(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0099722
(43) 공개일자 2017년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/58 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0022151
(22) 출원일자 2016년02월24일
심사청구일자 2016년02월24일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이현우
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
박종석
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
유미특허법인

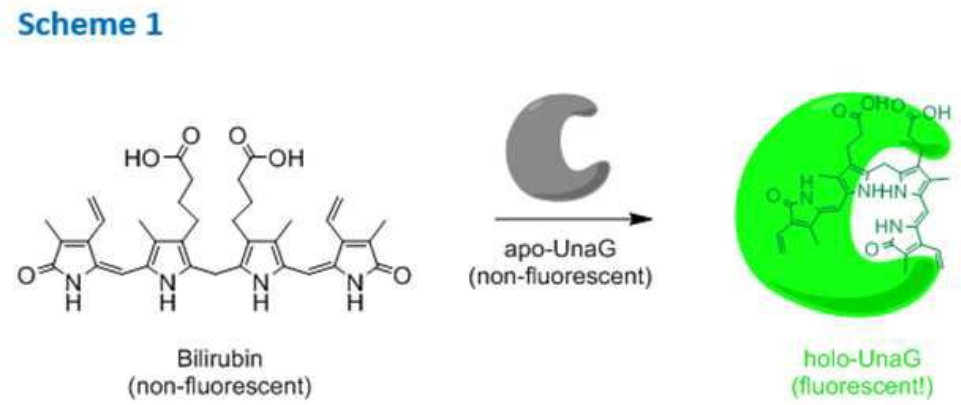
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **UnaG 단백질을 이용한 세포 소기관 내 빌리루빈 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 살아있는 세포 내 소기관에 존재하는 빌리루빈을 검출하는 방법에 관한 것으로, 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이를 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환하는 단계, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 형광세기를 측정하는 단계, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계, 및 형광세기와 발현 정도를 비교하여 결정계수 및 추세를 확인하는 단계를 포함하는 세포 내 빌리루빈 정량 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 1/68 (2013.01)
G01N 33/68 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711029419
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구자지원
연구과제명 효소화학반응을 이용한 살아있는 세포의 단백질체 레이블링 시스템
기 여 율 1/1
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2015.11.01~2016.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환하는 단계;

(2) 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 형광세기를 측정하는 단계;

(3) 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

(4) 형광세기와 발현 정도를 비교하여 결정계수 및 추세를 확인하는 단계;

를 포함하는 세포 내 빌리루빈 정량 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 11의 염기서열 중에서 선택된 1종 이상인 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 UnaG 단백질은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 23의 염기서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 FLAG tag을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 FLAG tag는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 FLAG tag을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 25의 염기서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 세포 내 소기관은 핵, 미토콘드라아 이중막 사이 공간, 미토콘드리아 외막, IMS, 소포체 내강, 미토콘드리아 기질, 세포질, 소포체 내강방향 조면소포체막, 세포질방향 조면 소포체 막, 원형질막 및 활면소포체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열번호 27 내지 38의 염기서열 중에서 선택된 염기서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

상기 (2) 단계는 공초점 형광 현미경 또는 형광 분광 광도계를 이용하여 형광세기를 측정하는 것인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 (3) 단계는 면역형광법, 중합효소 연쇄반응, 노던 블랏 또는 유전자미세배열을 이용하여 수행하는 것인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 (3) 단계는 세포를 고정 및 투과 처리를 거친 뒤 수행하는 것인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 고정은 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 20 내지 30℃에서 10 내지 20분간 반응을 수행하는 것인, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 투과 처리는 0.4% 트리톤-X100으로 20 내지 30℃에서 30 내지 90분간 반응을 수행하는 것인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 (4) 단계의 결정계수 및 추세를 확인은, UnaG 단백질의 형광세기와 발현 정도를 배경과의 대비하여 이를 수치화 하고, 수치화된 형광세기(Y축)와 발현 정도(X축)를 좌표평면상에 표시하여, 가장 표준편차가 적도록 추세선을 그리고, 상기 추세선의 기울기를 결정계수, 추세선과 각각의 데이터의 차이를 표준편차로 나타낸 것을 분석하여 수행하는 것인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 수치화는 하기의 계산식 1 및 2를 통해 수행하는 것인, 방법:

[계산식 1]

$$\hat{\beta} = \frac{\Sigma(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}$$

[계산식 2]

$$\hat{\alpha} = \bar{y} - \hat{\beta}\bar{x}$$

상기 x_i 는 하나의 픽셀에 해당하는 발현 정도,

y_i 는 형광 세기,

$\bar{x}$ 는 평균 발현 정도,

$\bar{y}$ 는 평균 형광 세기,

$\hat{\alpha}$ 는 추세선의 Y절편, 및

$\hat{\beta}$ 은 추세선의 기울기 및 결정계수를 의미한다.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 세포는 신장 세포, 암 세포, 피부 세포, 난소 세포, 활막세포, 말초혈액 단핵구 세포, 섬유아세포, 섬유 세포, 신경세포, 상피세포, 각질세포, 조혈 세포, 멜라닌 세포, 연골세포, 대식세포, 근육

세포, 혈액 세포, 골수 세포, 림프구 세포, 단핵 세포, 폐 세포, 췌장 세포, 간 세포, 위 세포, 장 세포, 심장 세포, 방광 세포, 요도 세포, 배아 생식세포 또는 난구세포인 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 살아있는 세포 내 소기관에 존재하는 빌리루빈을 검출하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이를 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환하는 단계, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 형광세기를 측정하는 단계, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계, 및 형광 세기와 발현 정도를 비교하여 결정계수 및 추세를 확인하는 단계를 포함하는 세포 내 빌리루빈 정량 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 보통 작은 생체분자들이 분산 작용을 통해 세포 내 소기관에서 대칭적으로 분포할 것이라는 게 일반적인 견해였으나, 최근 살아있는 세포 내에서의 많은 작은 생체분자들이 세포 내 소기관에서 비대칭적으로 분포함이 발견되어 학계의 놀라움을 주고 있다. 예를 들어 생체분자의 하나인 지질이 세포 내 소기관 내에서 비대칭적을 존재하고 또 한 세포 내 소기관에서도 다른 종류의 지질들이 막을 구성하고 있다는 게 밝혀져 이러한 연구는 학계의 새로운 시각을 제공해주었다고 평가되고 있다.

[0003] 하지만, 이러한 세포 내 소기관에서 생체분자를 정성 및 정량 분석하는 방법은 다소 어려운 측면이 있는데, 기존의 세포분획방법과 화학반응, 안티바디(anti-body)를 통한 검출 방법은 위정(false-positive)의 위험이 있고 이러한 방법은 살아있는 세포상태가 아닌 인위적인 용액에서 실행해야 한다는 한계가 있다. 이러한 한계는 생물학적, 의학적인 분석을 어렵게 하기에 보다 상세하고 살아있는 상태에서 할 수 있는 방법을 필요로 하게 되었다.

[0004] 현재까지 형광단백질을 이용한 이미징 기술은 생체분자를 정성 및 정량하는 가장 실용적인 방법으로 평가되고 있으며, 또 살아있는 세포 내 특정 소기관에서 독성이 거의 없어 장기적인 측정도 가능하다는 장점이 있다. 이제까지 이러한 형광이미징 기술을 이용한 센서로 ATP, GTP, cAMP, 금속이온, 포도당 등을 검출하는데 사용되었고, 이는 곧 세포 내에서 그 생체분자의 생리학적 기능을 밝히는데 큰 도움을 주었다.

[0005] 빌리루빈은 척추동물의 지질성 대사물질 중 하나로 끊임없이 재생산되며 그 양이 하루에만 사람기준 250 내지 400mg에 달한다. 빌리루빈은 주로 헴 분해과정에서 생기며 헴 산소첨가효소(소포체에 위치)와 빌리버딘 환원효소(세포질에 위치)에 의해 생성된다. 빌리루빈은 항산화제의 성격을 가지며 활성산소 중의 하나인 과산화수소를 10,000배나 분해할 수 있다는 것이 밝혀져 있다. 그러나 이러한 빌리루빈도 많은 양이 체내에 축적되면 치명적인 질병을 일으키는 데 만성 황달, 뇌병증, Crigler-Najjar syndrome, Dublin-Johnson syndrome이 그 예이다. 현재까지 빌리루빈의 기본적인 정보가 안 밝혀져 있어 그 생물학적, 병리학적 중요함에도 불구하고 빌리루빈의 역할을 가늠하기에 많은 어려움이 있었다.

[0006] 빌리루빈의 측정을 위해 여러 실험관 분석기기들이 이용되어 왔으나 살아있는 세포에서 측정하기에는 무리가 있었고 아주 근래에 이르러 이광자 레이저 현미경을 통해 종양세포에서의 빌리루빈 2량체를 분석을 한 연구가 있었으나 빌리루빈 1량체를 분석하기에 또 세포 내 소기관에서의 분포를 측정하기에는 적합하지 않았다. 또한, 이러한 이광자 레이저 현미경이라고 하는 고가의 기기를 사용해야 할 뿐만 아니라 현미경 작동에 관한 복잡한 과정을 수행할 수 있는 노련한 기술자가 필요하기에 모든 과학자들이 쉽게 적용할 수 있는 기술이라고 볼 수 없어, 보다 용이하게 세포 내 소기관에서 빌리루빈을 분석할 수 있는 기술이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 빌리루빈과 결합하여 형광을 내는 UnaG 단백질을 이용해, 형광이미징 기술을 통해 빌리루빈이 살아있는 세포 내 소기관에 분포하는지 여부를 확인하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에, 본 발명의 목적은 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이를 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환하는 단계, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 형광세기를 측정하는 단계, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계, 및 형광세기와 발현 정도를

비교하여 결정계수 및 추세를 확인하는 단계를 포함하는 세포 내 빌리루빈 정량 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 살아있는 세포 내 소기관에 존재하는 빌리루빈을 형광을 통해 검출하는 신규한 방법에 관한 것으로, 기존의 세포 분획법, 화학반응을 통한 방법보다 선택적인 효과를 가진다.

[0010] 일 예에서, 본 발명은 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 형광세기를 측정하는 단계, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계, 및 형광세기와 발현 정도를 비교하여 결정계수 및 추세를 확인하는 단계를 통해 빌리루빈의 동적 이동과 이와 관련된 메커니즘을 규명하는 방법을 제공할 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 예는, 세포 내 소기관에 따른 빌리루빈의 정량 방법을 제공한다.

[0012] 다른 예는 세포 내 소기관에 따른 빌리루빈 가시화 방법을 제공한다.

[0013] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다

[0014] 일 예에서, 상기 빌리루빈의 정량 방법은 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다:

[0015] (1) 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이를 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환하는 단계;

[0016] (2) 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 형광세기를 측정하는 단계;

[0017] (3) 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

[0018] (4) 형광세기와 발현 정도를 비교하여 결정계수 및 추세를 확인하는 단계.

[0019] 또한, 상기 빌리루빈 가시화 방법은 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다:

[0020] (a) 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이를 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환하는 단계; 및

[0021] (b) 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 형광 여부를 확인하는 단계.

[0022] 상기 빌리루빈 가시화 방법에서, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 형광이 확인되면, 상기 폴리뉴클레오타이드에 의하여 타겟팅되는 세포 내 소기관에 빌리루빈이 존재함을 확인할 수 있다.

[0023] 상기 세포는 동물 세포, 식물 세포, 미생물 등을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 동물 세포(mammalian cell)일 수 있으며, 외래 유전자의 형질 감염(transfection)이 가능한 모든 살아있는 세포들 중에서 특별한 제한 없이 선택될 수 있다.

[0024] 구체적인 예로, 신장 세포, 암 세포, 피부 세포, 난소 세포, 활막 세포, 말초혈액 단핵구 세포, 섬유아세포, 섬유 세포, 신경세포, 상피세포, 각질세포, 조혈 세포, 멜라닌 세포, 연골세포, 대식세포, 근육 세포, 혈액 세포, 골수 세포, 림프구 세포, 단핵세포, 폐 세포, 췌장 세포, 간 세포, 위 세포, 장 세포, 심장 세포, 방광 세포, 요도 세포, 배아 생식세포 또는 난구세포 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 더욱 구체적으로, 상기 동물 세포는 신장 세포(hek293T 세포, hek293 세포 등), 암 세포(hela 세포 등), 원숭이 콩팥 세포(Cos-7 세포 등), 골육종 세포(U2OS 세포 등), 피부 세포(NIH3T3 세포 등), 난소 세포(CHO 세포 등) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 상기 "세포 내 소기관(organelle)"이란, 세포의 내부에 존재하며 세포의 여러 가지 기능을 분업으로 하고 있는 구조단위를 의미한다. 바람직하게, 본 발명에 있어서 세포 소기관은 세포 내막에 싸인 구조체로, 다른 공간과는 구획한 세포 내 구획을 형성하고 있으며 고유의 미세환경을 갖는 소기관을 의미한다. 이러한 세포 소기관은 고유의 기능을 가지며, 예를 들어, 핵, 미토콘드라아 이중막 사이 공간, 미토콘드리아 외막, IMS, 소포체 내강, 미토콘드리아 기질, 세포질, 소포체 내강방향 조면소포체막, 세포질방향 조면 소포체 막, 원형질막, 활면소포체 등 일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 식물세포의 경우 엽록체, 액포 등을 포함할 수 있다.

[0027] 상기 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드는 특정 세포 내 소기관을 타겟팅하여 UnaG 단백질을 특정 타겟팅된 세포 내 소기관에서 발현하도록 하는 역할을 한다. 각 세포 내 소기관 별로 이를 타겟팅 하는 폴리펩타이드 및 이를 암호화하는 염기서열은 잘 알려져 있다.

[0028] 일 예에서, 상기 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클라오타이드는 서열번호 1 내지 11의 염기서열 중에서 선택된

것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 서열번호 1 내지 11의 염기서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[0029] 상기 UnaG 단백질은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 25의 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함할 수 있으며, 예컨대, 서열번호 23의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 일 예에서, 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터에서, 상기 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드는 상기 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단 모두 (세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드가 2개 사용되는 경우)에 연결되어 있을 수 있다. 상기 재조합 벡터 내에서의 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드의 위치는 타겟팅되는 소기관 및/또는 사용되는 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 위치에 따라서 정해질 수 있다.

[0031] 상기 재조합 벡터는 통상적인 표지 부위 (예컨대, FLAG tag 등)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0032] 상기 FLAG tag는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 FLAG tag을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 25의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 상기 재조합 벡터 내 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 통상적인 표지 부위, 통상의 제한 부위, 펩타이드 링커 암호화 폴리뉴클레오타이드 등을 통하거나 통하지 않고 연결될 수 있다.

[0034] 일 예에서, 상기 재조합 벡터에 포함 가능한 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드의 염기서열 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 기준으로 한 재조합 벡터 내 위치를 표 1 및 2에 정리하고, 상기 폴리뉴클레오타이드로부터 암호화되는 아미노산 서열을 표 3에 정리하였다. 그 외 재조합 벡터에 포함되는 UnaG 단백질과 표지 부위 (FLAG tag)의 암호화 염기서열 및 아미노산 서열을 표 4에 정리하였다.

표 1

[0035]

서열 번호	타켓팅 영역	서열목록 (5' -> 3')	벡터 내 위치 (UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 기준)
1	핵	AGCAGGGCCGACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGGACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGGACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTG	3' 말단 쪽
2	미토콘드리아 이중막 사이 공간	ATGTACCGGCTCCTGTCAAGCGTGACAGCTCGGGCTGCGGCCACCGCAGGCCCAGCCTGGGACGGAGGGCGGCGCGGGGCGCACAGGCGACCGGGCCTGCCTGTGCTGGGCCTTGGTTGGGCCGGCGGCCTGGGGCTCGGGCTGGGGCTGGCTCTCGGCGCGAAGCTGGTGGTCGGGCTGCGGGGCGCCGTCCCCATTCAGTCC	5' 말단 쪽
3	미토콘드리아 외막	ATGGTGGGTCGGAACAGCGCCATCGCCGCCGGTGTATGCGGGGCCCTTTTCATTGGGTACTGCATCTACTTCGACCGCAAAAGACGAAGTGACCCCAACTTCAAGAACAGGCTTCGAGAACGAAGAAAGAAACAGAAGCTTGCCAAGGAGAGAGCTGGGCTTTCCAAGTTACCTGACCTTAAAGATGCTGAAGCTGTTCAGAAGTTCTTCCTTGAAGAAATACAGCTTGGTGAAGAGTTACTAGCTCAAGGTGAATATGAGAAGGGCGTAGACCATCTGACAAATGCAATTGCTGTGTGTGGACAGCCACAGCAGTTACTGCAGGTCTTACAGCAAACTCTTCCACCACCAGTGTTCCAGATGCTTCTGACTAAGCTCCCAACAATTAGTCAGAGAATTGTAAGTGCTCAGAGCTTGGCTGAAGATGATGTGGAA	5' 말단 쪽

4	IMS (Mito-intermembrane spece)	ATGGCGATGCTGGTCCTAGTACCCGGACGAGTTATGCGGCCTCTGGGTGGCCAAC TTTGGCGCTTCTTGCCTCGCGGACTCGAGTTTTGGGGCCCAGCCGAGGGGACTGC GAGAGTCTTGCTGAGGCAGTTCTGCGCGCGGCAAGCGGAGGCGTGGCGTGCCTCG GGGCGCCCTGGCTATTGCCTGGGAACCCGGCCCCTCAGCACTGCGAGGCCGCCAC CCCCGTGGTCGCAGAAGGGCCCCGGAGACTCCACGCGCCCCTCGAAGCCCGGGCC TGTTTCCTGGAAGTCTTTAGCAATCACATTTGCTATTGGAGGAGCTTTACTGGCT GGAATGAAGCACGTCAAGAAAGAAAAGGCAGAGAAGTTAGAGAAGGAACGGCAGC GACACATCGGCAAGCCTTTACTTGGGGGACCGTTTTCCCTCACAACTCATACTGG GGAGCGTAAAACTGACAAGGACTACTTGGGTCAGTGGTTATTGATTTATTTTGGC TTCACTCATTGCCCTGATGTCTGTCCAGAAGAACTAGAAAAGATGATTCAAGTCG TGGATGAAATAGATAGCATTACAACTCTGCCAGATCTAACTCCACTTTTCATCAG CATTGACCCAGAGAGGGACACAAAAGAAGCCATCGCAAATTATGTGAAAGAATTT TCTCCCAAACTGGTTGGCTTGACTGGCACGAGAGAAGAGGTCGATCAAGTGGCCA GAGCATACAGAGTGTATTACAGCCCTGGCCCCAAGGACGAAGATGAAGACTACAT AGTGGATCACACAATAATAATGTACTTGATTGGACCAGATGGTGAGTTTCTAGAT TATTTTGGCCAGAACAAGAGGAAGGGAGAAATAGCTGCTTCAATTGCCACACACA TGAGGCCATACAGAAAAAAGAGC	5' 말단 쪽

표 2

[0036]

서열 번호	타켓팅 영역	서열목록 (5' -> 3')	벡터 내 위치 (UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 기준)
5	소포체 내강	AAGGACGAGCTG	5' 말단 및 3' 말단 쪽
6	미토콘드리아 기질	ATGCTGGCCACCCGCGTGTTCAGCCTGGTGGGCAAGCGCGCCATCAGCACCAGCG TGTGCGTGCGCGCCCAC	5' 말단 쪽
7	세포질	CTGCAGCTGCCCCCCCTGGAGCGCCTGACCCTGGAC	3' 말단 쪽
8	소포체 내강방향 조면소포체 막	ATGCCTGGTCCGACCCCCAGTGGCACTAACGTGGGATCCTCAGGGCGCTCTCCCA GCAAAGCAGTGGCCGCCCGGGCGGCGGGATCCACTGTCCGGCAGAGGAAAAATGC CAGCTGTGGGACAAGGAGTGCAGGCCGCACAACCTCGGCAGGCACCGGGGGGATG TGGCGATTCTACACAGAAGATTCACCTGGGCTCAAAGTTGGCCCTGTTCCAGTAT TGGTTATGAGTCTTCTGTTCATCGCTTCTGTATTTATGTTGCACATTTGGGGCAA GTACACTCGTTCG	5' 말단 쪽
9	세포질방향 조면 소포체 막	ATGCCTGGTCCGACCCCCAGTGGCACTAACGTGGGATCCTCAGGGCGCTCTCCCA GCAAAGCAGTGGCCGCCCGGGCGGCGGGATCCACTGTCCGGCAGAGGAAAAATGC CAGCTGTGGGACAAGGAGTGCAGGCCGCACAACCTCGGCAGGCACCGGGGGGATG TGGCGATTCTACACAGAAGATTCACCTGGGCTCAAAGTTGGCCCTGTTCCAGTAT TGGTTATGAGTCTTCTGTTCATCGCTTCTGTATTTATGTTGCACATTTGGGGCAA GTACACTCGTTCG	3' 말단 쪽
10	원형질막	CGCAGCAAGCTGAACCCCCCCCGACGAGAGCGGCCCCGGCTGCATGAGCTGCAAGT GCGTGCTGAGC	3' 말단 쪽
11	활면소포체	ATGGATCCTGTGGTGGTGCTGGGGCTCTGTCTCTCCTGTTTGCTTCTCCTTTCAC TCTGGAAACAGAGCTATGGGGGAGGG	5' 말단 쪽

표 3

[0037]

서열 번호	타켓팅 영역	서열목록 (5' -> 3')
12	핵	SRADPKKKRKVDPKKKRKVDPKKKRKV
13	미토콘드리아 이중막 사이 공간	MYRLLSSVTARAAATAGPAWDGGRRGAHRRPGLPVLGLGWAGGLGLGLGLALGAKLVVGLRGAVPIQS
14	미토콘드리아 외막	MVGRNSAIAAGVCGALFIGYCIYFDRKRRSDPNFKNRLRERRKKQKLAKERAGLSKLPDLKDAEAVQKFFLEEIQLG EELLAQGEYEKGVDHLTNAIAVCGQPQQLLQVLQQTLPPPVFQMLLTKLPTISQRIVSAQSLAEDDVE
15	IMS	MAMLVLVPGRVMRPLGGQLWRFLPRGLEFWGPAEGTARVLLRQFCARQAEAWRASGRPGYCLGTRPLSTARPPPPWS QKGPGDSTRPSKPGPVSWKSLAITFAIGGALLAGMKHVKKEKAEKLEKERQRHIGKPLLGGPFSLTTHTGERKTDKD YLGQWLLIYFGFTHCPDVCPEELEKMIQVVDEIDSITTLPDLTPLFISIDPERDTKEAIANYVKEFSPKLVGLTGTR EEVDQVARAYRVYYSPGPKDEDEDYIVDHTIIMYLIGPDGEFLDYFGQNKRKGEIAASIATHMRPYRKKS
16	소포체 내강	KDEL
17	미토콘드리아 기질	MLATRVFSLVGKRAISTSVCVRAH
18	세포질	LQLPPLERLTLD
19	소포체 내강방향 조면소포체 막	PGPTPSGTNVGSSGRSPSKAVAARAAGSTVRQRKNASCGTRSAGRTTSAGTGGMWRFYTEDSPGLKVGPVPVLVMSL LFIASVFMLHIWGKYTRS

20	세포질방향 조면 소포체 막	MPGPTPSGTNVGSSGRSPSKAVAARAAGSTVRQRKNASCGTRSAGRTTSAGTGGMWRFYTEDSPGLKVGPVPVLVMS LLFIASVFMLHIWGKYTRS
21	원형질막	RSKLNPPDESGPGCMSCKCVLS
22	활면소포체	MDPVVVLGLCLSCLLLLSLWKQSYGGG

표 4

[0038]

서열 번호	명명	서열목록 (5' -> 3')
23	UnaG	ATGGTTGAAAAATTTGTTGGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGAAGGCTATCGGGGC GCCTAAAGAGCTGAGTGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGACGGTGATAAAATGA CCGTTAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGAATTTGATGAG TTCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTATATGTCCAAAAATG GGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTGACAATGGGCGACGTGG TGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAA
24	FLAG tag	GACTACAAGGATGACGACGATAAG
25	UnaG	MVEKFVGTWKIADSHNFGEYLKAIGAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDE FPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYVREIKDGKLVVTLTMGDVVAVRSYRRATE
26	FLAG tag	DYKDDDDK

[0039] 상기 재조합 벡터는 세포 내 특정 소기관에서 UnaG 단백질이 발현될 수 있도록 할 수 있다. 예를 들어, UnaG 단백질을 핵, 미토콘드라아 이중막 사이 공간, 미토콘드리아 외막, IMS, 소포체 내강, 미토콘드리아 기질, 세포질, 소포체 내강방향 조면소포체막, 세포질방향 조면 소포체 막, 원형질막, 활면소포체에서 발현할 수 있다.

[0040] 또한, 상기 재조합 벡터는 서열번호 27 내지 38의 염기서열 중에서 선택된 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 서열번호 27 내지 38의 염기서열은 하기의 표 5 내지 표 7에 나타내었다.

표 5

[0041]

명명	타켓팅 영역	서열목록(5'->3')	서열 번호
UnaG-Flag-NLS	핵	ATGGTTGAAAAATTTGTTGGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGAAGGCTATCGG GGCGCCTAAAGAGCTGAGTGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGACGGTGATA AAATGACCGTTAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGAA TTTGATGAGTTCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTATA TGTCCAAAAATGGGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTGA CAATGGGCGACGTGGTGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAAGACTACAAGGATGACGACGATAAGGAA TTCAGCAGGGCCGACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGGACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGGACCCCAAGAAGAA GAGGAAGGTGTGA	27
LACTB-UnaG-Flag	미토콘드리아 이중막 사이 공간	ATGTACCGGCTCCTGTCAAGCGTGACAGCTCGGGCTGCGGCCACCGCAGGCCCAGCCTGGGACGGAGGGCGGCG CGGGGCGCACAGGCGACCGGGCCTGCCTGTGCTGGGCCTTGGTTGGGCCGGCGGCCTGGGGCTCGGGCTGGGGC TGGCTCTCGGCGCGAAGCTGGTGGTCGGGCTGCGGGGCGCCGTCCCCATTCAGTCCATGGTTGAAAAATTTGTT GGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGAAGGCTATCGGGGCGCCTAAAGAGCTGAG TGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGACGGTGATAAAATGACCGTTAAGATCG AGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGAATTTGATGAGTTCCCGAGC GACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTATATGTCCAAAAATGGGATGG CAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTGACAATGGGCGACGTGGTGG CAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAAGACTACAAGGATGACGACGATAAGTAA	28
Tom20-flag-UnaG	미토콘드리아 외막	ATGGTGGGTCGGAACAGCGCCATCGCCGCCGGTGTATGCGGGGCCCTTTTCATTGGGTACTGCATCTACTTCGA CCGCAAAAGACGAAGTGACCCCAACTTCAAGAACAGGCTTCGAGAACGAAGAAAGAAACAGAAGCTTGCCAAGG AGAGAGCTGGGCTTTCCAAGTTACCTGACCTTAAAGATGCTGAAGCTGTTCAGAAGTTCTTCCTTGAAGAAATA CAGCTTGGTGAAGAGTTACTAGCTCAAGGTGAATATGAGAAGGGCGTAGACCATCTGACAAATGCAATTGCTGT GTGTGGACAGCCACAGCAGTTACTGCAGGTCTTACAGCAAACTCTTCCACCACCAGTGTTCCAGATGCTTCTGA CTAAGCTCCCAACAATTAGTCAGAGAATTGTAAGTGCTCAGAGCTTGGCTGAAGATGATGTGGAAGGATCCTCT GGTGGATCTGGTGGATCTAGAGACTACAAGGATGACGACGATAAGAAGCTAGCAATGGTTGAAAAATTTGTTGG TACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGAAGGCTATCGGGGCGCCTAAAGAGCTGAGTG ATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGACGGTGATAAAATGACCGTTAAGATCGAG AATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGAATTTGATGAGTTCCCGAGCGA CAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTATATGTCCAAAAATGGGATGGCA AAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTGACAATGGGCGACGTGGTGGCA GTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAATAA	29

표 6

[0042]

명명	타켓팅 영역	서열목록(5'->3')	서열 번호
ScoI-UnaG-flag	IMS	TCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGACGGTGATAAAATGACCGTTAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCC TGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGAATTTGATGAGTTCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAA TCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTATATGTCCAAAAATGGGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCG TGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTGACAATGGGCGACGTGGTGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTG CAACCGAAGACTACAAGGATGACGACGATAAGTAA	30
ss-UnaG-KDEL-Flag	소포체 내강	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGGGCCCAGCC GGCCAGATCTATGGTTGAAAAATTTGTTGGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGA AGGCTATCGGGGCGCCTAAAGAGCTGAGTGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAG GACGGTGATAAAATGACCGTTAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACT TGGTGAAGAATTTGATGAGTTCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAA AACTCGTATATGTCCAAAAATGGGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTT GTGACGCTGACAATGGGCGACGTGGTGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAAGACTACAAGGATGACGA CGATAAGAAGGACGAGCTGTGA	31
mito-UnaG-flag	미토콘드리아 기질	ATGCTGGCCACCCGCGTGTTCAGCCTGGTGGGCAAGCGCGCCATCAGCACCAGCGTGTGCGTGCGCGCCCACAA GGATCCAATGGTTGAAAAATTTGTTGGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGAAGG CTATCGGGGCGCCTAAAGAGCTGAGTGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGAC GGTGATAAAATGACCGTTAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGG TGAAGAATTTGATGAGTTCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAAC TCGTATATGTCCAAAAATGGGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTG ACGCTGACAATGGGCGACGTGGTGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAAGACTACAAGGATGACGACGA TAAGTAA	32
Flag-UnaG-NES	세포질	ATGGACTACAAGGATGACGACGATAAGATGGTTGAAAAATTTGTTGGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAA TTTTGGCGAATATCTGAAGGCTATCGGGGCGCCTAAAGAGCTGAGTGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTC TGTATATTTCACAGAAGGACGGTGATAAAATGACCGTTAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACA CAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGAATTTGATGAGTTCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGT CAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTATATGTCCAAAAATGGGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTA AAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTGACAATGGGCGACGTGGTGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAA CTGCAGCTGCCCCCCCTGGAGCGCCTGACCCTGGACTAA	33

표 7

[0043]

명명	타켓팅 영역	서열목록(5'->3')	서열 번호
Sec61B-UnaG-Flag	소포체 내강 방향 조면소포체 막	ATGCCTGGTCCGACCCCCAGTGGCACTAACGTGGGATCCTCAGGGCGCTCTCCCAGCAAAGCAGTGGCCGCCCG GGCGGCGGGATCCACTGTCCGGCAGAGGAAAAATGCCAGCTGTGGGACAAGGAGTGCAGGCCGCACAACCTCGG CAGGCACCGGGGGGGATGTGGCGATTCTACACAGAAGATTCACCTGGGCTCAAAGTTGGCCCTGTTCCAGTATTG GTTATGAGTCTTCTGTTCATCGCTTCTGTATTTATGTTGCACATTTGGGGCAAGTACACTCGTTCGAAGCTAGC AATGGTTGAAAAATTTGTTGGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGAAGGCTATCG GGGCGCCTAAAGAGCTGAGTGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGACGGTGAT AAAATGACCGTTAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGA ATTTGATGAGTTCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTAT ATGTCCAAAAATGGGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTG ACAATGGGCGACGTGGTGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAAGACTACAAGGATGACGACGATAAGTA A	34
UnaG-Flag-Sec61	세포질방향 조면 소포체 막	ATGGTTGAAAAATTTGTTGGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGAAGGCTATCGG GGCGCCTAAAGAGCTGAGTGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGACGGTGATA AAATGACCGTTAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGAA TTTGATGAGTTCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTATA TGTCCAAAAATGGGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTGA CAATGGGCGACGTGGTGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAAGACTACAAGGATGACGACGATAAGGAA TTCATGCCTGGTCCGACCCCCAGTGGCACTAACGTGGGATCCTCAGGGCGCTCTCCCAGCAAAGCAGTGGCCGC CCGGGCGGCGGGATCCACTGTCCGGCAGAGGAAAAATGCCAGCTGTGGGACAAGGAGTGCAGGCCGCACAACCT CGGCAGGCACCGGGGGGATGTGGCGATTCTACACAGAAGATTCACCTGGGCTCAAAGTTGGCCCTGTTCCAGTA TTGGTTATGAGTCTTCTGTTCATCGCTTCTGTATTTATGTTGCACATTTGGGGCAAGTACACTCGTTCGTGA	35

UnaG-Flag-PM	원형질막	ATGGTTGAAAAATTTGTTGGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGAAGGCTATCGG GGCGCCTAAAGAGCTGAGTGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGACGGTGATA AAATGACCGTTAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGAA TTTGATGAGTTCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTATA TGTCCAAAAATGGGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTGA CAATGGGCGACGTGGTGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAAGACTACAAGGATGACGACGATAAGGAA TTCCGCAGCAAGCTGAACCCCCCCGACGAGAGCGGCCCCGGCTGCATGAGCTGCAAGTGCGTGCTGAGCTGA	36
C1(1-29)-Flag-UnaG	활면소포체	ATGGATCCTGTGGTGGTGCTGGGGCTCTGTCTCTCCTGTTTGCTTCTCCTTTCACTCTGGAAACAGAGCTATGG GGGAGGGTCTGGTGGATCTGGTGGATCTAGAGACTACAAGGATGACGACGATAAGAAGCTAGCAATGGTTGAAA AATTTGTTGGTACGTGGAAAATAGCGGATTCTCATAATTTTGGCGAATATCTGAAGGCTATCGGGGCGCCTAAA GAGCTGAGTGATGGAGGCGATGCCACGACTCCAACTCTGTATATTTCACAGAAGGACGGTGATAAAATGACCGT TAAGATCGAGAATGGCCCGCCCACCTTCCTGGATACACAGGTAAAGTTTAAACTTGGTGAAGAATTTGATGAGT TCCCGAGCGACAGACGCAAAGGTGTTAAATCCGTAGTCAACTTGGTCGGAGAAAAACTCGTATATGTCCAAAAA TGGGATGGCAAAGAGACAACCTACGTGCGTGAAATTAAAGACGGGAAACTGGTTGTGACGCTGACAATGGGCGA CGTGGTGGCAGTGCGCTCGTACCGGCGTGCAACCGAATAA	37

[0044] 상기 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다.

[0045] 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0046] 상기 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다.

[0047] 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pcDNA3, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λgt4λB, λ-Charon, λΔ1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0048] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0049] 상기 (2) 단계는 공초점 형광 현미경 또는 형광 분광 광도계를 이용하여 형광세기를 측정하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 상기 (3) 단계는 면역형광법, 중합효소 연쇄반응, 노던 블랏 또는 유전자미세배열을 이용하여 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 상기 (4) 단계의 결정계수 및 추세를 확인은, UnaG 단백질의 형광세기와 발현 정도를 배경과의 대비하여 이를 수치화 하고, 수치화된 형광세기와 발현 정도를 좌표평면상에 표시하여 (X축: 발현 정도, Y축: 형광세기) 가장 표준편차가 적도록 추세선을 그리고, 상기 추세선의 기울기를 결정계수, 추세선과 각각의 데이터의 차이를 표준편차로 나타낸 것을 분석하여 수행하는 것일 수 있다.

[0052] 상기 수치화는 선형회귀분석(linear regression model)을 이용하였으며, 하기의 계산식을 이용하였다 (imagej 분석프로그램을 이용).

[0053] [계산식 1]

[0054] $$\hat{\beta} = \frac{\Sigma(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}$$

[0055] [계산식 2]

[0056] $$\hat{\alpha} = \bar{y} - \hat{\beta}\bar{x}$$

[0057] 상기 x_i 는 하나의 픽셀에 해당하는 발현 정도, y_i 는 형광 세기, $\bar{x}$ 는 평균 발현 정도, $\bar{y}$ 는 평균 형

광 세기, $\hat{\alpha}$ 는 추세선의 Y절편, $\hat{\beta}$ 은 추세선의 기울기로서 즉 $\hat{\beta}$ 이 결정계수를 의미한다.

[0058] 상기 결정계수는 상대적인 발현대비 형광세기 정도를 의미하며, 결정계수가 클수록 빌리루빈이 특정 소기관에 많이 분포함을 의미한다.

[0059] 상기 표준편차는 각각의 픽셀간의 분포를 의미하며, 표준편차가 작을수록 높은 연관성을 의미한다.

[0060] 상기 (3) 단계는 세포를 고정 및 투과 처리를 거친 뒤 수행하는 것일 수 있다.

[0061] 상기 고정은 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 상온에서 반응시키는 것일 수 있으며, 10 내지 20분, 11 내지 19분, 12 내지 18분, 13 내지 17분, 14 내지 16분, 예를 들어, 15분간 반응을 수행하는 것일 수 있다. 상기 상온은 20 내지 30℃, 22 내지 28℃, 24 내지 36℃, 예를 들어 25℃인 것일 수 있다.

[0062] 상기 투과 처리는 0.4% 트리톤-X100으로 상온에서 반응시키는 것일 수 있으며, 30 내지 90분, 40 내지 80분, 50 내지 70분, 예를 들어, 60분 동안 반응을 수행하는 것일 수 있다. 상기 상온은 20 내지 30℃, 22 내지 28℃, 24 내지 36℃, 예를 들어 25℃인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0063] 본 발명은 살아있는 세포 내 소기관에 존재하는 빌리루빈을 검출하는 방법에 관한 것으로, 세포 내 소기관 타겟팅 폴리뉴클레오타이드 및 UnaG 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이를 포함하는 재조합 벡터로 세포를 형질전환하는 단계, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 형광세기를 측정하는 단계, 형질전환된 세포에서의 UnaG 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계, 및 형광세기와 발현 정도를 비교하여 결정계수 및 추세를 확인하는 단계를 포함하는 세포 내 빌리루빈 정량 방법에 관한 것으로, 본 발명은 빌리루빈의 동적 이동과 이와 관련한 매커니즘 규명할 수 있는 가능성을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 UnaG 단백질이 빌리루빈(bilirubin; BR)과 결합하여 형광을 타나내는 메커니즘을 나타낸 그림이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 UnaG 단백질이 세포의 목적 소기관에서 발현된 모습을 나타낸 모식도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 UnaG 단백질을 세포 내 목적 소기관에서 발현하기 위한 유전자 구조 지도(Genetic construct map)를 타나낸 그림이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 세포 내의 소기관에 존재하는 빌리루빈의 양을 분석하여 빌리루빈의 동적 이동과 이와 관련된 매커니즘을 나타낸 그림이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 세포 내의 소기관에 존재하는 빌리루빈의 양을 분석하여 빌리루빈의 동적 이동과 이와 관련된 매커니즘을 나타낸 그림이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 내의 소기관(핵, 세포질, 원형질막, 미토콘드리아 기질 및 막 사이 공간, 활면소포체, 조면소포체의 내강 및 외막의 세포질방향, 내강방향)을 타겟팅 할 수 있는 UnaG 단백질을 살아있는 HEK-293T 세포 내에서 발현시켜 공초점 형광 현미경을 통해 분석한 결과를 보여주는 사진이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 내의 소기관(핵, 세포질, 원형질막, 미토콘드리아 기질 및 막 사이 공간, 활면소포체, 조면소포체의 내강 및 외막의 세포질방향, 내강방향)을 타겟팅 할 수 있는 UnaG 단백질을 살아있는 N2a 세포 내에서 발현시켜 공초점 형광 현미경을 통해 분석한 결과를 보여주는 사진이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 내의 소기관(핵, 세포질, 원형질막, 미토콘드리아 기질 및 막 사이 공간, 활면소포체, 조면소포체의 내강 및 외막의 세포질방향, 내강방향)을 타겟팅 할 수 있는 UnaG 단백질을 살아있는 U2OS 세포 내에서 발현시켜 공초점 형광 현미경을 통해 분석한 결과를 보여주는 사진이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 내의 소기관(핵, 세포질, 원형질막, 미토콘드리아 기질 및 막 사이 공간, 활면소포체, 조면소포체의 내강 및 외막의 세포질방향, 내강방향)을 타겟팅 할 수 있는 UnaG 단백질을 살아있는 세포 내에서 발현시켜 공초점 형광 현미경을 통해 분석한 결과를 보여주는 사진이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 HEK-293T 세포에서의 Scatter plot 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 N2a 세포에서의 Scatter plot 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 U2OS 세포에서의 Scatter plot 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 N2a 및 N2a-APP 세포주에서의 UnaG 형광 및 면역형광 결과를 보여주는 사진이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 N2a 및 N2a-APP 세포주에서의 UnaG 형광 및 면역형광 결과를 바탕으로 결정계수를 도식화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0067] **실시예 1. 재조합 벡터 제작**

[0068] HEK293T 세포의 각기 다른 세포 소기관(예. 미토콘드리아 기질 공간(mitochondria matrix), 미토콘드리아 이중막 사이 공간(Intermembrane Space of Mitochondrial, IMS), 미토콘드리아의 외막 공간(outer mitochondrial membrane, OMM), 소포체, 핵, 세포질, 골지체 등)에 UnaG 단백질을 도입하기 위하여, 각 세포 소기관으로 타겟팅하는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자와 UnaG 단백질을 코딩하는 유전자 서열(서열번호 23)이 연결된 폴리뉴클레오타이드를 pcDNA3벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하였다. 재조합 과정은 본 분야에 잘 알려진 통상의 방법에 따라 수행하였으며, 상기 벡터의 구성 및 특징을 하기 표 8에 정리하였다.

표 8

[0069]

플라스미드	특징	발현위치	Promoter/ Vector	세부사항
UnaG-Flag-NLS	NotI-UnaG-Flag-EcoRI-NLS-Stop-XhoI	핵	CMV/ pCDNA3	NLS: PKKKRKVDPKKKRKVDPKKKRKV Flag: DYKDDDDK
LACTB-UnaG-Flag	NotI-LACTB-BamHI-UnaG-Flag-Stop-XhoI	미토콘드리아 이중막 사이 공간	CMV/ pCDNA3	LACTB(1-68): MYRLLSSVTARAAATAGPAWDGGRRGAHRRPGLPVLGLGWAGGLGLGLGLALGAKLVVGLRGAVPIQS
Tom20-Flag-UnaG	KpnI-Tom20-10aalinker-BamHI-Flag-NheI-UnaG-Stop-XhoI	미토콘드리아 외막	CMV/ pCDNA5	10aa linker : GSSGGSGGSR Tom20 (NM_014765.2)
ScoI-UnaG-Flag	NotI-ScoI-BamHI-UnaG-Flag-Stop-XhoI	미토콘드리아 이중막 사이 공간	CMV/ pCDNA3	Sco1 (NM_004589)
ss-UnaG-Flag-KDEL	EcoRI-IgK ss-ApaI-BglII-UnaG-Flag-KDEL-Stop-NotI	소포체 내강	CMV/ pDisplay	ss: METDTLLLWVLLLWVPGSTGD KDEL: ER retention motif
Mito-UnaG-Flag	NotI-Mito-BamHI-UnaG-Flag-Stop-XhoI	미토콘드리아 기질	CMV/ pCDNA3	Mito matrix targeting sequence: MLATRVFSLVGKRAISTSVCVRAH
Flag-UnaG-NES	NotI-Flag-UnaG-NES-Stop-XhoI	세포질	CMV/ pCDNA3	NES: LQLPPLERLTLD
Sec61B-UnaG-Flag	NotI-Sec61B-NheI-UnaG-Flag-Stop-XhoI	소포체 내강 방향 조면 소포체 막	CMV/ pCDNA3	Sec61B (NM_006808)
UnaG-Flag-Sec61B	NotI-UnaG-Flag-EcoRI-Sec61B-Stop-XhoI	세포질 방향 조면 소포체 막	CMV/ pCDNA3	Sec61B (NM_006808)
UnaG-Flag-PM	NotI-UnaG-Flag-EcoRI-PM-Stop-XhoI	원형질막	CMV/ pCDNA3	
ss C1(1-29) P450-linker-Flag-UnaG	NotI-ss C1(1-29) P450-linker-Flag-NheI-UnaG-Stop-XhoI	활면 소포체 막	CMV/ pCDNA3	C1(1-29): MDPVVVLGLCLSCLLLLSLW KQSYGGGKL (endoplasmic reticulum membrane anchor

[0070] **실시예 2. 형질전환 및 단백질 발현**

[0071] 실시예 1에서 제조한 벡터를 세포에 도입시키기 위해, ATCC에서 구입한 HEK293T 세포, N2a 세포 및 U2OS 세포에 상기 벡터를 리포펙타민(Lipofectamin) transfection reagent를 사용하여 도입하여 형질전환 시켰다.

[0072] 그 다음, 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)이 함유된 MEM(Minimum Essential Medium) 배지에 36℃로 16 내지 24 시간동안 CO_2 배양기에서 배양하였다. 그 다음, DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 3번 씻어주어 단백질이 발현된 세포를 수득하였다.

[0074] **실시예 3. 단백질 발현 확인**

[0075] **3-1. 공초점 형광 현미경을 통한 살아있는 세포 내의 형광확인**

[0076] 실시예 2의 단백질이 발현된 세포(HEK293T 세포, N2a 세포 및 U2OS 세포)를 4℃ DPBS용액에서 여자파장(excitation wavelength)을 488mm에서, 방사파장 (emission wavelength)을 510mm에서 공초점 형광 현미경을 통해 형광세기를 측정하였다. 그 다음, 최종농도가 10uM이 되도록 빌리루빈을 첨가하여 UnaG 단백질이 포화가 되지는 않았는지 확인한다. 그 결과를 도 6 내지 8에 나타내었다.

[0077] 도 6 내지 8에서 확인할 수 있듯이, HEK293T 세포, N2a 세포 및 U2OS 세포 모두에서 세포 내 형광이 확인되어, 모든 세포 내 소기관에서 UnaG 단백질이 모두 잘 발현이 잘 되고 빌리루빈을 잘 검출되고 있음을 알 수 있었다. 또한, 기존의 견해와 달리 빌리루빈이 분포하는 정도가 고르지 않아 빌리루빈의 동적 이동과 의학적, 생물학적 메커니즘을 연구할 수 있음을 확인하였다.

[0079] **3-2. 공초점 형광 현미경을 통한 단백질 발현 확인**

[0080] 실시예 2의 단백질이 발현된 세포(HEK293T 세포, N2a 세포 및 U2OS 세포)를 4% PFA용액(Para-Formaldehyde)으로 상온에서 15분 고정을 시킨 다음, 0.4% Triton X100 용액으로 상온에서 1시간 투과를 진행하였다. 그 다음, 2% BSA가 들어간 DPBS용액으로 1시간 동안 상온에서 교반하였다. 2%의 투석된 BSA 용액에 1차 항체 (예를 들어, anti-FLAG-mouse antibody) 를 3000:1로 희석하여 1시간동안 상온에서 교반하였다. 그 다음, 1회당 5분씩 총 4회 DPBS로 세포를 씻어주었다. 2%의 투석된 BSA 용액에 2차 항체 (예를 들어, anti-647-mouse antibody) 를 3000:1로 희석하여 1시간동안 상온에서 교반하였다. 그 다음, 1회당 5분씩 총 4회 DPBS로 세포를 씻어주었다.

[0081] 4℃ DPBS용액에서 UnaG의 형광측정은 각각 여자파장(excitation wavelength)을 488mm에서, 방사파장(emission wavelength)을 510mm에서 공초점 형광 현미경을 통해 형광세기를 측정하였다. UnaG의 발현 정도 측정은 각각 여자파장(excitation wavelength)을 651mm에서, 방사파장(emission wavelength)을 667mm에서 공초점 형광 현미경을 통해 형광세기를 측정하고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0082] 도 9에서 확인할 수 있듯이, UnaG단백질의 발현 정도를 면역형광법으로 확인하였고 이를 형광세기와 비교하여 정량분석을 가능함을 알 수 있었다.

[0084] **실시예 3. 세포 내 소기관의 빌리루빈 정량 분석**

[0085] 세포 내 소기관은 조금씩 그 환경이 달라 이에 UnaG의 발현 정도가 달라질 수 있을 가능성이 있기에 각각의 소기관에서 발현되는 정도를 면역형광법을 이용하여 측정하고 그에 해당하는 부분의 형광세기를 비교하여, 발현 정도 대비 형광세기를 측정을 통해 각각의 소기관에 존재하는 빌리루빈의 양을 정량 분석하였다.

[0086] 구체적으로, 공초점 현광현미경을 통해 얻은 이미지에서 각각의 픽셀이 가지는 형광세기와 발현 정도를 gray scale index(0~255)로 변환하여 즉, 이미지상에서 배경과 대비하여 얼마나 차이를 보이는지를 수치화하였다.

[0087] 그 다음, 수치화된 형광세기와 발현 정도를 좌표평면상에 표시하여 (X축: 발현 정도, Y축: 형광세기) 가장 표준편차가 적도록 추세선을 그린 후, 이 추세선의 기울기를 결정계수로 표현하고, 추세선과 각각의 데이터의 차이를 표준편차로 나타낸 것을 분석하였다. 그 결과를 도 10 내지 14, 및 표 9에 나타내었다.

표 9

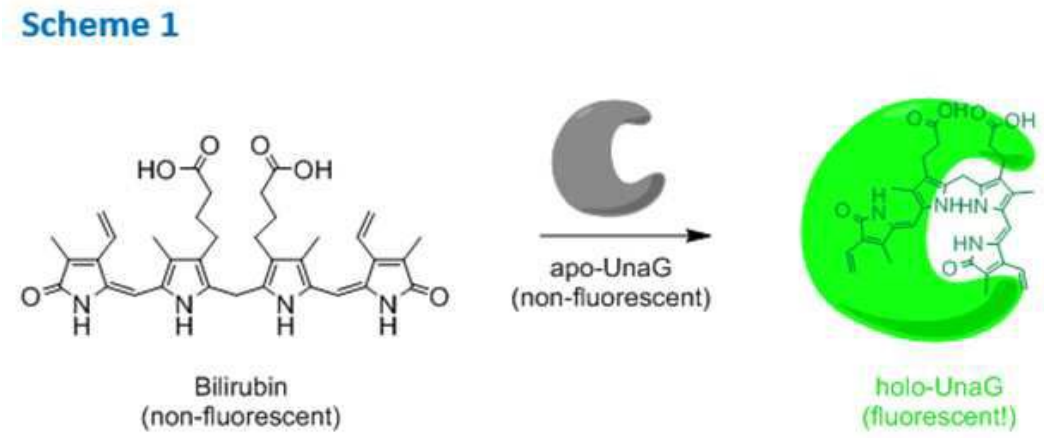
[0088]

세포내 소기관	셀 라인 구분	결정계수
UnaG-Sec61B	N2a	2.11
	N2a-APP	0.64
KDEL	N2a	0.62
	N2a-APP	0.20
NLS	N2a	1.66
	N2a-APP	0.93
Mito	N2a	0.61
	N2a-APP	0.16
PM	N2a	1.39
	N2a-APP	0.29

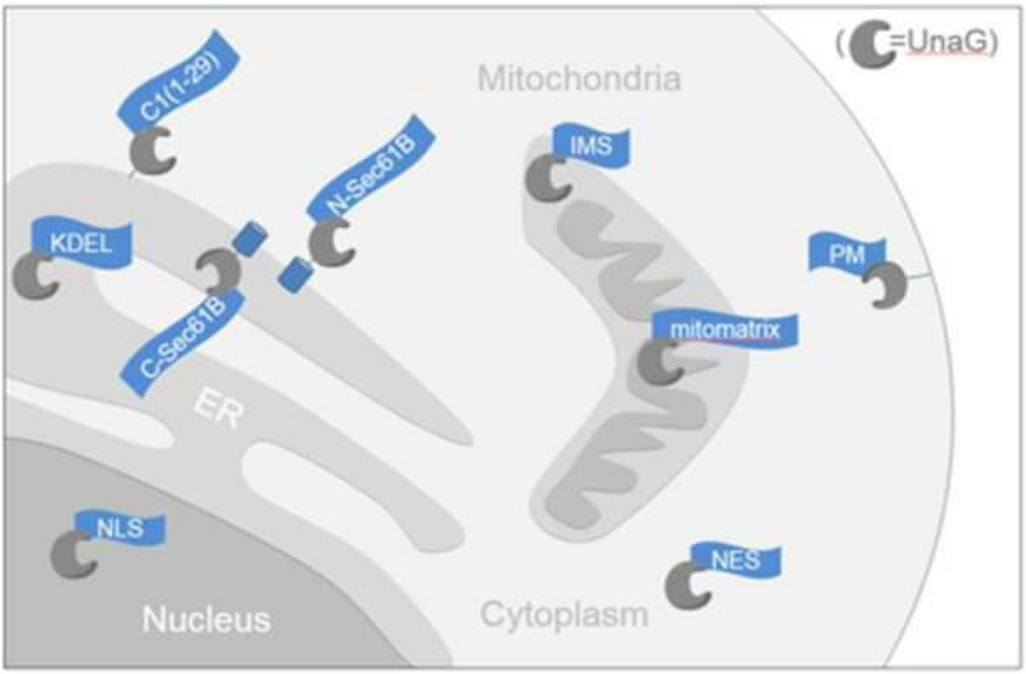
[0089] 도 13 내지 14 및 표 9에서 확인할 수 있듯이, APP 단백질의 유무로 인해 세포 내 여러 소기관에서 빌리루빈 양을 줄여주는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 APP 단백질에 의한 빌리루빈의 의학적, 생물학적 매커니즘을 연구할 수 있는 좋은 수단으로 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

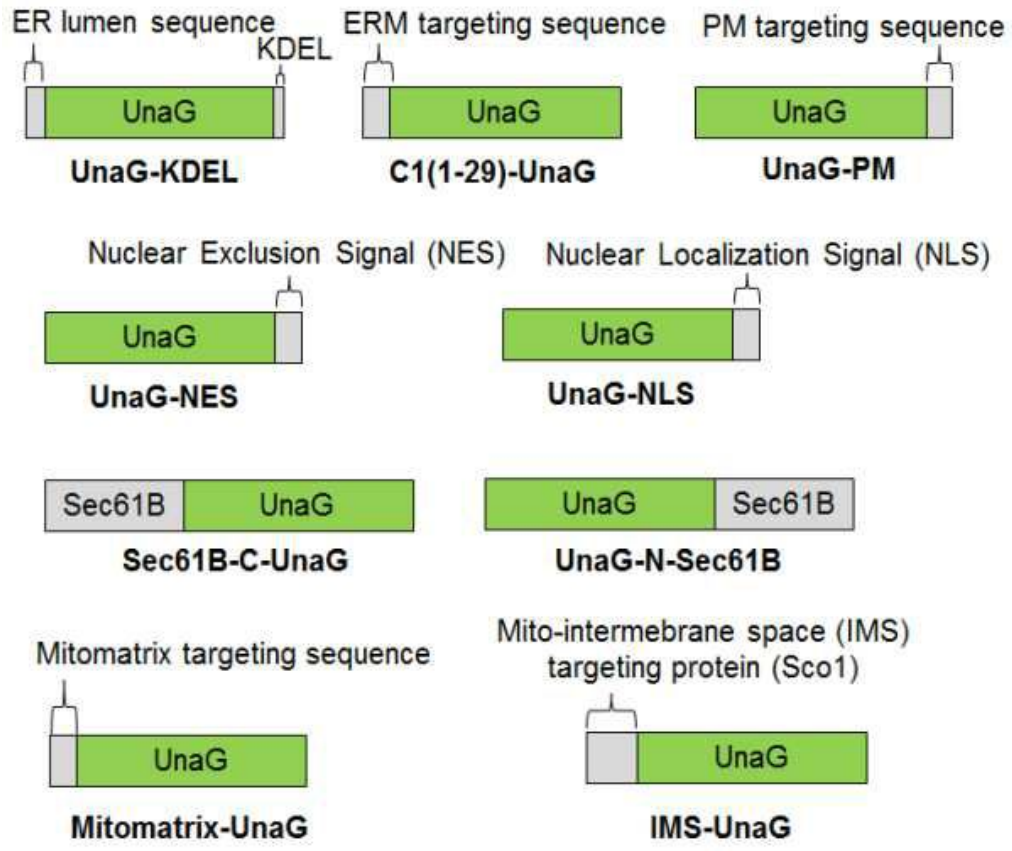
도면1



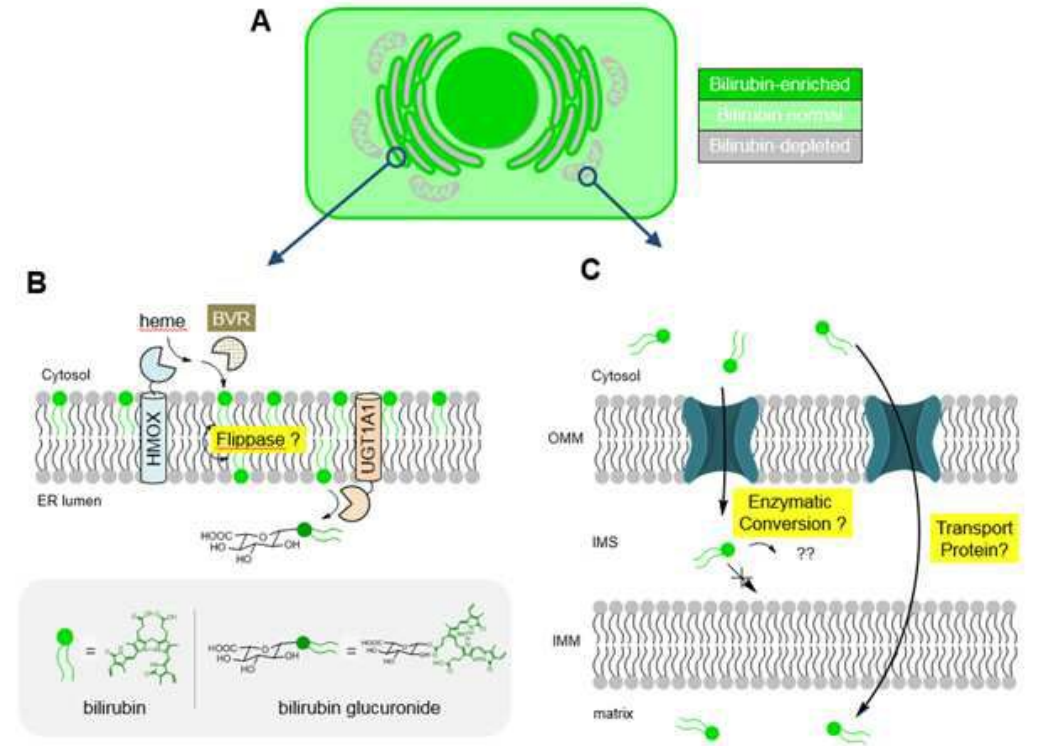
도면2


(=UnaG)
Mitochondria
C1(1-29)
N-Sec61B
IMS
KDEL
PM
mitomatrix
C-Sec61B
ER
NLS
NES
Nucleus
Cytoplasm

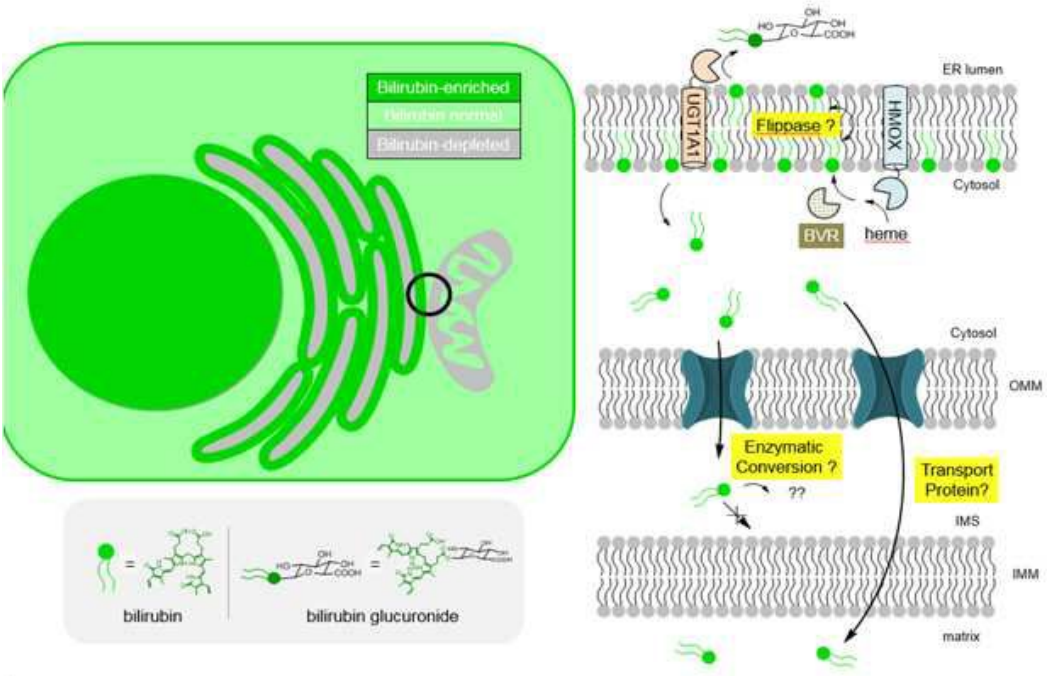
도면3


ER lumen sequence
KDEL
UnaG
UnaG-KDEL
ERM targeting sequence
UnaG
C1(1-29)-UnaG
PM targeting sequence
UnaG
UnaG-PM
Nuclear Exclusion Signal (NES)
UnaG
UnaG-NES
Nuclear Localization Signal (NLS)
UnaG
UnaG-NLS
Sec61B
UnaG
Sec61B-C-UnaG
UnaG
Sec61B
UnaG-N-Sec61B
Mitomatrix targeting sequence
UnaG
Mitomatrix-UnaG
Mito-intermebrane space (IMS) targeting protein (Sco1)
UnaG
IMS-UnaG

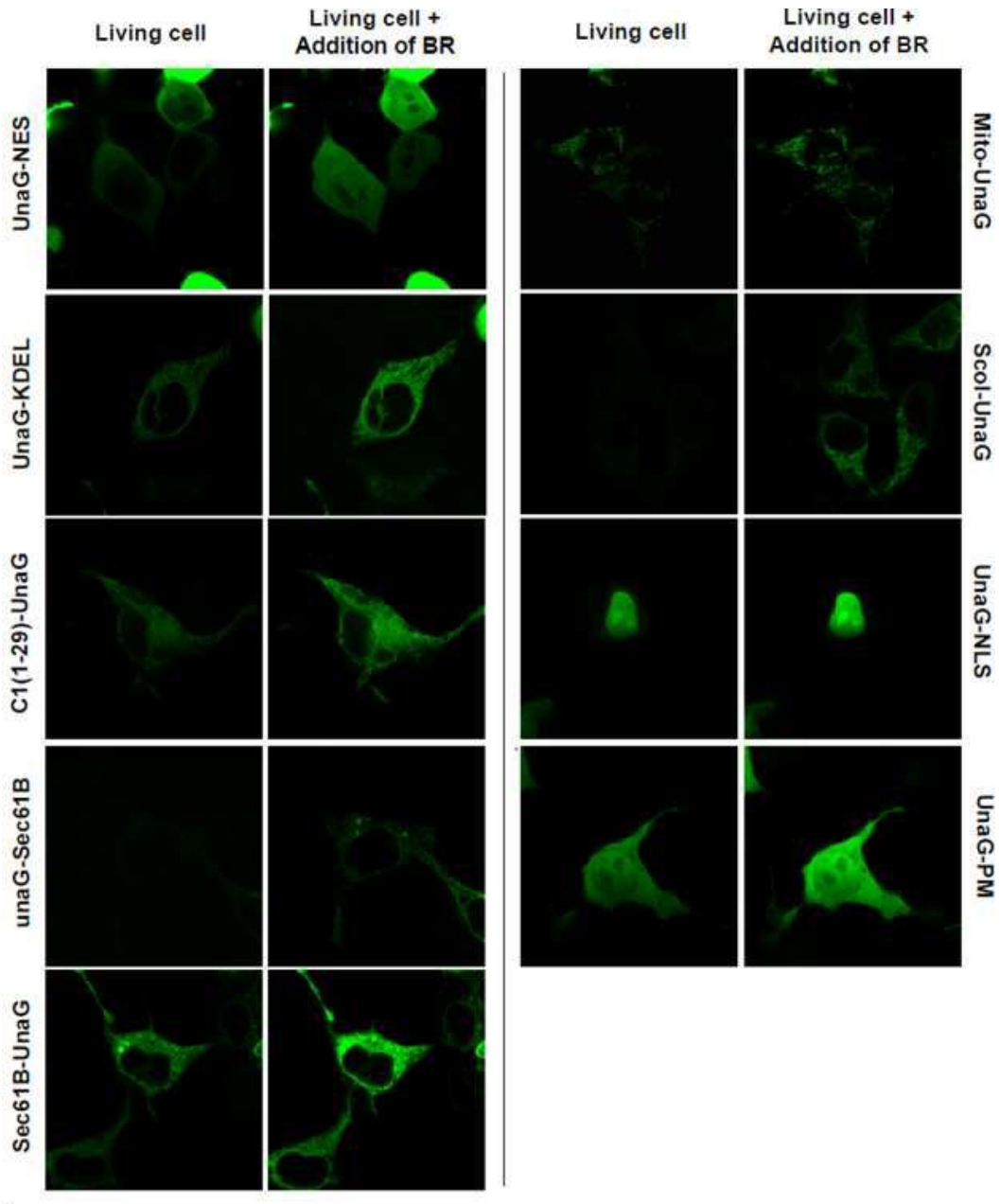
도면4


A
Bilirubin-enriched
Bilirubin-depleted
B
heme
BVR
Cytosol
HMOX
Flippase ?
UGT1A1
ER lumen
bilirubin
bilirubin glucuronide
C
Cytosol
OMM
Enzymatic Conversion ?
??
Transport Protein?
IMS
IMM
matrix

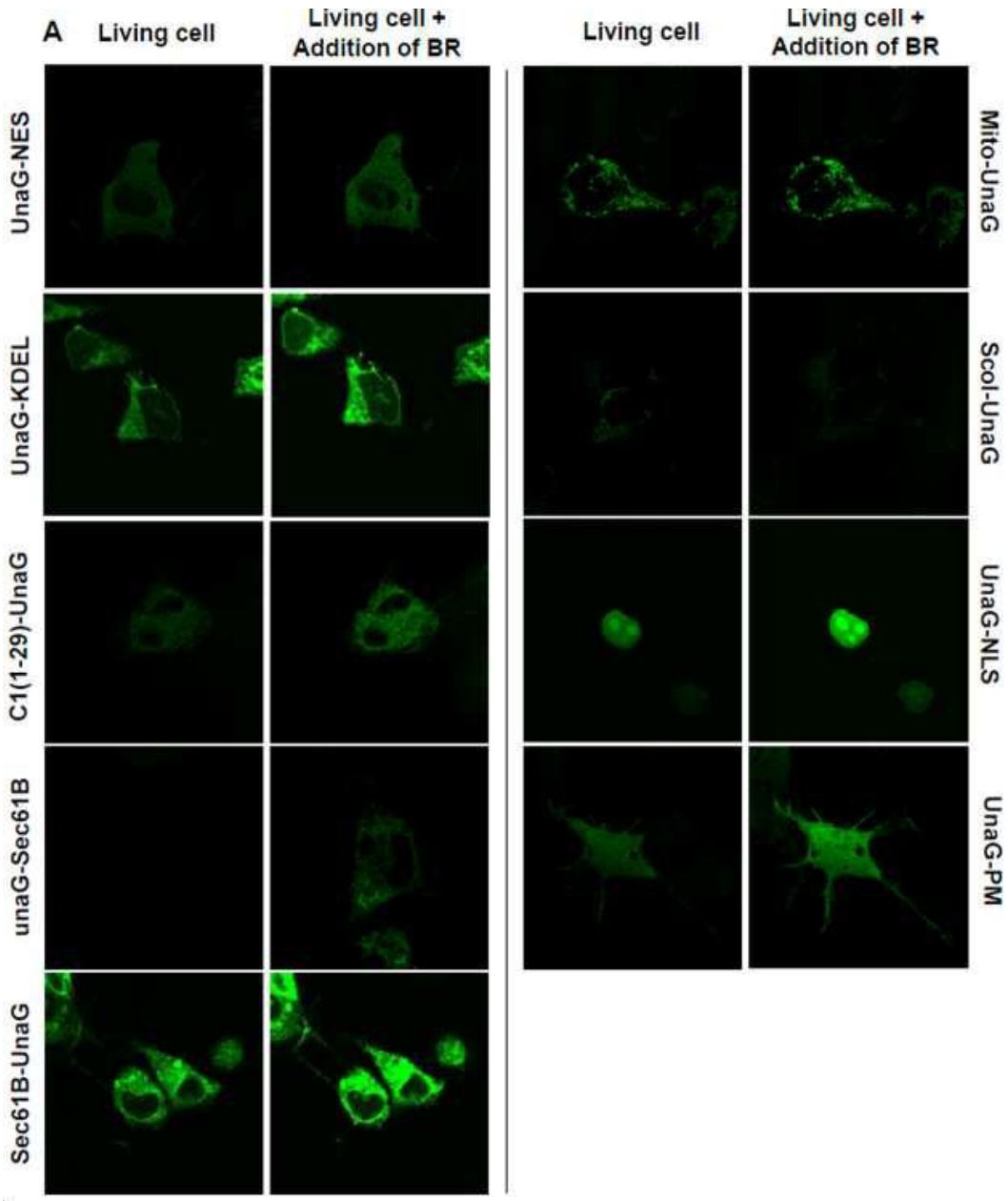
도면5


Bilirubin-enriched
Bilirubin-depleted
bilirubin
bilirubin glucuronide
ER lumen
UGT1A1
Flippase ?
HMOX
Cytosol
BVR
heme
Cytosol
OMM
Enzymatic Conversion ?
??
Transport Protein?
IMS
IMM
matrix

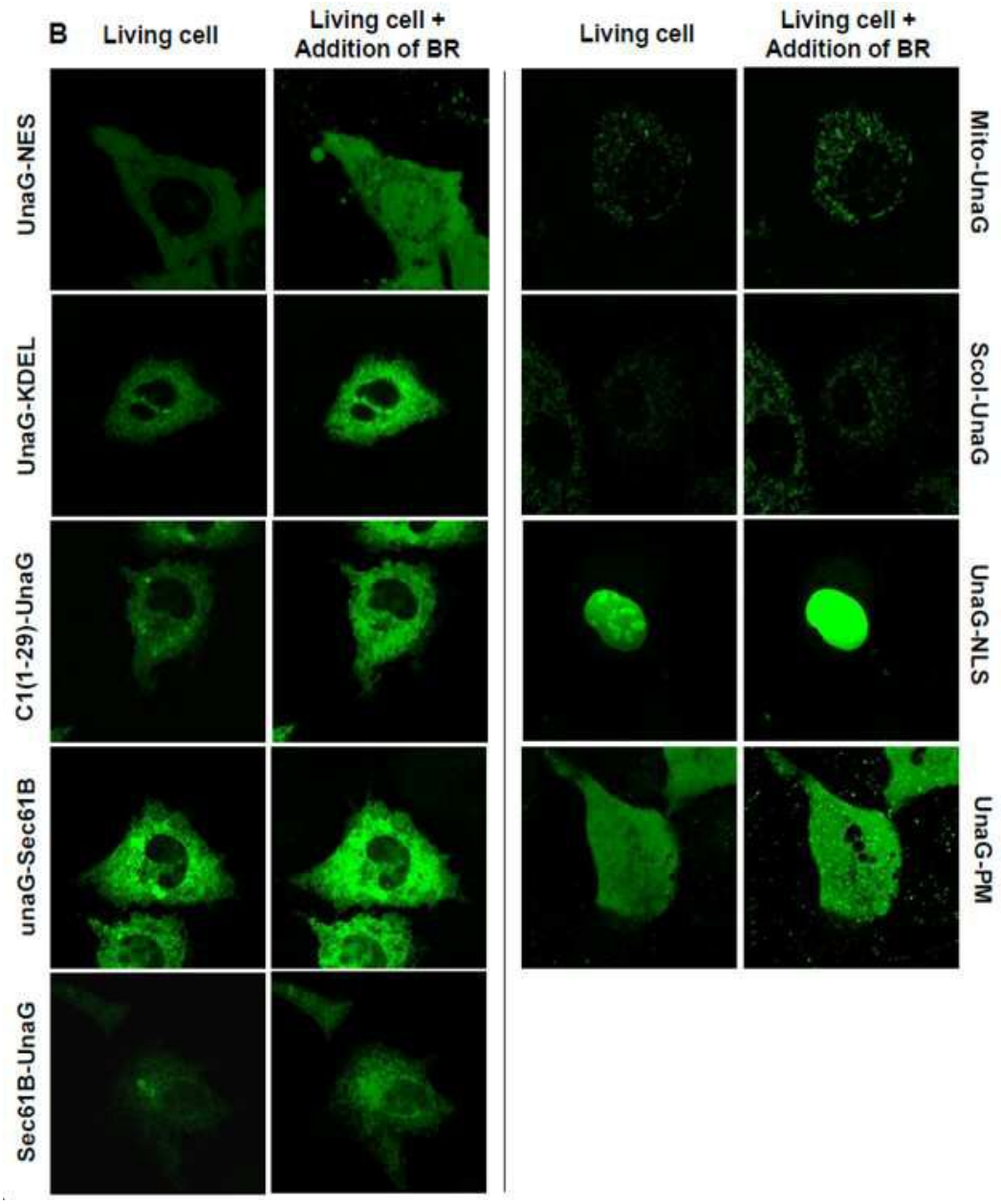
도면6


Living cell
Living cell + Addition of BR
Living cell
Living cell + Addition of BR
UnaG-NES
UnaG-KDEL
C1(1-29)-UnaG
unaG-Sec61B
Sec61B-UnaG
Mito-UnaG
Scol-UnaG
UnaG-NLS
UnaG-PM

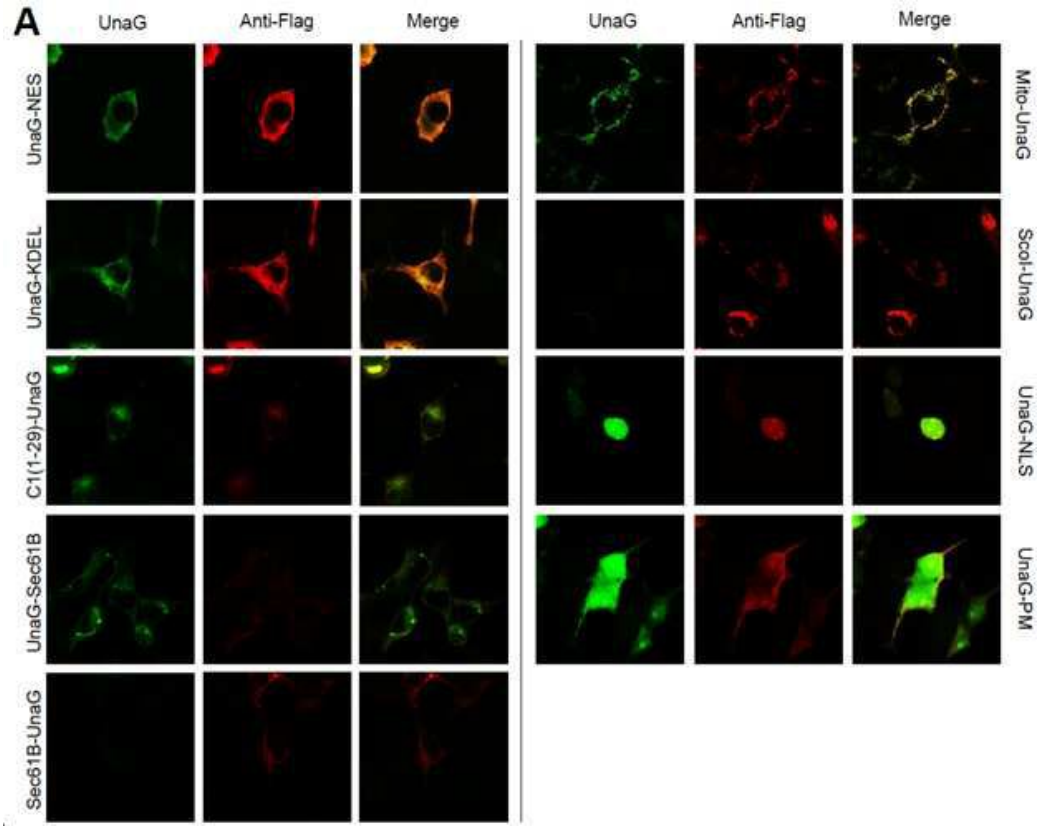
도면7


A
Living cell
Living cell + Addition of BR
Living cell
Living cell + Addition of BR
UnaG-NES
UnaG-KDEL
C1(1-29)-UnaG
unaG-Sec61B
Sec61B-UnaG
Mito-UnaG
ScoI-UnaG
UnaG-NLS
UnaG-PM

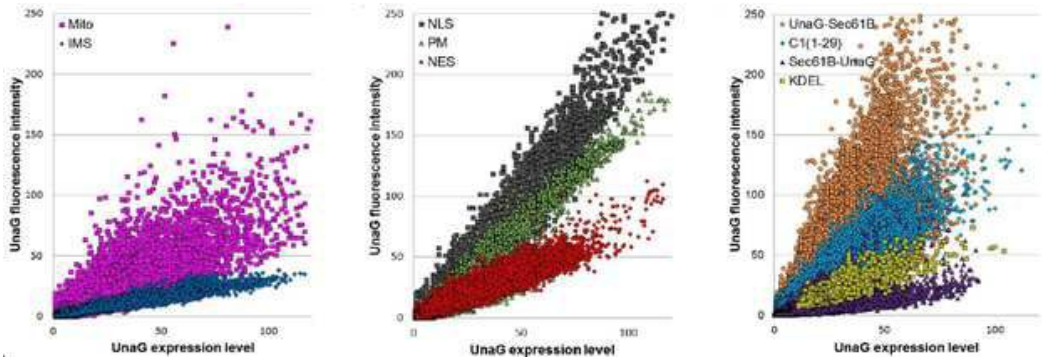
도면8


B
Living cell
Living cell + Addition of BR
Living cell
Living cell + Addition of BR
UnaG-NES
UnaG-KDEL
C1(1-29)-UnaG
unaG-Sec61B
Sec61B-UnaG
Mito-UnaG
ScoI-UnaG
UnaG-NLS
UnaG-PM

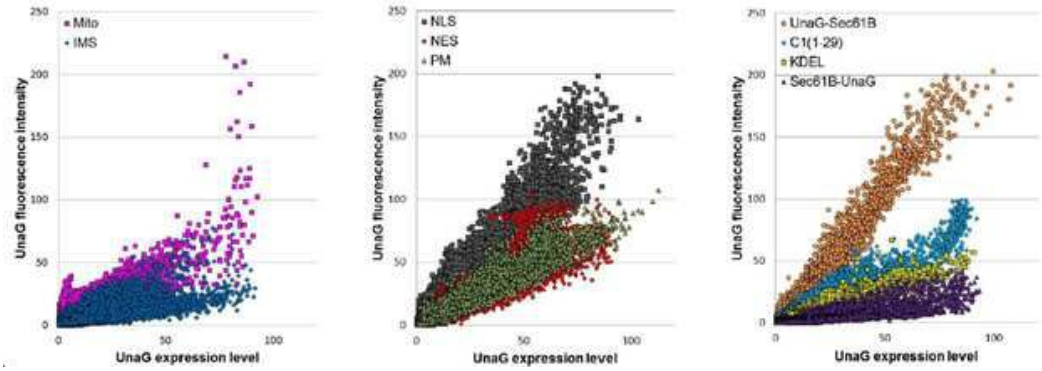
도면9



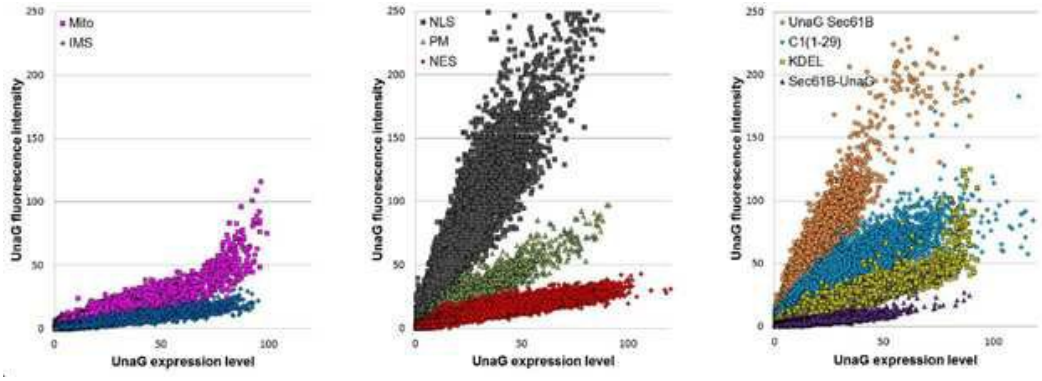
도면10



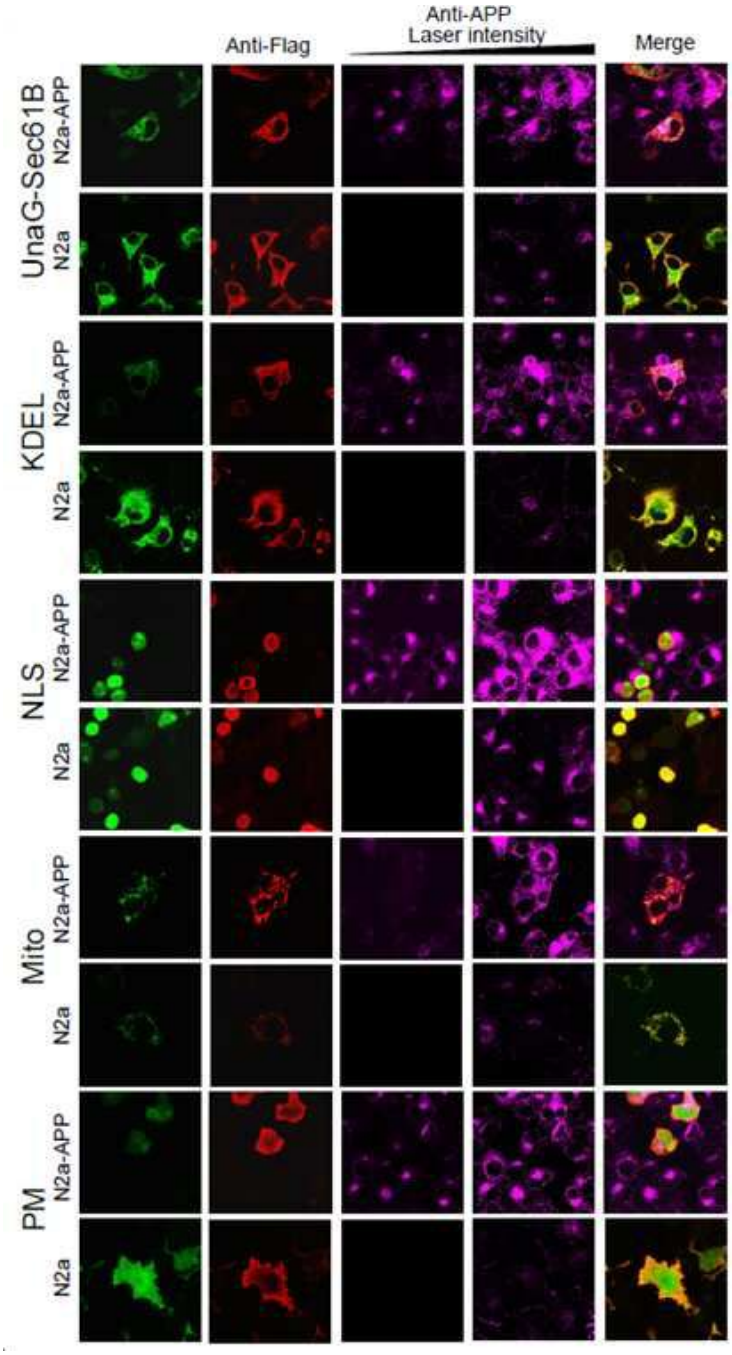
도면11



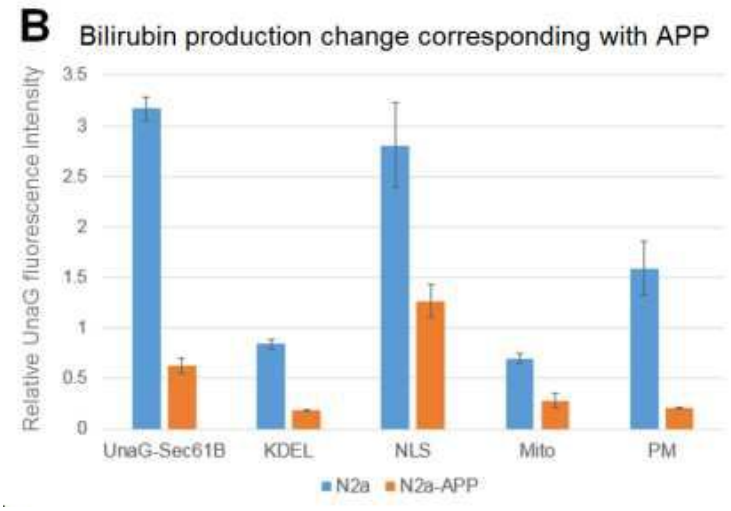
도면12


Mito
IMS
NLS
PM
NES
UnaG Sec61B
C1(1-29)
KDEL
Sec61B-UnaG
UnaG fluorescence intensity
UnaG expression level
0
50
100
150
200
250

도면13


Anti-Flag
Anti-APP
Laser intensity
Merge
UnaG-Sec61B
KDEL
NLS
Mito
PM
N2a-APP
N2a

도면14



서 열 목 록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> method for detecting subcellular bilirubin by UnaG protein

<130> DPP20154502KR

<160> 48

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS

<400> 1

agcagggccg accccaagaa gaagaggaag gtggacccca agaagaagag gaaggtggac 60

cccaagaaga agaggaaggt g 81

<210> 2

<211> 204

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> LACTB

<400> 2

atgtaccggc tcctgtcaag cgtgacagct cgggctgcgg ccaccgcagg cccagcctgg 60

gacggagggc ggcgcggggc gcacaggcga ccgggcctgc ctgtgctggg ccttggttgg 120

gccggcggcc tggggctcgg gctggggctg gctctcggcg cgaagctggt ggtcgggctg 180

cggggcgccg tccccattca gtcc 204

<210> 3

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tom20

<400> 3

atggtgggtc ggaacagcgc catcgccgcc ggtgtatgcg gggccctttt cattgggtac 60

tgcatctact tcgaccgcaa aagacgaagt gaccccaact tcaagaacag gcttcgagaa 120

cgaagaaaga aacagaagct tgccaaggag agagctgggc tttccaagtt acctgacctt 180

aaagatgctg aagctgttca gaagttcttc cttgaagaaa tacagcttgg tgaagagtta 240

ctagctcaag gtgaatatga gaagggcgta gaccatctga caaatgcaat tgctgtgtgt 300

ggacagccac agcagttact gcaggtctta cagcaaactc ttccaccacc agtgttccag 360

atgcttctga ctaagctccc aacaattagt cagagaattg taagtgctca gagcttggct 420

gaagatgatg tggaa 435

<210> 4

<211> 903

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ScoI

<400> 4

atggcgatgc tggtcctagt acccggacga gttatgcggc ctctgggtgg ccaactttgg 60

cgcttcttgc ctcgcggact cgagttttgg ggcccagccg aggggactgc gagagtcttg 120

ctgaggcagt tctgcgcgcg gcaagcggag gcgtggcgtg cctcggggcg ccctggctat 180

tgcctgggaa cccggcccct cagcactgcg aggccgccac ccccgtggtc gcagaagggc 240

cccggagact ccacgcgccc ctcgaagccc gggcctgttt cctggaagtc tttagcaatc 300

acatttgcta ttggaggagc tttactggct ggaatgaagc acgtcaagaa agaaaaggca 360

gagaagttag agaaggaacg gcagcgacac atcggcaagc ctttacttgg gggaccgttt 420

tccctcacaa ctcatactgg ggagcgtaaa actgacaagg actacttggg tcagtggtta 480

ttgatttatt ttggcttcac tcattgccct gatgtctgtc cagaagaact agaaaagatg 540

attcaagtcg tggatgaaat agatagcatt acaactctgc cagatctaac tccacttttc 600

atcagcattg acccagagag ggacacaaaa gaagccatcg caaattatgt gaaagaattt 660

tctcccaaac tggttggctt gactggcacg agagaagagg tcgatcaagt ggccagagca 720

tacagagtgt attacagccc tggccccaag gacgaagatg aagactacat agtggatcac 780

acaataataa tgtacttgat tggaccagat ggtgagtttc tagattattt tggccagaac 840

aagaggaagg gagaaatagc tgcttcaatt gccacacaca tgaggccata cagaaaaaag 900

agc 903

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KDEL

<400> 5

aaggacgagc tg 12

<210> 6

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mito

<400> 6

atgctggcca cccgcgtgtt cagcctggtg ggcaagcgcg ccatcagcac cagcgtgtgc 60

gtgcgcgccc ac 72

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NES

<400> 7

ctgcagctgc ccccctgga gcgcctgacc ctggac 36

<210> 8

<211> 288

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sec61B

<400> 8

atgcctggtc cgacccccag tggcactaac gtgggatcct cagggcgctc tcccagcaaa 60

gcagtggccg cccgggcggc gggatccact gtccggcaga ggaaaaatgc cagctgtggg 120

acaaggagtg caggccgcac aacctcggca ggcaccgggg ggatgtggcg attctacaca 180

gaagattcac ctgggctcaa agttggccct gttccagtat tggttatgag tcttctgttc 240

atcgcttctg tatttatgtt gcacatttgg ggcaagtaca ctcgttcg 288

<210> 9

<211> 288

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sec61

<400> 9

atgcctggtc cgacccccag tggcactaac gtgggatcct cagggcgctc tcccagcaaa 60

gcagtggccg cccgggcggc gggatccact gtccggcaga ggaaaaatgc cagctgtggg 120

acaaggagtg caggccgcac aacctcggca ggcaccgggg ggatgtggcg attctacaca 180

gaagattcac ctgggctcaa agttggccct gttccagtat tggttatgag tcttctgttc 240

atcgcttctg tatttatgtt gcacatttgg ggcaagtaca ctcgttcg 288

<210> 10

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PM

<400> 10

cgcagcaagc tgaacccccc cgacgagagc ggccccggct gcatgagctg caagtgcgtg 60

ctgagc 66

<210> 11

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C1(1-29)

<400> 11

atggatcctg tggtggtgct ggggctctgt ctctcctgtt tgcttctcct ttcactctgg 60

aaacagagct atgggggagg g 81

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS

<400> 12

Ser Arg Ala Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Pro Lys Lys Lys

1 5 10 15

Arg Lys Val Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20 25

<210> 13

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LACTB

<400> 13

Met Tyr Arg Leu Leu Ser Ser Val Thr Ala Arg Ala Ala Ala Thr Ala

1 5 10 15

Gly Pro Ala Trp Asp Gly Gly Arg Arg Gly Ala His Arg Arg Pro Gly

20 25 30

Leu Pro Val Leu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Gly Leu Gly Leu Gly Leu

35 40 45

Gly Leu Ala Leu Gly Ala Lys Leu Val Val Gly Leu Arg Gly Ala Val

50 55 60

Pro Ile Gln Ser

65

<210> 14

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tom20

<400> 14

Met Val Gly Arg Asn Ser Ala Ile Ala Ala Gly Val Cys Gly Ala Leu

1 5 10 15

Phe Ile Gly Tyr Cys Ile Tyr Phe Asp Arg Lys Arg Arg Ser Asp Pro

20 25 30

Asn Phe Lys Asn Arg Leu Arg Glu Arg Arg Lys Lys Gln Lys Leu Ala

35 40 45

Lys Glu Arg Ala Gly Leu Ser Lys Leu Pro Asp Leu Lys Asp Ala Glu

50 55 60

Ala Val Gln Lys Phe Phe Leu Glu Glu Ile Gln Leu Gly Glu Glu Leu

65 70 75 80

Leu Ala Gln Gly Glu Tyr Glu Lys Gly Val Asp His Leu Thr Asn Ala

85 90 95

Ile Ala Val Cys Gly Gln Pro Gln Gln Leu Leu Gln Val Leu Gln Gln

100 105 110

Thr Leu Pro Pro Pro Val Phe Gln Met Leu Leu Thr Lys Leu Pro Thr

115 120 125

Ile Ser Gln Arg Ile Val Ser Ala Gln Ser Leu Ala Glu Asp Asp Val

130 135 140

Glu

145

<210> 15

<211> 301

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ScoI

<400> 15

Met Ala Met Leu Val Leu Val Pro Gly Arg Val Met Arg Pro Leu Gly

1 5 10 15

Gly Gln Leu Trp Arg Phe Leu Pro Arg Gly Leu Glu Phe Trp Gly Pro

20 25 30

Ala Glu Gly Thr Ala Arg Val Leu Leu Arg Gln Phe Cys Ala Arg Gln

35 40 45

Ala Glu Ala Trp Arg Ala Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Cys Leu Gly Thr

50 55 60

Arg Pro Leu Ser Thr Ala Arg Pro Pro Pro Pro Trp Ser Gln Lys Gly

65 70 75 80

Pro Gly Asp Ser Thr Arg Pro Ser Lys Pro Gly Pro Val Ser Trp Lys

85 90 95

Ser Leu Ala Ile Thr Phe Ala Ile Gly Gly Ala Leu Leu Ala Gly Met

100 105 110

Lys His Val Lys Lys Glu Lys Ala Glu Lys Leu Glu Lys Glu Arg Gln

115 120 125

Arg His Ile Gly Lys Pro Leu Leu Gly Gly Pro Phe Ser Leu Thr Thr

130 135 140

His Thr Gly Glu Arg Lys Thr Asp Lys Asp Tyr Leu Gly Gln Trp Leu

145 150 155 160

Leu Ile Tyr Phe Gly Phe Thr His Cys Pro Asp Val Cys Pro Glu Glu

165 170 175

Leu Glu Lys Met Ile Gln Val Val Asp Glu Ile Asp Ser Ile Thr Thr

180 185 190

Leu Pro Asp Leu Thr Pro Leu Phe Ile Ser Ile Asp Pro Glu Arg Asp

195 200 205

Thr Lys Glu Ala Ile Ala Asn Tyr Val Lys Glu Phe Ser Pro Lys Leu

210 215 220

Val Gly Leu Thr Gly Thr Arg Glu Glu Val Asp Gln Val Ala Arg Ala

225 230 235 240

Tyr Arg Val Tyr Tyr Ser Pro Gly Pro Lys Asp Glu Asp Glu Asp Tyr

245 250 255

Ile Val Asp His Thr Ile Ile Met Tyr Leu Ile Gly Pro Asp Gly Glu

260 265 270

Phe Leu Asp Tyr Phe Gly Gln Asn Lys Arg Lys Gly Glu Ile Ala Ala

275 280 285

Ser Ile Ala Thr His Met Arg Pro Tyr Arg Lys Lys Ser

290 295 300

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KDEL

<400> 16

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mito

<400> 17

Met Leu Ala Thr Arg Val Phe Ser Leu Val Gly Lys Arg Ala Ile Ser

1 5 10 15

Thr Ser Val Cys Val Arg Ala His

20

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NES

<400> 18

Leu Gln Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu Asp

1 5 10

<210> 19

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sec61B

<400> 19

Pro Gly Pro Thr Pro Ser Gly Thr Asn Val Gly Ser Ser Gly Arg Ser

1 5 10 15

Pro Ser Lys Ala Val Ala Ala Arg Ala Ala Gly Ser Thr Val Arg Gln
20 25 30
Arg Lys Asn Ala Ser Cys Gly Thr Arg Ser Ala Gly Arg Thr Thr Ser

35 40 45
Ala Gly Thr Gly Gly Met Trp Arg Phe Tyr Thr Glu Asp Ser Pro Gly
50 55 60
Leu Lys Val Gly Pro Val Pro Val Leu Val Met Ser Leu Leu Phe Ile
65 70 75 80
Ala Ser Val Phe Met Leu His Ile Trp Gly Lys Tyr Thr Arg Ser
85 90 95

<210> 20
<211> 96
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Sec61

<400> 20
Met Pro Gly Pro Thr Pro Ser Gly Thr Asn Val Gly Ser Ser Gly Arg
1 5 10 15
Ser Pro Ser Lys Ala Val Ala Ala Arg Ala Ala Gly Ser Thr Val Arg
20 25 30
Gln Arg Lys Asn Ala Ser Cys Gly Thr Arg Ser Ala Gly Arg Thr Thr
35 40 45
Ser Ala Gly Thr Gly Gly Met Trp Arg Phe Tyr Thr Glu Asp Ser Pro
50 55 60
Gly Leu Lys Val Gly Pro Val Pro Val Leu Val Met Ser Leu Leu Phe

65 70 75 80
Ile Ala Ser Val Phe Met Leu His Ile Trp Gly Lys Tyr Thr Arg Ser
85 90 95

<210> 21
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> PM

<400> 21

Arg Ser Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser
1 5 10 15

Cys Lys Cys Val Leu Ser
20

<210> 22

<211> 27

<212
> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C1(1-29)

<400> 22

Met Asp Pro Val Val Val Leu Gly Leu Cys Leu Ser Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Trp Lys Gln Ser Tyr Gly Gly Gly
20 25

<210> 23

<211> 417

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UnaG

<400> 23

atggttgaaa aatttgttgg tacgtggaaa atagcggatt ctcataattt tggcgaatat 60

ctgaaggcta tcggggcgcc taaagagctg agtgatggag gcgatgccac gactccaact 120

ctgtatattt cacagaagga cggtgataaa atgaccgtta agatcgagaa tggcccgccc 180

accttcctgg atacacaggt aaagtttaaa cttggtgaag aatttgatga gttcccgagc 240

gacagacgca aaggtgttaa atccgtagtc aacttggtcg gagaaaaact cgtatatgtc 300

caaaaatggg atggcaaaga gacaacctac gtgcgtgaaa ttaaagacgg gaaactggtt 360

gtgacgctga caatgggcga cgtggtggca gtgcgctcgt accggcgtgc aaccgaa 417

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG tag

<400> 24

gactacaagg atgacgacga taag 24

<210> 25

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UnaG

<400> 25

Met Val Glu Lys Phe Val Gly Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser His Asn
1 5 10 15

Phe Gly Glu Tyr Leu Lys Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp
20 25 30

Gly Gly Asp Ala Thr Thr Pro Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly
35 40 45

Asp Lys Met Thr Val Lys Ile Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp

50 55 60

Thr Gln Val Lys Phe Lys Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser
65 70 75 80

Asp Arg Arg Lys Gly Val Lys Ser Val Val Asn Leu Val Gly Glu Lys
85 90 95

Leu Val Tyr Val Gln Lys Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg
100 105 110

Glu Ile Lys Asp Gly Lys Leu Val Val Thr Leu Thr Met Gly Asp Val
115 120 125

Val Ala Val Arg Ser Tyr Arg Arg Ala Thr Glu
130 135

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG tag

<400> 26

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 27

<211> 531

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UnaG-Flag-NLS

<400> 27

atggttgaaa aatttgttgg tacgtggaaa atagcggatt ctcataattt tggcgaatat 60

ctgaaggcta tcggggcgcc taaagagctg agtgatggag gcgatgccac gactccaact 120

ctgtatattt cacagaagga cggtgataaa atgaccgtta agatcgagaa tggcccgccc 180

accttcctgg atacacaggt aaagtttaaa cttggtgaag aatttgatga gttcccgagc 240

gacagacgca aaggtgttaa atccgtagtc aacttggtcg gagaaaaact cgtatatgtc 300

caaaaatggg atggcaaaga gacaacctac gtgcgtgaaa ttaaagacgg gaaactggtt 360

gtgacgctga caatgggcga cgtggtggca gtgcgctcgt accggcgtgc aaccgaagac 420

tacaaggatg acgacgataa ggaattcagc agggccgacc ccaagaagaa gaggaaggtg 480

gaccccaaga agaagaggaa ggtggacccc aagaagaaga ggaaggtgtg a 531

<210> 28

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LACTB-UnaG-Flag

<400> 28

atgtaccggc tcctgtcaag cgtgacagct cgggctgcgg ccaccgcagg cccagcctgg 60

gacggagggc ggcgcggggc gcacaggcga ccgggcctgc ctgtgctggg ccttggttgg 120

gccggcggcc tggggctcgg gctggggctg gctctcggcg cgaagctggt ggtcgggctg 180

cggggcgccg tccccattca gtccatggtt gaaaaatttg ttggtacgtg gaaaatagcg 240

gattctcata attttggcga atatctgaag gctatcgggg cgcctaaaga gctgagtgat 300

ggaggcgatg ccacgactcc aactctgtat atttcacaga aggacggtga taaaatgacc 360

gttaagatcg agaatggccc gcccaccttc ctggatacac aggtaaagtt taaacttggt 420

gaagaatttg atgagttccc gagcgacaga cgcaaaggtg ttaaatccgt agtcaacttg 480

gtcggagaaa aactcgtata tgtccaaaaa tgggatggca aagagacaac ctacgtgcgt 540

gaaattaaag acgggaaact ggttgtgacg ctgacaatgg gcgacgtggt ggcagtgcgc 600

tcgtaccggc gtgcaaccga agactacaag gatgacgacg ataagtaa 648

<210> 29

<211> 918

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tom20-flag-UnaG

<400> 29

atggtgggtc ggaacagcgc catcgccgcc ggtgtatgcg gggccctttt cattgggtac 60

tgcatctact tcgaccgcaa aagacgaagt gaccccaact tcaagaacag gcttcgagaa 120

cgaagaaaga aacagaagct tgccaaggag agagctgggc tttccaagtt acctgacctt 180

aaagatgctg aagctgttca gaagttcttc cttgaagaaa tacagcttgg tgaagagtta 240

ctagctcaag gtgaatatga gaagggcgta gaccatctga caaatgcaat tgctgtgtgt 300

ggacagccac agcagttact gcaggtctta cagcaaactc ttccaccacc agtgttccag 360

atgcttctga ctaagctccc aacaattagt cagagaattg taagtgctca gagcttggct 420

gaagatgatg tggaaggatc ctctggtgga tctggtggat ctagagacta caaggatgac 480

gacgataaga agctagcaat ggttgaaaaa tttgttggta cgtggaaaat agcggattct 540

cataattttg gcgaatatct gaaggctatc ggggcgccta aagagctgag tgatggaggc 600

gatgccacga ctccaactct gtatatttca cagaaggacg gtgataaaat gaccgttaag 660

atcgagaatg gcccgcccac cttcctggat acacaggtaa agtttaaact tggtgaagaa 720

tttgatgagt tcccgagcga cagacgcaaa ggtgttaaat ccgtagtcaa cttggtcgga 780

gaaaaactcg tatatgtcca aaaatgggat ggcaaagaga caacctacgt gcgtgaaatt 840

aaagacggga aactggttgt gacgctgaca atgggcgacg tggtggcagt gcgctcgtac 900

cggcgtgcaa ccgaataa 918

<210> 30

<211> 1356

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ScoI-UnaG-flag

<400> 30

atggcgatgc tggtcctagt acccggacga gttatgcggc ctctgggtgg ccaactttgg 60

cgcttcttgc ctcgcggact cgagttttgg ggcccagccg aggggactgc gagagtcttg 120

ctgaggcagt tctgcgcgcg gcaagcggag gcgtggcgtg cctcggggcg ccctggctat 180

tgcctgggaa cccggcccct cagcactgcg aggccgccac ccccgtggtc gcagaagggc 240

cccggagact ccacgcgccc ctcgaagccc gggcctgttt cctggaagtc tttagcaatc 300

acatttgcta ttggaggagc tttactggct ggaatgaagc acgtcaagaa agaaaaggca 360

gagaagttag agaaggaacg gcagcgacac atcggcaagc ctttacttgg gggaccgttt 420

tccctcacaa ctcatactgg ggagcgtaaa actgacaagg actacttggg tcagtggtta 480

ttgatttatt ttggcttcac tcattgccct gatgtctgtc cagaagaact agaaaagatg 540

attcaagtcg tggatgaaat agatagcatt acaactctgc cagatctaac tccacttttc 600

atcagcattg acccagagag ggacacaaaa gaagccatcg caaattatgt gaaagaattt 660

tctcccaaac tggttggctt gactggcacg agagaagagg tcgatcaagt ggccagagca 720

tacagagtgt attacagccc tggccccaag gacgaagatg aagactacat agtggatcac 780

acaataataa tgtacttgat tggaccagat ggtgagtttc tagattattt tggccagaac 840

aagaggaagg gagaaatagc tgcttcaatt gccacacaca tgaggccata cagaaaaaag 900

agcaaggatc caatggttga aaaatttgtt ggtacgtgga aaatagcgga ttctcataat 960

tttggcgaat atctgaaggc tatcggggcg cctaaagagc tgagtgatgg aggcgatgcc 1020

acgactccaa ctctgtatat ttcacagaag gacggtgata aaatgaccgt taagatcgag 1080

aatggcccgc ccaccttcct ggatacacag gtaaagttta aacttggtga agaatttgat 1140

gagttcccga gcgacagacg caaaggtgtt aaatccgtag tcaacttggt cggagaaaaa 1200

ctcgtatatg tccaaaaatg ggatggcaaa gagacaacct acgtgcgtga aattaaagac 1260

gggaaactgg ttgtgacgct gacaatgggc gacgtggtgg cagtgcgctc gtaccggcgt 1320

gcaaccgaag actacaagga tgacgacgat aagtaa 1356

<210> 31

<211> 540

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ss-UnaG-KDEL-Flag

<400> 31

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gacggggccc agccggccag atctatggtt gaaaaatttg ttggtacgtg gaaaatagcg 120

gattctcata attttggcga atatctgaag gctatcgggg cgcctaaaga gctgagtgat 180

ggaggcgatg ccacgactcc aactctgtat atttcacaga aggacggtga taaaatgacc 240

gttaagatcg agaatggccc gcccaccttc ctggatacac aggtaaagtt taaacttggt 300

gaagaatttg atgagttccc gagcgacaga cgcaaaggtg ttaaatccgt agtcaacttg 360

gtcggagaaa aactcgtata tgtccaaaaa tgggatggca aagagacaac ctacgtgcgt 420

gaaattaaag acgggaaact ggttgtgacg ctgacaatgg gcgacgtggt ggcagtgcgc 480

tcgtaccggc gtgcaaccga agactacaag gatgacgacg ataagaagga cgagctgtga 540

540

<210> 32

<211> 525

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mito-UnaG-flag

<400> 32

atgctggcca cccgcgtgtt cagcctggtg ggcaagcgcg ccatcagcac cagcgtgtgc 60

gtgcgcgccc acaaggatcc aatggttgaa aaatttgttg gtacgtggaa aatagcggat 120

tctcataatt ttggcgaata tctgaaggct atcggggcgc ctaaagagct gagtgatgga 180

ggcgatgcca cgactccaac tctgtatatt tcacagaagg acggtgataa aatgaccgtt 240

aagatcgaga atggcccgcc caccttcctg gatacacagg taaagtttaa acttggtgaa 300

gaatttgatg agttcccgag cgacagacgc aaaggtgtta aatccgtagt caacttggtc 360

ggagaaaaac tcgtatatgt ccaaaaatgg gatggcaaag agacaaccta cgtgcgtgaa 420

attaaagacg ggaaactggt tgtgacgctg acaatgggcg acgtggtggc agtgcgctcg 480

taccggcgtg caaccgaaga ctacaaggat gacgacgata agtaa 525

<210> 33

<211> 483

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flag-UnaG-NES

<400> 33

atggactaca aggatgacga cgataagatg gttgaaaaat ttgttggtac gtggaaaata 60

gcggattctc ataattttgg cgaatatctg aaggctatcg gggcgcctaa agagctgagt 120

gatggaggcg atgccacgac tccaactctg tatatttcac agaaggacgg tgataaaatg 180

accgttaaga tcgagaatgg cccgcccacc ttcctggata cacaggtaaa gtttaaactt 240

ggtgaagaat ttgatgagtt cccgagcgac agacgcaaag gtgttaaatc cgtagtcaac 300

ttggtcggag aaaaactcgt atatgtccaa aaatgggatg gcaaagagac aacctacgtg 360

cgtgaaatta aagacgggaa actggttgtg acgctgacaa tgggcgacgt ggtggcagtg 420

cgctcgtacc ggcgtgcaac cgaactgcag ctgccccccc tggagcgcct gaccctggac 480

taa 483

<210> 34

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sec61B-UnaG-Flag

<400> 34

atgcctggtc cgacccccag tggcactaac gtgggatcct cagggcgctc tcccagcaaa 60

gcagtggccg cccgggcggc gggatccact gtccggcaga ggaaaaatgc cagctgtggg 120

acaaggagtg caggccgcac aacctcggca ggcaccgggg ggatgtggcg attctacaca 180

gaagattcac ctgggctcaa agttggccct gttccagtat tggttatgag tcttctgttc 240

atcgcttctg tatttatgtt gcacatttgg ggcaagtaca ctcgttcgaa gctagcaatg 300

gttgaaaaat ttgttggtac gtggaaaata gcggattctc ataattttgg cgaatatctg 360

aaggctatcg gggcgcctaa agagctgagt gatggaggcg atgccacgac tccaactctg 420

tatatttcac agaaggacgg tgataaaatg accgttaaga tcgagaatgg cccgcccacc 480

ttcctggata cacaggtaaa gtttaaactt ggtgaagaat ttgatgagtt cccgagcgac 540

agacgcaaag gtgttaaatc cgtagtcaac ttggtcggag aaaaactcgt atatgtccaa 600

aaatgggatg gcaaagagac aacctacgtg cgtgaaatta aagacgggaa actggttgtg 660

acgctgacaa tgggcgacgt ggtggcagtg cgctcgtacc ggcgtgcaac cgaagactac 720

aaggatgacg acgataagta a 741

<210> 35

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UnaG-Flag-Sec61

<400> 35

atggttgaaa aatttgttgg tacgtggaaa atagcggatt ctcataattt tggcgaatat 60

ctgaaggcta tcggggcgcc taaagagctg agtgatggag gcgatgccac gactccaact 120

ctgtatattt cacagaagga cggtgataaa atgaccgtta agatcgagaa tggcccgccc 180

accttcctgg atacacaggt aaagtttaaa cttggtgaag aatttgatga gttcccgagc 240

gacagacgca aaggtgttaa atccgtagtc aacttggtcg gagaaaaact cgtatatgtc 300

caaaaatggg atggcaaaga gacaacctac gtgcgtgaaa ttaaagacgg gaaactggtt 360

gtgacgctga caatgggcga cgtggtggca gtgcgctcgt accggcgtgc aaccgaagac 420

tacaaggatg acgacgataa ggaattcatg cctggtccga cccccagtgg cactaacgtg 480

ggatcctcag ggcgctctcc cagcaaagca gtggccgccc gggcggcggg atccactgtc 540

cggcagagga aaaatgccag ctgtgggaca aggagtgcag gccgcacaac ctcggcaggc 600

accgggggga tgtggcgatt ctacacagaa gattcacctg ggctcaaagt tggccctgtt 660

ccagtattgg ttatgagtct tctgttcatc gcttctgtat ttatgttgca catttggggc 720

aagtacactc gttcgtga 738

<210> 36

<211> 516

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UnaG-Flag-PM

<400> 36

atggttgaaa aatttgttgg tacgtggaaa atagcggatt ctcataattt tggcgaatat 60

ctgaaggcta tcggggcgcc taaagagctg agtgatggag gcgatgccac gactccaact 120

ctgtatattt cacagaagga cggtgataaa atgaccgtta agatcgagaa tggcccgccc 180

accttcctgg atacacaggt aaagtttaaa cttggtgaag aatttgatga gttcccgagc 240

gacagacgca aaggtgttaa atccgtagtc aacttggtcg gagaaaaact cgtatatgtc 300

caaaaatggg atggcaaaga gacaacctac gtgcgtgaaa ttaaagacgg gaaactggtt 360

gtgacgctga caatgggcga cgtggtggca gtgcgctcgt accggcgtgc aaccgaagac 420

tacaaggatg acgacgataa ggaattccgc agcaagctga acccccccga cgagagcggc 480

cccggctgca tgagctgcaa gtgcgtgctg agctga 516

<210> 37

<211> 558

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C1(1-29)-Flag-UnaG

<400> 37

atggatcctg tggtggtgct ggggctctgt ctctcctgtt tgcttctcct ttcactctgg 60

aaacagagct atgggggagg gtctggtgga tctggtggat ctagagacta caaggatgac 120

gacgataaga agctagcaat ggttgaaaaa tttgttggta cgtggaaaat agcggattct 180

cataattttg gcgaatatct gaaggctatc ggggcgccta aagagctgag tgatggaggc 240

gatgccacga ctccaactct gtatatttca cagaaggacg gtgataaaat gaccgttaag 300

atcgagaatg gcccgcccac cttcctggat acacaggtaa agtttaaact tggtgaagaa 360

tttgatgagt tcccgagcga cagacgcaaa ggtgttaaat ccgtagtcaa cttggtcgga 420

gaaaaactcg tatatgtcca aaaatgggat ggcaaagaga caacctacgt gcgtgaaatt 480

aaagacggga aactggttgt gacgctgaca atgggcgacg tggtggcagt gcgctcgtac 540

cggcgtgcaa ccgaataa 558

<210> 38

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UnaG-Flag-NLS

<400> 38

Met Val Glu Lys Phe Val Gly Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser His Asn
1 5 10 15

Phe Gly Glu Tyr Leu Lys Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp
20 25 30

Gly Gly Asp Ala Thr Thr Pro Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly
35 40 45

Asp Lys Met Thr Val Lys Ile Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp
50 55 60

Thr Gln Val Lys Phe Lys Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser
65 70 75 80

Asp Arg Arg Lys Gly Val Lys Ser Val Val Asn Leu Val Gly Glu Lys
85 90 95

Leu Val Tyr Val Gln Lys Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg
100 105 110

Glu Ile Lys Asp Gly Lys Leu Val Val Thr Leu Thr Met Gly Asp Val
115 120 125
Val Ala Val Arg Ser Tyr Arg Arg Ala Thr Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
130 135 140
Asp Asp Lys Glu Phe Ser Arg Ala Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
145 150 155 160
Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

165 170 175

<210> 39
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LACTB-UnaG-Flag
<400> 39
Met Tyr Arg Leu Leu Ser Ser Val Thr Ala Arg Ala Ala Ala Thr Ala
1 5 10 15
Gly Pro Ala Trp Asp Gly Gly Arg Arg Gly Ala His Arg Arg Pro Gly
20 25 30
Leu Pro Val Leu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Gly Leu Gly Leu Gly Leu
35 40 45

Gly Leu Ala Leu Gly Ala Lys Leu Val Val Gly Leu Arg Gly Ala Val
50 55 60
Pro Ile Gln Ser Arg Asp Pro Met Val Glu Lys Phe Val Gly Thr Trp
65 70 75 80
Lys Ile Ala Asp Ser His Asn Phe Gly Glu Tyr Leu Lys Ala Ile Gly
85 90 95
Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp Gly Gly Asp Ala Thr Thr Pro Thr Leu
100 105 110
Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly Asp Lys Met Thr Val Lys Ile Glu Asn

115 120 125
Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp Thr Gln Val Lys Phe Lys Leu Gly Glu
130 135 140

Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser Asp Arg Arg Lys Gly Val Lys Ser Val
145 150 155 160
Val Asn Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Tyr Val Gln Lys Trp Asp Gly
165 170 175
Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg Glu Ile Lys Asp Gly Lys Leu Val Val
180 185 190

Thr Leu Thr Met Gly Asp Val Val Ala Val Arg Ser Tyr Arg Arg Ala
195 200 205
Thr Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
210 215

<210> 40
<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Tom20-flag-UnaG
<400> 40

Met Val Gly Arg Asn Ser Ala Ile Ala Ala Gly Val Cys Gly Ala Leu
1 5 10 15
Phe Ile Gly Tyr Cys Ile Tyr Phe Asp Arg Lys Arg Arg Ser Asp Pro
20 25 30
Asn Phe Lys Asn Arg Leu Arg Glu Arg Arg Lys Lys Gln Lys Leu Ala
35 40 45
Lys Glu Arg Ala Gly Leu Ser Lys Leu Pro Asp Leu Lys Asp Ala Glu
50 55 60
Ala Val Gln Lys Phe Phe Leu Glu Glu Ile Gln Leu Gly Glu Glu Leu
65 70 75 80
Leu Ala Gln Gly Glu Tyr Glu Lys Gly Val Asp His Leu Thr Asn Ala
85 90 95

Ile Ala Val Cys Gly Gln Pro Gln Gln Leu Leu Gln Val Leu Gln Gln
100 105 110
Thr Leu Pro Pro Pro Val Phe Gln Met Leu Leu Thr Lys Leu Pro Thr
115 120 125

Ile Ser Gln Arg Ile Val Ser Ala Gln Ser Leu Ala Glu Asp Asp Val
130 135 140
Glu Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Asp Tyr Lys Asp Asp
145 150 155 160
Asp Asp Lys Lys Leu Ala Met Val Glu Lys Phe Val Gly Thr Trp Lys

165 170 175
Ile Ala Asp Ser His Asn Phe Gly Glu Tyr Leu Lys Ala Ile Gly Ala
180 185 190
Pro Lys Glu Leu Ser Asp Gly Gly Asp Ala Thr Thr Pro Thr Leu Tyr
195 200 205
Ile Ser Gln Lys Asp Gly Asp Lys Met Thr Val Lys Ile Glu Asn Gly
210 215 220
Pro Pro Thr Phe Leu Asp Thr Gln Val Lys Phe Lys Leu Gly Glu Glu
225 230 235 240

Phe Asp Glu Phe Pro Ser Asp Arg Arg Lys Gly Val Lys Ser Val Val
245 250 255
Asn Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Tyr Val Gln Lys Trp Asp Gly Lys
260 265 270
Glu Thr Thr Tyr Val Arg Glu Ile Lys Asp Gly Lys Leu Val Val Thr
275 280 285
Leu Thr Met Gly Asp Val Val Ala Val Arg Ser Tyr Arg Arg Ala Thr
290 295 300
Glu
305

<210> 41

<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ScoI-UnaG-flag
<400> 41
Met Ala Met Leu Val Leu Val Pro Gly Arg Val Met Arg Pro Leu Gly
1 5 10 15

Gly Gln Leu Trp Arg Phe Leu Pro Arg Gly Leu Glu Phe Trp Gly Pro
20 25 30
Ala Glu Gly Thr Ala Arg Val Leu Leu Arg Gln Phe Cys Ala Arg Gln
35 40 45
Ala Glu Ala Trp Arg Ala Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Cys Leu Gly Thr

50 55 60
Arg Pro Leu Ser Thr Ala Arg Pro Pro Pro Pro Trp Ser Gln Lys Gly
65 70 75 80
Pro Gly Asp Ser Thr Arg Pro Ser Lys Pro Gly Pro Val Ser Trp Lys
85 90 95
Ser Leu Ala Ile Thr Phe Ala Ile Gly Gly Ala Leu Leu Ala Gly Met
100 105 110
Lys His Val Lys Lys Glu Lys Ala Glu Lys Leu Glu Lys Glu Arg Gln
115 120 125

Arg His Ile Gly Lys Pro Leu Leu Gly Gly Pro Phe Ser Leu Thr Thr
130 135 140
His Thr Gly Glu Arg Lys Thr Asp Lys Asp Tyr Leu Gly Gln Trp Leu
145 150 155 160
Leu Ile Tyr Phe Gly Phe Thr His Cys Pro Asp Val Cys Pro Glu Glu
165 170 175
Leu Glu Lys Met Ile Gln Val Val Asp Glu Ile Asp Ser Ile Thr Thr
180 185 190
Leu Pro Asp Leu Thr Pro Leu Phe Ile Ser Ile Asp Pro Glu Arg Asp

195 200 205
Thr Lys Glu Ala Ile Ala Asn Tyr Val Lys Glu Phe Ser Pro Lys Leu
210 215 220
Val Gly Leu Thr Gly Thr Arg Glu Glu Val Asp Gln Val Ala Arg Ala
225 230 235 240
Tyr Arg Val Tyr Tyr Ser Pro Gly Pro Lys Asp Glu Asp Glu Asp Tyr
245 250 255
Ile Val Asp His Thr Ile Ile Met Tyr Leu Ile Gly Pro Asp Gly Glu

260 265 270

Phe Leu Asp Tyr Phe Gly Gln Asn Lys Arg Lys Gly Glu Ile Ala Ala
275 280 285
Ser Ile Ala Thr His Met Arg Pro Tyr Arg Lys Lys Ser Lys Asp Pro
290 295 300
Met Val Glu Lys Phe Val Gly Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser His Asn
305 310 315 320
Phe Gly Glu Tyr Leu Lys Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp
325 330 335
Gly Gly Asp Ala Thr Thr Pro Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly

340 345 350
Asp Lys Met Thr Val Lys Ile Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp
355 360 365
Thr Gln Val Lys Phe Lys Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser
370 375 380
Asp Arg Arg Lys Gly Val Lys Ser Val Val Asn Leu Val Gly Glu Lys
385 390 395 400
Leu Val Tyr Val Gln Lys Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg
405 410 415

Glu Ile Lys Asp Gly Lys Leu Val Val Thr Leu Thr Met Gly Asp Val
420 425 430
Val Ala Val Arg Ser Tyr Arg Arg Ala Thr Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
435 440 445
Asp Asp Lys
450

<210> 42
<211> 179
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ss-UnaG-KDEL-Flag
<400> 42
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gly Ala Gln Pro Ala Arg Ser Met Val Glu Lys
20 25 30
Phe Val Gly Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser His Asn Phe Gly Glu Tyr
35 40 45
Leu Lys Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp Gly Gly Asp Ala
50 55 60
Thr Thr Pro Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly Asp Lys Met Thr
65 70 75 80
Val Lys Ile Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp Thr Gln Val Lys

85 90 95
Phe Lys Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser Asp Arg Arg Lys
100 105 110
Gly Val Lys Ser Val Val Asn Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Tyr Val
115 120 125
Gln Lys Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg Glu Ile Lys Asp
130 135 140
Gly Lys Leu Val Val Thr Leu Thr Met Gly Asp Val Val Ala Val Arg
145 150 155 160

Ser Tyr Arg Arg Ala Thr Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys
165 170 175
Asp Glu Leu

<210> 43
<211> 174
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> mito-UnaG-flag
<400> 43
Met Leu Ala Thr Arg Val Phe Ser Leu Val Gly Lys Arg Ala Ile Ser
1 5 10 15
Thr Ser Val Cys Val Arg Ala His Lys Asp Pro Met Val Glu Lys Phe

20 25 30

Val Gly Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser His Asn Phe Gly Glu Tyr Leu
35 40 45
Lys Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp Gly Gly Asp Ala Thr
50 55 60
Thr Pro Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly Asp Lys Met Thr Val
65 70 75 80
Lys Ile Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp Thr Gln Val Lys Phe
85 90 95
Lys Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser Asp Arg Arg Lys Gly

100 105 110
Val Lys Ser Val Val Asn Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Tyr Val Gln
115 120 125
Lys Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg Glu Ile Lys Asp Gly
130 135 140
Lys Leu Val Val Thr Leu Thr Met Gly Asp Val Val Ala Val Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Arg Arg Ala Thr Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
165 170

<210> 44
<211> 160
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Flag-UnaG-NES
<400> 44
Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Val Glu Lys Phe Val Gly
1 5 10 15
Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser His Asn Phe Gly Glu Tyr Leu Lys Ala
20 25 30
Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp Gly Gly Asp Ala Thr Thr Pro
35 40 45

Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly Asp Lys Met Thr Val Lys Ile

50 55 60

Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp Thr Gln Val Lys Phe Lys Leu

65 70 75 80

Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser Asp Arg Arg Lys Gly Val Lys

85 90 95

Ser Val Val Asn Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Tyr Val Gln Lys Trp

100 105 110

Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg Glu Ile Lys Asp Gly Lys Leu

115 120 125

Val Val Thr Leu Thr Met Gly Asp Val Val Ala Val Arg Ser Tyr Arg

130 135 140

Arg Ala Thr Glu Leu Gln Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu Asp

145 150 155 160

<210> 45

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sec61B-UnaG-Flag

<400> 45

Pro Gly Pro Thr Pro Ser Gly Thr Asn Val Gly Ser Ser Gly Arg Ser

1 5 10 15

Pro Ser Lys Ala Val Ala Ala Arg Ala Ala Gly Ser Thr Val Arg Gln

20 25 30

Arg Lys Asn Ala Ser Cys Gly Thr Arg Ser Ala Gly Arg Thr Thr Ser

35 40 45

Ala Gly Thr Gly Gly Met Trp Arg Phe Tyr Thr Glu Asp Ser Pro Gly

50 55 60

Leu Lys Val Gly Pro Val Pro Val Leu Val Met Ser Leu Leu Phe Ile

65 70 75 80

Ala Ser Val Phe Met Leu His Ile Trp Gly Lys Tyr Thr Arg Ser Lys

85 90 95

Leu Ala Met Val Glu Lys Phe Val Gly Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser
100 105 110
His Asn Phe Gly Glu Tyr Leu Lys Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu
115 120 125
Ser Asp Gly Gly Asp Ala Thr Thr Pro Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys
130 135 140
Asp Gly Asp Lys Met Thr Val Lys Ile Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe
145 150 155 160
Leu Asp Thr Gln Val Lys Phe Lys Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe

165 170 175
Pro Ser Asp Arg Arg Lys Gly Val Lys Ser Val Val Asn Leu Val Gly
180 185 190
Glu Lys Leu Val Tyr Val Gln Lys Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr
195 200 205
Val Arg Glu Ile Lys Asp Gly Lys Leu Val Val Thr Leu Thr Met Gly
210 215 220
Asp Val Val Ala Val Arg Ser Tyr Arg Arg Ala Thr Glu Asp Tyr Lys
225 230 235 240

Asp Asp Asp Asp Lys
245

<210> 46
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> UnaG-Flag-Sec61
<400> 46
Met Val Glu Lys Phe Val Gly Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser His Asn
1 5 10 15
Phe Gly Glu Tyr Leu Lys Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp
20 25 30
Gly Gly Asp Ala Thr Thr Pro Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly

35 40 45

Asp Lys Met Thr Val Lys Ile Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp
50 55 60
Thr Gln Val Lys Phe Lys Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser
65 70 75 80
Asp Arg Arg Lys Gly Val Lys Ser Val Val Asn Leu Val Gly Glu Lys
85 90 95
Leu Val Tyr Val Gln Lys Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg
100 105 110
Glu Ile Lys Asp Gly Lys Leu Val Val Thr Leu Thr Met Gly Asp Val

115 120 125
Val Ala Val Arg Ser Tyr Arg Arg Ala Thr Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
130 135 140
Asp Asp Lys Glu Phe Met Pro Gly Pro Thr Pro Ser Gly Thr Asn Val
145 150 155 160
Gly Ser Ser Gly Arg Ser Pro Ser Lys Ala Val Ala Ala Arg Ala Ala
165 170 175
Gly Ser Thr Val Arg Gln Arg Lys Asn Ala Ser Cys Gly Thr Arg Ser
180 185 190

Ala Gly Arg Thr Thr Ser Ala Gly Thr Gly Gly Met Trp Arg Phe Tyr
195 200 205
Thr Glu Asp Ser Pro Gly Leu Lys Val Gly Pro Val Pro Val Leu Val
210 215 220
Met Ser Leu Leu Phe Ile Ala Ser Val Phe Met Leu His Ile Trp Gly
225 230 235 240
Lys Tyr Thr Arg Ser
245

<210> 47
<211> 171
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> UnaG-Flag-PM

<400> 47

Met Val Glu Lys Phe Val Gly Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser His Asn
1 5 10 15

Phe Gly Glu Tyr Leu Lys Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp
20 25 30

Gly Gly Asp Ala Thr Thr Pro Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly
35 40 45

Asp Lys Met Thr Val Lys Ile Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp
50 55 60

Thr Gln Val Lys Phe Lys Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser
65 70 75 80

Asp Arg Arg Lys Gly Val Lys Ser Val Val Asn Leu Val Gly Glu Lys
85 90 95

Leu Val Tyr Val Gln Lys Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg
100 105 110

Glu Ile Lys Asp Gly Lys Leu Val Val Thr Leu Thr Met Gly Asp Val
115 120 125

Val Ala Val Arg Ser Tyr Arg Arg Ala Thr Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
130 135 140

Asp Asp Lys Glu Phe Arg Ser Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu Ser Gly
145 150 155 160

Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
165 170

<210> 48

<211> 185

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C1(1-29)-Flag-UnaG

<400> 48

Met Asp Pro Val Val Val Leu Gly Leu Cys Leu Ser Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Trp Lys Gln Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

20 25 30

Gly Ser Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Ala Met Val

35 40 45

Glu Lys Phe Val Gly Thr Trp Lys Ile Ala Asp Ser His Asn Phe Gly

50 55 60

Glu Tyr Leu Lys Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Ser Asp Gly Gly

65 70 75 80

Asp Ala Thr Thr Pro Thr Leu Tyr Ile Ser Gln Lys Asp Gly Asp Lys

85 90 95

Met Thr Val Lys Ile Glu Asn Gly Pro Pro Thr Phe Leu Asp Thr Gln

100 105 110

Val Lys Phe Lys Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Phe Pro Ser Asp Arg

115 120 125

Arg Lys Gly Val Lys Ser Val Val Asn Leu Val Gly Glu Lys Leu Val

130 135 140

Tyr Val Gln Lys Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Tyr Val Arg Glu Ile

145 150 155 160

Lys Asp Gly Lys Leu Val Val Thr Leu Thr Met Gly Asp Val Val Ala

165 170 175

Val Arg Ser Tyr Arg Arg Ala Thr Glu

180 185