

결핵균 배양여과액으로부터 Ag85 Complex, 38-kDa 및 MTB12 항원의 분리정제

건양대학교 의과대학 미생물학교실¹, 충남대학교 의과대학 미생물학교실²

이지숙¹ · 백태현¹ · 유영춘¹ · 이정림¹ · 신아름² · 송창화² · 조은경² · 김화중² · 박정규²

Purification of Native Ag85 Complex, 38-kDa and MTB12 Protein Antigens from the Culture Filtrate of *Mycobacterium tuberculosis*

Ji-Sook Lee¹, Tae-Hyun Paik¹, Yung-Choon Yoo¹, Junglim Lee¹, Arum Shin², Chang-Hwa Song², Eun-Kyung Jo², Hwa-Jung Kim² and Jung-Kyu Park²

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 302-718, Korea

²Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 301-747, Korea

Received : September 1, 2006

Accepted : October 17, 2006

The purification of immunodominant native protein antigens from the culture filtrates of *Mycobacterium tuberculosis* is needed for the development of new vaccines and immunodiagnostic reagents against tuberculosis. In the present study, we conducted large scale purification of well-known secreted antigens, Ag85 complex, 38-kDa, and MTB12, from the culture filtrate proteins (CFPs) prepared from *M. tuberculosis* H37Rv grown as a surface pellicle on synthetic Sauton medium. The protein and antigen concentrations of culture filtrates were sufficiently increased after 6 week of culture. The MTB12 antigen was detected as early as 1 week of culture, and Ag85 complex and 38-kDa antigen were detected after 2 and 3 week of culture, respectively, by immunodiffusion with specific antiserum against 100-fold concentrated culture filtrates. For large-scale purification, the six-week-culture filtrates of *M. tuberculosis* H37Rv diluted 2.5-fold with 20 mM Tris-HCl, pH 8.3 were subjected to anion-exchange chromatography. The CFPs were eluted with 100 mM NaCl-20 mM Tris-HCl, pH 8.3 and concentrated by ultrafiltration. The concentrated CFPs were fractionated with ammonium sulfate, and followed by hydrophobic interaction chromatography and anion-exchange chromatography (FPLC). Eventually, 10 mg of Ag85 complex, 0.56 mg of 38-kDa, and 1.81 mg of MTB12 antigens were purified from 1 liter of the six-week-culture filtrates of *M. tuberculosis* H37Rv which contained 307.81 mg of protein of culture filtrate.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Protein antigen, Purification, Ag85 complex

서 론

결핵균은 절대산소성 항산균으로 주로 호흡기로 전파되

어 만성 감염병인 결핵을 일으킨다. 결핵은 isoniazid (INH), rifampin, ethambutol, pyrazinamide 등의 우수한 항결핵제가 개발되어 성공적인 치료가 가능함에도 불구하고 아직도 전 세계적으로 약 20억 명이 감염되어 있으며 매년 900여만 명의 신환자와 300여만 명의 사망자를 발생하는 매우 심각한 보건문제로 남아있다 (12). 더욱이 최근에는 HIV 감염자의 증가와 다제내성균의 출현과 확산으로 결핵문제가 더욱 복잡해지고 있다 (13,21). 이와 같이 결핵이 만연하는 가장 중요한 이유는 아직까지 특이도와 민감도가 높은 진단법과 효

*교신저자: 백태현, 302-801, 대전광역시 서구 가수원동 681번지, 건양대학교 의학과 미생물학교실
Phone: 042-600-6494, Fax: 042-600-6314,
e-mail: thpaik@konyang.ac.kr

**본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (01-PJ10-PG6-01GM03-002).

과적인 예방백신이 개발되지 못하고 있기 때문이다

결핵의 방어면역은 주로 $CD4^+$ T 세포와 이들 세포가 분비하는 감마인터페론 ($IFN-\gamma$)이 큰포식세포를 활성화하여 나타내는 세포매개면역 (cell-mediated immunity)에 의한다 (4,14,15,30,33). 우형결핵균 (*M. bovis*)을 약독화시킨 BCG가 방어면역을 증강시키는 결핵백신으로 1928년부터 보급되기 시작하여 전 세계적으로 널리 사용되고 있지만 그 예방효과에 대해서는 아직도 논란이 많다 (9). 또한 도말검사나 배양검사에 의한 결핵균 검출이 결핵의 확진법이나 민감도가 낮아서 주로 임상증상, X-ray, CT 등의 비특이적 진단법에 의존하는 경우가 많다. 따라서 감염원의 조기발견 및 관리가 어렵고 오진으로 인한 불필요한 치료를 시행하는 경우도 많다.

결핵균 단백질의 분석과 분리정제는 새로운 백신 및 진단항원의 개발에 있어서 필수적이다. 최근 유전체학과 단백질체학의 발전으로 다양하고 복잡한 결핵균 단백질의 탐색과 분석이 가능하게 되었으며 다수의 단백질이 재조합항원으로 생산되고 있다. 이들 단백질 중에서 살아있는 결핵균이 분비하는 분비형 단백질 (이하 분비항원이라고 함)이 감염 초기에 숙주 면역계에 의해 인식되는 주요 표적항원으로 생각되어 그동안 주로 분비항원에 대한 연구가 집중되어 왔다. 그러나 결핵균의 복잡한 항원성분과 숙주반응의 다양성으로 인하여 새로운 진단 및 백신항원을 개발하지 못하고 있다 (1,6,27,31).

결핵균의 대표적인 분비항원으로는 Ag85 complex 항원을 비롯하여 38-kDa glycolipoprotein, ESAT-6 (early secreted antigenic target-6) 등이 잘 알려져 있으며 이들 항원은 숙주에 의해 인식되어 효과적으로 세포매개면역을 유도할 수 있는 T 세포항원이다 (7,22,32). 특히, Ag85 complex 항원은 Ag85A (32-kDa Ag), Ag85B (30-kDa 또는 α -Ag), 및 Ag85C (32.5-kDa Ag)로 구성된 복합단백항원으로 배양 초기에 비교적 다량 분비되는 주요 분비항원으로 알려져 있다 (24). 또한 Ag85 complex 항원은 기니픽에서 강력한 세포매개면역반응을 유도하고 (20), 투베르쿨린 양성자의 말초혈액 단핵구에서 강력한 T 세포증식능력과 $IFN-\gamma$ 생성능을 나타내어 강력한 세포매개 방어면역을 유도하였다고 보고된 바 있다 (24). Ag85 complex 항원은 ESAT-6 항원을 비롯한 다른 단백질과 fusion protein 형태로 생산할 수 있어서 결핵백신후보항원으로 연구되고 있다 (26,36). 38-kDa 항원은 phosphate transport protein (PstS-1)으로 사람과 실험동물에서 강력한 방어면역을 유도하고 (3,16), 활동성 결핵 시에 특이항체가 증가되어 특이도가 높은 진단항원으로 주목받고 있다 (11). MTB-12는 Ag85 complex 항원과 같이 결핵균 배양액 내에 매우 풍부하게 분비되며 결핵환자와 건강인의 말초혈액 단핵구의 증가된 세포증식능력을 나타내는 항원이다 (35).

결핵균의 단백질은 생산방법에 따라 천연단백항원 (native protein antigen)과 재조합 단백질항원 (recombinant protein antigen)로 나눌 수 있다. 일반적으로 재조합 단백질항원은 재조합 대장균이 생산한 단백질을 일단계 affinity chromatography로 분리할 수 있으나 천연단백항원은 배양액을 여과멸균 후에 초미세여과법 (ultrafiltration), 황산암모늄침전 (ammonium sulfate precipitation), 이온교환크로마토그래피 (ionic-exchange chromatography) 및 소수성크로마토그래피 (hydrophobic interaction chromatography) 등의 다양한 분리정제법을 사용하는 비교적 복잡한 과정을 거쳐야 한다. 그러나 재조합항원의 면역학적 활성능이 천연항원과 비교하여 유사한 경우도 있지만 (18,34) 차이가 큰 경우도 보고되고 있다 (28,29). 특히 Rosenkrands 등 (28)은 GroES 천연항원이 재조합항원보다도 강력한 세포증식능과 $IFN-\gamma$ 생성능을 나타내었다고 보고한 바 있어서 결핵항원의 면역학적 연구에 있어서 천연항원이 기준항원으로 사용되어야 할 것으로 생각한다.

이에 본 연구는 결핵균 배양액으로부터 Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 항원 등 주요 천연항원의 대량정제를 시도했던 바, 그 결과를 보고하는 바이다. 특히 이들 천연항원은 앞으로 결핵의 진단 및 백신후보항원 개발연구에 있어서 기준항원으로 널리 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

재료 및 방법

1. 결핵균 배양

M. tuberculosis H37Rv (ATCC 27294)를 멸균 Sauton 합성 배지에 각각 접종하여 6주간 표면 배양한 후에 배양액을 $15,000 \times g$, 1시간 원심 분리하여 균체를 제거하고 상청액을 모아서 0.22- μ m-pore-size filter를 사용하여 여과멸균한 배양 여과액 (culture filtrate)을 Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 항원의 분리정제에 사용하였다.

또한 배양시간 별로 Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 항원의 발현양상을 조사하기 위해서 결핵균 부유액을 8군의 Sauton 배지에 동일한 조건으로 접종한 후 주 간격으로 8주까지 표면 배양하였다. 주 간격으로 배양한 8군의 결핵균 배양액은 $15,000 \times g$, 1시간 원심 분리 및 여과멸균을 실시한 후, 배양여과액을 Amicon Ultra-15 centrifugal filter [molecular weight cutoff (MWCO) 5,000; Millipore, Bedford, MA, USA]로 초미세여과를 실시하여 100배로 농축하였다. 농축배양여과액은 단백질 농도를 측정하고 SDS-PAGE에 의한 항원분석과 면역확산법에 의한 특이항원의 농도를 측정하였다.

모든 결핵균 배양은 500 ml 삼각플라스크에 200 ml의 Sauton 합성배지가 들어있는 멸균액체배지에 접종하여 37°C

에서 표면 배양하였다.

2. Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 항원에 특이항체 제조와 면역확산법

정제된 Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 항원을 동량의 complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)와 혼합하고 emulsifying needle (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA)로 충분히 부유시킨 후에 수컷의 New Zealand White 토끼 (몸무게 약 3 kg)에 항원부유액 (500 µg/ml) 1 ml를 6 부위로 나누어 피하접종하였다. 추가접종은 동량의 단백항원을 incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich)와 전기의 동일한 방법으로 혼합하여 4주 간격으로 2회의 추가접종을 시행하였다. 마지막 접종 2주 후에 부분채혈을 실시하여 충분한 항체생성을 확인한 다음에 전혈을 실시하여 혈청을 취하였다. 면역확산법은 Ouchterlony immunodiffusion으로 실시하였다. 간단히 기술하면 1% agarose 겔을 슬라이드 글라스 상에 굳힌 후 직경 2 mm의 구멍 (well)을 중앙에 1개, 주변에 5 mm 간격으로 4개의 구멍을 십자형으로 만들었다. 항체를 측정하기 위해서 중앙 구멍에 항원을 넣고 주변 구멍에는 2배 계단 희석한 항체를 넣어 37℃에서 2시간 반응시킨 후에 4℃ 냉장실에서 하룻밤 반응시킨 후에 침강대를 관찰하여 항체가를 정량적으로 측정하였다. 항원가를 측정하기 위해서는 반대로 중앙 구멍에 항체를 넣고 주변 구멍에 2배 계단 희석한 항체를 넣어 동일한 방법으로 반응시킨 후에 항원농도를 정량적으로 측정하였다.

3. Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 항원의 대량 분리정제

항원의 분리정제는 1차 anion-exchange chromatography, ammonium sulfate fractionation, hydrophobic interaction chromatography (HIC) 및 2차 anion-exchange chromatography를 순차적으로 실시하여 분리하였으며 분리정제 과정 중에서 각 항원의 확인은 SDS-PAGE와 특이항체 (rabbit anti-Ag85 complex antiserum, anti-38-kDa antiserum 및 anti-MTB12 antiserum)를 사용한 면역확산법을 병용하여 실시하였다. 1차 anion-exchange chromatography와 HIC는 UV monitor와 conductivity monitor가 장착된 low pressure chromatography 시스템 (Bio-Rad, CA, USA)을 사용하였으며 2차 anion-exchange chromatography는 UNO-Q6 column을 장착한 fast protein liquid chromatography (HPLC) 시스템 (Bio-Rad)을 사용하였다.

1) 1차 anion-exchange chromatography에 의한 배양 여과단백질 (culture filtrate proteins; CFPs)의 준비

20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3로 2.5배 희석한 2 l의 배양여과액을 Macro-prep high Q support (Bio-Rad)가 충전된

anion-exchange chromatography 컬럼 (2.5×20 cm)에 2 ml/min 유속으로 가하여 단백질을 흡착시켰다. 흡착된 단백질은 100 mM NaCl-20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3를 사용하여 5 ml/min 유속으로 용출하였으며 용출된 단백질은 모두 Amicon ultra 15 centrifugal filter (MWCO 5,000)를 사용한 초미세여과법으로 농축하여 CFPs을 준비하였다. 컬럼에 흡착되지 않고 통과된 단백질을 회수하기 위하여 컬럼통과 배양여과액을 동일한 방법으로 3회까지 반복하여 anion-exchange chromatography를 실시한 후에 다음 단계의 정제를 위한 CFPs로 사용하였다.

2) Ammonium sulfate fractionation

1차 anion-exchange chromatography에 의하여 분리 농축된 CFPs 용액에 100% ammonium sulfate-100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8를 서서히 가하여 혼합시킨 후 4℃에서 하룻밤 반응시킨 후에 원심 분리하여 각각 0~40% 염석분획과 40~80% 염석분획을 취하였다. Ag85 complex 항원의 분리정제 시에는 0~40% 황산암모늄 염석분획을 사용하였으며, 38-kDa 항원과 MTB12 항원의 분리정제 시에는 40~80% 황산암모늄 염석분획을 사용하였다.

3) Hydrophobic interaction chromatography (HIC)

0~40% 황산암모늄 염석분획과 40~80% 황산암모늄 염석분획은 별도의 투석과정 없이 1.8 M ammonium sulfate-100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8~0.02% Na₃-1 mM EDTA에 용해시킨 후 Macro-prep methyl HIC support (Bio-Rad)가 충전된 컬럼 (1.5×10 cm)에 3 ml/min 속도로 가하여 단백질을 흡착시켰다. 흡착된 단백질은 1.8 M으로부터 0 M까지의 낮아지는 농도 경사로 단백질을 용출시킨 후에 각각의 항원분획을 SDS-PAGE와 면역확산법으로 확인한 후에 모아서 초미세여과법으로 농축하였다. 특히 Ag85 complex 항원과 38-kDa 항원이 포함된 분획은 Amicon Ultra-15 centrifugal filter (MWCO 10,000)으로, MTB12는 Amicon Ultra-15 centrifugal filter (MWCO 5,000)로 초미세여과를 실시하여 각각 농축하였다. 각각의 농축항원액은 다음 단계의 정제를 위하여 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3으로 투석하였다.

4) 2차 anion-exchange chromatography (FPLC)

20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3로 투석된 각각의 농축항원액은 FPLC 시스템에 장착된 UNO-Q6 컬럼 (Bio-Rad)에 가하여 단백질을 흡착시키고, 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3로 2 ml/min 유속에서 10분 세척한 후에 Ag85 complex와 38-kDa 항원은 20 mM NaCl, MTB12 항원은 10 mM NaCl 농도에서 각각 단백질을 용출하여 최종 정제를 실시하였다. 용출된 항원은 초미세여과법으로 농축하고 immobilized polymyxin B column (Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel; Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., USA)을 통과하여 endotoxin을 제

Table 1. The protein and antigen concentration of culture filtrates during the different culture period of *M. tuberculosis* H37Rv

Duration of culture (weeks)	1	2	3	4	5	6	7	8
Protein concentration of culture filtrates ($\mu\text{g/ml}$)	2.6	5.4	25.5	74.5	264.0	331.0	479.0	549.0
Titer of specific antigen ^a	Ag85 complex	0	8	16	64	128	128	256
	38-kDa	0	0	1	2	8	16	64
	MTB12	2	4	32	128	256	512	512

^a: Titer of specific antigen concentrated 100-fold by ultrafiltration was expressed as the reciprocal of the maximum antigen dilution that showed positive precipitin reaction with specific anti-serum by Ouchterlony immunodiffusion

거한 후에 0.22- μm -pore-size filter를 사용하여 여과멸균한 후 단백질 농도를 측정하여 -20°C에서 보관하였다.

4. SDS-PAGE

각 항원은 X Cell SureLock Mini-Cell system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 precast gradient Bis-Tris gel (Novex 4~12%, Invitrogen)에서 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 후 Coomassie blue 염색을 실시하여 각 항원을 분석하였다.

5. 단백질 농도 측정

단백질의 농도 측정은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Rockford, Ill., USA)로 측정하였다.

6. 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE)와 단백질 동정

최종 정제된 항원 38-kDa, MTB12 항원 150 μg 을 pH 4.0~7.0, pH 4.7~5.9 IPG strip (7 cm) (Bio-Rad)을 사용하여 isoelectric focusing (IEF)을 실시하였다. 12~16시간의 rehydration 과정 후, 250 V (30분), 250 V~>4,000 V (2시간), 4,000 V (20,000 Vhr)의 단계로 focusing하였다. Focusing한 strip은 equilibration 과정 후, 12% 또는 15%의 gel에 전기영동하였고, 각각의 gel은 Coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad)로 염색하였다. 2-DE로 분리된 단백항원의 spot은 LC-ESI-MS 분석을 Yonsei Proteome Research Center (서울)에 의뢰하여 단백질을 동정하였다.

결 과

1. 배양시간에 따른 단백질항원의 분비양상

결핵균이 배양액에 분비하는 분비항원의 발현양상을 배양 시간 별로 조사했던 바, Table 1에서와 같이 1주 배양액의 단백질 농도는 2.6 $\mu\text{g/ml}$, 2주 배양액은 5.4 $\mu\text{g/ml}$, 3주 배양

액은 25.5 $\mu\text{g/ml}$, 4주간 배양액은 74.5 $\mu\text{g/ml}$, 5주 배양액은 264.0 $\mu\text{g/ml}$, 6주 배양액은 331.0 $\mu\text{g/ml}$, 7주 배양액은 479.0 $\mu\text{g/ml}$, 8주 배양액은 549.0 $\mu\text{g/ml}$ 으로 배양시간이 길수록 총 단백질 농도가 증가했으나 2주에서 3주 사이에 4.72배, 3주에서 4주 사이에 2.92배, 4주에서 5주 사이에 3.54배로 급격한 단백질 농도의 상승률을 나타내었고, 5주에서 6주 사이에 1.25배, 6주에서 7주 사이는 1.25배, 7주에서 8주 사이는 1.44배로 비교적 완만한 상승률을 나타내었다 (Fig. 1-A). 또한 8주까지 주별 배양액을 초미세여과법으로 100배로 농축한 후 SDS-PAGE으로 항원의 발현양상을 분석하였던 바, Fig. 1-B에서와 같이 1주 배양액에서는 31~36 kDa 사이에서만 약한 밴드를 나타내었으나 2주 후에는 6~10 kDa, 55 kDa 및 80 kDa에서도 약하지만 다수의 단백질 밴드를 나타내었다. 또한 3주 배양액부터는 무수한 밴드를 나타내었으며 6~14 kDa, 21~36 kDa, 66~80 kDa 사이에서 매우 강한 단백질 밴드가 다수 나타내었다. 또한 면역확산법으로 각 항원농도를 정량적으로 측정하였던 바, Table 1에서와 같이 MTB12 항원은 1주 배양액부터에서 가장 일찍 검출되기 시작했으며 Ag85 complex 항원은 2주 배양액부터, 38-kDa는 3주 배양액부터 검출되었다. 100배로 농축한 배양액에서 특이항원의 농도 (면역확산법에서 양성반응을 나타내는 항원 희석배수의 역수로 표시함)를 면역확산법으로 조사했던 바, MTB12 항원은 1주 배양액에서 2배, 2주에서 4배, 3주에서 32배, 4주에서 128배, 5주에서 256배, 6주에서 8주까지는 동일한 512배의 항원농도를 나타내어 6주에서 최고의 항원농도를 나타내어 2주에서 3주 사이에 가장 높은 8배의 상승률을 나타내었으며 그 다음으로는 3주에서 4주 사이에서 4배의 상승률을 나타내었다. Ag85 complex 항원은 2주 배양액에서부터 나타나기 시작하여 2주에서 8배, 3주에서 16배, 4주에서 64배, 5주에서 7주까지 128배, 8주차에서 256배의 항원농도를 나타내어 1주에서 2주 사이에 8배 이상, 3주에서 4주 사이에 4배의 상승률을 나타내어 초기 발현률이 높았다. 반면에 38-kDa 항원은 CFP-2와 Ag85 complex 항원보다 다소 늦은 3주 배양액에서부터 검출되기 시작하여 4주에서 2배, 5주에서 8배, 6

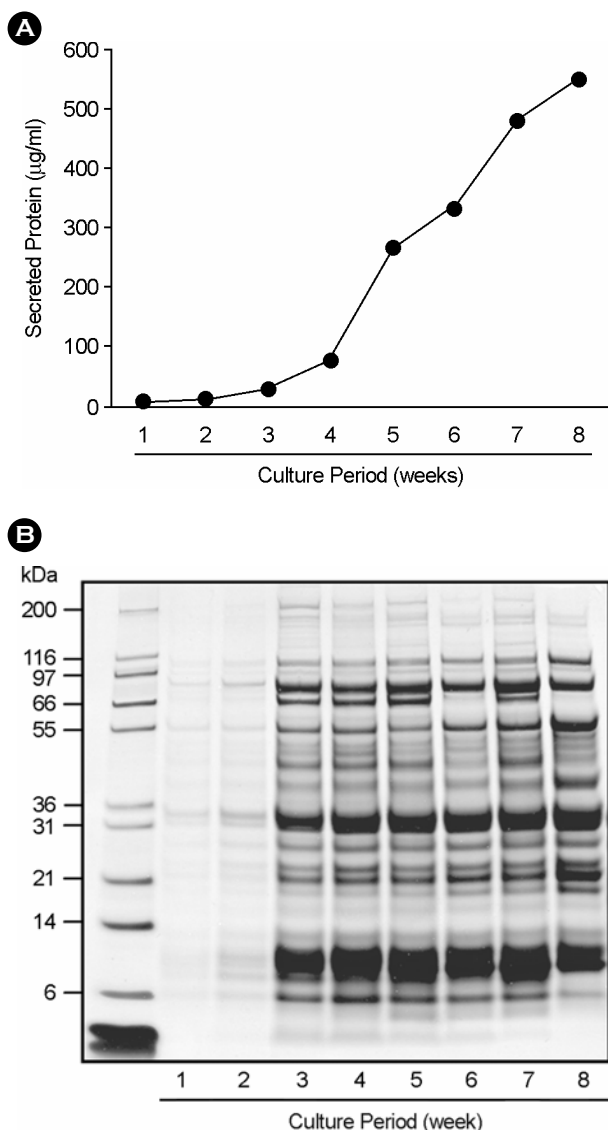


Figure 1. Protein concentration and SDS-PAGE analysis of culture filtrates from *M. tuberculosis* H37Rv. **(A)** The protein concentration of culture filtrates during different culture period (1~8 week). The culture filtrates of *M. tuberculosis* H37Rv were isolated from growing tubercle bacilli in Sauton's synthetic medium. And the protein concentrations were measured by bicinchoninic acid (BCA) protein assay. **(B)** SDS-PAGE analysis of culture filtrates during various culture periods. The culture filtrates for SDS-PAGE analysis were concentrated 100-fold by ultrafiltration. The 70 µg of protein was loaded to gradient Bis-Tris gel (4~12%), except culture filtrates for 1~2 weeks (10 µg of protein), separated by SDS-PAGE, and Coomassie blue stained. Lane 1~8; week 1~8, respectively.

주와 7주에서 16배, 8주차에서 64배의 항원농도를 나타내었다. 이와 같은 결과로 미루어서 MTB12와 Ag85 complex 항원은 배양 초기인 2~3주에 부터 다량 분비되기 시작하여 대략 6주 정도에서 최고 농도에 도달하였으나 반면에 38-kDa

항원은 3주부터 서서히 분비되기 시작하여 7주에서 8주 사이에 가장 높게 증가되었다.

2. Ag85 Complex, 38-kDa 및 MTB12 단백질항원의 분리정제

1) 결핵균 배양여과액 단백질 (CFPs)

배양여과액을 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3으로 2.5배 희석하여 Macro-prep High Q support가 충전된 컬럼에 가하여 단백질을 흡착시킨 후에 0~100 mM, 100~200 mM, 200~300 mM, 300~500 mM, 500 mM~1 M NaCl 농도에서 각각 용출하였던 바, Fig. 2-A에서 보는 바와 같이 Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 항원은 100 mM NaCl 농도에서 모두 분리되었다. 또한 100 mM 이상의 농도에서 용출된 단백질 분획에서는 Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 항원은 거의 존재하지 않았다 (결과는 그림으로 표시하지 않음). 따라서 Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 항원의 1차 분리를 위해서는 100 mM NaCl 농도에서 단백질을 분리 농축하여 배양여과액 단백질 (CFPs)로 준비하였다. 또한 Fig. 2-A에서와 같이 통과 배양여과액 (pass through culture filtrate)을 추가로 3회 까지 반복하여 anion-exchange chromatography를 실시하면 Ag85 complex의 농도가 다른 항원보다 상대적으로 높은 순도로 분리할 수 있었다.

2) Ammonium sulfate fractionation

CFPs의 0~40%와 40~80%의 황산암모늄 염석분획을 SDS-PAGE 분석을 실시하였던 바, Fig. 2-B에서와 같이 Ag85 complex 항원은 0~40% 염석분획에 주로 포함되어 있었으며 38-kDa와 MTB12 항원은 주로 40~80% 염석분획에 포함되어 있었다.

3) Hydrophobic interaction chromatography

1.8 M ammonium sulfate-100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8~0.02% NaN₃-1 mM EDTA (이하 PB buffer)에 용해시킨 0~40%와 40~80% 황산암모늄 염석분획을 각각 Macro-Prep Methyl HIC support 충전된 컬럼에 가하여 단백질을 흡착시킨 후에 1.8 M ammonium sulfate-PB buffer로 10분 세척한 후에 HIC를 실시하여 단백질을 분리하였다. HIC column에 흡착된 단백질을 1.8 M에서 0 M까지 낮아지는 황산암모늄 농도경사로 분리하였던 바, Table 2에서와 같이 Ag85 complex는 0.81에서 0.45 M 사이에서 분리되었으며, MTB12 항원은 1.80에서 1.62 M 사이에서, 38-kDa 항원은 1.35에서 1.17 M 사이에서 각각 분리되었다.

4) HPLC를 이용한 2차 anion-exchange chromatography

HIC로 각각 분리된 단백질항원은 2차 anion-exchange chromatography를 실시하여 최종 분리정제를 실시하였던 바, Ag-

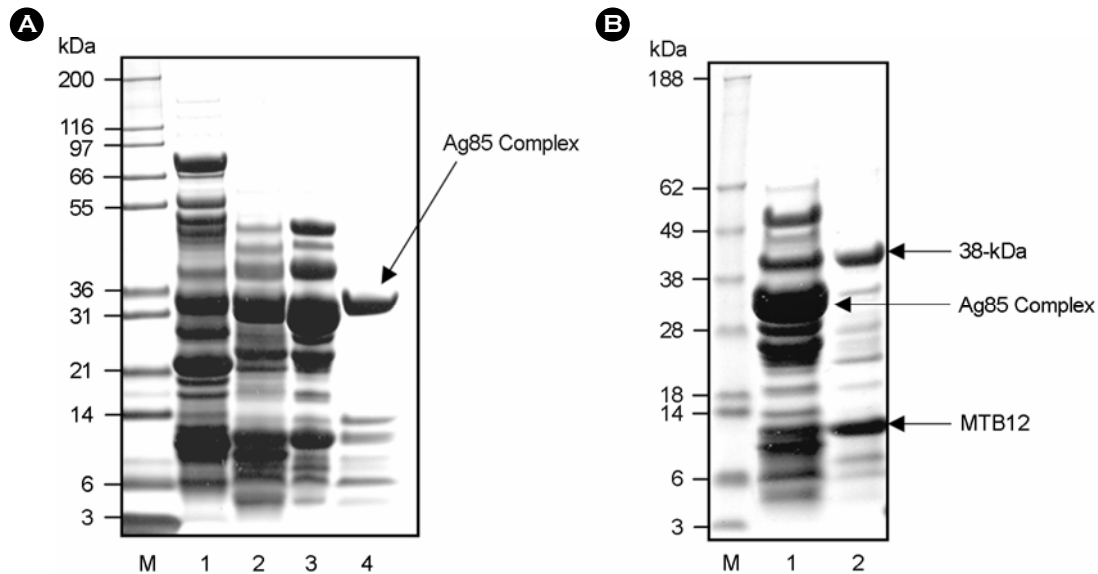


Figure 2. (A) SDS-PAGE analysis of *M. tuberculosis* culture filtrate protein concentration by anion-exchange chromatography. The unheated culture filtrate protein of *M. tuberculosis* H37Rv was concentrated by anion-exchange chromatography. The culture filtrate protein of *M. tuberculosis* was diluted with 2.5 volume of 20 mM Tris-HCl, pH 8.3 and loaded to a column (2.5 by 20 cm) of Macro-prep High Q support (Bio-Rad). The CFPs were eluted in 20 mM Tris-HCl, pH 8.3 with 100 mM NaCl, concentrated by ultrafiltration (1st elution; lane 1). All pass-through fractions produced in the procedure were pooled, and then reappplied to Macro-prep High Q column, eluted with 100 mM NaCl again and concentrated by ultrafiltration (2nd elution; lane 2). This process was repeated twice more (3rd and 4th elution; lane 3, 4) (B) SDS-PAGE analysis after ammonium sulfate fractionation of the culture filtrate proteins (CFPs). Lane 1, 0~40% ammonium sulfate fraction; lane 2, 40~80% ammonium sulfate fraction.

Table 2. The purification procedures of Ag85 complex, 38-kDa and MTB12 antigens from the culture filtrate of *Mycobacterium tuberculosis*

Purification procedure	Ag85 complex	38-kDa	MTB12
Anion exchange chromatography ^a (Macro-prep high Q)	100 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
Ammonium sulfate fractionation	0~40%	40~80%	40~80%
Hydrophobic interaction chromatography ^b	0.81~0.45 M	1.35~1.17 M	1.8~1.62 M
Anion exchange chromatography ^c (UNO-Q)	0~20 mM NaCl	0~20 mM NaCl	0~10 mM NaCl

^a: Bound proteins were eluted with 100 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 8.3 containing 0.02% NaN₃, 1 mM EDTA.

^b: Bound proteins were eluted with decreasing linear concentration of ammonium sulfate from 1.8 M to 0 M in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 containing 0.02% NaN₃ and 1 mM EDTA.

^c: Concentration of NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 8.3 containing 0.02% NaN₃ and 1 mM EDTA

85 complex와 38-kDa는 0~20 mM, MTB12 항원은 0~10 mM NaCl에서 각각 분리되었다 (Table 2와 Fig. 3).

5) 최종 항원의 정제량

Sauton 배지에서 *M. tuberculosis* H37Rv를 6주간 배양한 후에 총단백질과 각 항원의 최종 정제량을 조사하였던 바, 배양여과액으로부터 307.81 mg/l의 총단백질이 분비되었으며 이 중에서 본 연구의 분리정제법으로 Ag85 complex가 10 mg/l, 38-kDa 항원은 0.56 mg/l, MTB12 항원은 1.81 mg/l이 최종 정제되었다. 최종 분리정제된 각 항원은 인산완충액 (PBS; phosphate buffered saline)으로 4℃에서 투석하였고, 내

독소 제거 컬럼 (Endotoxin Removing Gel; Pierce, IL, USA)을 통과시켜 0.22 µm membrane filter로 여과멸균하여 -20℃에서 냉동 보관하였다.

3. 38-kDa과 MTB12 항원의 동정

분리정제된 항원 중에서 38-kDa과 MTB12 항원에 대한 단백질 동정을 위하여 2차원 전기영동 (2-dimensional electrophoresis)과 mass-spectrometry를 실시하였다. 38-kDa 항원은 pH 4.7~5.9에서, MTB12 항원은 pH 4.0~7.0에서 강한 spot이 2~3개가 나타났으며 (Fig. 4), 이들 단백질 spot에 대

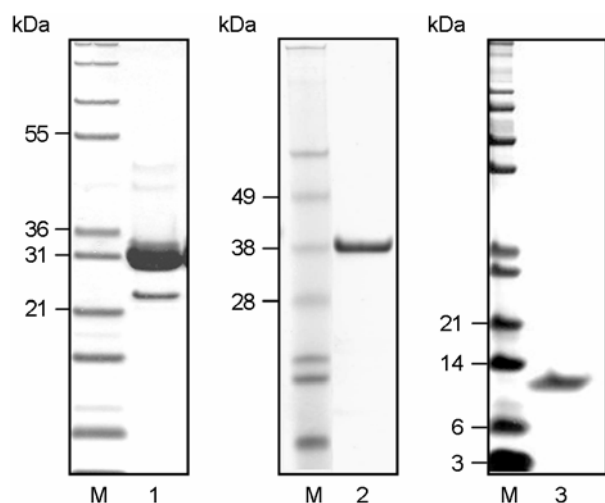


Figure 3. SDS-PAGE analysis of finally purified Ag85 complex, 38-kDa, and MTB12 antigen of *M. tuberculosis* culture filtrate. The Ag85 complex, 38-kDa, and MTB12 were purified from unheated culture filtrate of *M. tuberculosis* H37Rv by 1st anion-exchange chromatography (Macro-prep high Q supported column (Bio-Rad), ultrafiltration, ammonium sulfate fractionation, hydrophobic interaction chromatography and 2nd anion-exchange chromatography (UNO-Q6 column (Bio-Rad) (FPLC)). Lane 1, purified Ag85 complex; Lane 2, purified 38-kDa Ag; lane 3, purified MTB12 Ag.

하여 LC-ESI-MS 분석 (Yonsei proteome research center)을 실시하였던 바, 38-kDa 항원은 38-kDa glycolipoprotein으로, MTB12 항원은 12.5-kDa 분자량의 CFP-2 항원 또는 MTB-12 항원으로 최종 확인되었다.

고 찰

결핵은 발병 초기에 발견하여 2~4 종류의 항결핵제를 병용하면 성공적인 치료가 가능하나 최소한 6개월 이상의 장기 치료기간이 필요하다. 따라서 어느 감염병보다도 일찍 환자를 발견하여 감염원을 제거하고 다제내성균의 출현을 막기 위해서는 결핵발병을 조기에 확진할 수 있는 면역학적 진단법의 절실히 필요하다. 그러나 결핵균의 복잡한 항원성분, 교차반응성 및 다양한 숙주반응성 등으로 아직까지 PPD를 대체할 수 있는 진단항원이나 또한 BCG를 대체할 만한 백신을 개발하고 있지 못하다. 결핵균을 최초로 발견한 Robert Koch가 배양여과액 (culture filtrate)을 가열 및 농축하여 제조한 old tuberculin (OT)을 백신으로 사용했다가 큰 실패를 하였고 대신에 결핵균 감염을 판정하는 투베르쿨린 검사의 항원으로 사용되기 시작하였다. 그 이후 OT를 개량하여 제조한 PPD (purified protein derivatives) 항원이 현재까지 결핵 진단 및 감염 판정에 널리 사용되고 있지만 PPD 항원은 조합된 복합단백항원으로 특이도와 민감도가 떨어져서 진단

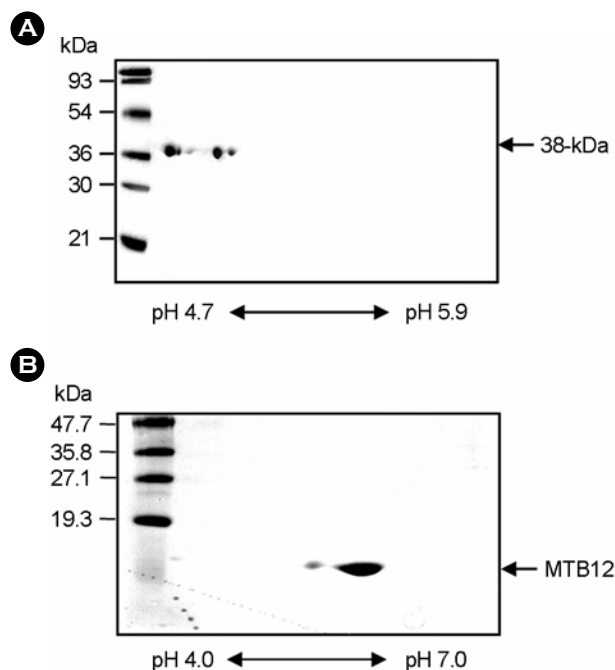


Figure 4. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the purified 38-kDa and MTB12 antigens purified from *M. tuberculosis* culture filtrate. The purified 38-kDa and MTB12 antigens were resolved by isoelectrofocusing (38-kDa Ag, pH 4.7~5.9; MTB12, pH 4.0~7.0) followed by SDS-PAGE (38-kDa Ag, 12% acrylamide gel; MTB12 Ag, 15% acrylamide gel). The gels were stained with Coomassie blue.

항원으로 사용하기에는 부적합하다.

따라서 결핵문제를 근본적으로 해결하기 위해서 새로운 진단 및 백신항원의 개발이 필요하며 이를 위하여 결핵균 단백질항원의 분석과 분리정제에 관한 연구가 집중적으로 이루어지고 있다. 최근에는 유전체학의 발달과 더불어 2-D 전기영동과 mass spectrometry 등의 단백질 분석기법의 발전으로 결핵항원의 분석과 동정은 물론 다양한 재조합 단백질항원이 생산되어 연구에 활기를 띠고 있다.

결핵균의 단백질항원은 천연단백질과 재조합단백질 형태로 얻을 수 있는데 근래 대부분의 연구는 재조합 단백질항원을 많이 사용하고 있다. 재조합 단백질항원은 대량생산이 용이하여 표준화된 항원을 공급할 수 있는 장점이 있으나 이들 재조합항원은 면역학적 활성능이 천연항원과는 다를 수 있다. *M. tuberculosis* GroES 천연항원은 사람과 마우스 T 세포에 의해 강력하게 인식되고, 이런 양상은 결핵환자와 BCG 백신접종 건강인군에서도 강력하게 나타났으나 (5,25) 재조합 GroES 항원에 의해서는 전혀 유도할 수 없었다 (28). 이와 같은 보고는 천연항원과 재조합항원간의 면역유도능을 재고해 보아야 할 여지를 남긴다. 실제로 천연항원과 재조합항원간의 생화학적 차이는 없었으나 흥미롭게도 재조합항원을

배양여과액에 접촉 후에 생물학적 활성능이 획득되었다는 보고 (28)는 배양여과액에 존재하는 항원 moiety가 천연항원과 연관되어 있고 이것이 직접적인 T 세포 인식에 기여했을 것으로 생각된다. 하지만 이들 연구에 있어서 결국 기준항원인 천연항원과의 비교연구가 필요하다. 그러나 이러한 천연단백항원의 분리정제는 장기간의 결핵균 배양시간과 까다롭고 복잡한 정제과정이 필요함은 물론 분리과정 중에 결핵균에 감염될 위험성도 높다. 따라서 본 연구에서는 주요 결핵항원의 독특한 분리정제 특성을 알아내고 이를 기반으로 순차적인 정제과정을 진행하면서 동시에 다수의 항원을 대량적으로 분리정제할 수 있는 방법을 찾아보고자 노력하였다.

천연항원은 결핵균을 Sauton 합성액배지에서 보통 2~8주 표면 배양한 후에 배양여과액을 취하여 단백항원을 분리하고 있다. 본 연구에서도 Sauton 합성배지에서 6주간 표면 배양한 후에 원심 분리하여 균체는 제거하고, 상층의 배양액을 취하여 여과멸균한 후에 anion-exchange chromatography로 단백질을 1차로 분리농축하고 ammonium sulfate fractionation, hydrophobic interaction chromatography 및 2차 anion-exchange chromatography를 사용하여 Ag85 complex, 38-kDa 및 MTB12 등의 천연분리항원의 대량 분리정제를 시도하였다. 특히 배양여과액을 1차 anion-exchange chromatography를 시행하면 3종류의 항원이 모두 포함된 CFPs를 비교적 간편하게 분리할 수 있었다. 또한 Ag85 complex 항원은 0~40% 황산암모늄 염석분획에 속하였고, 38-kDa과 MTB12 항원은 40~80% 분획에 속하여 ammonium sulfate fractionation에 의하여 Ag85 complex 항원의 분리가 매우 용이하였다. Ammonium sulfate fractionation에서 분리된 각각의 항원분획은 투석과정 없이 직접 hydrophobic interaction chromatography로 진행할 수 있어서 정제시간을 단축시킬 수 있었다. Hydrophobic interaction chromatography 시에 Ag85 complex는 0.81에서 0.45 M 사이의 황산암모늄 농도에서 분리되었으며, MTB12 항원은 1.80에서 1.62 M 사이에서, 38-kDa 항원은 1.35에서 1.17 M 사이에서 각각 특징적으로 분리되어서 3종류의 항원을 HIC에 의하여 성공적인 대량 분리정제가 가능하였다.

Ag85 complex 항원은 비교적 초기 배양여과액 (short-term culture filtrate)에 풍부한 주요 항원성분으로 잘 알려져 있다 (19,24). 본 연구에서도 2주차의 배양액으로부터 30-kDa 항원이 급증하였고 양적으로도 다른 항원에 비해 가장 풍부하였다. 이는 Ag85 complex가 세포벽 생합성에 중요한 mycolyl transferase로써 세균 배양이 log phase인 때에 매우 다량으로 생산되는 것으로 생각된다. Ag85 complex는 0~40% 황산암모늄 염석분획에 속하여서 40~80% 염석분획에 속한 38-kDa과 MTB12 항원과는 물리화학적 성상의 차이가 많을 것으로 생각되었다. 배양여과액을 1차 anion-exchange chromatography

를 실시했을 때에 38-kDa과 MTB12 항원은 한 번에 거의 회수할 수 있었으나 Ag85 complex는 컬럼통과액을 3차례 반복하여 anion-exchange chromatography를 실시하여야 모두 회수할 수 있었으며 반복할수록 Ag85 complex의 순도가 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 사실은 Ag85 complex 항원이 처음에는 다른 여러 항원에 밀려서 상대적으로 anion-exchange resin에 잘 결합하지 않았으나 통과액을 반복하여 anion-exchange chromatography를 시행하면 비교적 순수하게 분리정제할 수 있었다.

38-kDa glycolipoprotein 항원은 phosphate-binding protein (PBP)으로 결핵균의 phosphate metabolism에 관여하는 것으로 보고된 바 있다 (8). 38-kDa 항원은 3주 배양액에서부터 나타나기 시작하여 Ag85 complex와 MTB12 항원에 비하여 늦게 분비되었고 최종 정제된 항원의 량도 가장 적었다. Webb 등은 MTB12 항원은 Ag85 complex 항원과 같이 결핵균 배양액 내에 매우 풍부하게 분비되는 항원으로 결핵환자와 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유의하게 증가된 세포증식능을 보여주었다고 하였다 (35). 본 연구에서도 MTB12 항원의 분비시기를 면역확산법으로 추적하였을 때 배양 1주부터 활발하게 분비되는 것으로 확인되었고, Ag85 complex 항원보다 더 먼저 분비되기 시작하는 것으로 나타났다. 또한 MTB12 항원은 IFN- γ 유도능을 나타내었지만 Ag85 complex 항원보다는 다소 약하였고 이런 양상은 건강인과 결핵신환자에서 유사하였다 (결과는 제시하지 않음). 그러나 초기 염증시토카인 (proinflammatory cytokine)인 TNF- α 와 IL-6의 유도능 비교 시 두 항원은 건강인과 결핵신환자의 MDM (monocyte-derived macrophage)에서 모두 유사한 양상의 시토카인 생성능을 나타내었다 (23). 한편 건강인과 결핵환자의 혈청의 Ag85 complex와 MTB12 항원의 IgG에 대한 특이도와 민감도를 비교한 결과 두 항원은 유사한 양상을 나타냈다 (결과는 제시하지 않음).

분리항원은 분리양상에 따라 크게 세 가지로 구분할 수 있다고 한다 (2). 배양 초기에 다량으로 분비되는 'excreted protein'과 배양 중 내내 세포외벽에서 서서히 분비되는 'secreted protein', 그리고 후기 대수증식기에 갑자기 죽은 세균으로부터 고농도로 분비되는 'cytoplasmic antigen'로 나눌 수 있다. 본 연구에서 분리정제된 Ag85 complex와 MTB12 항원은 상대적으로 배양 초기인 2~3주 사이에서 가장 활발하게 분비되었고 6주에서 8주까지도 지속적으로 분비되어 대표적인 'secreted protein'에 속하였다. 그러나 38-kDa 항원은 3주 배양여과액부터 나타나기 시작하여 서서히 증가하다가 배양 8주에서 가장 높은 농도를 나타내어 'secreted protein'보다는 'cytoplasmic antigen'에 속할 것으로 생각되었다.

본 연구는 결핵균 배양여과액으로부터 전통적인 물리화학

적 정제방법인 anion-exchange chromatography (1차: Macro-prep high Q 컬럼 (Bio-Rad), 2차: UNO-Q6 컬럼 (Bio-Rad)), ultrafiltration, ammonium sulfate precipitation 및 hydrophobic interaction chromatography 등을 사용하여 Ag85 complex 항원을 비롯한 38-kDa 및 MTB12 항원의 대량 분리정제방법을 제시하게 되었다.

참 고 문 헌

- 1) Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bentzon MW, Heron I: T-cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **59**: 1558-1563, 1991.
- 2) Andersen P: The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology* **191**: 537-547, 1994.
- 3) Andersen AB, Hansen EB: Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **57**: 2481-2418, 1989.
- 4) Appelberg R: Protective role of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* infections. *Immunobiology* **191**: 520-525, 1994.
- 5) Barnes PF, Mehra V, Rivoire B, Fong SJ, Brennan PJ, Voegtline MS, Minden P, Houghten RA, Bloom BR, Modlin RL: Immunoreactivity of a 10-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **148**: 1835-1840, 1992.
- 6) Boesen H, Jensen BN, Wilcke T, Andersen P: Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**: 1491-1497, 1995.
- 7) Cardoso FL, Antas PR, Milagres AS, Geluk A, Franken KL, Oliveira EB, Teixeira HC, Nogueira SA, Sarno EN, Klatser P, Ottenhoff TH, Sampaio EP: T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients. *Infect Immun* **70**: 6707-6714, 2002.
- 8) Chang Z, Choudhary A, Lathigra R, Quijcho FA: The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biol Chem* **269**: 1956-1958, 1994.
- 9) Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F: Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* **271**: 698-702, 1994.
- 10) Daniel TM, Janicki BW: Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol Rev* **42**: 84-113, 1978.
- 11) Davidow A, Kanaujia GV, Shi L, Kaviar J, Guo X, Sung N, Kaplan G, Menzies D, Gennaro ML: Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state. *Infect Immun* **73**: 6846-6851, 2005.
- 12) Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Ravigliione MC: Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* **282**: 677-686, 1999.
- 13) Espinal MA: The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis (Edinb)* **83**: 44-51, 2003.
- 14) Fleisch IE, Kaufmann SH: Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology* **189**: 316-339, 1993.
- 15) Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**: 93-129, 2001.
- 16) Fonseca DP, Benaissa-Trouw B, van Engelen M, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AF: Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infect Immun* **69**: 4839-4845, 2001.
- 17) Giulian GG, Moss RL, Greaser M: Analytical isoelectric focusing using a high-voltage vertical slab polyacrylamide gel system. *Anal Biochem* **142**: 421-436, 1984.
- 18) Haga S, Yamaguchi R, Nagai S, Matsuo K, Yamazaki A, Nakamura RM: Delayed-type hypersensitivity to a recombinant mycobacterial antigen, MPB64, in guinea pigs sensitized to *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol* **57**: 221-225, 1995.
- 19) Harth G, Lee BY, Wang J, Clemens DL, Horwitz MA: Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **64**: 3038-3047, 1996.
- 20) Horwitz MA, Lee BW, Dillon BJ, Harth G: Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1530-1534, 1995.
- 21) Kaufmann SH: Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* **6**: 955-960, 2000.
- 22) Lee BY, Horwitz MA: T-cell epitope mapping of the three

- most abundant extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in outbred guinea pigs. *Infect Immun* **67**: 2665-2670, 1999.
- 23) **Lee JS, Son JW, Jung SB, Kwon YM, Yang CS, Oh JH, Song CH, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Jo EK**: Ex Vivo Responses for Interferon-gamma and Proinflammatory Cytokine Secretion to Low-Molecular-Weight Antigen MTB12 of *Mycobacterium tuberculosis* during Human Tuberculosis. *Scand J Immunol* **64**: 145-154, 2006.
 - 24) **Lim JH, Park JK, Jo EK, Song CH, Min D, Song YJ, Kim HJ**: Purification and immunoreactivity of three components from the 30/32-kilodalton antigen 85 complex in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **67**: 6187-6190, 1999.
 - 25) **Mehra V, Bloom BR, Bajardi AC, Grisso CL, Sieling PA, Alland D, Convit J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, et al**: A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10-kD heat-shock cognate protein. *J Exp Med* **175**: 275-284, 1992.
 - 26) **Olsen AW, Williams A, Okkels LM, Hatch G, Andersen P**: Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model. *Infect Immun* **72**: 6148-6150, 2004.
 - 27) **Pehler K, Brasky KM, Butler TM, Attanasio R**: *Mycobacterium tuberculosis*-secreted protein antigens: immunogenicity in baboons. *J Clin Immunol* **20**: 306-316, 2000.
 - 28) **Rosenkrands I, Weldingh K, Ravn P, Brandt L, Hojrup P, Rasmussen PB, Coates AR, Singh M, Mascagni P, Andersen P**: Differential T-cell recognition of native and recombinant *Mycobacterium tuberculosis* GroES. *Infect Immun* **67**: 5552-5558, 1999.
 - 29) **Samanich KM, Keen MA, Vissa VD, Harder JD, Spencer JS, Belisle JT, Zolla-Pazner S, Laal S**: Serodiagnostic potential of culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**: 662-668, 2000.
 - 30) **Schluger NW, Rom WN**: The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **157**: 679-691, 1998.
 - 31) **Silveira H, Ordway D, Dockrell H, Jackson M, Ventura F**: Cell-mediated immune responses to mycobacterial antigens in patients with pulmonary tuberculosis and HIV infection. *Clin Exp Immunol* **110**: 26-34, 1997.
 - 32) **Skjot RL, Oettinger T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S, Andersen P**: Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun* **68**: 214-220, 2000.
 - 33) **Stenger S, Modlin RL**: T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol* **2**: 89-93, 1999.
 - 34) **Triccas JA, Roche PW, Winter N, Feng CG, Butlin CR, Britton WJ**: A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* **64**: 5171-5177, 1996.
 - 35) **Webb JR, Vedvick TS, Alderson MR, Guderian JA, Jen SS, Ovendale PJ, Johnson SM, Reed SG, Skeiky YA**: Molecular cloning, expression, and immunogenicity of MTB-12, a novel low-molecular-weight antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **66**: 4208-4214, 1998.
 - 36) **Weinrich Olsen A, van Pinxteren LA, Meng Okkels L, Birk Rasmussen P, Andersen P**: Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infect Immun* **69**: 2773-2778, 2001.