



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.
C12N 9/02 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0059485
(43) 공개일자 2007년06월12일

(21) 출원번호 10-2005-0118377
(22) 출원일자 2005년12월06일
심사청구일자 2005년12월06일

(71) 출원인 서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교

(72) 발명자 이정국
서울 마포구 염리동 삼성래미안아파트 108동 604호
김주심
경기 용인시 기흥읍 구갈리 강남마을 써미트빌 606동 1302호
김의진
서울 서대문구 홍제1동 158-19
류민형
서울 도봉구 방학2동 628-1
이일한
경기 고양시 덕양구 성사동 신원당아파트 802동 1504호

(74) 대리인 백남훈
이학수

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 로도박터 스페로이데스로부터 유래한 슈퍼옥시드 생성 효소

(57) 요약

본 발명은 산소 농도가 1 ~ 3 %인 조건에서 과산화수소를 생성하지 않으면서 슈퍼옥시드를 생성하는 활성을 가진 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 유래 다량체 단백질에 관한 것이다. 기존의 슈퍼옥시드를 생성하는 잔틴 옥시다제(xanthine oxidase) 또는 메틸 비올로진(methyl viologen), 플럼바진(plumbagin) 등이 슈퍼옥시드 외에 과산화수소를 생성하는 데 반해, 본 발명의 다량체 단백질은 슈퍼옥시드만을 생성하므로 세포 내외에서 슈퍼옥시드 생성 시약으로 응용할 수 있으며, 상기 로도박터 스페로이데스 유래 다량체 단백질을 생성하지 않는 이종 세균에 상기 다량체 단백질을 코딩하는 유전자를 도입시킨 형질전환 세포는 배지에 클로로필리드를 첨가하는 것만으로 세포의 선택적 사멸이 가능하게 한다.

대표도

도 4

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 및 서열번호 3의 BchZ 단백질로 구성된 클로로필리드를 환원시키는 활성을 가지는 다량체 단백질에 있어서,

산소 농도가 1 ~ 3 %인 조건에서 과산화수소를 생성하지 않으면서 슈퍼옥시드를 생성하는 활성을 가지고, 상기 산소 농도에서의 클로로필리드 환원 활성은 혐기 조건에서의 클로로필리드 환원 활성의 10 % 미만인 것을 특징으로 하는 다량체 단백질:

청구항 2.

청구항 1에 있어서, 상기 다량체 단백질의 슈퍼옥시드는 생성 활성은 빛의 존재 유무에 관계없는 것을 특징으로 하는 다량체 단백질.

청구항 3.

서열번호 4의 bchX, 서열번호 5의 bchY 또는 서열번호 6의 bchZ 유전자에 서열번호 7의 rrnB 프로모터 및 N-말단에 6개의 히스티딘 잔기를 포함하는 태그(tag)를 포함하는 재조합 발현백터를 제조하는 단계;

상기 재조합 발현백터를 대장균 S17-1으로부터 로도박터 스페로이데스로 접합법을 통하여 형질전환시키고, 형질전환된 로도박터 스페로이데스를 선별하는 단계;

상기 형질전환된 로도박터 스페로이데스를 산소 농도 2 % 미만의 낮은 산소 분압에서 배양하여 발현된 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질을 포함하는 봉입체를 수득하는 단계; 및

상기 봉입체를 파쇄하여 세포질액을 회수하여 니켈-친화 크로마토그래피에 통과시켜 N-말단에 6개의 히스티딘 잔기가 포함된 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질을 회수하는 단계를 포함하는

서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질의 분리방법.

청구항 4.

청구항 3에 있어서, 상기 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)는 로도박터 스페로이데스 2.4.1(ATCC 55398)인 것을 특징으로 하는 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질의 분리방법.

청구항 5.

세포 내(*in vivo*)의 슈퍼옥시드 생성으로 인한 세포 독성을 측정하는 방법에 있어서,

상기 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 및 서열번호 3의 BchZ 단백질로 구성되는 다량체 단백질을 상기 세포 내에 도입하는 것을 특징으로 하는 세포 내의 슈퍼옥시드 생성으로 인한 세포 독성 측정방법.

청구항 6.

청구항 5에 있어서, 상기 측정방법은 과산화수소 제거를 위한 별도의 약물이 필요치 않음을 특징으로 하는 세포 내의 슈퍼옥시드 생성으로 인한 세포 독성 측정방법.

청구항 7.

슈퍼옥시드 생성 약물과 슈퍼옥시드 생성 억제 물질을 혼합하여 슈퍼옥시드 생성 억제 효과를 시험관 내(*in vitro*)에서 측정하는 방법에 있어서,

상기 슈퍼옥시드 생성 약물로 상기 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 및 서열번호 3의 BchZ 단백질로 구성되는 다량체 단백질과 클로로필리드를 이용하는 것을 특징으로 하는 슈퍼옥시드 생성 억제 효과 시험관 내 측정방법.

청구항 8.

서열번호 4의 bchX, 서열번호 5의 bchY 및 서열번호 6의 bchZ 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 제조하는 단계;

상기 재조합 발현백터를 파라코코스 디나이트리피칸스에 형질전환시켜 형질전환된 숙주세포를 제조하는 단계;

상기 형질전환된 숙주세포와 형질전환되지 않은 숙주세포를 혼합배양하는 단계; 및

상기 혼합배양 중인 배지에 클로로필리드를 첨가하는 단계를 포함하는 형질전환된 숙주세포의 선택적 사멸을 유도하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 산소 농도가 1 ~ 3 %인 조건에서 과산화수소를 생성하지 않으면서 슈퍼옥시드를 생성하는 활성을 가진 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 유래 다량체 단백질에 관한 것이다. 기존의 슈퍼옥시드를 생성하는 잔틴 옥시다제(xanthine oxidase) 또는 메틸 비올로진(methyl viologen), 플럼바진(plumbagin) 등이 슈퍼옥시드 외에 과산화수소를 생성하는 데 반해, 본 발명의 다량체 단백질은 슈퍼옥시드만을 생성하므로 세포 내외에서 슈퍼옥시드 생성 시약으로 응용할 수 있으며, 상기 로도박터 스페로이데스 유래 다량체 단백질을 생성하지 않는 이종 세균에 상기 다량체 단백질을 코딩하는 유전자를 도입시킨 형질전환 세포는 배지에 클로로필리드를 첨가하는 것만으로 세포의 선택적 사멸이 가능하게 한다.

광합성세균은 자색비유황세균 (purple non-sulfur bacteria), 자색유황세균 (purple sulfur bacteria), 녹색비유황세균 (green non-sulfur bacteria), 및 녹색유황세균 (green sulfur bacteria)으로 구분되고, 이들은 조류 (algae)나 식물의 광합성과는 달리 그 과정 중에 산소를 발생시키지 않는다. 자색비유황세균인 로도박터 속 미생물은 다양한 대사조건, 즉, 호기적 조건, 혐기 어둡조건, 혐기 광조건 모두에서 성장할 수 있다. 특히, 혐기 광조건에서는 박테리오클로로필 색소가 함유된 광기구를 이용해 장파장의 빛을 받아서 일련의 전자전달 과정이 세포막과 연관되어 일어난다. 이를 통해 빛에너지를 화학에너지로 전환시킨다. 이 화학에너지는 이산화탄소의 고정을 포함한 세포대사 활동에 필요한 에너지로 사용된다.

박테리오클로로필을 합성하는 대사과정을 매개하는 효소 중 하나로 bchX, bchY 및 bchZ의 세 개의 유전자에 의해서 만들어지는 다량체 단백질은 클로로필리드 환원 활성을 가지는 것으로 알려져 있다(도 2). 자색 및 녹색 광합성 세균에서는 상기 다량체 단백질이 존재하여 박테리오클로로필을 합성하는 반면에 조류(algae)나 식물에서는 이 효소가 존재하지 않아 박테리오클로로필을 합성하지 않고, 구조가 상이한 클로로필을 합성하여 광합성을 수행한다(Suzuki et. al., 1997, Ann. Rev. Microbiol. 31: 61-89).

슈퍼옥시드는 생체가 산소를 대사하는 과정에서 산소가 전자를 하나 더 받아 환원된 활성산소의 일종으로, 그 반응성이 높아 생체 구성물질인 핵산, 단백질, 지질을 비가역적으로 파괴시킨다. 슈퍼옥시드는 특히, 철 이온(Fe^{3+})이 존재할 때, 철 이온을 Fe^{2+} 로 환원시키고 환원된 Fe^{2+} 은 과산화수소와의 반응을 통하여 하이드록시 라디칼(hydroxy radical)을 형성한다. 하이드록시 라디칼은 생체 DNA와 반응해서 생체 돌연변이를 유발하거나 단백질의 Fe-S 중심체를 파괴하고, 지질의 과산화를 유발시키는 등 생명체의 대사 및 항상성을 저해한다는 사실이 잘 알려져 있다(Imlay, J. A., 2003, Ann. Rev. Microbiol. 57: 395-418). 따라서 슈퍼옥시드에 의한 다양한 질병의 발생기작에 대한 세포 내(*in vivo*) 또는 시험관 내(*in vitro*)의 연구를 위해서는 슈퍼옥시드 생성 시약이 필요하고, 이에 대해 오랜 연구 결과를 바탕으로 산화환원 순환시약(redox cycling agent)과 잔틴 옥시다제는 슈퍼옥시드 생성 시약으로 가장 많이 사용되고 있다.

종래의 슈퍼옥시드 생성 화합물로는 메틸 바이올로젠, 플럼바진, 메나디온(menadione) 등 산화환원 순환시약을 생체에 처리하여 슈퍼옥시드 생성체로서 사용하였으나 다음과 같은 문제점이 있어 왔다. 첫째, 상기 시약들은 그 작용 도중 슈퍼옥시드 뿐만 아니라 과산화수소를 동시에 생성시킨다. 둘째, 상기 시약들은 세포내의 환원된 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오타이드 포스페이트(NADPH)의 양을 감소시킨다. NADPH의 감소는 세포내의 정상적인 대사과정을 교란하여 활성산소와 무관한 세포 독성을 유발한다(Suntres, Z. E, 2002, Toxicology. 180: 65-77). 셋째, 화학 물질에 의한 슈퍼옥시드 및 과산화수소 생성은 시약의 처리 시 확산 및 세포막 투과를 통하여 모든 세포에 영향을 미치기 때문에 특정 세포에 대한 사멸을 선택적으로 유도할 수 없다.

또한 잔틴 옥시다제는 1902년 처음 분리된 효소로 아데노신 모노포스페이트(adenosine monophosphate; AMP)로부터 유래된 잔틴이 존재할 경우 슈퍼옥시드와 과산화수소를 생성한다(Berry, C. E. and J. M. Hare. 2004. J. Physiol. 555: 589-606). 잔틴 옥시다제는 인체를 비롯한 다양한 생명체에 이미 존재하기 때문에 광합성 미생물로부터 기원한 클로로필리드 환원효소를 사용하는 것과 같은 선택적 세포사멸을 적용하기 어렵다. 예를 들어, 클로로필리드 환원효소의 경우 인체의 변형세포에 클로로필리드 환원효소를 도입하고 외부에서 기질을 처리하여 변형세포만을 선택적으로 사멸시키는 것을 특징으로 하는 의약적 활용 방안이 가능하다. 반면, 다양한 세포내 이미 존재하는 잔틴 옥시다제를 이용한 인체 세포의 선택적 사멸은 불가능하다. 또한 잔틴 옥시다제의 기질인 잔틴이 수용성을 갖기 때문에 클로로필리드와 같은 양친매성 물질이 나타내는 세포막 투과성을 갖지 못한다. 따라서 잔틴 옥시다제를 사용할 경우 세포사멸의 대상 및 시점을 외부에서 조절하는 것이 어렵다는 문제가 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 산소가 존재하지 않는 혐기 조건에서는 클로로필리드를 환원시키는 동시에 산소 농도가 1 ~ 3 %인 조건에서 슈퍼옥시드는 생성하면서 과산화수소는 생성하지 않는 다량체 단백질을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 다량체 단백질을 코딩하는 유전자를 숙주 세포에 삽입하여 과발현시킨 후 혐기조건에서 상기 다량체 단백질을 분리하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 다량체 단백질을 세포 내에 도입하여 세포 내(*in vivo*)의 슈퍼옥시드 생성으로 인한 세포 독성을 측정하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 다량체 단백질과 클로로필리드를 이용하여 시험관내에서 슈퍼옥시드 생성을 유도하고, 혼합된 시료 물질의 슈퍼옥시드 생성 억제 효과를 측정하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 다량체 단백질을 코딩하는 유전자를 이중 세포에 도입한 형질전환 세포를 배양할 때, 클로로필리드만의 첨가로 형질전환된 세포의 선택적 사멸을 유도하는 방법을 제공한다.

발명의 구성

본 발명은 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 및 서열번호 3의 BchZ 단백질로 구성된 클로로필리드를 환원시키는 활성을 가지는 다량체 단백질에 있어서, 산소 농도가 1 ~ 3 %인 조건에서 과산화수소를 생성하지 않으면서 슈퍼옥시드를 생성하는 활성을 가지고, 상기 산소 농도에서의 클로로필리드 환원 활성은 혐기 조건에서의 클로로필리드 환원 활성의 10 % 미만인 것을 특징으로 하는 다량체 단백질을 특징으로 한다.

또한 본 발명은 서열번호 4의 bchX, 서열번호 5의 bchY 또는 서열번호 6의 bchZ 유전자에 서열번호 7의 로도박터 스페로이데스의 rrnB 프로모터(promoter) 및 N-말단에 6개의 히스티딘 잔기를 포함하는 태그(tag)를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계; 상기 재조합 발현 벡터를 대장균 S17-1로부터 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)로 접합법(conjugation)을 통하여 형질전환시키고, 형질전환된 로도박터 스페로이데스를 선별하는 단계; 상기 형질전환된 로도박터 스페로이데스를 산소 농도 2 % 미만의 낮은 산소 분압에서 배양하여 발현된 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질을 포함하는 봉입체를 수득하는 단계; 및 상기 봉입체를 파쇄하여 세포질액을 회수하여 니켈-친화 크로마토그래피에 통과시켜 N-말단에 6개의 히스티딘 잔기가 포함된 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질의 분리방법을 또 다른 특징으로 한다.

또한 본 발명은 세포 내(*in vivo*)의 슈퍼옥시드 생성으로 인한 세포 독성을 측정하는 방법에 있어서, 상기 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 및 서열번호 3의 BchZ 단백질로 구성되는 다량체 단백질을 상기 세포 내에 도입하는 것을 특징으로 하는 세포 내의 슈퍼옥시드 생성으로 인한 세포 독성 측정방법을 또 다른 특징으로 한다.

또한 본 발명은 슈퍼옥시드 생성 약물과 슈퍼옥시드 생성 억제 물질을 혼합하여 슈퍼옥시드 생성 억제 효과를 시험관 내(*in vitro*)에서 측정하는 방법에 있어서, 상기 슈퍼옥시드 생성 약물로 상기 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 및 서열번호 3의 BchZ 단백질로 구성되는 다량체 단백질과 클로로필리드를 이용하는 것을 특징으로 하는 슈퍼옥시드 생성 억제 효과 시험관 내 측정방법을 또 다른 특징으로 한다.

또한 본 발명은 서열번호 4의 bchX, 서열번호 5의 bchY 및 서열번호 6의 bchZ 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계; 상기 재조합 발현 벡터를 파라코코스 디나이트리피칸스에 형질전환시켜 형질전환된 숙주세포를 제조하는 단계; 상기 형질전환된 숙주세포와 형질전환되지 않은 숙주세포를 혼합배양하는 단계; 및 상기 혼합배양 중인 배지에 클로로필리드를 첨가하는 단계를 포함하는 형질전환된 숙주세포의 선택적 사멸을 유도하는 방법을 또 다른 특징으로 한다.

이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명의 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 및 서열번호 3의 BchZ 단백질로 구성되는 다량체 단백질은 기질로 클로로필리드가 존재하고, 산소 농도가 1 ~ 3 %인 조건인 조건에서 슈퍼옥시드는 생성하면서 과산화수소는 생성하지 않음을 특징으로 한다. 상기 다량체 단백질에 의한 슈퍼옥시드 생성은 빛의 존재 여부와 무관하다. 또한 상기 다량체 단백질의 클로로필리드 환원 활성은 산소가 완전하게 제거된 혐기 조건에서 최대값을 가지며, 공기 중의 산소 농도 1%를 초과하는 조건에서는 그 활성이 10% 이하로 관찰된다. 반면에 슈퍼옥시드 생성 활성은 공기 중의 산소 농도가 0.5 ~ 4.5 %, 바람직하게는 1 ~ 3 %, 더욱 바람직하게는 2 %인 조건에서 현저히 증가하며, 공기 중의 산소 농도 5 %를 초과하는 경우에는 활성이 급격히 감소한다(도 5). 특히 일반 호기 조건에서는 약 시간당 10 % 정도씩 단백질이 비가역적으로 파괴된다.

서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질은 아래의 방법을 통하여 각각의 단백질을 분리할 수 있다. 서열번호 4의 bchX, 서열번호 5의 bchY 또는 서열번호 6의 bchZ 유전자를 포함하는 유전자 절편은 아래의 방법과 같이 폴리메라아제 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 통해서 얻었다. 상기 유전자 절편을 서열번호 7의 로도박터 스페로이데스의 16S 라이보솜 RNA(ribosomal RNA; rRNA)를 전사하는데 관여하여 그 전사 정도가 매우 높은 rrnB 프로모터(Dryden and Kaplan, 1990, Nucleic Acid Res. 18: 7267-7277)와 N-말단에 6개의 히스티딘 잔기를 포함하는 태그(tag)를 아래의 방법을 통해 융합하고, 이를 포함하는 pRK415로부터 유래한 재조합 발현 벡터를 제조한다.

상기 재조합 발현 벡터를 대장균(*E.coli*) S17-1에 형질전환(transformation)한 다음 로도박터 스페로이데스에 아래의 방법으로 접합법(conjugation)을 통해 넣어 주었다. 벡터가 들어가 있는 대장균 세포를 대상 숙주세포와 섞은 후 평판배지에 올려놓고 6시간에서 12시간 정도 접합이 일어나게 한 후 해당 항생제가 첨가된 시스트롬 한정평판배지에 도말하여 형질전환된 숙주세포를 얻는다. 대장균 S17-1은 아미노산 중 프롤린(proline)을 합성하지 못하는 영양요구성변이주(auxotroph)로서 프롤린이 결핍된 한정평판배지에서 자라지 못하며, 형질전환되지 않은 숙주세포는 항생제를 첨가한 배지에서 자라지 못하므로 항생제 저항성을 가지는 형질전환된 숙주세포를 확보할 수 있다. 각각의 BchX, BchY, 및 BchZ 단백질의 발현은 히스-태그에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅(Western blotting) 방법을 통해 확인할 수 있다.

상기 형질전환된 숙주세포를 산소 농도 2 % 미만의 낮은 분압의 산소 조건에서 배양하여 과발현된 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질을 포함하는 봉입체를 수득한다.

상기 봉입체를 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심분리를 통하여 세포질액을 회수하여 니켈-친화 크로마토그래피에 통과시켜 N-말단에 6개의 히스티딘 잔기가 포함된 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 또는 서열번호 3의 BchZ 단백질을 회수한다.

세포 내의 슈퍼옥시드 생성으로 인한 세포 독성을 측정하는 종래 방법인 잔틴과 잔틴 옥시다제의 반응에 의한 세포 내에서의 슈퍼옥시드 생성 방법은 기질인 잔틴이 수용성 물질로서 세포막 투과성이 없기 때문에 슈퍼옥시드 생성 시점을 외부에서 조절하는 것이 어렵고, 과산화수소가 동시에 발생하므로 이를 제거하기 위해 카탈라제(catalase)를 이들 시약과 더불어 처리해야하는 불편함이 있으며, 잔틴 옥시다제를 이미 가지고 있는 인체를 비롯한 대부분의 세포에 적용하기 어렵다는 문제점이 있다. 슈퍼옥시드에 의해 나타나는 세포독성은 Fe-S 함유 단백질의 파괴와 관련 있고, 이에 비해 같은 활성산소 중에서도 과산화수소에 의해 나타나는 세포독성은 과산화수소가 철 이온(Fe^{2+})과의 화학반응 결과 생성되는 하이드록시 라디칼에 의한 지방 변성, DNA 변이 등과 관련 있는 것으로 보고되어 있다. 또한 세포 내에서 과산화수소가 생성될 경우 과산화수소는 세포막 투과성이 높고 상대적으로 안정하여 과산화수소가 생성된 세포 이외의 다른 세포에도 영향을 미칠 수 있고, 반면에 세포 내에서 생성된 슈퍼옥시드는 음전하를 띠고 있어 일반적인 세포 내의 수소이온농도 조건(pH 7)에서 막 투과성이 매우 낮고, 높은 반응성 때문에 반감기가 매우 짧아 생성된 세포에서만 주로 독성을 나타내게 된다(Korshunov and Imlay, 2002, Mol Microbiol 43: 95-106)는 점에서 본 발명은 상기 부작용을 최소화할 수 있다.

또한 시험관 내(*in vitro*)에서 특정 물질 또는 조성물의 슈퍼옥시드 생성 억제 능력을 평가하기 위하여 토다 등(Toda, et al., Planta, Med. 57:8, 1991)의 방법에 의하여 잔틴과 잔틴 옥시다제를 이용하고 있으나, 서열번호 1의 BchX 단백질, 서열번호 2의 BchY 단백질 및 서열번호 3의 BchZ 단백질을 밀폐된 용기에 담긴 완충용액에 넣고 질소로 공기를 치환하여 산소가 제거된 조건에서 30분간 반응시켜 재조합한 이후 산소를 농도 1 ~ 3 %, 바람직하게는 2 %가 되도록 주입하여 슈퍼옥시드를 생성시키고, 5,5-디메틸-1-피롤린-N-옥시드(5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)와 기질인 클로로필리드, 슈퍼옥시드 생성 억제 능력을 평가하기 위한 시료 물질 또는 조성물을 첨가한 후 일정시간 후, 특정 물질 또는 조성물의 슈퍼옥사이드 생성 억제 능력을 측정하는 것으로 이를 위해 전자 상자 공명(electro paramagnetic resonance) 등을 이용할 수 있다.

또한 본 발명은 서열번호 4의 bchX, 서열번호 5의 bchY 및 서열번호 6의 bchZ 유전자를 파라코코스 디나이트리피칸스에서 발현시켜, 클로로필리드의 첨가로 형질전환된 숙주세포만을 선택적 사멸을 유도할 수 있음을 확인하였다. 동종의 세포의 경우 영양 요구 물질이 동일하고 환경 스트레스를 동일하게 받기 때문에 기존의 특수한 유전적 조작 없이는 외부에서 선택적 사멸을 유도하기 어려운 경우가 많다. 두 종류 이상의 세포를 혼합 배양 중에 특정 세포만을 세포 내의 슈퍼옥시드 생성을 통하여 사멸시켜 공정을 제어하는 방법은 서열번호 4의 bchX, 서열번호 5의 bchY 및 서열번호 6의 bchZ 유전자를 포함하는 세포만을 선택적으로 사멸시키기 때문에, 동종의 세포의 혼합 배양 시에도 상기 유전자에 의한 형질전환 유무로서 사멸 대상을 구분하여 실시할 수 있다. 나아가 상기 유전자를 염색체상에 도입하여 발현시킬 경우 기존의 항생제 및 항생제 저항성 유전자를 사용하여 선택적 사멸을 유도하는 방법에서 발생하는 오염을 억제할 수 있다는 점에서 장점을 갖는다.

이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

실시예 1 : BchX, BchY 및 BchZ 단백질의 분리

로도박터 스페로이데스 2. 4. 1 을 대상 균주로 사용하였으며, 이 균주의 성장을 위하여 시스트롬(Sistrom) 최소배지[20 mM 인산이수소칼륨(KH_2PO_4), 3.8 mM 황산암모늄($(NH_4)_2SO_4$), 34 mM 숙신산, 0.59 mM L-글루탐산, 0.30 mM L-아스파르트산, 8.5 mM 염화나트륨, 1.05 mM 니트릴로트리아세트산(nitrilotriacetic acid), 1.2 mM 염화마그네슘($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 0.23 mM 염화칼슘($CaCl_2 \cdot 7H_2O$), 25 μ M 황산제일철($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 0.16 μ M 몰리브덴산암모늄($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$), 4.7 μ M EDTA, 38 μ M 황산아연($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 9.1 μ M 황산망간($MnSO_4 \cdot H_2O$), 1.6 μ M 황산동($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 0.85 μ M 질산코발트(II)($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), 1.8 μ M 붕산(H_3BO_3), 8.1 μ M 니코틴산, 1.5 μ M 티아민염산염, 41 nM 비오틴(biotin) (Sistrom, W. R, 1962. J. Gen. Microbiol. 28: 607-616)]를 사용하였다.

bchX, bchY, bchZ 유전자는 폴리메라아제 연쇄 반응을 통하여 N-말단에 히스-태그를 연결하였다. 전방 프라이머(primer)는 번역 시작 코돈인 ATG 코돈을 변형시켰다. 이를 위하여 bchX는 서열번호 8, bchY는 서열번호 9, bchZ는 서

열번호 10의 프라이머를 제작하여 사용하였다. 후방 프라이머는 HindIII 위치를 제조하여 bchX, bchY 및 bchZ을 위하여 각각 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13을 제작하여 사용하였다. 표 1의 밑줄은 제한효소 위치를 만들기 위하여 임의로 변형시킨 염기서열을 나타내고, 굵게 표시한 염기 서열은 해당 제한효소의 인식서열이다.

[표 1]

서열번호	구분	서열목록(5' → 3')	비고
8	전방 프라이머	CACCGGATCCCGGATGCA	BamHI 인식 서열
9	전방 프라이머	GGCAGGAGGATCCGCCAGACC	BamHI 인식 서열
10	전방 프라이머	GATCTAGATCTCGTGCAG	BglII 인식 서열
11	후방 프라이머	CGCGCGAAGCTITCGAGA	HindIII 인식 서열
12	후방 프라이머	TGTCATAAGCTITGCACGA	HindIII 인식 서열
13	후방 프라이머	CGGAAGCTTCGCTCATTG	HindIII 인식 서열

폴리메라아제 연쇄 반응으로 얻어진 조각을 bchX 와 bchY 의 경우 BamHI과 HindIII 로 오려내어 pRSET-C 벡터 (Invitrogen)의 BamHI과 HindIII 지역을 절단하고 여기에 접합하여 각각 pRSET-HisX, pRSET-HisY를 제작하였다. DNA 조각을 얻기 위한 절단을 위해 해당 제한효소(restriction endonuclease, TAKARA)를 사용하였고, 조각의 접합을 위해서는 T4 DNA 리가아제(ligase, TAKARA)를 사용하였다. 또한 bchZ의 경우 BglII와 HindIII 지역으로 오려내어 pRSET-C의 BamHI과 HindIII 지역을 이용하여 접합하여 pRSET-HisZ를 제작하였다. pRSET-C 벡터의 BamHI 위치로부터 142 bp 상위에 있는 XbaI 위치를 이용하여 pRSET-HisX, pRSET-HisY, 및 pRSET-HisZ에서 각각의 XbaI과 HindIII 조각을 얻어 pRK415에 로도박터 스페로이데스의 rrnB 프로모터를 함유하고 있는 벡터에 접합하여 pRK-HisX, pRK-HisY, 및 pRK-HisZ 구조물을 제작하였다. 이들 벡터는 세포 내에서 rrnB 프로모터에 의해 전사되고 N-말단에 히스-태그가 융합된 해당 단백질을 발현시킨다. 이들 각각의 구조물을 대장균 S17-1으로 형질전환한 다음 로도박터 스페로이데스에 접합법을 통해 가동화하였다. 형질전환체를 얻기 위해 벡터 플라스미드를 선별할 수 있는 항생제 테트라사이클린(tetracycline)을 첨가한 시스트롬 최소배지에 도말하였으며 항생제 저항성을 가지는 균주들을 확보하였다. 각각의 BchX, BchY, BchZ 단백질의 발현은 히스-태그에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅을 통해 확인할 수 있다.

이 균주들로부터 BchX, BchY, 및 BchZ 단백질을 과발현시켜 단백질을 분리하였다. pRK-HisX, pRK-HisY, 및 pRK-HisZ 구조물을 포함하는 각 균주들은 어둠 혐기 조건에서 1 L 배양병을 부틸 합성 고무 뚜껑으로 막고 배지를 질소 가스로 치환하여 배양하였다. 분리과정은 5% 수소, 5% 이산화탄소, 90% 질소를 포함하고 있는 혐기상자(Anaerobic chamber, model 10, COY, Grass Lake, MI) 안에서 이루어졌다. 세포 내에 있는 수용성의 과발현 단백질을 얻기 위해 초음파 파쇄기(sonicator, Sonifier 250, Branson, Sweden)를 이용하여 4 ??에서 10 분간 세포를 파쇄하였고, 이를 4 ℃에서 12,000 g로 원심분리 하여 수용성 세포질액을 얻은 후 니켈-친화 크로마토그래피(Qiagen)를 제조사의 방법에 따라 이용하여 분리하였다. 세포질액을 니켈 레진(resin)에 붙인 후 이미다졸(imidazole)과의 친화도 경쟁을 통해 BchX, BchY, 및 BchZ 단백질을 수득하였으며, 단백질의 용출을 위하여 150 mM의 이미다졸과 300 mM 염화나트륨이 포함된 50 mM 인산이수소나트륨(NaH₂PO₄) 버퍼(pH 7.9)를 사용하였다. 각각의 단백질의 확인은 12% 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 전기영동을 통하여 이루어졌으며 BchX는 40 kDa, BchY는 58 KDa, BchZ는 57 kDa의 밴드를 확인할 수 있었다(도 1).

도 1은 로도박터 스페로이데스로부터 BchX 단백질, BchY 단백질 및 BchZ 단백질을 분리하기 전 후의 전기영동(SDS-PAGE)을 수행한 12% 폴리아크릴아미드 겔 사진이다. 각 1번은 각각의 단백질이 발현된 세포의 전체 단백질을 나타내고, 각 2번에서 보이는 단백질들은 니켈-친화 크로마토그래피 컬럼을 통과한 니켈에 대한 친화성이 없는 일반 단백질에 해당되며, 각 3번은 분리된 단백질(BchX, BchY, BchZ)에 해당된다. 각각의 단백질의 크기를 확인하기 위하여 표준 분자량을 갖는 단백질을 함께 전기영동 하였다.

상기 분리한 BchX 단백질, BchY 단백질 및 BchZ 단백질의 분자적 특성은 아래 표 2에 나타내었다.

[표 2]

특성	BchX	BchY	BchZ
----	------	------	------

분자량(KDa)	40	58	57
등전점(pI)	5.5	6.5	5.5
단백질의 순도(%)	90	95	95
1차 서열상의 특징	ATP 결합부위 보유 Iron-sulfur center 결합부위 보유		

상기 분리한 실시예 1에서 BchX 단백질, BchY 단백질 및 BchZ 단백질을 혼합하여 실험예 2의 반응조건을 따라 다량체 단백질로 재조립하였다.

실험예 1: 효소적 특성 확인

상기 실시예 1에서 재조립한 다량체 단백질의 효소적 특성을 확인하여 표 2에 나타내었다. 이러한 효소적 특성은 아래 실험예 2의 (1)의 클로로필리드 환원 반응 및 (3)의 슈퍼옥시드 생성 확인을 위한 시토크롬 환원반응의 방법에 따라 실시하되 해당 조건만을 달리하여 확인하였다. 산소가 0.1 % 미만인 혐기조건에서는 클로로필리드 환원 활성이 최대를 나타내고, 산소가 1 ~ 3 % 존재하는 저산소분압하에서 슈퍼옥시드 생성 활성이 최대를 나타내고, 산소 농도 5 % 이상인 경우에는 슈퍼옥시드 생성 활성이 급격히 감소한다. 또한 산소가 1 ~ 3 % 존재할 때의 클로로필리드 환원 활성은 혐기 조건의 클로로필리드 환원 활성의 10 % 미만이었다.

[표 3]

	클로로필리드 환원 활성	슈퍼옥시드 생성 활성
최적 온도	30℃	30℃
최적 pH	7.4	7.4
최적 산소 농도	0%	2%
빛에 대한 안정성	안정	안정
산소에 대한 안정성	불안정 (산소 존재 시 활성 10% 이하)	불안정 (2%를 초과하는 산소농도에서 활성 감소)

실시예 2: 클로로필리드의 분리

상기 효소의 기질인 클로로필리드를 분리하기 위하여 로도박터 스페로이데스의 bchZ 유전자를 상동 재결합(homologous recombination)을 유도하는 방법을 통해 파괴하였다. bchZ 유전자가 결손된 변이주를 제작하기 위해 bchZ 유전자안에 있는 제한 효소인 BamHI를 이용하였다. BalI 과 PstI 을 이용하여 bchZ 유전자 부근을 얻은 후 BamHI 지역에 항생제 카나마이신(kanamycin) 저항성 유전자를 포함하는 전사 및 번역 종결 구조물을 끼워 넣어 자살 벡터 (suicide vector)인 pSUP2O2에 클로닝하여 pSUP-BZ를 제작하였다. 이 구조물을 사용하여 상동 재결합 시 유전자 중간에 위치하는 카나마이신 저항성 유전자에 의해 카나마이신에 대해서만 저항성을 가지고 벡터에 의한 테트라사이클린 저항성이 없는 이중교차(double crossover) 상동 재결합이 일어난 콜로니(colony)를 선별하여 bchZ 결손 변이주를 확보하였다.

이 bchZ 결손 변이주는 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)를 최종 전자전달 수용체로 사용하는 혐기 어둠조건에서 성장시켰을 경우 초록색의 클로로필리드를 배지 내에 축적시켰으며, 이를 분광 광도계(spectrophotometer, UV-2550, Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였을 때 기준에 보고된 바와 같이 663 nm의 파장에 대한 흡광도를 나타내었다. 배지 내에 축적되어있는 클로로필리드를 분리하기 위하여, 배지를 디에틸에테르(diethylether)로 추출 하였고, 이를 질소를 이용하여 건조시킨 후 디메틸설폭사이드에 녹여 반응에 사용하였다.

실험예 2: 다량체 단백질의 시험관내(in vitro)효소 활성 측정

(1) 클로로필리드 환원 반응

도 2는 박테리오클로로필의 생합성 과정을 나타낸다. BchX 단백질, BchY 단백질 및 BchZ 단백질로 구성되는 다량체 단백질(BchXYZ)은 클로로필리드 환원을 매개하는 효소로서, 박테리오클로로필 합성의 중간 단계를 매개한다.

클로로필리드 환원 반응을 위하여 반응 완충용액[100 mM HEPES-KOH(pH 7.4), 5 mM 염화마그네슘($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 5 mM 디티오쓰레이톨(dithiothreitol), 20 mM 크레아틴 포스페이트(creatine phosphate), 0.2 mg/mL 크레아틴 포스포키나제(creatine phosphokinase), 1 mM ATP, 30 mM NADH]을 준비하였다. 여기에 실시예 1에서 분리한 BchX, BchY 및 BchZ 단백질을 100 mM HEPES-KOH(pH 7.4) 버퍼에 투석(dialysis)한 후 각각의 단백질을 동일한 농도(80 nM)로 반응 완충용액에 첨가하고 질소를 이용하여 가스를 치환하여 산소를 제거하였다. 색소 운반체인 Q 단백질도 피다이 등이 발표한 방법 (Fidai et. al., 1993, J. Bacteriol. 175: 4834-4842)에 따라 분리하여 동일 농도(80 nM)로 첨가하였으며, 기질인 클로로필리드를 250 μM 농도로 첨가하여 30 °C의 혐기 조건에서 시간에 따른 기질의 변환 정도를 흡광도의 측정을 통해 관찰하였다. 혐기 조건에서 빛의 존재 여부에 따라 수행한 결과 유사한 결과를 얻은 반면에, 1 ~ 3 %의 산소 존재 시 기질의 환원 작용은 10 % 미만으로 감소하였다. 클로로필리드는 환원 작용을 통해 735 nm의 흡광도를 갖는 디아세틸 비닐 박테리오클로로필리드(2-deacetyl-2-vinyl bacteriochlorophyllide)로 전환되었다(도 3).

(2) 슈퍼옥시드 생성 확인-전자 상자 공명

효소 반응 과정 동안 생성되는 슈퍼옥시드를 전자 상자 공명(electro paramagnetic resonance; 이하 EPR이라 함)에 의해 측정하였다. 시험관 내에서의 실시예 1에서 분리한 BchX, BchY 및 BchZ 단백질의 재조합은 상기 (1)의 클로로필리드 환원 반응과 동일한 조성의 완충용액에서 실시하였다. 고무 뚜껑으로 밀폐된 5 mL의 유리병 내에 완충용액과 각 단백질을 넣은 후 이를 밀봉하고 질소로 치환시켰다. 이를 30 °C에서 30 분간 배양하여 상기 단백질의 재조합을 유도한 후, 150 mM의 5,5-디메틸-1-피롤린-N-옥시드(5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)와 기질인 클로로필리드를 첨가한 후, 산소를 2 % 첨가하고 석영 EPR 셀(cell)에서 30 °C로 1 시간 동안 반응을 유도하였다. EPR 측정은 상온에서 Bruker ER 300 EPR spectrometer를 이용하여 측정하였고, 그 조건은 보고된 방법[modulation amplitude 0.32 G, time constant 0.16 s, scan time 60 s, modulation frequency 100 kHz, microwave power 20 mW, and microwave frequency 9.76 GHz (Roubaud et. al., 1998, Anal. Biochem. 257: 210-217)]에 따라 실시하였다. 이때 슈퍼옥시드를 제거하는 슈퍼옥시드 디스뮤테이즈 (superoxide dismutase; SOD)가 첨가된 반응과 그렇지 않은 반응에서의 EPR 신호 차이를 통하여 상기 효소에 의한 슈퍼옥시드의 생성을 확인 할 수 있었다(도 4). 슈퍼옥시드를 생성시키는 시스템으로 잘 알려진 잔틴 옥시다제가 기질인 잔틴을 사용하여 발생시킨 슈퍼옥시드를 기준으로 했다(Dikalov et. al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 230: 54-57). 잔틴 옥시다제는 0.004 U으로 사용했고, 잔틴은 100 mM로 사용하였다.

(3) 슈퍼옥시드 생성 확인-시토크롬 환원

시토크롬 환원방법은 기존 방법을 응용하여 수행하였다(McCord and Fridovich, 1969, J. Biol. Chem. 244: 6049-6055). 시험관 내에서의 실시예 1에서 분리한 BchX, BchY 및 BchZ 단백질의 재조합은 상기 (1)의 클로로필리드 환원 반응과 동일한 완충용액에서 실시하였다. 고무 뚜껑으로 밀폐된 5 mL의 유리병 내에 버퍼와 각 단백질을 넣은 후 이를 밀봉하고 질소로 치환시켰다. 이를 30 °C에서 30 분간 배양하여 상기 단백질의 재조합을 유도한 후 20 μM 의 시토크롬(cytochrome c)과 기질인 클로로필리드를 넣고 산소를 각각 0, 1, 2, 5, 10%로 첨가하였다. 시토크롬의 환원은 550 nm에서 흡광도의 증가를 통해 측정하였고, 21000 $M^{-1}cm^{-1}$ 의 흡광계수(extinction coefficient)를 이용하여 값을 얻어내었다. 이때 슈퍼옥시드를 제거하는 슈퍼옥시드 디스뮤테이즈 (superoxide dismutase; SOD)가 첨가된 반응과 그렇지 않은 반응에서의 시토크롬의 환원 정도 차이를 통하여 슈퍼옥시드의 생성 정도를 확인할 수 있었다(도 5).

산소 농도를 변화시켜 상기 반응을 실시한 결과 2 % 산소 분압이 슈퍼옥시드의 최적 생성 조건임을 알 수 있었으며, 5 % 이상의 산소 농도에서는 슈퍼옥시드 생성이 거의 일어나지 않았다. 슈퍼옥시드 생성은 산소 농도 2 %일 때가 최적 조건임을 시토크롬 환원방법과 EPR을 이용하여 확인하였다. 아울러 상기 반응은 빛의 존재 여부와는 무관하게 동일한 정도의 슈퍼옥시드를 생성하였다.

실험예 2의 (1) 클로로필리드 환원 반응에서 본 발명의 다량체 단백질은 혐기 어둠조건에서 클로로필리드 환원이 관찰된 반면, 1 ~ 3 %의 산소를 주입할 경우 이러한 클로로필리드의 환원은 90% 이상 저해되어, 클로로필리드 환원 활성과 슈퍼옥시드 생성 활성의 최적 산소 농도에 현저한 차이가 있음을 확인하였다.

(4) 과산화수소 발생 여부 확인

상기 반응에서의 과산화수소의 발생 여부를 확인하기 위하여 티와리 등의 방법에 따라 실험을 실시하였다(Tiwari et. al., 2002, Plant Physiology, 128: 1271-1281). 시험관 내에서의 실시예 1에서 분리한 BchX, BchY 및 BchZ 단백질의 재조합은 상기 (1)의 클로로필리드 환원 반응과 동일한 완충용액에서 실시하였다. 이 반응액을 100 μ L 취하여 증류수로 희석하여 900 μ L가 되게 한 후 100 μ L의 황화 티타늄(titanium sulfate)을 첨가하고 실온에서 15 분간 황화티타늄의 과산화수소에 의한 산화 반응을 유도하였다. 황화티타늄의 산화정도를 405 nm에서의 흡광도 감소를 통해 측정하였고, 과산화수소의 농도에 따른 흡광도 변화의 표준 곡선을 얻어 이를 비교하였다. 그 결과 표 4에서 나타낸바와 같이 슈퍼옥시드가 생성되는 클로로필리드 환원효소 반응 도중 405 nm에서의 흡광도 변화 정도의 차이가 없었고, 슈퍼옥시드 생성 반응 중에 과산화수소가 생성되지 않음을 확인하였다.

[표 4]

	표준 용액						슈퍼옥시드 생성 효소 반응 용액
과산화수소 (mg)	0	0.1	0.3	0.5	1	2	미검출
흡광도 (405 nm)	0.86	0.80	0.70	0.61	0.40	0.04	0.87

실시예 3: 형질전환된 세포의 제조

파라코코스 디나이트리피칸스 ATCC 19367의 경우 로도박터 스페로이데스와 진화적으로 유사하나 광합성을 하지 않으며 성장 속도가 비교적 빨라 산업적으로 유용한 균주이다.

서틀벡터인 pRK415에 bchX 유전자, bchY 유전자 및 bchZ 유전자(이하 bchXYZ 유전자라 함)를 함께 클로닝 하였다. 오페론 구조로 이루어진 bchXYZ 유전자를 얻기 위해 이들을 포함한 로도박터 스페로이데스의 코스미드 라이브러리(cosmid library)를 이용하였다. bchXYZ를 포함하는 코스미드 pUI8487에서부터 bchXYZ 전체를 포함하는 조각을 제한 효소 BalI과 HincII를 이용하여 오퍼내었다. 이 조각을 pBluescript(Stratagene) 벡터의 SmaI 지역에 접합하여 pBS-bchXYZ를 제조하였다. 이후 pBS-bchXYZ를 제한효소 HindIII와 XbaI으로 오퍼내어 서틀벡터인 pRK415의 HindIII와 XbaI 지역에 융합하여 pRKXYZ 재조합 플라스미드를 완성하였다. 이것과 벡터 자체인 pRK415 플라스미드를 각각 파라코코스 디나이트리피칸스에 접합법을 통해 가동화하였고, 항생제 테트라사이클린이 들어간 시스트롬 배지에 도말하여 형질전환된 파라코코스 디나이트리피칸스를 확보하였다.

실험예 3: 형질전환된 세포 내(*in vivo*)의 슈퍼옥시드 생성 확인

상기 실시예 3에서 제조된 형질전환된 파라코코스 디나이트리피칸스에서 BchX, BchY 및 BchZ 단백질로 구성된 다량체 단백질에 의한 슈퍼옥시드 생성을 검증하였다. 우선 30 $^{\circ}$ C에서 분당 회전수(rpm) 250 이상으로 흔들어 주어 산소가 충분히 제공되는 어둠 조건에서 시스트롬 액체배지로 파라코코스 디나이트리피칸스를 배양한 다음 600 nm에서의 흡광도가 0.5 ~ 1 사이의 로그 구간 세포를 기질인 클로로필리드를 600 μ M을 첨가한 시스트롬 평판배지에 10의 4제곱의 세포수로 도말하였다. 평판배지는 액체배지에 아가로스 1.5%를 첨가하여 페트리 접시(Petri dish)에 굳혀 사용하였다. 이것을 혐기상자를 이용하여 97 % 질소가스, 1 % 이산화탄소가스, 2 % 산소가스를 채워주고 30 $^{\circ}$ C 어둠조건에서 배양하였다. 기질인 클로로필리드 600 μ M을 배지에 첨가해 주면 벡터만 함유한 균주와는 달리 bchXYZ 유전자(pRKXYZ)를 함유한 균주는 기질 첨가 시 세포 사멸에 이르렀다(도 6).

상기 결과를 통하여 상기 효소를 코딩하는 bchXYZ 유전자는 생체 내에서 그 기질인 클로로필리드 존재 시 슈퍼옥시드를 생성해서 세포를 사멸시킨다는 사실을 확인 하였으며, 이러한 작용은 빛의 존재 유무와 무관하다는 것을 아울러 확인 하였다.

발명의 효과

본 발명의 다량체 단백질은 특정 산소 조건에서 양친매성의 기질인 클로로필리드가 존재하면 생체 내외에서 슈퍼옥시드를 생성한다. 따라서 상기 다량체 단백질을 세포내에서 발현시키고 외부에서 기질을 첨가하여 주었을 경우 세포를 선택적으

로 사멸시킬 수 있다. 이러한 생체 시스템을 발효나 세포 배양에 이용하여 세포의 혼합 배양에 의한 공정 중 bchXYZ 유전자를 함유한 특정 세포만을 원하는 시기에 선택적으로 제거할 수 있다. 또한, 산화환원 순환시약인 메틸 바이올로젠 등과 같은 활성산소 발생 물질들과는 달리 과산화수소를 생성하지 않으므로 세포 내에서 슈퍼옥시드 생성 시약으로 이용될 수 있는 의학적 가치를 가진다.

도면의 간단한 설명

도 1은 BchX, BchY 및 BchZ 단백질을 로도박터 스페로이데스로부터 정제한 후, 12% 폴리아크릴아미드 겔로 전기영동(SDS-PAGE)을 수행한 사진이다. 각 1번은 각각의 단백질이 발현된 세포의 전체 단백질을 나타내고, 각 2번에서 보이는 단백질들은 니켈-친화 크로마토그래피 컬럼을 통과한 니켈에 대한 친화성이 없는 일반 단백질이고, 각 3번은 분리된 BchX, BchY 및 BchZ 단백질이다.

도 2는 박테리오클로로필(bacteriochlorophyll)의 생합성 과정을 나타낸다. BchX 단백질, BchY 단백질 및 BchZ 단백질로 구성되는 다량체 단백질(BchXYZ)은 클로로필리드 환원을 매개하는 효소로서, 박테리오클로로필 합성의 중간 단계를 매개한다.

도 3은 BchXYZ 단백질의 존재 유무에 따른 클로로필리드 환원 반응을 흡광도를 측정하여 나타낸 그래프이다. 663 nm에서 흡광도를 갖는 클로로필리드는 환원 작용을 통해 735 nm 흡광도를 갖는 디아세틸 비닐 박테리오클로로필리드(2-deacetyl-2-vinyl bacteriochlorophyllide)로 전환되었다.

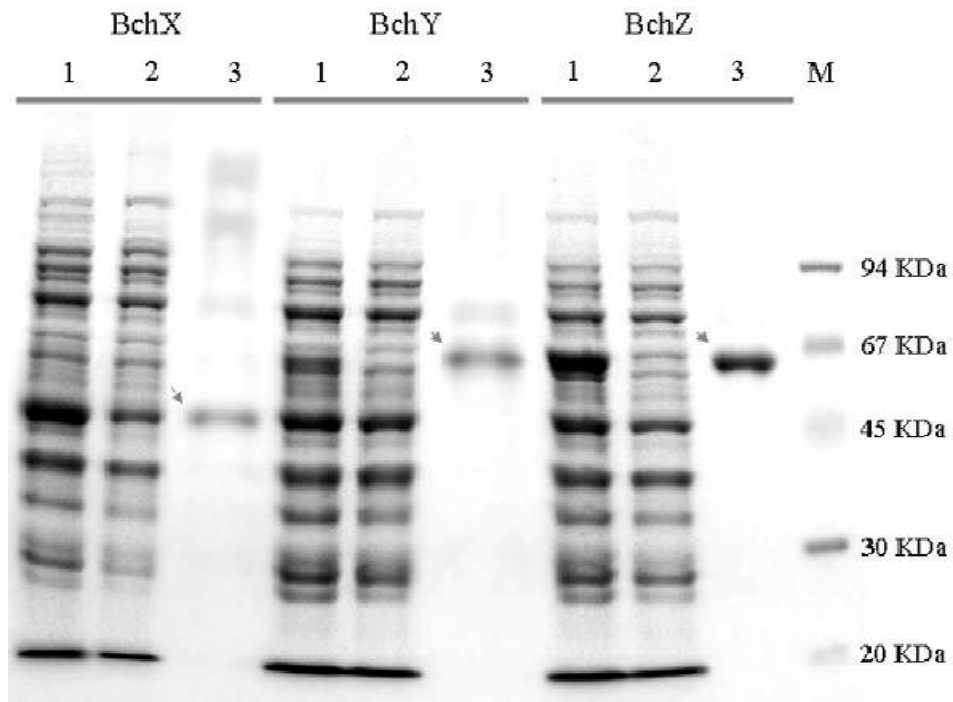
도 4는 슈퍼옥시드 생성 여부를 전자 상자기 공명(electroparamagnetic resonance)을 이용하여 확인한 결과이다. 양성 대조군으로 잔틴 옥시다제(xanthine oxidase)와 기질인 잔틴(xanthine)을 이용하였고, 음성대조군으로 BchXYZ 단백질과 클로로필리드에 슈퍼옥시드 디스뮤테이즈(superoxide dismutase)를 첨가한 것을 사용하였다.

도 5는 산소의 농도에 따른 슈퍼옥시드 생성반응을 시토크롬 (cytochrome c) 환원방법을 통해 조사한 결과의 그래프이다.

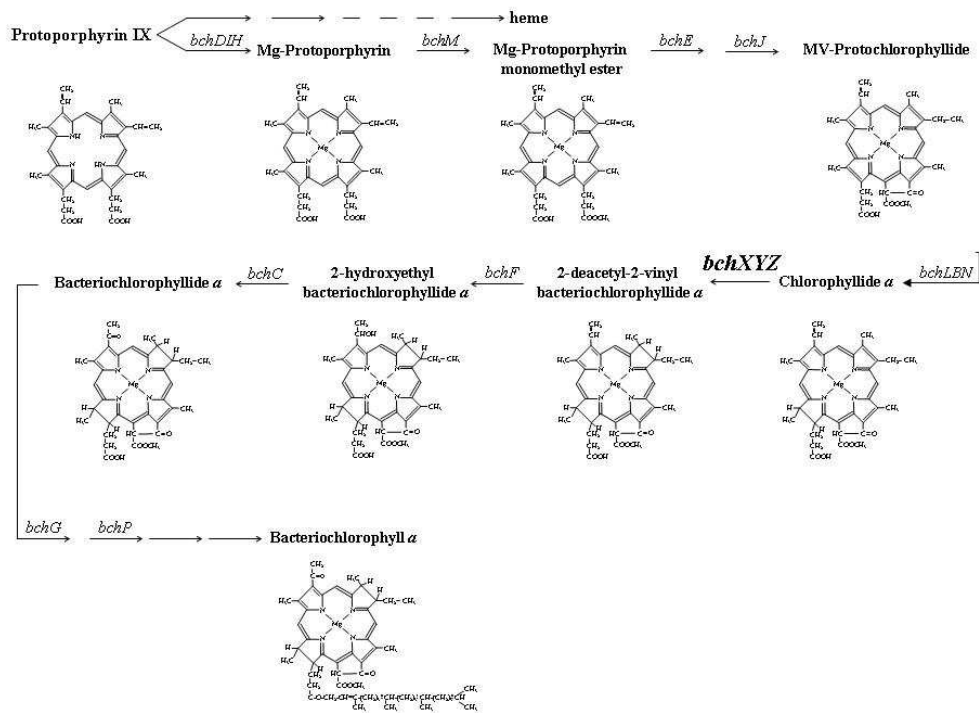
도 6은 파라코코스 디나이트리피칸스(*Paracoccus dinitrificans*)에서 bchXYZ 유전자를 발현시킨 후 클로로필리드 기질을 배지에 첨가했을 때의 파라코코스 디나이트리피칸스의 생존율을 나타낸 그래프이다. pRK415는 벡터 플라스미드(plasmid)만 형질전환된 것, pRKXYZ는 bchXYZ 유전자가 함유된 재조합 플라스미드로 형질전환된 파라코코스 디나이트리피칸스를 나타낸다.

도면

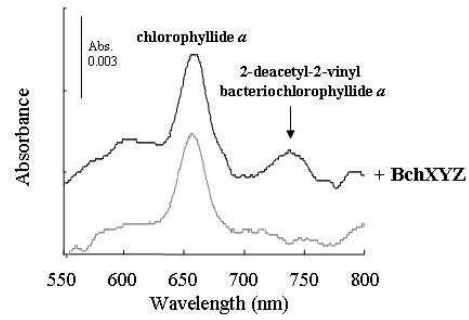
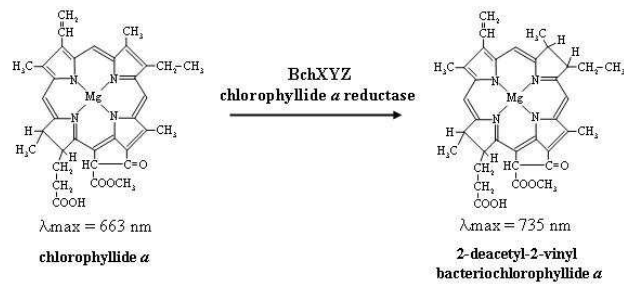
도면1



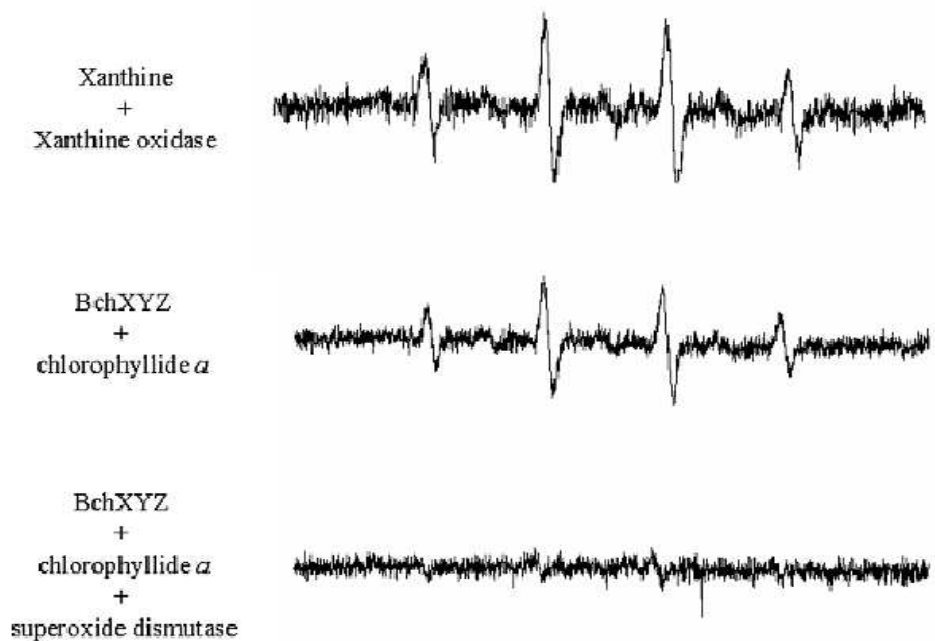
도면2



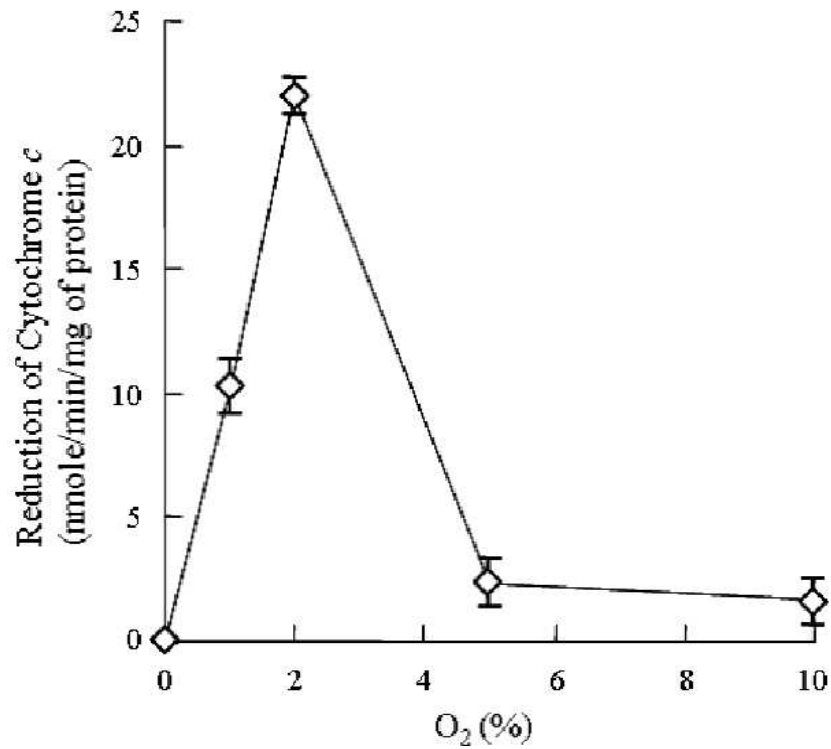
도면3



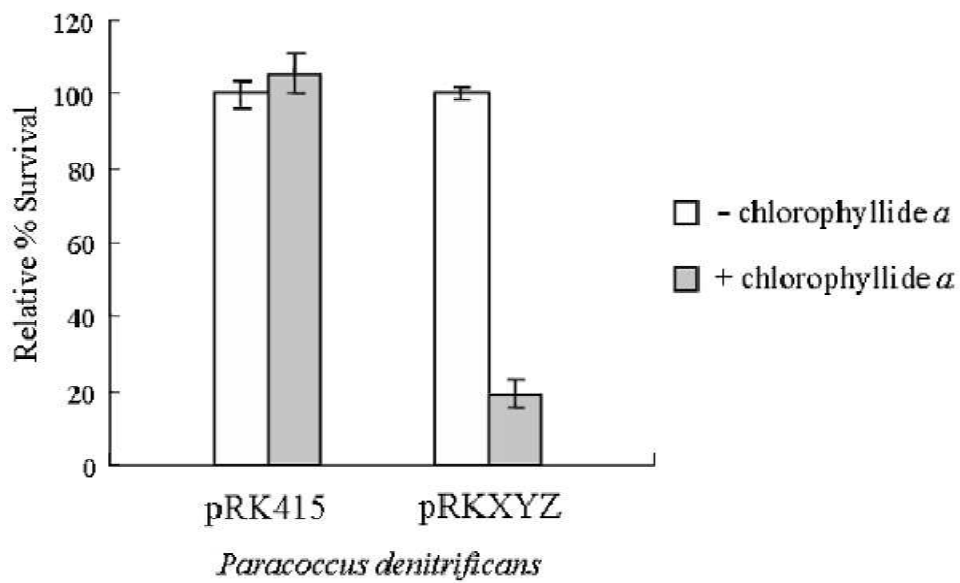
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Superoxide-generating enzyme in Rhodobacter sphaeroides
- <160> 13
- <170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Rhodobacter sphaeroides

 <400> 1
 Met Thr Asp Ala Pro Glu Leu Lys Ala Phe Asp Gln Arg Leu Arg Asp
 1 5 10 15

 Glu Ala Ala Glu Glu Pro Thr Leu Glu Val Pro Gln Gly Glu Pro Lys
 20 25 30

 Lys Lys Thr Gln Val Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Gly Gly Ile Gly Lys
 35 40 45

 Ser Phe Thr Leu Ala Asn Leu Ser Tyr Met Met Ala Gln Ile Gly Lys
 50 55 60

 Arg Val Leu Leu Ile Gly Cys Asp Pro Lys Ser Asp Thr Thr Ser Leu
 65 70 75 80

 Leu Phe Gly Gly Lys Ala Cys Pro Thr Ile Ile Glu Thr Ser Ala Arg
 85 90 95

 Lys Lys Leu Ala Gly Glu Glu Val Gln Ile Gly Asp Val Cys Phe Lys
 100 105 110

 Arg Asp Gly Val Phe Ala Met Glu Leu Gly Gly Pro Glu Val Gly Arg
 115 120 125

 Gly Cys Gly Gly Arg Gly Ile Ile His Gly Phe Glu Leu Leu Glu Lys
 130 135 140

 Leu Gly Phe His Asp Trp Asp Phe Asp Tyr Val Leu Leu Asp Phe Leu
 145 150 155 160

 Gly Asp Val Val Cys Gly Gly Phe Gly Leu Pro Ile Ala Arg Asp Met
 165 170 175

 Ala Gln Lys Val Ile Leu Val Gly Ser Asn Asp Leu Gln Ser Leu Tyr
 180 185 190

 Val Thr Asn Asn Val Cys Ser Ala Val Glu Tyr Phe Arg Lys Leu Gly
 195 200 205

 Gly Asn Val Gly Val Ala Gly Leu Val Ile Asn Lys Asp Asp Gly Thr
 210 215 220

 Gly Glu Ala Lys Ala Phe Ala Glu Ala Ala Asp Ile Pro Ile Leu Ala
 225 230 235 240

 Thr Ile Pro Ala Asp Glu Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Asn Tyr Gln

245	250	255
Ile Val Gly Ile Pro Gly Thr Gln Trp Gly Pro Leu Phe Glu Gly Leu		
260	265	270
Ala His Ala Val Gly Glu Ala Pro Pro Ile Arg Pro Lys Pro Leu Ser		
275	280	285
Gln Asp Gly Leu Leu Asp Leu Phe Thr Pro Glu Ala Ile Gly Ala Asp		
290	295	300
Phe Lys Leu Glu Pro Ala Thr Asp Ala Asp Met Arg Gly Lys Asn Ala		
305	310	315
Ala Ala Lys Lys Ser Leu Glu Val Ile Tyr Asp Asp Ala		
325	330	
<210> 2		
<211> 502		
<212> PRT		
<213> Rhodobacter sphaeroides		
<400> 2		
Met Ser Gln Thr Pro Gly Gly Ala Pro Met Ala Pro Glu Ala Met Gly		
1	5	10
Cys His Ser Thr Ala Asp Met Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ala Gly Asn		
20	25	30
Gly Glu Leu Met Glu Arg Phe Lys Ala Asp Tyr Pro Val Gly Pro His		
35	40	45
Asp Lys Pro Gln Ser Met Cys Pro Ala Phe Gly Ser Leu Arg Thr Gly		
50	55	60
Leu Arg Met Arg Arg Val Gly Thr Ile Ile Ser Gly Ser Ala Cys Cys		
65	70	75
Thr Tyr Gly Leu Ser Phe Val Ser His Phe Tyr Gly Ala Arg Arg Ser		
85	90	95
Ile Gly Tyr Val Pro Phe Asn Ser Glu Ser Leu Val Thr Gly Lys Leu		
100	105	110
Phe Glu Asp Ile Arg Glu Ala Val His Glu Met Ala Asp Pro Gln Arg		
115	120	125
Tyr Asp Ala Ile Val Val Thr Asn Leu Cys Val Pro Thr Ala Ser Gly		
130	135	140
Val Pro Leu Arg Leu Leu Pro Ser Glu Ile Asn Gly Val Arg Ile Val		

145	150	155	160
Gly Ile Asp Val Pro Gly Phe Gly Val Pro Thr His Ala Glu Ala Lys			
	165	170	175
Asp Val Leu Ala Gly Ala Met Leu Lys Tyr Ala Arg Ser Glu Ile Glu			
	180	185	190
Ala Gly Pro Val Gln Ala Pro Val Ser Gly Arg Ser Asp Arg Pro Thr			
	195	200	205
Val Ala Leu Leu Gly Glu Met Phe Pro Ala Asp Pro Val Met Ile Gly			
	210	215	220
Ala Leu Leu Ala Pro Leu Gly Leu Ala Ala Gly Pro Val Val Pro Cys			
	225	230	235
Arg Asp Trp Arg Glu Leu Tyr Ala Ala Leu Asp Ser Gly Val Ala Ala			
	245	250	255
Ala Ile His Pro Phe Tyr Thr Ala Ser Val Arg Glu Phe Gln Ala Ala			
	260	265	270
Gly Arg Ala Ile Val Gly Ser Ala Pro Val Gly His Asp Gly Thr Ala			
	275	280	285
Ala Trp Leu Ala Ala Ile Gly Glu Ala Tyr Gly Ile Ala Ala Asp Lys			
	290	295	300
Val Ala Ala Ala Gln Asn Ala Phe Leu Pro Ala Ile Arg Gly Ala Leu			
	305	310	315
Ala Gly Ala Pro Ile Lys Gly Arg Ile Thr Leu Ser Gly Tyr Glu Gly			
	325	330	335
Ser Glu Leu Ile Val Ala Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Ala Glu Val			
	340	345	350
Pro Tyr Val Gly Thr Ala Ala Gly Arg Thr Pro Trp Ser Ala Ala Asp			
	355	360	365
Arg Glu Trp Leu Glu Ala Arg Gly Thr Val Val Lys Phe Arg Ala Ser			
	370	375	380
Leu Glu Asp Asp Leu Ala Ala Met Gln Gly Phe Glu Pro Asp Leu Ala			
	385	390	395
Val Gly Thr Thr Pro Val Val Gln Lys Ala Lys Ser Leu Gly Ile Pro			
	405	410	415
Ser Leu Tyr Phe Thr Asn Leu Ile Ser Ala Arg Pro Leu Met Gly Pro			
	420	425	430

Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Gln Val Ile Asn Ala Ala Ile Gly Asn
435 440 445

Arg Glu Arg Met Ser Lys Met Lys Ala Phe Phe Ala Gly Val Gly Glu
450 455 460

Gly Asp Thr Ala Gly Ile Trp Glu Gly Ala Pro Asn Leu Arg Pro Asp
465 470 475 480

Phe Arg Ala Ala His Gln Lys Lys Leu Glu Lys Ala Ala Arg Ala Ala
485 490 495

Lys Ser Glu Glu Met Ile
500

<210> 3
<211> 491
<212> PRT
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 3
Met Leu Val Gln Asp His Asp Arg Ala Gly Gly Tyr Trp Gly Ala Val
1 5 10 15

Tyr Ala Phe Cys Ala Val Lys Gly Leu Gln Val Val Ile Asp Gly Pro
20 25 30

Val Gly Cys Glu Asn Leu Pro Val Thr Ser Val Leu His Tyr Thr Asp
35 40 45

Ala Leu Pro Pro His Glu Leu Pro Ile Val Val Thr Gly Leu Gly Glu
50 55 60

Ser Glu Met Ser Glu Gly Thr Glu Ala Ser Met Ser Arg Ala Trp Lys
65 70 75 80

Val Leu Asp Pro Ala Leu Pro Ala Val Val Val Thr Gly Ser Ile Ala
85 90 95

Glu Met Ile Gly Gly Gly Val Thr Pro Gln Gly Thr Asn Ile Gln Arg
100 105 110

Phe Leu Pro Arg Thr Ile Asp Glu Asp Gln Trp Glu Ala Ala Asp Arg
115 120 125

Ala Met Thr Trp Ile Phe Ser Glu Phe Gly Met Thr Lys Gly Arg Met
130 135 140

Pro Pro Glu Ala Lys Arg Pro Glu Gly Ala Lys Pro Arg Val Asn Ile
145 150 155 160

Leu Gly Pro Met Tyr Gly Val Phe Asn Met Ala Ser Asp Leu His Glu
 165 170 175
 Ile Arg Arg Leu Val Glu Gly Ile Gly Ala Glu Val Asn Met Val Met
 180 185 190
 Pro Leu Gly Ala His Leu Ala Glu Met Arg His Leu Val Asn Ala Asp
 195 200 205
 Ala Asn Ile Val Met Tyr Arg Glu Phe Gly Arg Gly Leu Ala Glu Val
 210 215 220
 Leu Gly Lys Pro Tyr Leu Gln Ala Pro Ile Gly Val Glu Ser Thr Thr
 225 230 235 240
 Ala Phe Leu Arg Arg Leu Gly Glu Ile Leu Gly Leu Asp Pro Glu Pro
 245 250 255
 Phe Ile Glu Arg Glu Lys His Ser Thr Leu Lys Pro Val Trp Asp Leu
 260 265 270
 Trp Arg Ser Val Thr Gln Asp Phe Phe Gly Thr Ala Asn Phe Gly Ile
 275 280 285
 Val Ala Thr Glu Thr Tyr Ala Arg Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Glu Gly
 290 295 300
 Asp Leu Gly Leu Pro Cys Ala Phe Ala Val Ala Arg Lys Arg Gly Ser
 305 310 315 320
 Lys Thr Asp Asn Glu Ala Val Arg Gly Leu Ile Arg Gln His Arg Pro
 325 330 335
 Leu Val Leu Met Gly Ser Ile Asn Glu Lys Ile Tyr Leu Ala Glu Leu
 340 345 350
 Lys Ala Gly His Gly Pro Gln Pro Ser Phe Ile Ala Ala Ser Phe Pro
 355 360 365
 Gly Ala Ala Ile Arg Arg Ala Thr Gly Thr Pro Val Met Gly Tyr Ala
 370 375 380
 Gly Ala Thr Trp Leu Leu Gln Glu Val Cys Asn Ala Leu Phe Asp Ala
 385 390 395 400
 Leu Phe His Ile Leu Pro Leu Gly Thr Glu Met Asp Ser Ala Ala Ala
 405 410 415
 Thr Pro Thr Thr Leu Arg Arg Asp Phe Pro Trp Asp Ala Asp Ala Gln
 420 425 430
 Ala Ala Leu Asp Arg Ile Val Glu Glu His Pro Val Leu Thr Arg Ile

435

440

445

Ser Ala Ala Arg Ala Leu Arg Asp Ala Ala Glu Lys Ala Ala Leu Asp
450 455 460

Ala Gly Ala Glu Arg Val Val Arg Glu Thr Val Glu Ala Leu Arg Gly
465 470 475 480

Pro Gly Phe Gly Glu Arg Lys Gly Glu Asn Gln
485 490

<210> 4
<211> 1002
<212> DNA
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 4
atgacggatg caccgaact gaaggcggtc gaccaacgcc tccgcgacga ggcggcgga 60
gagccgacgc tcgaggtgcc gcaaggcgag ccgaagaaga agacgcaggt catcgcgatc 120
tacggcaagg gcggcatcgg caagagcttc acgctggcga acctcagcta catgatggcc 180
cagatcggca agcgcgtgct gctgatcggc tgcgaccga agtccgacac gacctcgctt 240
ctgttcggcg gcaaggcctg cccacgatac atcgagacct cggccaggaa gaagctggcc 300
ggcgaagagg tccagatcgg cgacgtctgc ttcaagcgcg acggcgctctt cgcgatggag 360
ctgggcgggc ccgaggtggg ccgcggctgc ggcgggcgcg gcatcatcca cggcttcgaa 420
ctgctggaga agctcggctt ccacgactgg gacttcgact atgtgctgct cgacttcctg 480
ggcgacgtgg tctgcggcgg cttcggcctg cccatcgccc gcgacatggc gcagaagggtg 540
atcctcgtcg gatcgaacga cctccagtcg ctctatgtga cgaacaacgt ctgctcggcg 600
gtggaatatt tccgcaagct cggcggcaac gtgggcgtgg cggggctcgt catcaacaag 660
gacgacggca ccggcgaggc caaggccttc gccgaggcgg cggacattcc gatccttgcg 720
acgattccgg ccgacgagga tctgcgccgc aagtcggcga actatcagat cgtcggcatt 780
cccggcacgc aatgggggacc tctcttcgag gggctggccc atgccgtggg cgaggcgccc 840
ccgatccggc cgaagccgct gtcgcaggat ggcctcctcg acctcttcac ccccgaggcg 900
atcggcgccg acttcaagct cgagcccgcc acggatgccg acatgcgcgg caagaacgcg 960
gccgcgaaga aatcgctgga agtgatctac gacgatgctt ga 1002

<210> 5
 <211> 1509
 <212> DNA
 <213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 5
 atgagccaga cccagggcgg cgccccgatg ggcgccgagg ccatgggctg ccattccacg 60
 gccgacatgg ccgccgcggc cagtgccgcg ggcaacggcg aactgatgga gcggttcaag 120
 gccgactatc cggtcggggc ccacgacaag ccgcagagca tgtgcccggc cttcgggtcg 180
 ctgcgcaccg ggcttcggat gcggcggggtg ggcacgatca tctcgggttc ggcttgctgc 240
 acctacggcc tctcgttcgt ctgcatttc tacggcgcg gcgggtcgat cggctatgtg 300
 cccttcaatt cggaatcgct cgtcacgggc aagctgttcg aggacatccg cgaggcggtc 360
 cacgagatgg ccgatccgca gcgctatgac gcgatcgtgg tgacgaacct ctgcgtgccg 420
 accgcctcgg gcgtgccgct gcggctcctg ccctccgaga tcaacggcgt gcggatcgtg 480
 ggcatcgacg tgccgggctt cggcgtgccg acccatgccg aggccaagga cgtgctggcg 540
 ggcgcgatgc tgaaatatgc ccgctccgag atcgaggcgg gcccggtgca ggcgccggtc 600
 tcggggccggt ccgaccggcc gaccgtggcg ctgctggggc agatgttccc ggccgatccg 660
 gtgatgatcg gggcgctgct ggcgcgctg ggtcttgctg cggggcccgt ggtgccctgc 720
 cgcgactggc gcgagctcta tgccgcgctc gacagtggcg tggccgcggc gatccatccc 780
 ttctacacgg cctcgggtccg cgagtttcag gccgcaggcc gcgccatcgt gggctctgcc 840
 cccgtggggc atgacggcac cgccgcctgg cttgccgcca tcggcgaggc ctatggcatc 900
 gccgccgaca aggtggccgc cgcgcagaac gccttcctgc ccgcgatcag gggcgcgctg 960
 gccggtgcgc cgatcaaggg gcgcatcacg ctctcgggct atgagggtc cgagctgatc 1020
 gtggcgcgcc tgctgatcga gagcggcgcc gaagtgcct atgtgggcac cgccgcaggc 1080
 aggacgccct ggagtgccgc cgaccgcgaa tggctcgagg cccggggcac ggtggtgaag 1140
 ttccgcgcct cgctcgagga cgatctcgcc gcgatgcagg gcttcgagcc cgacctcgcc 1200
 gtgggcacga ccccggtggt gcagaaggcc aagtcgctgg gcatcccgtc gctctacttc 1260
 accaactca tctcggcccc gccgctgatg gggccggccg gagcgggcag cctcgcgcag 1320
 gtgatcaatg cggccatcgg caaccgcgag cggatgtcga agatgaaagc cttcttcgcc 1380

ggcgtaggcg aggggggatac ggccggcatc tgggaggggtg cgcccaacct gcgccccgac 1440
 ttccggggccg cgcaccagaa gaagctcgag aaggccgccc gggccgcaa gtccgaggag 1500
 atgatctga 1509

<210> 6
 <211> 1476
 <212> DNA
 <213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 6
 atgctcgtgc aggatcatga cagggcaggg ggctactggg gcgccgtcta tgccttctgt 60
 gcggtgaagg ggcttcaggt ggtgatcgac ggccccgtgg gctgcgagaa cctgccggtg 120
 acctcggtgc tgcattacac cgacgcgctg cccccgcacg agctgcccac cgtggtgacg 180
 ggctcggcg agagcgagat gagcgagggc accgaggcct cgatgagccg ggcttgaag 240
 gtgctggatc cggcgctgcc cgcggtggtg gtcacgggct cgatcgccga gatgatcggc 300
 ggcggcgtga cgccgcaggg cacgaacatc cagcgcttcc tgccccgcac catcgacgag 360
 gaccagtggg aagcggccga ccgggcgatg acctggatct tctcgagtt cgggatgacc 420
 aagggtcgca tgccgcccga agccaagcgc cccgaggggg cgaagccgcg ggtgaacatc 480
 ctggggcca tgtacggcgt cttcaacatg gcgtcggacc ttcacgagat tcgccgtctc 540
 gtcgagggga tcggcgccga agtgaacatg gtgatgccct tgggcgcgca tctggccgag 600
 atgcgacact tgggtcaatgc cgacgccaac atcgatcatgt accgcaatt cggccgcggg 660
 ctggccgagg tgctgggcaa gccctacctc caggcccca tcggggtcga gagcacgacc 720
 gccttctctgc gccgcctggg cgagattctg ggctcgcac cgagaccctt catcgagcgc 780
 gagaagcact cgacgctgaa gcccggtgtg gatctgtggc ggagtgtcac gcaggacttc 840
 ttccgggacg ccaatttcgg aatcggtggc accgaaactt atgcaagagg catccgaaac 900
 tatctcgaag gcgatctcgg gctgccctgc gccttcgccg tggcccgcaa gaggggctcg 960
 aagaccgaca acgaagcggg gcgcggactg atccgccagc accgtccgct cgtgctcatg 1020
 gggtcgatca acgagaagat ttaccttgcg gaactgaaag ccggtcacgg cccgcaaccc 1080
 tctttcatcg ctgcctcttt cccgggtgcg gcgatccggc gcgctaccgg aacgcccgtt 1140
 atgggatatg cagggtgctac gtggttactg caggaagttt gcaacgccct gttcgacgcc 1200

ctgttccaca ttctgcccct cgggacggag atggacagcg ccgccgccac accgacgaca 1260
 ctgcgccgcg acttcccgtg ggatgccgat gcgcaagcgg ccttgaccg catcgtagag 1320
 gagcatccgg ttctcaccgg gatcagcgcc gcgcgctgcct tgcgcgacgc cgccgagaag 1380
 gctgccctcg atgccggtgc cgagaggggtc gtgagagaga ctgtcgaagc cctgcgtggg 1440
 ccgggcttcg gcgagaggaa gggagagaac caatga 1476

<210> 7
 <211> 302
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> rrnB promoter

<400> 7
 cgtcgcgcgc accctctgcg gcggccggac gactcaccgg aggctctgag tcgccgcgca 60
 ggtcgggcga aaggggcggg tcgccggctc cgcggaacg aaaaacgcca agatttcttg 120
 gctgcgacat gaaattgtta cggagcccaa aaaatccgct tgcgcccggg gccgtctgct 180
 cctagaaacc gcttcaccga gacgaagacc ggcagcgccg gacggagacg agggagcgga 240
 tgacagaaac gtcggccgcg acaattgaag atgaggcgga cgggatcgct ggttgtctgg 300
 cg 302

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer of bchX

<400> 8
 caccggatcc cggatgca 18

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer of bchY

<400> 9
ggcaggagga tccgccagac c 21

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of bchZ

<400> 10
gatctagatc tcgtgcag 18

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of bchX

<400> 11
cgcgcaagc ttctgaga 18

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of bchY

<400> 12
tgtcataagc ttgcacga 18

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of bchZ

<400> 13
cggaagcttc gctcattg

18