 대한 항체를 사용하여 검출할 수 있었고(Fig. 4A), 이는 탄저균 재조합 단백질이 발현됨을 암시한다. 따라서, 본 연구에서는 탄저균 항혈청을 이용하여 무작위 96개의 개별 클론들에 대한 colony blot을 수행하여, 탄저균 감염숙주에서 면역반응을 유도할 수 있는 면역원을 검출을 시도하였던 바, 2개의 클론에서 양성반응을 확인 할 수 있었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 구축된 전장유전자 발현 라이브러리를 이용하여, 탄저균 항혈청에 반응하는 새로운 면역원을 탐색할 수 있음을 암시한다.

결론적으로, 본 연구에서는 약 5.23 Mb로 알려진 탄저균 게놈 DNA (18)로부터 *Sau3AI* 제한효소의 부분절단에 의해 생산된 0.5-1.5 kb와 1.5-3.0 kb DNA 절편들을 회수하여 pET30abc에 접합시킴으로써 총 1×10^5 개의 BL21(DE3) 유래 탄저균 전장유전자 발현 라이브러리를 구축하였고, 구축된 라이브러리로부터 탄저균 단백질의 유도발현을 확인하였다. 이러한 구축된 유전자 발현 라이브러리를 기반으로 탄저균 면역체 분석을 실시 혹은 적용함으로써 기존에 알려지지 않았던 새로운 면역원 혹은 *in vivo* induced antigens의 탐색에 기여 할 수 있을 것으로 사료된다.

적요

탄저균(*Bacillus anthracis*)은 탄저(Anthrax)의 원인균으로 사람은 물론, 초식동물인 소, 양, 말 등에서 급성의 폐사성 전염병을 일으킨다. 현재 사용되고 있는 탄저 치료 및 예방법은 항

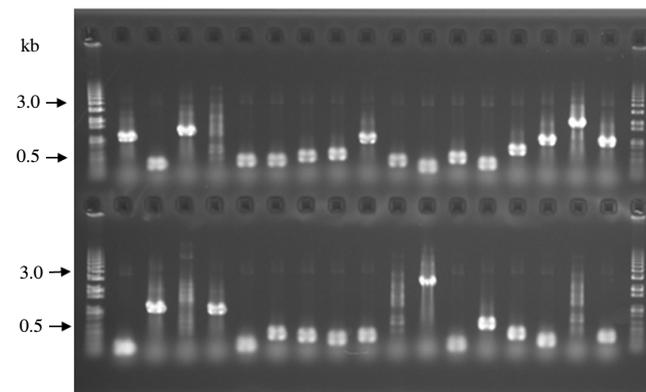


Fig. 3. PCR confirmation of the clones carrying the insert DNAs from the constructed genomic expression library. The colony PCRs using the universal T7 promoter and terminator primers were performed for all the randomly selected clones. The PCR was carried out with an initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 30 cycles of 95°C, 1 min, 62°C, 1 min, and 72°C, 3 min and a final extension at 72°C for 10 min. All the PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis after EtBr staining.

Table 1. DNA sequencing of the inserts in the pET30 vectors from the 111 BL21 (DE3)-based clones

No. of clones (%)	<i>B. anthracis</i> genes (%)	Not matched/not sequenced (%)	Vector sequence (%)
111 (100)	56 (50.5)	17 (15.3)	38 (34.2)

생체 치료와 약독화 백신주를 토대로 하고 있으나, 항생제 내성주의 출현 및 잔류 병원성이 문제시 되고 있는 실정이다. 따라서, 인체에 적용 가능하며 보다 안전한 탄저 치료제 및 백신 개발이 요구되고 있으며, 최근 탄저균 아포 및 영양세포, 그리고 탄저독소(Anthrax toxins)에 대한 동시 면역을 유도하는 다가백신 개발이 보고된 바 있다. 본 연구에서는, 향후 탄저균에 대한 새로운 다가백신 후보물질 발굴을 위하여, 탄저균에 대한 전장 유전자 발현 라이브러리(whole genomic expression library)를 구축하였다. 라이브러리 구축을 위하여, 탄저균(ATCC

14578) 게놈 DNA를 *Sau3AI*으로 부분 제한효소 처리였고, 유도 발현이 가능한 pET30abc 벡터에 접합시킴으로써, 총 1×10^5 개에 해당하는 대장균 BL21(DE3) 유래의 전장 유전자 발현 라이브러리를 구축하였다. 염기서열분석을 통한 중복성(redundancy) 확인 결과, 111개의 무작위 클론 중 56개(50.5%)가 탄저균 유전자로 확인되었으며, 17개(15.3%)는 벡터 유전자였고, 38개(34.2%)는 BLAST 탐색에서 일치하는 유전자를 찾지 못하였다. 또한 웨스턴 분석을 통하여 단백질 유도발현을 확인하였으며, 탄저균 항혈청에 대한 colony blot으로부터 양성반응

Table 2. The BLAST analysis of the 56 selected GEL clones after DNA nucleotide sequencing

Clone ID	BLAST results (Number of the redundant clones identified)	Reference ID
1	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family protein	>gb AE017334.2
2	acetyltransferase, GNAT family conserved domain protein	>gb AE017334.2
3	acyl-CoA dehydrogenase (2)	>gb AE017334.2
4	addB gene, complete sequence	>gb EF410334.1
5	arsenical pump family protein	>gb AE017334.2
6	ATP synthase F1 alpha subunit	>gb AE017334.2
7	BA3927 gene, complete sequence (3)	>gb EF040399.1
8	Brevibacillus laterosporus azorectase gene	>gb EF626662.1
9	conserved hypothetical protein / conserved domain protein	>gb AE017334.2
10	conserved hypothetical protein signal peptidase I	>gb AE017334.2
11	DNA-binding response regulator sensor histidine kinase	>gb AE017334.2
12	ferrochelataase, protoporphyrinogen oxidase (2)	>gb AE017334.2
13	fructose-1,6-bisphosphatase, class II	>gb AE017334.2
14	glycerol kinase / glycerol-3-phosphate dehydrogenase (2)	>gb AE017334.2
15	GTP-binding protein YchF	>gb AE017334.2
16	hypothetical protein / DNA-binding response regulator	>gb AE017334.2
17	iron compound ABC transporter, permease protein	>gb AE017334.2
18	L-lactate dehydrogenase	>gb AE016879.1
19	macrolide 2-phosphotransferase, putative	>gb AE017334.2
20	membrane protein, putative (3)	>gb AE017334.2
21	penicillin-binding protein	>gb AE017334.2
22	plasmid pXO2, complete sequence (3)	>gb AE017335.3
23	polysaccharide biosynthesis family protein (2)	>gb AE017334.2
24	putative tellurium resistance protein	>gb AE017334.2
25	replicative DNA helicase	>gb AE017334.2
26	ribonuclease HII	>gb AE017334.2
27	serine/threonine transporter family protein	>gb AE017334.2
28	sodium/alanine symporter family protein / general stress protein 20U	>gb AE017334.2
29	superoxide dismutase / D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family (3)	>gb AE017334.2
30	transcriptional regulator, LysR family	>gb AE017334.2
31	uvrD/Rep helicase family protein	>gb AE017334.2
32	plasmid pXO1, complete sequence (4)	>gb AE017336.2
33	hypothetical protein	>gb AE017334.2
34	hypothetical protein	>gb AE017334.2
35	hypothetical protein (3)	>gb AE017334.2
36	hypothetical protein	>gb AE017334.2
37	hypothetical protein	>gb AE017334.2
38	hypothetical protein	>gb AE017334.2
39	hypothetical protein	>gb AE017334.2

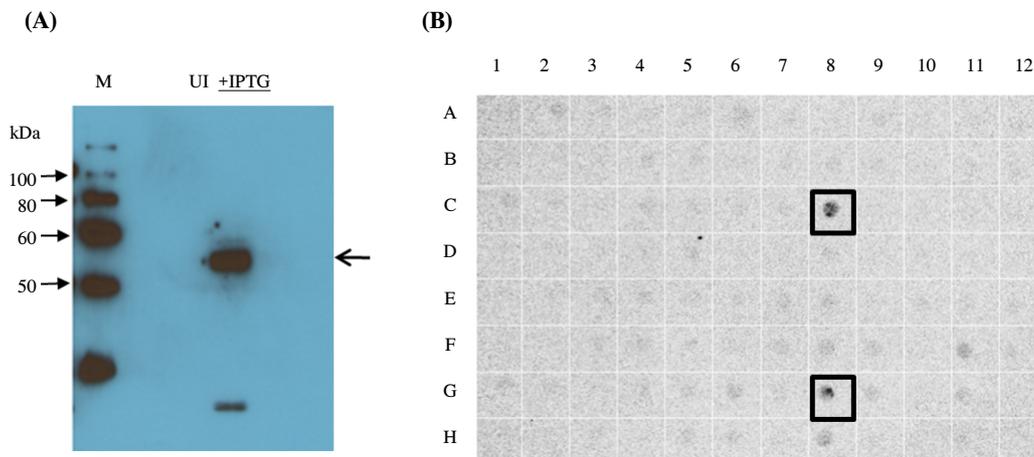


Fig. 4. Evaluation of the genomic expression library clone for identifying *B. anthracis* immunogens. (A) Western blot analysis using anti-His antibody. The arrow indicates the recombinant protein from the genomic expression library clones that were induced by 1 mM IPTG. Lanes: M, Western XP marker (Invitrogen); UI, un-induced sample; +IPTG, IPTG-induced samples. (B) Colony blot analysis of the 96 randomly selected clones from the genomic expression library using the antiserum against *B. anthracis*. C8 (No. 32) and G8 (No.80) were strongly positive.

을 보이는 일부 클론들을 확인할 수 있었다. 이러한 결과물들은, 구축된 전장 유전자 발현 라이브러리가 향후 탄저균에 대한 면역체(immunome) 분석을 위해 적용 가능성을 암시한다.

감사의 말

이 과정은 질병관리본부 학술연구용역사업으로 수행한 결과입니다(2007-E00121-00).

참고문헌

- Akoachere, M., R. Squires, A. Nour, L. Angelov, J. Brojatsch, and E. Abel-Santos. 2007. Identification of an *in vivo* inhibitor of *Bacillus anthracis* spore germination. *J. Biol. Chem.* 282, 12112-12118.
- Aulinger, B., M. Roehrl, J. Mekalanos, R. Collier, and J. Wang. 2005. Combining anthrax vaccine and therapy: a dominant-negative inhibitor of anthrax toxin is also a potent and safe immunogen for vaccines. *Infect. Immun.* 73, 3408-3414.
- Basha, S., P. Rai, V. Poon, A. Saraph, K. Gujraty, M. Go, S. Sadacharan, M. Frost, J. Mogridge, and R. Kane. 2006. Polyvalent inhibitors of anthrax toxin that target host receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 13509-13513.
- Collier, R.J. and J.A. Young. 2003. Anthrax toxin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19, 45-70.
- De Groot, A.S. and J.A. Berzofsky. 2004. From genome to vaccine—new immunoinformatics tools for vaccine design. *Methods* 34, 425-428.
- Drysdale, M., S. Heninger, J. Hutt, Y. Chen, C. Lyons, and T. Koehler. 2005. Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. *EMBO J.* 24, 221-227.
- Friedlander, A. and S. Little. 2009. Advances in the development of next-generation anthrax vaccines. *Vaccine* 27, 28-32.
- Green, B., L. Battisti, T. Koehler, C. Thorne, and B. Ivins. 1985. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 49, 291-297.
- Hicks, R., A. Bhattacharjee, B. Koser, and D. Traficantes. 2004. The anthrax protective antigen (PA63) bound conformation of a peptide inhibitor of the binding of lethal factor to PA63: As determined by trNOESY NMR and molecular modeling. *J. Med. Chem.* 47, 5347-5355.
- Inglesby, T., D. Henderson, J. Bartlett, M. Ascher, E. Eitzen, A. Friedlander, J. Hauer, J. McDade, M. Osterholm, and T. O'Toole. 1999. Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 281, 1735-1745.
- Jernigan, D., P. Raghunathan, B. Bell, R. Brechner, E. Bresnitz, J. Butler, M. Cetron, M. Cohen, T. Doyle, and M. Fischer. 2002. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1019-1028.
- Kudva, I.T., R.W. Griffin, J.M. Garren, S.B. Calderwood, and M. John. 2005. Identification of a protein subset of the anthrax spore immunome in humans immunized with the anthrax vaccine adsorbed preparation. *Infect. Immun.* 73, 5685-5696.
- Little, S. and G. Knudson. 1986. Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. *Infect. Immun.* 52, 509-512.
- Mikesell, P., B. Ivins, J. Ristoph, and T. Dreier. 1983. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 39, 371-376.
- Moayeri, M. and S.H. Leppla. 2004. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 19-24.
- Mock, M. and A. Fouet. 2001. Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 647-671.
- Mourez, M. 2004. Anthrax toxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152, 135-164.
- Rasko, D., M. Altherr, C. Han, and J. Ravel. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 303-329.
- Rollins, S., A. Peppercorn, J. Young, M. Drysdale, A. Baresch, M. Bikowski, D. Ashford, C. Quinn, M. Handfield, and J. Hillman. 2008. Application of *in vivo* induced antigen technology (IVIAT) to *Bacillus anthracis*. *PLoS one* 3, 1824.
- Stepanov, A.V., L.I. Marinin, A.P. Pomerantsev, and N.A. Staritsin. 1996. Development of novel vaccines against anthrax in man. *J. Biotechnol.* 44, 155-160.