

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0100575 (43) 공개일자 2013년09월11일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 38/17 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)		(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(21) 출원번호	10-2012-0021908	(72) 발명자 박윤경 전라남도 장성군 장성읍 남면 분향리 876-3번지
(22) 출원일자	2012년03월02일	박성철 광주광역시 북구 두암동 주공아파트 307-305
심사청구일자	2012년03월02일	(74) 대리인 이원희

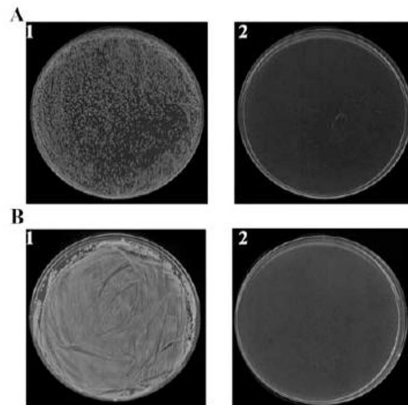
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 인간의 양수로부터 분리 정제된 항균 활성 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 사람의 양수에서 분리한 항균 활성을 갖는 단백질에 관한 것이다. 본 발명에 따른 분리, 정제된 단백질은 유해균에서 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 항균 활성 단백질을 화장품 및 의약품 보존제로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0017532

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 담석증 환자에서 분리한 Quinolone계와 Macrolide계 항생물질 다제 내성세균에 작용하는
항균펩타이드 개발 및 제제화 연구

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2016.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 항균 활성 단백질을 유효성분으로 함유하는 항균 및 방부 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 항균 활성 단백질은 인간의 양수에서 유래하는 것을 특징으로 하는 항균 및 방부 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 항균 활성 단백질은 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 스태필로코쿠스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 대장균(*Escheria coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*) 및 살모넬라 티피모리움(*Salmonella typhimurium*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 한 종의 미생물에 대해 항균 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 항균 및 방부 조성물.

청구항 4

제 1항에 기재된 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 농약제제.

청구항 5

제 1항에 기재된 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 항균 활성을 나타내는 화장품 조성물.

청구항 6

제 1항에 기재된 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 식품 방부제.

청구항 7

제 1항에 기재된 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 항균용 사료 첨가제.

청구항 8

- 1) 양수(amniotic fluid)를 원심분리하여 상층액을 얻는 단계;
- 2) 상기 단계 1)에서 얻어진 상층액을 투석한 후 여과하는 단계; 및
- 3) 크로마토그래피를 이용하여 상기 단계 2)에서 수득한 여과액으로부터 항균 활성 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 항균 활성 단백질의 분리방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 단계 2)의 투석은 아세트산암모늄완충액을 사용하는 것을 특징으로 하는 항균 활성 단백

질의 분리방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간의 양수로부터 분리 정제된 항균 활성 단백질 및 이의 항생제로서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 농약, 식품의 방부제 및 화장품, 의약품 등의 기능성 항생제란 넓은 의미에 있어서 농작물에서 농약으로써의 기능, 식품이나 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 포함된다. 항생제는 좁은 의미로는 세균, 곰팡이, 효모등 미생물의 증식을 억제하여 농약, 식품 및 의약품에서 부패미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 것이다. 이러한 농약, 식품의 방부제 및 화장품, 의약품 등의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.

[0003] 천연항균제란 천연 자원이나 미생물 자원으로부터 선택성이나 생화학적, 생리학적 차이를 극대화하여 바이러스, 세균, 효모, 곰팡이 등을 선택적으로 제어하나 인체에는 무해하도록 독성을 최소화한 항균제를 말한다. 예를 들면, 식물이나 동물들이 생산하는 펩타이드 항생제가 있다(Bevins *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, 59, 395-414, 1990). 상기 펩타이드 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나누어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β 쉬트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α -회전형(helical) 양친화성 분자이며, 세 번째는 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다(Mayasaki *et al.*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 9, 269-280, 1998).

[0004] 이들 항균 펩타이드들은 숙주 방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Boman, H. G., *Cell*, 65, 205, 1991; Boman, H. G., *Annu. Rev. Microbiol.*, 13, 61, 1995). 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 갖는데, 이들 구조 중 가장 많이 존재하는 것은 시스테인(cysteine) 잔기가 없고, 양친화성 알파 나선형을 형성하는 구조이며, 그 예로써 곤충에서 발견된 항균 펩타이드인 세크로핀(cecropin)이 있다. 상기와 같이 식물이나 동물에서 분리된 항균 펩타이드가 제시된 바 있으나, 인간의 양수로부터 분리된 단백질의 항균 활성은 잘 알려지지 않았다.

[0005] 따라서, 본 발명자들은 자연소재인 항생제 펩타이드를 탐색하고자, 예의노력한 결과, 인간의 양수에서 분리 및 정제한 단백질을 얻었고, 상기 단백질이 우수한 항균 활성이 있음을 확인하였으므로, 상기 단백질을 항생제의 유효성분으로 이용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 인간의 양수로부터 분리 정제된 항균 활성 단백질 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 항균 활성 단백질을 유효성분으로 함유하는 항균 및 방부 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 농약제제를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 항균 활성을 나타내는 화장료 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 식품 방부제를 제공한다.

- [0011] 또한, 본 발명은 상기 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [0012] 아울러, 본 발명은
- [0013] 1) 양수(amniotic fluid)를 원심분리하여 상층액을 얻는 단계;
- [0014] 2) 상기 단계 1)에서 얻어진 상층액을 투석한 후 여과하는 단계; 및
- [0015] 3) 크로마토그래피를 이용하여 상기 단계 2)에서 수득한 여과액으로부터 항균 활성 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 항균 활성 단백질의 분리방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에서 분리, 정제한 단백질은 유해균에서 탁월한 항균 작용을 나타내었으므로, 상기 분리된 단백질을 화장품 및 의약품 보존제의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1A는 역상 크로마토그래피를 이용하여 양수로부터 단백질을 분리정제해 얻은 그래프이고, 도 1B 및 도 1C는 활성분획을 추가로 정제하여 트리신 SDS-PAGE로 분석하여 최종 분리정제된 단백질을 확인하는 것을 나타낸 그래프이다.

도 2는 최종 분리정제된 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

도 3A는 상기 분리된 단백질의 항균 활성을 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*)로 확인한 결과이고, 도 3B는 상기 분리된 단백질의 항균 활성을 대장균(*Escheria coli*, *E. coli*)로 확인한 결과를 나타낸 도이다:

- 1 : 분리된 단백질을 처리하지 않은 대조군; 및
- 2 : 분리된 단백질을 처리한 실험군.

도 4A는 막전위 탈분극을 이용하여 상기 항균 활성 단백질이 박테리아 세포막에 미치는 영향을 *E. coli* 세포로 확인한 결과이며, 도 4B는 SYTOX Green 흡수 정도를 이용하여 항균 활성 단백질의 박테리아 세포막에 대한 작용을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다:

네모 모양 : 펠리틴 펩타이드(양성 대조군);

마름모 모양 : 항균 활성 단백질(실험군); 및

검은색 및 흰색 : 다른 종의 두 가지 *E. coli*.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0019] 본 발명은 서열번호 1의 항균 활성 단백질을 유효성분으로 함유하는 항균 및 방부 조성물을 제공한다.

- [0020] 상기 항균 활성 단백질은 인간의 양수에서 유래하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0021] 상기 항균 활성 단백질은 스테필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 스태필로코쿠스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 대장균(*Escheria coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*) 및 살모넬라 티피모리움(*Salmonella typhimurium*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 한 종의 미생물에 대해 항균 활성을 나타내는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0022] 또한, 본 발명은 상기 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 농약제제를 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 항균 활성을 나타내는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 식품 방부제를 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 항균 활성 단백질을 유효성분으로 포함하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [0026] 아울러, 본 발명은
- [0027] 1) 양수(amniotic fluid)를 원심분리하여 상층액을 얻는 단계;
- [0028] 2) 상기 단계 1)에서 얻어진 상층액을 투석한 후 여과하는 단계; 및
- [0029] 3) 크로마토그래피를 이용하여 상기 단계 2)에서 수득한 여과액으로부터 항균 활성 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 항균 활성 단백질의 분리방법을 제공한다.
- [0030] 상기 단계 2)의 투석은 아세트산암모늄완충액을 사용하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0031] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 양수로부터 단백질의 추출과 정제하기 위해, 임신후기 여성으로부터 얻은 양수는 원심분리한 후 상층액을 얻어 필터하였다. 아세트산암모늄완충액(ammonium acetate buffer)(pH 6.0)으로 투석하여 우린과 염분을 제거하고 한외여과(ultrafiltration, UF)한 후 C18 컬럼을 이용한 역상 크로마토그래피를 수행하였다. 활성분획은 한번 더 분리정제하였고, 16.5% 트리신 SDS-PAGE와 역상 크로마토그래피로 확인하였다. 1차 역상 크로마토 그래피를 수행한 결과, 도 1A와 같이 몇 개의 피크(peak)를 확인하였고(도 1A 참조), 이들 각 피크의 항균 활성을 측정된 결과 도 1A의 화살표를 표시한 피크만이 항균활성을 나타내었다. 위 항균 활성을 나타내는 도 1A의 화살표 피크만을 분리하기 위해 2차 역상 크로마토그래피를 수행하였고, 이를 정제한 결과를 16.5% 트리신 SDS-PAGE로 확인하였다(도 1B 및 도 1C 참조). 아울러, 상기 단백질의 아미노산 서열은 도 2와 같았다(도 2 참조).
- [0032] 상기 분리된 단백질의 항균 활성 확인은 미량희석법(microdilution assay)을 통해 측정하였다. 성장이 완벽하게 억제된 가장 낮은 농도는 생육최소저해농도(MIC)이며, 각 균에 대한 생육최소저해농도를 하기 표 1에 나타내었다(표 1 참조). 그 결과, 각 균주에 따라 서로 다른 생육최소저해농도가 확인되었으며, 가장 낮은 생육최소저해농도는 리스테리아 모노사이토제네스에서 0.3 μ M로 확인되었다. 아울러, 상기 정제된 단백질의 항균 활성을 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*) 또는 대장균(*Escheria coli*, *E. coli*)을 사용하여 확인하였다. 액체 상태로 배양된 리스테리아 모노사이토제네스 및 *E. coli*에 정제된 항균 활성 단백질을 처리하였고, 이를 고체 배지 플레이트에 스프레딩(spreading) 시킨 후 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 그 결과, 리스테리아 모노사이토제네스 및 *E. coli*에 대하여 항균 활성이 강하게 나타남을 확인하였다(도 3 참조).
- [0033] 상기 항균 활성 단백질의 박테리아 세포막에 대한 세포막 활동 전위 소실 작용을 확인하기 위해, 세포막 확산 전위 소실을 하기와 같은 막전위 탈분극 분석 방법으로 측정하였다. *E. coli* ATCC 25922와 CCARM 1229의 스페로플라스트(sphero-plast)를 하기와 같은 삼투압 충격(osmotic shock) 과정을 통해 준비하였다. 스페로플라스트는 완충액(buffer)에서 부유하였다. 세포막의 탈분극은 형광 염색제 DiSC3-5(시그마 알드리치)를 이용하여 측정하였다. 1 μ M 농도의 염색제를 배지에 첨가하여 세포에서 안정한 형광 베이스라인이 잡힐 때까지 배양하였다. 상기 항균 활성단백질 및 멜리틴(melittin)은 생육 최소저해 농도의 1배, 2배, 4배 값의 농도로 처리하였고, 탈분극은 단백질이 더해진 뒤의 형광 증가를 여기파장 622 nm, 발광파장 670 nm에서 모니터링하여 얻었다. 그 결과, 세포막을 파괴하는 것으로 알려진 멜리틴의 경우 두 가지 모든 *E. coli*에서 형광 분출이 높게 일어난 반면, 항균 활성 단백질의 경우 비교적 낮게 나타났다(도 4A 참조).
- [0034] 상기 항균 활성 단백질의 박테리아 세포막에 대한 작용을 알아보기 위해, 하기와 같은 방법으로 측정하였다. PBS 버퍼에 *E. coli* CCARM1229를 부유하였고, SYTOX green(Molecular probes)를 최종농도가 1 μ M가 되도록 넣은 후 37°C 암실에서 15분 동안 배양하였다. 농도별로 상기 항균 활성 단백질과 멜리틴을 처리한 뒤에 세포내 형광 증가를 여기파장 485 nm, 발광파장 520 nm에서 측정하였다. 그 결과, *E. coli* CCARM1229의 세포막을 MIC 농도의 1배, 5배 10배까지 처리하였을 때 항균 활성 단백질은 영향을 미치지 않은 반면, 멜리틴의 경우 농도 의존적으로 세포막이 파괴됨을 확인함으로써 이들의 작용 기작이 서로 다름을 확인하였다(도 4B 참조).

[0035] 따라서, 양수로부터 분리된 단백질이 유해균에 대해 항균 활성을 가지는 것을 확인하였으므로, 본 발명에 따른 상기 분리된 항균 활성 단백질을 농약제제, 항균 활성을 나타내는 화장료 조성물, 식품 방부제 또는 항균용 사료 첨가제의 유효성분으로 사용할 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0037] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] <실시예 1> 양수로부터 항균 활성 단백질의 추출과 정제

[0039] 임신후기 여성으로부터 얻은 양수는 원심분리한 후 상층액을 얻어 필터(pore size = 0.2 μ m, Millipore)하였다. 10 mM 아세트산암모늄완충액(ammonium acetate buffer)(pH 6.0)로 투석하여 우린과 염분을 제거하고 한외여과(ultrafiltration, UF)한 후 C18 컬럼(5 μ m, 300 Å, 4.6 x 250 mm, Vydac, Hesperia, CA)을 이용한 역상 크로마토그래피를 수행하였다(10-60% 아세토니트릴(acetonitrile), 50 분, 1 ml/분). 활성분획은 한번 더 분리정제하였고, 16.5% 트리신 SDS-PAGE와 역상 크로마토그래피로 확인하였다.

[0040] 그 결과, 1차 역상 크로마토 그래피를 수행한 결과 도 1A와 같이 몇 개의 피크(peak)를 확인하였고(도 1A), 이들 각 피크의 항균 활성을 측정한 결과 도 1A의 화살표를 표시한 피크만이 항균활성을 나타내었다. 위 항균 활성을 나타내는 도 1A의 화살표 피크만을 분리하기 위해 2차 역상 크로마토그래피를 수행하였고, 이를 정제한 결과를 16.5% 트리신 SDS-PAGE로 확인하였다(도 1B 및 도 1C). 아울러, 상기 분리된 단백질의 아미노산 서열은 도 2와 같았다(도 2).

[0041] <실시예 2> 양수로부터 분리된 단백질의 항균 활성 확인

[0042] 양수로부터 분리된 단백질의 항균 활성은 미량희석법(microdilution assay)를 통해 측정하였다. 항균 활성을 측정하기 위하여, 균수는 96-웰 마이크로적정 플레이트(microtiter plate)에 각 웰당 1×10^6 세포가 되도록 희석하여 균을 포함한 배지 50 μ l를 단백질이 포함된 플레이트에 분주한 후, 음성 대조군에는 펩타이드 대신 배지만을 분주하고 37 °C 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 성장이 완벽하게 억제된 가장 낮은 농도는 생육최소저해농도(MIC)이며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다(표 1).

표 1

[0043] 박테리아 균에 대한 분리된 단백질의 생육 최소 저해농도

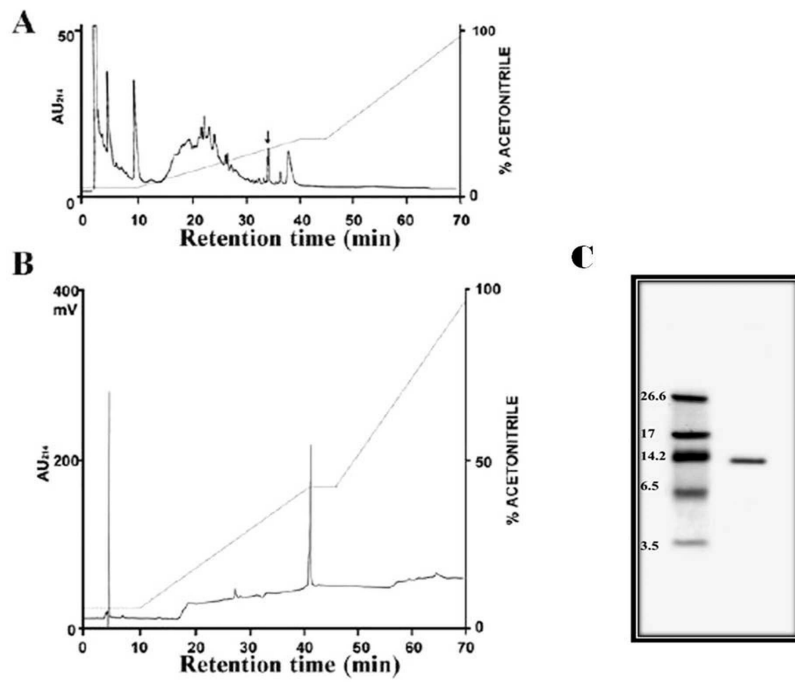
	생육최소저해농도(μ M)			
	1	2	3	4
스테필로코쿠스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. aureus</i>) ATCC25923	2.4	>2.4	>2.4	>2.4
리스테리아 모노사이토제네스 (<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>L. monocytogenes</i>) ATCC19115	0.3	>2.4	>2.4	>2.4
스테필로코쿠스 에피더미디스 (<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. epidermidis</i>) KCTC1917	0.6	>2.4	>2.4	>2.4
대장균 (<i>Escheria coli</i> , <i>E. coli</i>) ATCC25922	0.3	>2.4	>2.4	>2.4
프로테우스 볼가리스 (<i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. vulgaris</i>) KCTC2433	0.3	>2.4	>2.4	>2.4
살모넬라 티피모리움 (<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S. typhimurium</i>) KCTC1926	>2.4	>2.4	>2.4	>2.4
스테필로코쿠스 아우레우스 CCARM31114	>10	-	-	-
스테필로코쿠스 아우레우스 CCARM3126	>10	-	-	-
<i>E. coli</i> CCARM1229	>10	-	-	-
<i>E. coli</i> CARM1238	>10	-	-	-

- [0044] 1 : 10 mM 인산칼륨(potassium phosphate), pH7.2
- [0045] 2 : 10 mM 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES), pH7.2
- [0046] 3 : 10 mM 인산나트륨(sodium phosphate), pH7.2
- [0047] 4 : 150 mM NaCl을 포함하는 10 mM 인산칼륨(potassium phosphate), pH7.2
- [0048] 그 결과, 각 균주에 따라 서로 다른 생육최소저해농도가 확인되었으며, 가장 낮은 생육최소저해농도는 리스테리아 모노사이토제네스에서 0.3 μ M로 확인되었다(표 1).
- [0049] 아울러, 분리된 단백질의 항균 활성을 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*) 또는 대장균(*Escheria coli*, *E. coli*)을 사용하여 확인하였다. 액체 상태로 배양된 리스테리아 모노사이토제네스 및 *E. coli*를 5×10^3 세포가 들어가도록 96 웰 플레이트에 나누어 놓고 여기에 분리된 항균 활성 단백질 2.2 μ g을 처리하였고, 이를 고체 배지 플레이트에 스프레딩(spreading) 시킨 후 37℃에서 하룻밤 배양하였다.
- [0050] 그 결과, 리스테리아 모노사이토제네스 및 *E. coli*에 대하여 항균 활성이 강하게 나타냄을 확인하였다(도 3). 리스테리아 모노사이토제네스(도 3 A1)는 분리된 단백질 미처리군이고, 리스테리아 모노사이토제네스(도 3 A2)는 분리된 단백질을 2.2 μ g 처리한 군이고, *E. coli*(도 3 B1)는 분리된 단백질 미처리군이며, *E. coli*(도 3 B2)는 분리된 단백질을 2.2 μ g 처리한 군이다.
- [0051] <실시예 3> 분리된 항균 활성 단백질의 박테리아 세포막에 대한 세포막 활동 전위 소실 작용 확인
- [0052] 항균 활성 단백질의 박테리아 세포막에 대한 작용을 알아보기 위해, 세포막 확산 전위 소실을 하기와 같은 막전위 탈분극 분석 방법으로 측정하였다. *E. coli* ATCC 25922와 CCARM 1229의 스페로플라스트(sphero-plast)를 하기와 같은 삼투압 충격(osmotic shock) 과정을 통해 준비하였다. 먼저 세포들을 $OD_{600} = 0.8$ 조건에서 원심분리하여 수득한 후 10 mM Tris/ H_2SO_4 (25% 자당(sucrose), pH 7.5)로 두 번 세척하였고, 1 mM EDTA가 포함된 세척 완충액(washing buffer)속에 부유하였다. 20℃에서 10분간 배양한 후 원심분리하여 0℃ 물에 부유하고 4℃에서 10분 배양하였고, 그 후에 다시 원심분리하여 스페로플라스트를 얻었다. 스페로플라스트는 완충액(buffer)(20 mM 글루코스(glucose), 5 mM HEPES, 1 M KCl, pH7.3)에서 $OD_{600}=0.05$ 농도로 부유하였다. 세포막의 탈분극은 형광 염색제 DiSC3-5(시그마 알드리치)를 이용하여 측정하였다. 1 μ M 농도의 염색제를 배지에 첨가하여 세포에서 안정한 형광 베이스라인이 잡힐 때까지 배양하였다. 단백질 및 멜리틴(melittin)은 생육 최소저해 농도의 1배, 2배, 4배 값의 농도로 처리하였고, 탈분극은 단백질이 더해진 뒤의 형광 증가를 여기파장 622 nm, 발광파장 670 nm에서 모니터링하여 얻었다.
- [0053] 그 결과, 세포막을 파괴하는 것으로 알려진 멜리틴의 경우 두 가지 모든 *E. coli*에서 형광 분출이 높게 일어난 반면, 항균 활성 단백질의 경우 비교적 낮게 나타났다(도 4A). 도 4A는 *E. coli* ATCC25922(검정색) 및 *E. coli* CCARM1229(흰색)에 항균 활성 단백질(마름모 모양) 및 멜리틴(네모 모양)을 처리한 결과이다.
- [0054] <실시예 4> 분리된 항균 활성 단백질의 박테리아 세포내 침투 작용 확인
- [0055] 항균 활성 단백질의 박테리아 세포막에 대한 작용을 알아보기 위해, 세포막 확산 전위 소실을 하기와 같은 방법으로 측정하였다. PBS 버퍼에 *E. coli* CCARM1229를 2×10^7 세포/ml 수로 부유하였고, SYTOX green(Molecular probes)를 최종농도가 1 μ M가 되도록 넣은 후 37℃ 암실에서 15분 동안 배양하였다. 농도별로 항균 활성 단백질과 멜리틴을 처리한 뒤에 세포내 형광 증가를 여기파장 485 nm, 발광파장 520 nm에서 측정하였다.
- [0056] 그 결과, *E. coli* CCARM1229의 세포막을 MIC 농도의 1배, 5배 10배까지 처리하였을 때 항균 활성 단백질은 영향을 미치지 않은 반면, 멜리틴의 경우 농도 의존적으로 세포막이 파괴됨을 확인함으로써 이들의 작용 기작이 서

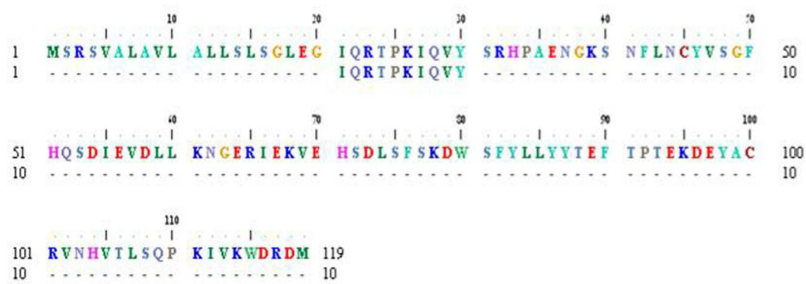
로 다름을 확인하였다(도 4B).

도면

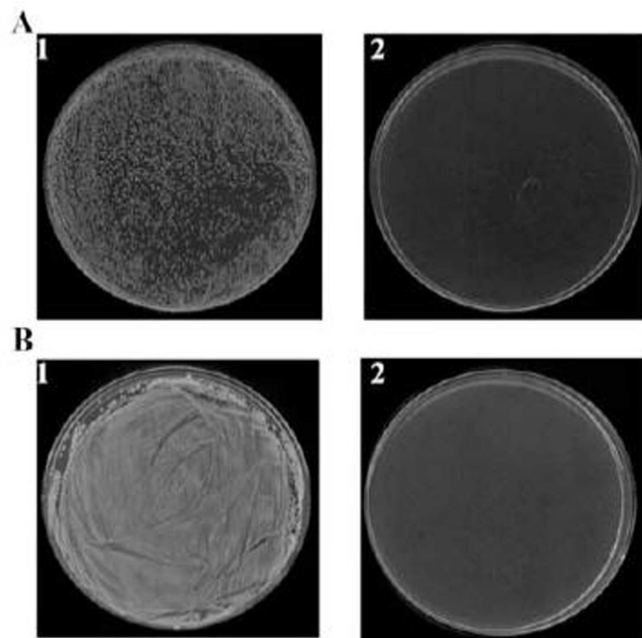
도면1



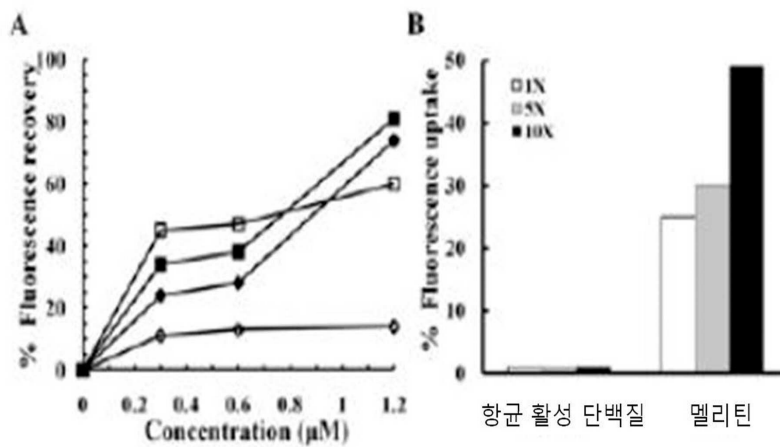
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Proteins having antibiotic activity derived from amniotic fluid of human and use thereof
- <130> 12p-02-33
- <160> 1
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser

1 5 10 15

Gly Leu Glu Cys Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg

20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser

35 40 45

Gly Phe His Gln Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu

50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp

65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp

85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile

100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met

115