(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0064711
(43) 공개일자 2018년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/10 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0164899
(22) 출원일자 2016년12월06일
심사청구일자 2016년12월06일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한성옥
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호 (잠실동, 리센츠아파트)
고영진
강원도 춘천시 춘주로 176-22, 105동 201호 (퇴계동, 퇴계동쌍용스윗닷홈)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

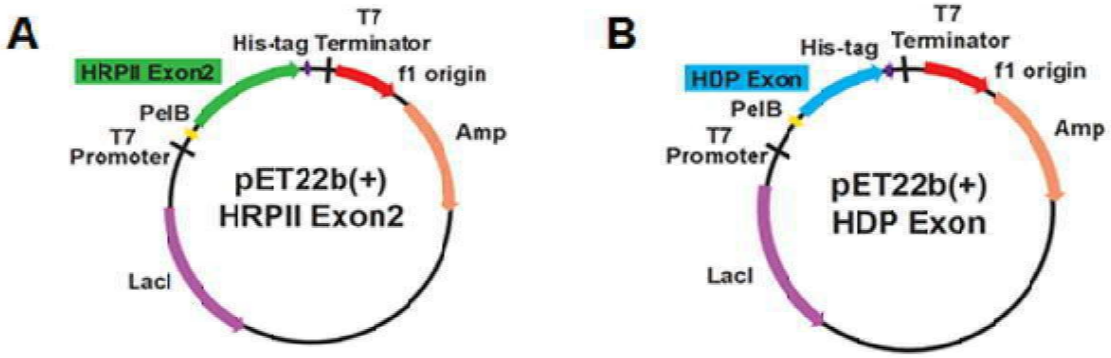
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **헴중합효소와 헴 라이게이즈를 포함하는 효소복합체 및 이를 이용한 헤모조인의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 헴중합효소와 헴 라이게이즈가 섬유소분해효소의 도커린 모듈을 통하여 연결되어 있는 효소복합체 및 이를 이용한 헤모조인의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 기존의 헤모조인 중합에 효소보다 헤모조인 중합 효율이 우수하여, 보다 경제적으로 전도성을 가지는 바이오중합체인 헤모조인을 효율적으로 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/96 (2013.01)
C12Y 499/01008 (2013.01)
(72) 발명자
정다운
서울특별시 도봉구 노해로57길 60, 1층 (쌍문동)
주영철
서울특별시 성북구 인촌로 46, 304호 (안암동3가, 에스엠오피스텔)
현정은
서울특별시 성북구 인촌로13길 18-21, 1층 (안암동2가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 G01201506010245
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 바이오의료기기산업핵심기술개발
연구과제명 [RCMS]코리네박테리움을 이용한 고부가 바이오플라스틱용 신규 단량체인 Heme의 생물학적 전환 및 이에 기반을 둔 Hemozoin 중합 공정 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

헴중합효소와 헴 라이게이즈가 섬유소분해효소의 도커린 모듈과 골격단백질의 결합을 통하여 연결되어 있는 효소복합체.

청구항 2

상기 도커린 모듈은 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유래인 것을 특징으로 하는 효소 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 헴중합효소는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 헴 라이게이즈는 서열번호 28로 표시되는 염기서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 5

다음 단계를 포함하는 제1항의 효소복합체의 제조방법:

(a) 도커린모듈이 연결되어 있는 헴중합효소를 준비하는 단계;

(b) 도커린모듈이 연결되어 있는 헴 라이게이즈를 준비하는 단계;

(c) 코히신모듈을 포함하는 소형 골격 단백질을 준비하는 단계; 및

(c) 상기 헴중합효소 및 헴 라이게이즈를 소형 골격 단백질과 혼합하여 도커린-코히신 상호작용을 이용한 효소복합체를 제조하는 단계.

청구항 6

제1항의 효소복합체를 이용하여 헴을 중합하는 것을 특징으로 하는 헤모조인의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 헴중합효소와 헴 라이게이즈를 포함하는 효소복합체에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 헴중합효소와 헴 라이게이즈가 섬유소분해효소의 도커린 모듈을 통하여 골격단백질과 연결되어 있는 효소복합체 및 이를 이용한 헤모조인의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오 플라스틱(bio plastic)은 수소 세균이나 질소 세균의 미생물이 갖는 고분자 폴리에스테르를 합성하여 만들어진 플라스틱으로, 예를 들면 전분, 당, 탄수화물, 식물성 오일 또는 지방으로부터 직접 발효 제법에 의해 제조되는 지방족 폴리에스테르 수지로 이루어진다. 폐기된 후 일정 시간이 경과되면 미생물이 배출하는 분해 요소에 의해 딱딱한 플라스틱이 자연 분해되는 생분해성 특성을 갖는다. 이러한 바이오 플라스틱은 바이오 원료의 사용으로 인해 석유화학기반 플라스틱보다 좀 더 환경적으로 지속가능한 물질로 매우 친환경적이라는 점에서 큰 이점을 갖는다. 특히, 환경 보호 및 기후 온난화 시작과 관련하여, 바이오 플라스틱은 패킹 부문뿐만 아니라 장기 지속성 산업용 플라스틱 제품 제조에서 중요성이 증가하고 있다.

[0003] 그러나, 유용 플라스틱 연구 분야에서 기능성을 가진 바이오 플라스틱에 관한 연구가 많이 진행되어 오고 있으나, 전도성을 가진 바이오플라스틱의 생산에 대한 연구는 미미한 실정이다.

[0004] 헤모조인(hemzoin)은 말라리아가 생체에서 혈색소를 소모하고 나온 산물로, 불용성이어서 철을 고갈시키고 빈혈을 심화시킨다. 헤모조인 성분인 말라리아 반점(malarial pigment)이 침착되면 장기들은 어두운 갈색 또는 검은색으로 변하게 된다.

[0005] 헤모조인(hemozoin)은 1㎛ 정도 크기로서, 말라리아 기생충이 적혈구 내에서 기생하며, 적혈구의 헤모글로빈 단백질 대사과정을 거치면서 발생하는 헴(heme) 부분의 독성을 제거하기 위해 만들어내는 결정화된 헤모글로빈 단백질 형태를 가진다. 이러한 헤모조인은 자기적으로는 상자성적(paramagnetic) 특성을 가지며, 광학적으로는 복굴절(birefringence) 특성을 가질 수 있다.

[0006] 기존 연구는 말라리아 유충의 생존 및 말라리아 진단을 위하여, 헤모조인이 자기장에 반응하는 성질을 가지는 것을 이용하기 위하여 헤모조인 연구에 집중하여 왔다(Rebelo, M. *et al.*, Acta. Trop. 123:58,2012;Rebelo, M. *et al.*, Cytometry A. 87:437, 2015; Karl, S. *et al.*, Malaria J. 7:66, 2008).

[0007] 이에, 본 발명자들은 전도성을 가지는 바이오플라스틱을 제조하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 헴 중합효소 및 헴 라이게이즈의 효소복합체를 제조하고, 상기 효소복합체를 사용하는 경우, 전도성을 가지는 헤모조인 중합체를 효율적으로 제조할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 헤모조인을 중합할 수 있는 효소복합체를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 헤모조인을 중합할 수 있는 효소복합체를 이용하여 헴을 중합하는 것을 특징으로 하는 헤모조인의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 헴중합효소와 헴 라이게이즈가 섬유소분해효소의 도커린 모듈을 통하여 골격단백질과 연결되어 있는 효소복합체를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, (a) 도커린모듈이 결합되어 있는 헴중합효소를 준비하는 단계; (b) 도커린모듈이 결합되어 있는 헴 라이게이즈를 준비하는 단계; 및 (c) 상기 헴중합효소 및 헴 라이게이즈를 혼합하여 효소복합체를 제조하는 단계를 포함하는 상기 효소복합체의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 효소복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 헤모조인의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 기존의 헤모조인 중합에 효소보다 헤모조인 중합 효율이 우수하여, 보다 경제적으로 전도성을 가지는 바이오중합체인 헤모조인을 효율적으로 제조할 수 있어, 환경 및 경제적으로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 발명에서 제시된 HRPII Exon2 및 HDP Exon 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET22(+) HRPII Exon2(A)와 pET22b(+) HDP Exon(B) 의 모식도이다.

도 2는 본 발명에서 제시된 섬유소 분해효소의 도커린 도메인 유전자가 융합된 헴중합효소 Exon2 유전자 HRPII-Doc(A) 및 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2, Exon 3 연결 유전자 HDP-Doc가 삽입된 재조합 벡터 pKEN HRPII-Doc과 pKEN HDP-Doc(B)의 모식도 및 효소 복합체를 형성하기 위하여 도커린 도메인과 결합하는 코히신 도메인을 가지는 소형 골격단백질 유전자 mCbpA가 삽입된 재조합 벡터 pET22b-mCbpA(C)의 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에서 제시된 재조합 벡터 pET22(+) HRPII Exon2 와 pET22b(+) HDP Exon가 삽입된 대장균의 발현 단백질의 His-tag을 이용한 정제 후 SDS-PAGE 분석 기법으로 발현을 확인한 것이다.

도 4는 본 발명에서 제시된 재조합 벡터 pKEN HRPII-Doc 과 pKEN HDP-Doc이 삽입된 대장균의 발현 단백질의 Western blot 분석 기법을 발현을 확인한 것이다.

도 5는 본 발명에서 제시된 헤모조인 중합 효소 복합체의 활성을 확인하기 위하여 Heme을 기질로 사용하여 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 플라스모디움 속 균주로부터 유래한 헴중합효소 HRPII-Doc 및 키메릭 헴 라이게이즈 HDP-Doc 단백질을 어셈블리시킨 복합체의 활성 분석을 실행하여 효소 활성의 증대를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 기존의 헤모조인을 대상으로 하는 연구의 경우 대부분 물질이 보유한 자성을 이용한 진단에 집중되어 있었으나, 본 발명에서는 자성을 가지는 헤모조인 중합체를 대장균 유래 효소를 이용하여 생산하여 바이오 플라스틱으로 발전시킬 수 있는 가능성을 확인하였다.

[0016] 본 발명에서는 전도성을 가지는 바이오플라스틱으로 적용가능한 헤모조인을 대량으로 생산하는 전환 효소 기술을 개발하고자, 기존 헤모조인 중합 효소의 효율을 개선하고자, 헤모조인 중합능을 가지는 서로 다른 종류의 두 가지 효소의 복합체를 제조하여 헤모조인의 중합 효율을 증가시켰다.

[0017] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 헴중합효소와 헴 라이게이즈가 섬유소분해효소의 도커린 모듈을 통하여 골격단백질과 연결되어 있는 효소복합체에 관한 것이다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에서는, 플라스모디움 속 균주로부터 유래한 헴중합효소와 헴 라이게이즈 유전자를 대장균 발현 벡터에 도입하여 발현시켰으며, 상기 헴 전환 효소들이 높은 수준으로 재조합 균주로부터 발현되어 용이하게 작동하는 것을 확인하였다.

[0019] 본 발명의 일 양태에서는 플라스모디움 속 균주 유래 헴중합효소 유전자 (Histidine rich protein 2) 유전자의 Exon2 부분와 헴 라이게이즈 유전자의 Exon1,Exon2 및 Exon3가 연결된 유전자에 각각 섬유소 분해효소의 도커린 도메인 유전자의 융합한 단편을 대장균 발현 벡터에 도입하여 발현시켰으며, 도커린모듈이 연결된 헴중합효소 융합단백질과 헴 라이게이즈 융합단백질이 생산되는 것을 확인하였다.

[0020] 상기 헴중합효소 융합단백질과 헴 라이게이즈 융합단백질을 도커린으로 연결하여 골격단백질과 함께 효소복합체를 제조하였다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 도커린 모듈은 엔도-베타-1, 4-글루칸아제-비 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 헴중합효소는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 코딩되는 것을 특징으로 할 수 있고, 본 발명에 있어서, 상기 헴 라이게이즈는 서열번호 28로 표시되는 염기서열로 코딩되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0023] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (a) 도커린모듈이 결합되어 있는 헴중합효소를 준비하는 단계; (b) 도커린모듈이 결합되어 있는 헴 라이게이즈를 준비하는 단계; 및 (c) 상기 헴중합효소 및 헴 라이게이즈를 혼합하여 효소복합체를 제조하는 단계를 포함하는 상기 효소복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0024] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 헤모조인을 중합할 수 있는 효소복합체를 이용하여 헴을 중합하는 것을 특징으로 하는 헤모조인의 제조방법에 관한 것이다.

[0025] 본 발명의 일양태에서, N,N-dimethylformamide에 용매에 녹인 헴 100uM을 기질로 하고, 500mM Sodium Acetate (pH 5.2)를 반응버퍼로 하여 37℃에서 12시간 반응시킨 후 중합된 헤모조인의 양을 흡광기를 이용해 400nm 파장으로 측정하여 분석한 결과, 헴중합효소 및 헴 라이게이즈의 조합으로 중합한 경우 단일 중합효소보다 활성이 높게 측정되었고 헤모조인 중합 효소 복합체 형성한 경우 1.4배 더 증가되었음을 확인하였다.

[0026] 본 발명에 따라 개발된 헴 전환 효소 복합체는 헴의 생물학적 전환에 있어 효과적으로 작용하여 경제적으로 저

렴하고 생산적으로 효율적인 헤모조인을 중합할 수 있다. 공정에 유용한 발명인 것으로 기대된다. 또한 이로 인해 전환되는 헤모조인은 전도성 바이오플라스틱으로 유용하게 사용될 수 있어 산업적으로 다양한 공정에 매우 유용한 발명인 것으로 기대된다.

[0027] 본 발명에서 "벡터(Vector)"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0028] 일반적으로 플라스미드 벡터는 염색체 외의 환형 이중가닥 DNA이고, 세포 내에 존재하며 다양한 기능을 한다. 항생물질에 내성을 가진 물질 및 박테리오신(Bacteriocin)을 생산하여 유사한 균주나 종들을 죽이는 저해 물질로 작용하고, 색소 생성, 화합물 분해, 질소 고정과 같은 생리학적 기능을 수행한다. 최고 약 10kb되는 길이의 외래 DNA 절편을 삽입하기 위해서 제한효소 부위를 가지고 있다.

[0029] 벡터로 사용되는 플라스미드와 박테리오파지의 중대한 단점인 상대적으로 작은 DNA 절편만 삽입할 수 있는 것은 플라스미드와 파지 DNA의 조작된 혼성체인 코스미드(Cosmid)를 사용하여 더 큰 DNA 절편을 클로닝 할 수 있다.

[0030] 파지 입자 안으로 포장되어 들어가는 코스(cos) 부위가 있고, 세균 숙주에서 복제하는 플라스미드의 복제 시작점과 플라스미드를 선별할 수 있는 유전자를 가지고 있다. 박테리오파지 벡터 같이 시험관 내에서 단백질 외피로 포장되지만, 포장된 DNA가 대장균 숙주세포를 감염한 후에, 그 DNA는 박테리오파지 DNA보다는 플라스미드 형태로 복제하고, 용균되지 않는다. 크기는 2.5kb, 숙주세포를 감염하여 포장된 후에 cos 부위가 37kb에서 52kb까지 분리되면, 외래 DNA를 삽입체로 수용한다. 일반적으로 35kb에서 45kb가 코스미드 벡터(Cosmid vector)로 클로닝 될 수 있다.

[0031] 또한 박테리오파지의 벡터의 일반적인 형태인 파지의 경우는 염기쌍을 이룰 수 있는 12개 뉴클레오티드의 단일가닥의 상보적인 말단으로 된 점착성 말단(cohesive termini) 혹은 cos를 가지는 50kb의 이중가닥으로 된 야생형 게놈에서 비롯된 것으로 용균성 경로에서 숙주세포는 새로운 바이러스가 복제되고, 자손 바이러스가 방출된 후에 융균된다. 이 형태의 DNA는 전체 52kb 크기에 3kb를 더하거나 그 게놈의 5% 만도 수용할 수 있으며, 외래 DNA를 위한 공간을 만드는 벡터는 비필수적인 DNA 조각이 제거된 형태이다.

[0032] 본 발명과 관련된 벡터는 플라스미드 벡터(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79 및 pUC19 등), 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터(예: gt4B, -Charon, z1 및 M13 등), 바이러스 벡터 등을 포함한다.

[0033] 바이러스 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 예를 들어 인간면역결핍바이러스(Human immunodeficiency virus, HIV), 생쥐백혈병 바이러스(Murine leukemia virus, MLV), 백혈증 바이러스(Avian sarcoma and leukosis virus, ASLV), 비장괴사바이러스(Spleen necrosis virus, SNV), 라우스육종바이러스(Rous sarcoma virus, RSV), 마우스 유방암 바이러스(Mouse mammary tumor virus, MMTV) 등, 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 관련 바이러스(Adeno-associated virus, AAV), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 등에서 유래한 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명에서 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 목적 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0035] 본 발명에서 "조절 요소"란 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 전사, 번역 또는 발현의 증진을 돕거나 이에 영향을 미치는 비해독화된 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 발현벡터는 조절 요소로 본 발명의 유전자 회로를 필수적으로 포함하고, 단백질 발현에 영향을 미칠 수 있는 발현 조절 서열, 예를 들어, 개시 코돈, 종결 코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서(enhancer), 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 등을 포함할 수 있다.

[0036] 폴리아데닐화 시그널은 전사체의 안정성을 증가시키거나 세포질 수송을 용이하게 한다. 인핸서 서열은 프로모터에서 다양한 부위에 위치하여 인핸서 서열이 없을 때의 프로모터에 의한 전사 활성과 비교하여, 전사 활성을 증가시키는 핵산 핵산 서열이다. 신호서열에는 숙주가 에스케리키아(Escherichia) 속 균인 경우에는 PhoA 신호서열, OmpA 신호서열 등이, 숙주가 바실러스 속 균인 경우에는 -아밀라아제 신호서열, 서브틸리신(Subtilisin) 신호서열 등을, 숙주가 효모인 경우에는 MF(Mating factor) 신호서열, SUC2 신호서열 등을, 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 또한, 벡터는 복제 가능한 발현 벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제 개시점(replication

origin)을 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 벡터는 선택 마커(selection marker)를 포함할 수 있다. 선택 마커는 벡터로 형질 전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택 가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선택 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질 전환된 세포를 선별 가능하다. 선택 마커의 대표적인 예로써, 영양 요구 마커(auxotrophic marker)인 ura4, leu1, his3 등을 들 수 있으나 상기 예에 의해 본 발명에서 사용될 수 있는 마커의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명에서 "숙주세포"란 다른 미생물 또는 유전자를 기생시켜 영양을 공급하는 세포로, 벡터가 숙주세포에 형질전환됨으로써 숙주세포 내에서 다양한 유전적 또는 분자적 영향을 미치게 되는 세포를 의미한다. 숙주세포는 외부 DNA를 받아들일 수 있는 수용성(competence) 상태에서, 벡터와 같은 외부 DNA가 삽입될 수 있는데, 벡터가 숙주세포에 성공적으로 도입되면, 해당 벡터의 유전형질을 숙주세포에 제공하게 된다.

[0040] 바람직하게 본 발명의 숙주 미생물은 그람 음성 균일 수 있으며, 상기 그람음성균은 살모넬라 속(*Salmonella sp.*), 아시네박터 속(*Acinebacter sp.*), 에스케리아 속(*Escherichia sp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas sp.*) 또는 크렙시엘라 속(*Klebsiella sp.*) 균주 등을 포함하고, 예를 들면, 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 아시네박터 칼코아세티쿠스(*Acinebacter calcoaceticus*), 대장균(*E. coli*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 크렙시엘라 아에로제네스(*Klebsiella aerogenes*), 아시네박터 바우마니 또는 크렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)등을 포함하나, 상기 예에 의해 본 발명의 벡터가 형질전환될 수 있는 숙주세포가 제한되는 것은 아니다.

[0041] 숙주 세포에 벡터를 도입하는 방법은 형질전환 방법이 이용될 수 있다. "형질전환"이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다. 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 방법에 DMSO (dimethyl sulfoxide)라는 환원 물질을 사용함으로써 효율을 높인 하나한(Hanahan)방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아(Agrobacteria) 매개된 형질전환법, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트(Dextran sulfate), 리포펙타민(lipopectamine) 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다. 본 발명의 플라스미드를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서는 통상적으로 사용되는 형질전환 방법이 제한없이 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 SoxRS 변이체 유전자 회로와 목적 유전자를 포함하는 재조합 벡터는 상기 서술한 바와 같이 당업계에서 통상적으로 사용되는 벡터에 제한효소 및 중합효소 연쇄반응법(Polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 제조할 수 있다. 또한 제조된 벡터는 일반적인 형질 전환 방법으로 숙주세포에 도입함으로써 제조될 수 있으며, 본 발명에서는 대장균(*E.coli*) XL1-Blue에 도입하여 형광 단백질 발현량을 측정하였다.

[0043] 또한, 상기 방법으로 형질전환된 숙주세포는 필요에 따라 당업계에서 통상적으로 사용되는 배양 방법을 통하여 배양될 수 있으며, 사용될 수 있는 배지 및 배양기간은 필요에 따라 당업자에 의해 임의적으로 선택될 수 있다.

[0044] 바람직하게 본 발명은 형질 전환된 대장균 균주를 LB(Luria Bertani) 배지에서 12시간 동안 배양한 후 재조합 유전자들로부터 형광 단백질의 생산을 유도하기 위하여 2시간 동안 추가 배양하였다. 상기 배지는 기술 분야에 일반적으로 사용될 수 있는 다양한 배지가 적용 가능할 것이다.

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0046] **실시예 1: 헴중합효소와 헴 라이게이즈 유전자의 증폭**

[0047] 헤모조인을 중합하기 위한 효소들을 클로닝하기 위하여 플라스모디움 속 균주의 지노믹 DNA *Plasmodium falciparum* Welch, ATCC PRA-405D)로부터 헴중합효소 (Histidine rich protein 2) 유전자의 Exon2 부분 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5’에는 제한효소 *Eco*RI 인식서열이, 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5’에는 제한효소 *Hind*III 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하고(서열번호 1 ~ 2), 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 853bp의 헴중합효소의 유전자의 Exon2 부분

(서열번호 3)이 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0049] 프라이머 염기 서열

[0050] 서열번호 1 : GCGC gaattc g AATAATTCCGCATTTAATAATAACTTGT

[0051] 서열번호 2: GCGC aagctt ATGGCGTAGGCAATGTGT

[0052] 또한 플라스모디움 속 균주의 지노믹 DNA (*Plasmodium falciparum* Welch, ATCC PRA-405D) 로부터 헴 라이게이즈 효소(Heme ligase) 유전자의 염기서열을 참고로 인트론 ㅂ부부위를 제거하고 Exon만을 확보하기 위하여 프라이머를 디자인하였다. 헴 라이게이즈 효소의 Exon 1 부분을 위하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 에는 제한효소 *Eco*RI, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5' 에는 헴 라이게이즈 효소의 Exon 2 부분 N-터미널의 10bp 크기의 서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다(서열번호 4 ~5).

[0053] 또한, 헴 라이게이즈 효소의 Exon 2 부분을 위하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 에는 헴 라이게이즈 효소의 Exon 1 부분 C-terminal의 10bp 크기의 서열이, 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5' 에는 헴 라이게이즈 효소의 Exon 3 부분 N-terminal의 10bp 크기의 서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였(서열번호 6~7)다. 마지막으로는, 헴 라이게이즈 효소의 Exon 3 부분을 위하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 에는 헴 라이게이즈 효소의 Exon 2 부분 C-terminal의 10bp 크기의 서열이, 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5' 에는 제한효소 *Hind*III 서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다(서열번호 8~9). 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0054] 그 결과, 216bp, 204bp 및 195bp의 헴 라이게이즈 Exon 1(서열번호 10), Exon 2(서열번호 11), Exon 3(서열번호 12) 절편의 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다.

[0055] 프라이머 염기 서열

[0056] 서열번호 4: GCGC gaattc g ATGAAAAATAGATTTTATTATAATTTGATAATTAAAA

[0057] 서열번호 5: agctgccaac TGTAGGATGATTTAACAGATTAGAA

[0058] 서열번호 6: tcatcctaca GTTGGCAGCTCGTTAATAC

[0059] 서열번호 7: acattaacca CGGTTGGTAAGATGAACCA

[0060] 서열번호 8: ttaccaaccg TGGTTAATGTACAATGAAAAAAGG

[0061] 서열번호 9: GCGC aagctt AAAAATGATGGGCTTATCTACTATA

[0062] **실시예 2: 헴중합효소(Histidine rich protein 2) 유전자의 Exon2 부분 클로닝, 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 부분의 유전자의 연결 및 클로닝**

[0063] 실시예 1에서 얻은 헴중합효소의 유전자의 Exon2 부분과 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2, Exon 3 부분의 유전자의 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[0064] 그 후 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 부분의 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 회수한 세 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 에는 제한효소 *Eco*RI, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5' 에는 제한효소 *Hind*III 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다(서열번호 12~13). PCR 반응을 수행하여서 그 결과 615bp의 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 부분의 유전자 연결된 헴 라이게이즈 Exon 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0065] 프라이머 서열

[0066] 서열번호 13:

[0067] GCGC gaattc g ATGAAAAATAGATTTTATTATAATTTGATAATTAAAA

[0068] 서열번호 14:

[0069] GCGC aagctt AAAAATGATGGGCTTATCTACTATA

[0070] 그 후, 헴중합효소 유전자 HrpII 유전자의 Exon2 부분과 헴 라이게이즈 Exon 유전자 Hdp Exon 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터 (*E. coli* expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 *EcoR*I과 *Hind*III로 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E. coli*) BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22b(+) HRPII Exon2 및 pET22b(+) HDP Exon 이라 명명하였고 도 1에 도시하였다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/HRPII Exon2 및 BL21/HDP Exon 이라 명명하였다.

[0071] **실시예 3: 섬유소 분해효소의 도커린 도메인 융합을 위한 헴중합효소 Exon2 유전자, 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 연결 유전자의 증폭**

[0072] 헤모조인 중합 효소 복합체 형성을 위하여 상기 실시예 1에서 얻은 헴중합효소의 Exon2 유전자와 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 연결 유전자에 섬유소 분해효소의 도커린 도메인 유전자의 융합을 수행하였다.

[0073] 헴중합효소의 Exon2 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인 유전자의 융합을 위하여 실시예 1에서 얻은 헴중합효소의 Exon2 유전자 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5’ 에는 제한효소 XbaI, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5’ 에는 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다(서열번호 15~16).

[0074] 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 875bp의 플라스모디움 속 균주로부터 유래한 헴중합효소의 Exon2 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0075] 또한 헴중합효소의 Exon2 유전자의 헤모조인 중합 효소 복합체 형성을 위한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 클로닝하기 위하여 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지노믹디엔에이로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5’ 에는 플라스모디움 속 균주로부터 유래한 헴중합효소의 Exon2 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5’ 에는 제한효소 Pst I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다(서열번호 17~18). 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0076] 그 결과, 222bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0077] 프라이머 염기 서열

[0078] 서열번호 15: GCGC tctaga tttaagaaggagatatacat ATG AATAATTCCGCATTTA

[0079] 서열번호 16: cagcggatcc ATGGCGTAGGCAATGTGT

[0080] 서열번호 17: cctacgccat GGATCCGCTGGCTCC

[0081] 서열번호 18: ATAT ctgcag tca gtggtggtggtggtggtg TAAAAGCATTTTTTTAAG

[0082] 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 연결 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인 유전자의 융합을 위하여 실시예 1에서 얻은 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 연결 유전자 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5’ 에는 제한효소 XbaI, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5’ 에는 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다(서열번호 19~20).

[0083] 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 641bp의 플라스모디움 속 균주로부터 유래한 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2, Exon 3 연결 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0085] 또한 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지노믹 DNA로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열(서열번호 22)을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5’ 에는 플라스모디움 속 균주로부터 유래한 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2, Exon 3 연결 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5’ 에는 제한효소 Pst I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다(서열번호 21~22).

[0086] 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 222bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0087] 프라이머 염기서열

[0088] 서열번호 19: GCGC tctaga tttaagaaggagatatacat ATGAAAAATAGATTTTATT

[0089] 서열번호 20: cagcggatcc AAAAATGATGGGCTTATCTACTATAT

[0090] 서열번호 21: catcattttt GGATCCGCTGGCTCCG

[0091] 서열번호 22: ATAT ctgcag tca gtggtggtggtggtggtg TAAAAGCATTTTTTTAAG

[0092] 도커린 서열(서열번호 23):
gatgttaacaaagatggaaaggtaaatgctatcgattatgcagtgcttaaatcaattcttttaggtacaaatactaacgttgatttatcagtatcagacatg
aataaggatggtaaagtaaatgctttggatttagctgttcttaaaaaaatgctttta

[0093] **실시예 4: 섬유소 분해효소의 도커린 도메인 유전자와 헴중합효소 Exon2 유전자 및 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 연결 유전자의 연결 및 클로닝**

[0094] 실시예 3에서 얻은 헴중합효소 Exon2 유전자 및 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 연결 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[0095] 그 후 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 헴중합효소 Exon2 유전자 및 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2 및 Exon 3 연결 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 에는 제한효소 XbaI, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5' 에는 제한효소 Pst I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다(서열번호 24~25)

[0096] PCR 반응을 수행하여서 그 결과 1097bp 및 863bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 헴중합효소 Exon2 유전자 및 헴 라이게이즈 Exon 1, Exon 2, Exon 3 연결 유전자(서열번호 28)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0097] 프라이머 염기 서열

[0098] 서열번호 24: GCGC tctaga tttaagaaggagatatacat ATG AATAATTCCGCATTTA

[0099] 서열번호 25: ATAT ctgcag tca gtggtggtggtggtggtg TAAAAGCATTTTTTTAAG

[0100] 서열번호 26: GCGC tctaga tttaagaaggagatatacat ATGAAAAATAGATTTTATT

[0101] 서열번호 27: ATAT ctgcag tca gtggtggtggtggtggtg TAAAAGCATTTTTTTAAG

[0102] 그 후, 키메릭 헴중합효소 HRPII-Doc 유전자 및 키메릭 헴 라이게이즈 HDP-Doc 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터 (*E. coli* expression vector)인 pKEN에 라이게이션(ligation)시켜 Xba I 과 PstI으로 에스세리시아 콜라이(대장균, *E. coli*) BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pKEN-HRPII-Doc 및 pKEN-HDP-Doc라 명명하였고 도 2에 도시하였다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/HRPII-Doc 및 BL21/HDP-Doc이라 명명하였다.

[0103] 그리고 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체 (primary

[0104] scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A)

[0105] 중 셀룰로즈 결합 모듈 (Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모

[0106] 듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulosebinding protein A) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer: 서열번호 29)의 5'에는 제한효소 BamHI 인식서열(ggatcc), 역방향 프라이머(Reverse primer: 서열번호 30)에는 제한효소 XhoI 인식서열(ctcgag)이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다. 그 결과, 1659bp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 mCbpA 유전자(서열번호 31)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0107] 서열번호 29: ggatccgcagcgacatcatcaa

[0108] 서열번호 30: GCGCctcgaggctataggatctccaatatttat

[0109] 그 후, 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이 mCbpA 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터 (*E. coli* expression vector)인 pET22b(+) Vector에 라이게이션(ligation)시켜 BamHI과 XhoI으로 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E. coli*) BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22b-mCbpA라 명명하였고 도 2에 도시하였다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/mCbpA라 명명하였다.

[0110] **실시예 5: 대장균 형질전환체의 헴중합효소 및 헴 라이게이즈 단백질 발현**

[0111] 실시예 2 및 실시예 4 에서 확보한 형질전환체의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여, His-Tag을 이용한 정제 및 SDS-PAGE를 수행하였다.

[0112] 대장균 형질전환체를 IPTG로 발현 유도하여 헴중합효소 및 헴 라이게이즈 단백질이 발현되도록 하는 조건을 조성하여 16℃에서 12시간동안 진탕배양 후 원심분리하여 세포를 확보하였다. 그 후, 세포를 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) 해당 단백질을 얻은 후 SDS-PAGE에 로딩하였다.

[0113] 그 후, 단백질의 C-terminal에 연결되어 있는 His-tag을 이용하여 Western Blot 분석기법을 이용하여 분석하였다.

[0114] 그 결과, 예상한 단백질 사이즈와 동일한 위치에서 나타남을 확인할 수 있었다. 이 결과를 각각 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0115] 헴중합효소 및 헴 라이게이즈의 조합으로 인한 골격단백질과 효소 복합체 형성을 확인하기 위해 골격단백질의 Carbohydrate binding module (CBM)을 기반으로 셀룰로오스를 레진으로 하여 정제하는 실험을 수행하였다.

[0116] BL21/mCbpA 재조합 균주의 단백질 발현 유도하여 mCbpA 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건을 조성하여 LB 배지에 접종하여 24시간 동안 37에서 배양하고, IPTG를 함유한 LB 액상배지에서 5시간 동안 배양한 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) mCbpA 소형 셀룰로즈-결합 단백질을 얻었다. 셀룰로스-결합 모듈(Cellulse binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 위해 셀룰로즈(Sigmacell Type 50, SIGMA) 를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 1M 소듐 클로라이드(sodium chloride) 0.02M 트리스 버퍼 (pH 8.0)로 세 번 헹구어낸 후 0.05M 트리스 버퍼(pH 12.5)로 용리하였다. 이의 SDS-PAGE는 10% poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기영동 하였다.

[0117] 헴중합효소 및 헴 라이게이즈가 골격단백질과 결합하여 효소 복합체를 형성하였을 경우에만 셀룰로오스를 이용하여 정제가 가능하였으며, 이를 확인하기 위해 SDS-PAGE 분석을 하여, His-tag을 정제한 각각의 Subunit에 해당하는 단백질들이 존재함을 확인하였으며, 이에 대한 결과를 도 5에 나타내었다.

[0118] **실시예 6: 헴중합효소 및 헴 라이게이즈 조합 및 활성 분석**

[0119] 헴중합효소 및 헴 라이게이즈의 조합으로 인한 활성을 확인하기 위해 헴중합효소, 헴라이게이즈를 각각 단독으로 사용하였을 때, 헴중합효소와 헴라이게이즈를 함께 사용하였을 때 및 헴중합효소 및 헴 라이게이즈를 복합체로 사용하였을 때 헴을 기질로 하는 중합활성 분석을 수행하였다.

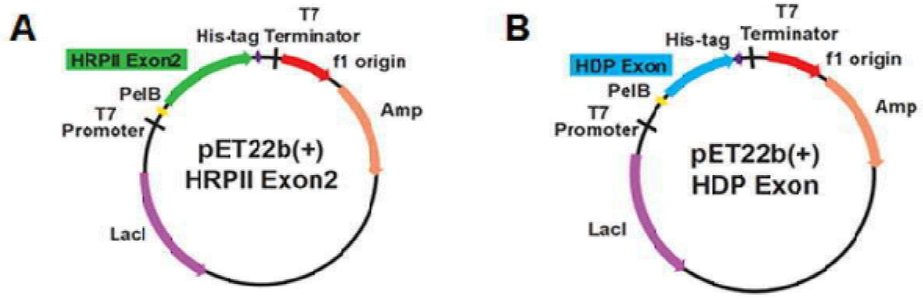
[0120] 활성 분석방법은 N,N-dimethylformamide에 용매에 녹인 헴 100uM을 기질로 하고, 500mM Sodium Acetate (pH 5.2)를 반응버퍼로 하여 37℃에서 12시간 반응시킨 후 중합된 헤모조인의 양을 흡광기를 이용해 400nm 파장으로 측정하여 분석하였다.

[0121] 상기 방법대로 실행결과 헴중합효소 및 헴 라이게이즈의 조합으로 중합한 경우 단일 중합효소보다 활성이 높게 측정되었고 헤모조인 중합 효소 복합체 형성한 경우 1.4배 더 증가되었음을 확인하였으며, 이 결과를 도 6에 도시하였다.

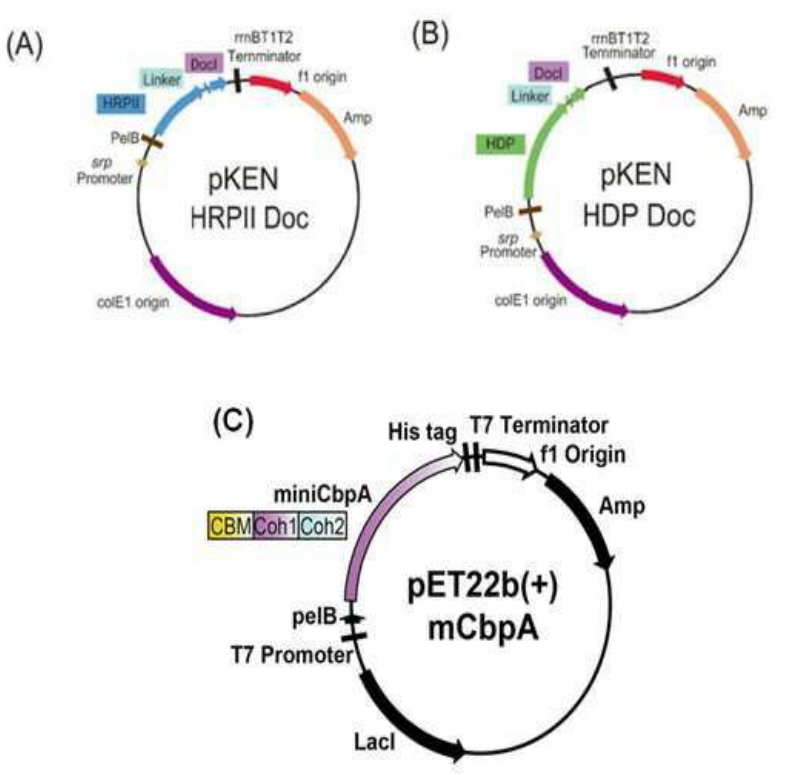
[0122] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

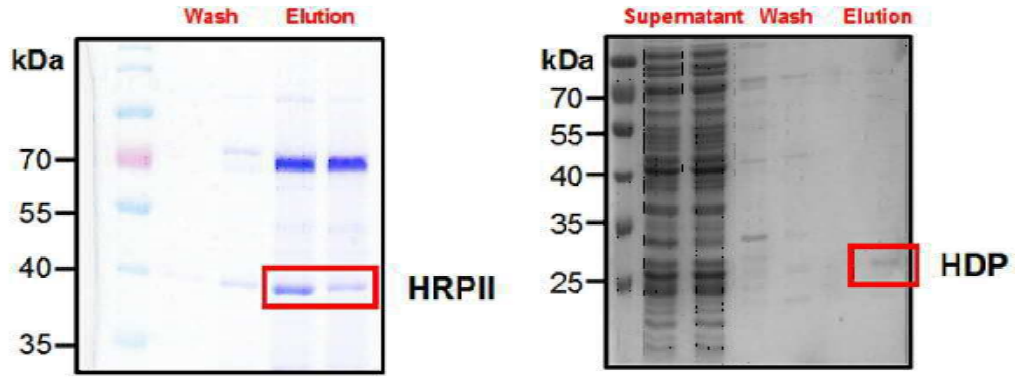
도면1


A
T7
His-tag Terminator
f1 origin
HRPII Exon2
PelB
T7
Promoter
Amp
pET22b(+)
HRPII Exon2
LacI
B
T7
His-tag
Terminator
f1 origin
HDP Exon
PelB
T7
Promoter
Amp
pET22b(+)
HDP Exon
LacI

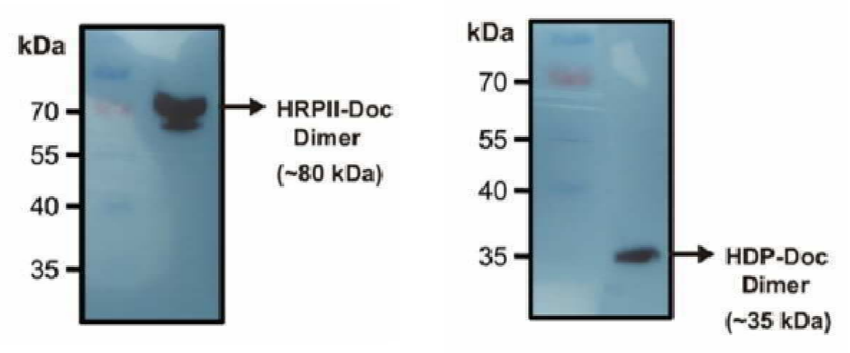
도면2


(A)
rrnBT1T2
Terminator
DocI
Linker
f1 origin
HRPII
Amp
PelB
srp
Promoter
pKEN
HRPII Doc
colE1 origin
(B)
rrnBT1T2
Terminator
f1 origin
DocI
Linker
Amp
HDP
pKEN
HDP Doc
PelB
srp
Promoter
colE1 origin
(C)
His tag
T7 Terminator
f1 Origin
miniCbpA
CBM
Coh1
Coh2
Amp
pET22b(+)
mCbpA
pelB
T7 Promoter
LacI

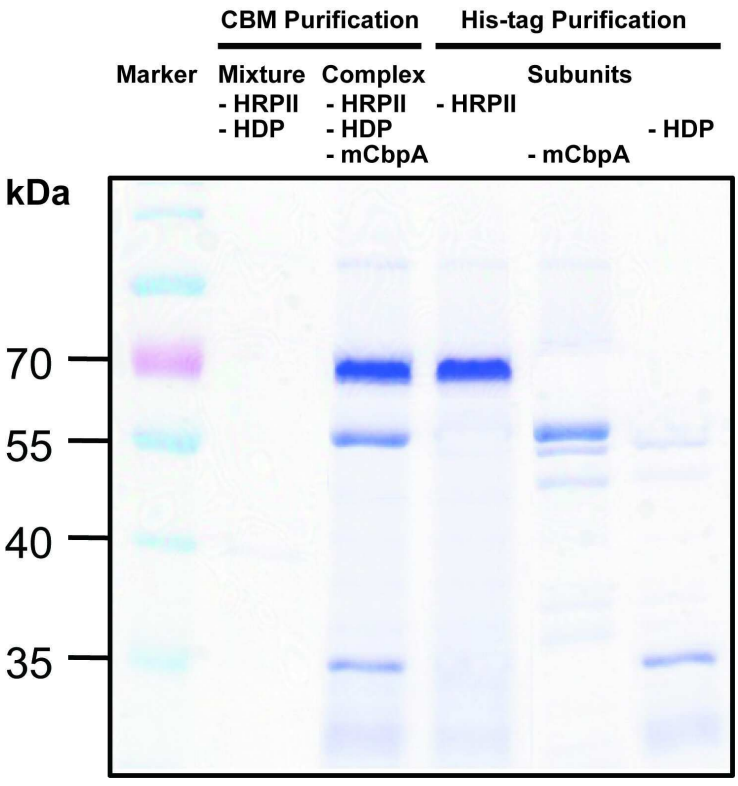
도면3


Wash
Elution
kDa
70
55
40
35
HRPII
Supernatant
Wash
Elution
kDa
70
55
40
35
25
HDP

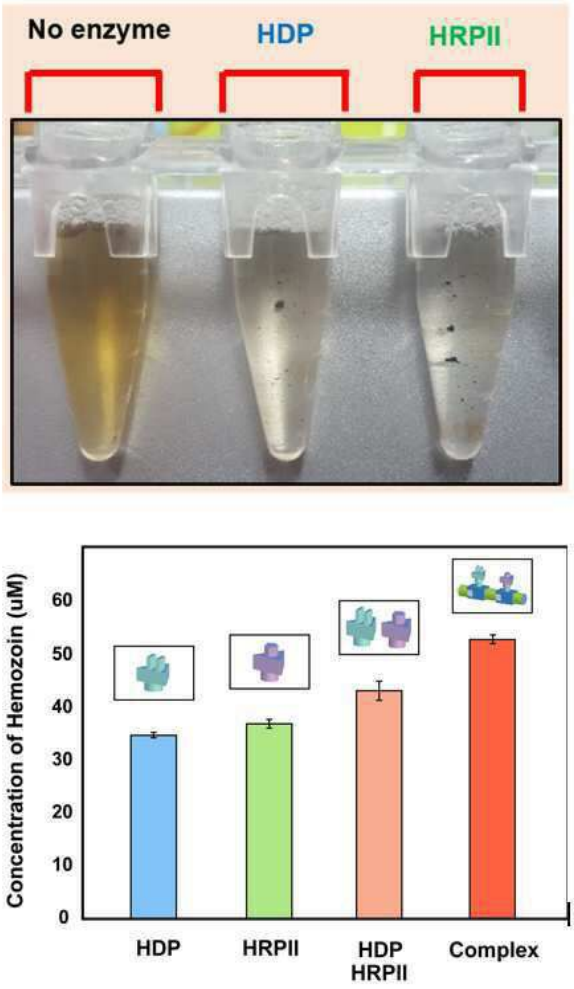
도면4


kDa
70
55
40
35
HRPII-Doc
Dimer
(~80 kDa)
kDa
70
55
40
35
HDP-Doc
Dimer
(~35 kDa)

도면5


CBM Purification
His-tag Purification
Marker
Mixture
- HRPII
- HDP
Complex
- HRPII
- HDP
- mCbpA
Subunits
- HRPII
- mCbpA
- HDP
kDa
70
55
40
35

도면6



서 열 목 록

<110> Korea University Research & Business Foundation

<120> Enzyme Complex Containing of Heme Polmerase and Heme Ligase and Method for Preparing Hemozoin Using Thereof

<130> P16-B022

<160> 31

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gcgcgaattc gaataattcc gcatttaata ataacttgt 39

<210> 2

<211> 846

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> primer

<400> 2

aataattccg catttaataa taacttgtgt agcaaaaatg caaaaggact taatttaaat 60

aagagattat tacacgaaac tcaagcacat gtagatgatg cccatcatgc tcatcatgta 120

gccgatgccc atcatgctca tcatgtagcc gatgcccatc atgctcatca tgtagccgat 180

gcccatcatg ctcatcatgc agccgatgcc catcatgctc atcatgcagc cgatgcccat 240

catgctcatc atgcagccga tgcccatcat gctcatcatg ctcaccatgc agccgatgcc 300

catcacgctc atcatgcagc cgatgcccat catgctcacc atgcagctga tgctcatcac 360

gctcatcatg cagccgatgc ccatcatgct caccatgcag ctgatgctca tcacgctcat 420

catgcatccg atgcccatca tgctcatcat gcagcctatg cccatcatgc tcatcatgca 480

tccgatgctc atcatgcagc tgatgctcac catgcagctt atgcccatca cgctcatcat 540

gcagcggatg ctcatcatgc agccgatgct caccatgcaa ccgatgctca tcatgcagcc 600

gatgctcatc atgcagccga tgctcaccat gcagccgatg ctcaccatgc aaccgatgct 660

catcacgctc accatgcagc cgatgctcac catgcaaccg atgctcatca cgctcaccat 720

gcagccgatg ctcatcatgc agccgcacac catgcaactg atgctcacca tgcagccgca 780

caccatgcaa ccgatgctca ccatgcagcc gcacaccacg aagccgccac acattgccta 840

cgccat 846

<210> 3

<211> 846

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Histidine rich protein 2-Exon2

<400> 3

aataattccg catttaataa taacttgtgt agcaaaaatg caaaaggact taatttaaat 60

aagagattat tacacgaaac tcaagcacat gtagatgatg cccatcatgc tcatcatgta 120

gccgatgccc atcatgctca tcatgtagcc gatgcccatc atgctcatca tgtagccgat 180

gcccatcatg ctcatcatgc agccgatgcc catcatgctc atcatgcagc cgatgcccat 240

catgctcatc atgcagccga tgcccatcat gctcatcatg ctcaccatgc agccgatgcc 300

catcacgctc atcatgcagc cgatgcccat catgctcacc atgcagctga tgctcatcac 360

gctcatcatg cagccgatgc ccatcatgct caccatgcag ctgatgctca tcacgctcat 420

catgcatccg atgcccatca tgctcatcat gcagcctatg cccatcatgc tcatcatgca 480

tccgatgctc atcatgcagc tgatgctcac catgcagctt atgcccatca cgctcatcat 540

gcagcggatg ctcatcatgc agccgatgct caccatgcaa ccgatgctca tcatgcagcc 600

gatgctcatc atgcagccga tgctcaccat gcagccgatg ctcaccatgc aaccgatgct 660

catcacgctc accatgcagc cgatgctcac catgcaaccg atgctcatca cgctcaccat 720

gcagccgatg ctcatcatgc agccgcacac catgcaactg atgctcacca tgcagccgca 780

caccatgcaa ccgatgctca ccatgcagcc gcacaccacg aagccgccac acattgccta 840

cgccat 846

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gcgcgaattc gatgaaaaat agattttatt ataatttgat aattaaaa 48

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

agctgccaac tgtaggatga tttaacagat tagaa 35

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

tcatcctaca gttggcagct cgttaatac 29

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

acattaacca cggttggtaa gatgaacca 29

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ttaccaaccg tggttaatgt acaatgaaaa aagg 34

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gcgcaagctt aaaaatgatg ggcttatcta ctata 35

<210> 10

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exon1 of heme ligase

<400> 10

atgaaaaata gattttatta taatttgata attaaaagat tatatacacg aagtggcggt 60

ttaagaaaac ctcaaaaggt aaccaacgac ccagaaagta taaatagaaa agtatattgg 120

tgttttgaac ataagcctgt aaaaaggaca attattaatt taatatattc acataacgaa 180

ctcaagatat tttctaatct gttaaatcat cctaca 216

<210> 11

<211> 204

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exon2 of heme ligase

<400> 11

gttggcagct cgttaataca tgaattatct ctcgatggcc cttatactgc atttttttccc 60

tccaacgaag ccatgcaatt aataaatata gaaagtttca ataaattgta taacgatgaa 120

aataaattat cagaatttgt tttaaatcac gttacgaaag aatattggct gtatagagat 180

ttatatggtt catcttacca accg 204

<210> 12

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exon3 of heme ligase

<400> 12

tggttaatgt acaatgaaaa aagggaagct ccagaaaaat taagaaattt attgaataat 60

gatttaatag taaaaattga gggggaattt aaacattgca atcattcgat atatttaaat 120

ggctcaaaaa ttataagacc aaatatgaag tgccacaatg gagttgtgca tatagtagat 180

aagcccatca ttttt 195

<210> 13

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gcgcgaattc gatgaaaaat agattttatt ataatttgat aattaaaa 48

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

gcgcaagctt aaaaatgatg ggcttatcta ctata 35

<210> 15

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gcgctctaga tttaagaagg agatatacat atgaataatt ccgcattta 49

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

cagcggatcc atggcgtagg caatgtgt 28

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

cctacgccat ggatccgctg gctcc 25

<210> 18

<211

> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

atatctgcag tcagtggtgg tggtggtggt gtaaaagcat ttttttaag 49

<210> 19

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

gcgctctaga tttaagaagg agatatacat atgaaaaata gattttatt 49

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

cagcggatcc aaaaatgatg ggcttatcta ctatat 36

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

catcattttt ggatccgctg gctccg 26

<210> 22

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

atatctgcag tcagtggtgg tggtggtggt gtaaaagcat ttttttaag 49

<210> 23

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dockerin domain

<400> 23

gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgcttaa atcaattctt 60

ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta 120

aatgctttgg atttagctgt tcttaaaaaa atgctttta 159

<210> 24

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

gcgctctaga tttaagaagg agatatacat atgaataatt ccgcattta 49

<210> 25

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 25

atatctgcag tcagtggtgg tggtggtggt gtaaaagcat ttttttaag 49

<210> 26

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 26

gcgctctaga tttaagaagg agatatacat atgaaaaata gattttatt 49

<210> 27

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 27

atatctgcag tcagtggtgg tggtggtggt gtaaaagcat ttttttaag 49

<210> 28

<211> 615

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Conjugated sequence of Exon 1, Exon2 and Exon3

<400> 28

atgaaaaata gattttatta taatttgata attaaaagat tatatacacg aagtggcggt 60

ttaagaaaac ctcaaaaggt aaccaacgac ccagaaagta taaatagaaa agtatattgg 120

tgttttgaac ataagcctgt aaaaaggaca attattaatt taatatattc acataacgaa 180

ctcaagatat tttctaatct gttaaatcat cctacagttg gcagctcgtt aatacatgaa 240

ttatctctcg atggccctta tactgcattt tttccctcca acgaagccat gcaattaata 300

aatatagaaa gtttcaataa attgtataac gatgaaaata aattatcaga atttgtttta 360

aatcacgtta cgaaagaata ttggctgtat agagatttat atggttcatc ttaccaaccg 420

tggttaatgt acaatgaaaa aagggaagct ccagaaaaat taagaaattt attgaataat 480

gatttaatag taaaaattga gggggaattt aaacattgca atcattcgat atatttaaat 540

ggctcaaaaa ttataagacc aaatatgaag tgccacaatg gagttgtgca tatagtagat 600

aagcccatca ttttt 615

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 29

ggatccgcag cgacatcatc aa 22

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 30

gcgcctcgag gctataggat ctccaatatt tat 33

<210> 31

<211> 1647

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCbpA

<400> 31

gcagcgacat catcaatgtc agttgaattt tacaactcta acaaatcagc acaaacaaac 60

tcaattacac caataatcaa aattactaac acatctgaca gtgatttaaa tttaaatgac 120

gtaaaagtta gatattatta cacaagtgat ggtacacaag gacaaacttt ctggtgtgac 180

catgctggtg cattattagg aaatagctat gttgataaca ctagcaaagt gacagcaaac 240

ttcgttaaag aaacagcaag cccaacatca acctatgata catatgttga atttggattt 300

gcaagcggag cagctactct taaaaaagga caatttataa ctattcaagg aagaataaca 360

aaatcagact ggtcaaacta cactcaaaca aatgactatt catttgatgc aagtagttca 420

acaccagttg taaatccaaa agttacagga tatataggtg gagctaaagt acttggtaca 480

gcaccaggtc cagatgtacc atcttcaata attaatccta cttctgcaac atttgataaa 540

aatgtaacta aacaagcaga tgttaaaact actatgactt taaatggtaa cacatttaaa 600

acaattacag atgcaaacgg tacagctcta aatgcaagca ctgattatag tgtttctgga 660

aatgatgtaa caataagcaa agcttattta gcaaaacaat cagtaggaac aactacatta 720

aactttaact ttagtgcagg aaatcctcaa aaattagtaa ttacagtagt tgacacacca 780

gttgaagctg taacagctac aattggaaaa gtacaagtaa atgctggaga aacggtagca 840

gtaccagtta acttaacaaa agttccagca gctggtttag caacaattga attaccatta 900

acttttgatt ctgcatcatt agaagtagta tcaataactg ctggagatat cgtattaaat 960

ccatcagtaa acttctcttc tacagtaagt ggaagcacaa taaaattatt attcttagat 1020

gatacattag gaagccaatt aatcactaag gatggagttt ttgcaacaat aacatttaaa 1080

gcaaaagcta taactggaac aactgcaaaa gtaacttcag ttaaattagc tggaacacca 1140

gtagttggtg atgcgcaatt acaagaaaaa ccttgtgcag ttaacccagg aacagtaact 1200

atcaatccaa tcgataatag aatgcaaatt tcagttggaa cagcaacagt aaaagctgga 1260

gaaatagcag cagtgccagt aacattaaca agtgttccat caactggaat agcaactgct 1320

gaagcacaag taagttttga tgcaacatta ttagaagtag catcagtaac tgctggagat 1380

atcgtattaa atccaacagt aaacttctct tatacagtaa acggaaatgt aataaaatta 1440

ttattcctag atgatacatt aggaagccaa ttaattagta aagatggagt ttttgtaaca 1500

ataaacttca aagcaaaagc tgtaacaagc acagtaacaa caccagttac agtatcagga 1560

acacctgtat ttgcagatgg tacattagca gaagtacaat ctaaaacagc agcaggtagc 1620

gttacaataa atattggaga tcctata 1647