



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0092789
(43) 공개일자 2016년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/06 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 7/06 (2013.01)
C07K 1/14 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0013628

(22) 출원일자 2015년01월28일

심사청구일자 2015년01월28일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

부성희

경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 10, 109동 1003호 (보라동, 민속마을 쌍용아파트)

김태립

경기도 용인시 기흥구 서천서로 125, 310동 1004호 (농서동, 서천마을휴먼시아 3단지)

(74) 대리인

고영갑, 이성원, 권정기, 임상엽

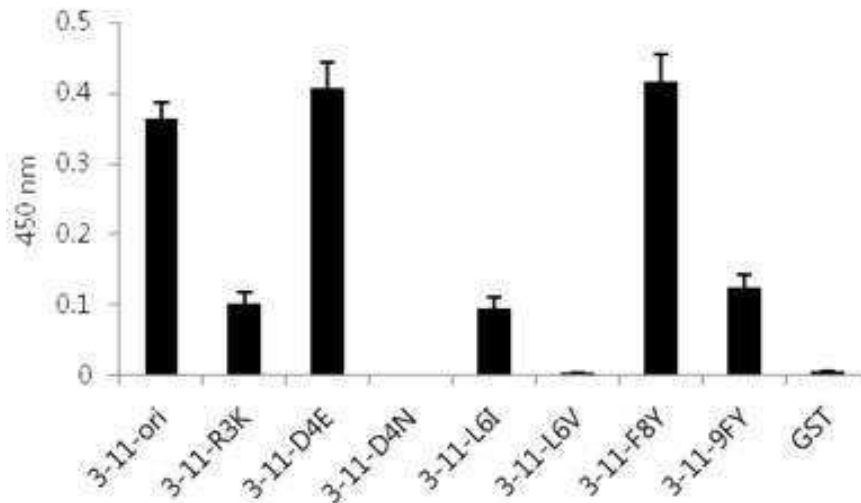
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 2B8 항체와의 친화성이 향상된 펩티드 태그 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 데이노코커스 라디오듀런스(Deinococcus radiodurans)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)으로부터 유래된 오리지널 에피토프 태그를 변이시켜 제조한 펩티드 태그 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 펩티드 태그는 짧은 길이 및 비특이적 반응의 최소화와 같은 오리지널 에피토프 태그의 장점을 그대로 보유하면서 동시에 오리지널 에피토프 태그보다 항체에 대한 친화성이 우수하다. 따라서, 본 발명에 따른 펩티드 태그 및 이에 대한 항체를 이용하는 경우 재조합 세포 내에서 발현된 융합 단백질을 매우 효율적으로 검출 또는 정제할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩티드 태그 및 이에 대한 항체를 포함하는 에피토프 태그 시스템은 특정 단백질의 세포 내 위치 확인, 기능성 규명, 검출, 정제 및 단백질 간의 상호작용 연구 등 다양한 분야에 적용이 가능하다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류

C07K 19/00 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

G01N 33/53 (2013.01)

C07K 2319/40 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드를 항체의 인식 부위 또는 항체의 결합 부위로 포함하는 펩티드 태그.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 친수성 아미노산은 타이로신인 것을 특징으로 하는 펩티드 태그.

청구항 3

펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로서,

상기 펩티드 태그는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드를 항체의 인식 부위 또는 항체의 결합 부위로 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 친수성 아미노산은 타이로신인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 32의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 33의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성되는 프라이머쌍 또는 서열번호 40의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 41의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성되는 프라이머쌍에 의해 합성되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성하기 위한 프라이머쌍으로서,

상기 펩티드 태그는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드를 항체의 인식 부위 또는 항체의 결합 부위로 포함하는 것을 특징으로 하는 프라이머쌍.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 친수성 아미노산은 타이로신인 것을 특징으로 하는 프라이머쌍.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 프라이머쌍은 서열번호 32의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 33의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성되거나 서열번호 40의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 41의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성되는 것을 특징으로 하는 프라이머쌍.

청구항 9

펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로서,

상기 펩티드 태그는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드를 항체의 인식 부위 또는 항체의 결합 부위로 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 친수성 아미노산은 타이로신인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 32의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 33의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성된 프라이머쌍 또는 서열번호 40의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 41의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성된 프라이머쌍에 의해 합성되는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 목적 단백질을 코딩하는 목적 폴리뉴클레오티드를 더 포함하고,

상기 목적 폴리뉴클레오티드는 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 13

목적 단백질 및 이와 연결된 펩티드 태그를 포함하는 융합 단백질로서,

상기 펩티드 태그는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드를 항체의 인식 부위 또는 항체의 결합 부위로 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 친수성 아미노산은 타이로신인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 15

제 13항 또는 제 14항의 융합 단백질을 펩티드 태그에 대한 항체와 접촉시켜 결합시키는 단계; 및
상기 항체에 결합된 융합 단백질의 존재를 확인하거나 양을 분석하는 단계를 포함하는 융합 단백질의 검출방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 항체는 수탁번호가 KCTC 12283BP인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 융합 단백질의 검출방법.

청구항 17

제 13항 또는 제 14항의 융합 단백질을 펩티드 태그에 대한 항체와 접촉시켜 결합시키는 단계; 및
상기 항체에 결합된 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 융합 단백질의 정제방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 항체는 수탁번호가 KCTC 12283BP인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 융합 단백질의 정제방법.

청구항 19

제 3항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드, 제 6항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 프라이머쌍 및 제 9항 내지 제 12항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나; 및

서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 및 상기 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주에서 선택된 어느 하나를 포함하는 융합 단백질 검출 또는 정제용 키트.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 하이브리도마 세포주는 수탁번호가 KCTC 12283BP인 것을 특징으로 하는 융합 단백질 검출 또는 정제용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 에피토프 태깅 시스템에 사용되는 펩티드 태그에 관한 것으로서, 더 상세하게는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)으로부터 유래되고 소정의 변이에 의해 항체와의 친화성이 향상된 펩티드 태그에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 펩티드 태그의 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 펩티드 태그를 이용하여 융합 단백질을 제조하기 위한 기술 및 융합 단백질을 검출 또는 정제하기 위한 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유용한 단백질 또는 폴리펩티드는 합성에 의해 생성되거나 천연 공급원으로부터 분리될 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 비용, 시간 면에서 비경제적이고, 생산량이 제한적이라는 단점이 있다. 따라서, 목적 단백질 또는 목

적 폴리펩티드를 과다발현하도록 재조합에 의해 제작된 형질전환체의 배양을 통해 목적 단백질 및 목적 폴리펩티드를 생산하는 것이 바람직하다. 그러나, 세포 환경에서 생산된 폴리펩티드(특히 짧은 폴리펩티드)는 세포에 존재하는 프로테아제의 작용으로 인한 분해(degradation)에 민감할 수 있고, 또한 모든 목적 단백질에 대한 항체가 존재하는 것은 아니어서 대응되는 항체가 존재하지 않는 목적 단백질을 정제하는 것이 용이하지 않을 수 있다.

[0003] 이러한 문제점을 극복하기 위하여 단백질 태깅 또는 에피토프 태깅이 사용되어왔다. 단백질 태깅(protein tagging) 또는 에피토프 태깅(epitope tagging)은 에피토프 태그의 코딩 서열을 목적 단백질의 코딩 서열에 연결한 재조합 핵산 분자를 제작하고, 이를 적당한 숙주 세포 안에서 발현시킨 후 에피토프 태그에 대한 항체를 이용하여 목적 단백질을 검출, 정량화, 정제하거나 목적 단백질의 세포 내 위치 파악, 기능성 규명 등에 사용하는 재조합 DNA 방법이다. 상업적으로 수많은 에피토프 태그와 이에 대한 리간드인 항체가 존재하며, 항체 적절한 에피토프 태그와 이에 대한 항체를 선택하는 경우 웨스턴 블롯 분석 (Western blot analysis), 면역침강 (immunoprecipitation), 면역형광(immunofluorescence), 면역세포화학(immunocytochemistry), 면역친화성 정제 (immunoaffinity purification) 방법 등으로 목적 단백질을 검출 또는 정제할 수 있기 때문에 목적 단백질에 대한 항체 생성의 필요성을 제거할 수 있다.

[0004] 현재 단백질 태깅(protein tagging) 또는 에피토프 태깅(epitope tagging)에 사용되는 에피토프 태그로는 6개 아미노산 잔기 정도의 짧은 펩티드 태그(예, 6×His 태그) 내지 40kDa 정도의 큰 단백질(예, MBP)에 이르는 많은 독특한 태그가 이용가능하며[Stevens, R.C., (2000) Structure Fold Des 8:R177-85 참조] 통상적으로 3 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 태그가 사용된다. His-태깅된 단백질은 Ni-NTA(니켈-니트릴로트리아세트산) 수지상에 특이적으로 트래핑되며, 이는 EDTA 또는 이미다졸에 의해 용출될 수 있다. 그 외에도 말토오스-결합 단백질(MBP, 396개 아미노산, 40 kDa), 스타필로코커스 단백질 A, 칼모둘린-결합 펩티드(CBP, 26개 아미노산, 2.96 kDa), GFP(238개 아미노산, 27 kDa) 및 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(GST, 211개 아미노산, 26 kDa)가 원핵생물 및 진핵생물 단백질의 검출 또는 정제에 사용될 수 있다. 또한, 일반적으로 가장 자주 사용되는 에피토프 태그로는 c-myc 태그, HA 태그, FLAG 태그 등을 들 수 있다. c-myc 태그는 사람 c-myc 단백질로부터 유래된 10개의 아미노산 길이의 에피토프 태그이고[Evans et al., (1985) Mol. Cell. Biol. , 12 : 3610-3616], HA 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌(influenza hemagglutinin) HA-1 단백질로부터 유래된 9개의 아미노산 길이의 에피토프 태그이다[Field et al., (1988) Mol. Cell. Biol., 8 : 2159-2165]. FLAG 태그는 박테리오파아지 T7으로부터 유래된 8개의 아미노산 길이의 에피토프 태그이다[Hopp et al., (1988) Bio/Technology , 6 : 1204-1210].

[0005] 한편, 에피토프 태깅시 사용되는 에피토프 태그는 목적 단백질과 융합되었을 때 목적 단백질의 3차원적 구조와 생물학적 활성에 최소한의 영향을 주는 것이 바람직한데, 일반적으로 길이가 긴 에피토프 태그(예를 들어 GST 태그 또는 MBP 태그)는 목적 단백질의 기능을 변경시키는 등의 문제점을 가진다. 반면, 상대적으로 길이가 짧은 에피토프 태그들, 예를 들어 FLAG 태그, c-myc 태그 등은 그와 융합된 목적 단백질의 특성에 거의 영향을 미치지 않고 그에 대한 항체와 매우 특이적으로 결합이 가능하며, 어떤 경우에는 융합 단백질에서 제거될 필요가 없기 때문에 현재 주로 사용되고 있다. 그러나, c-myc 태그와 FLAG 태그의 아미노산 서열은 현재까지 알려진 생물체 세포 내의 단백질 중 다수의 단백질에 동일한 서열이 포함되어 있어서 태그를 인지하는 항체의 비특이적 반응을 유도하고, 이러한 비특이적 항체 반응은 특정 목적 단백질의 분리 및 확인에 방해가 되어 실험의 신뢰성을 떨어뜨리는 문제가 있다[Ksenija Gasic et al., (2005) Plant molecular biology reporter 23:9-16]. 이러한 비특이적 반응 문제를 극복하기 위해, 단백질의 N-말단에 연속적으로 2개의 상이한 태그를 융합하여 사용하는 친화 정제 시스템이 개발된바 있다[Rigaut, G., et al. (1999) Nat Biotechnol 17:1030-2]. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1241667호 및 대한민국 등록특허공보 제10-1342974호에는 데이노코커스 라디오듀런스(Deinococcus radiodurans)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)으로부터 유래되어 비특이적인 반응을 최소화할 수 있고 동시에 짧은 아미노산 서열을 가진 펩티드 태그 및 이와 짝을 이루어 사용할 수 있는 2B8 단일클론 항체가 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 발명자는 이전에 데이노코커스 라디오듀런스(Deinococcus radiodurans)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)을 이용하여 2B8 단일클론 항체 및 이의 오리지널 에피토프 태그를 포함하는 에피토프 태깅 시스템을 개발하고, 이를 특허출원한 바 있다. 본 발명은 이러한 배경하에서 도출된

것으로서, 본 발명의 목적은 오리지날 에피토프 태그보다 2B8 단일클론 항체에 대한 친화성이 향상된 변이 펩티드 태그 및 이의 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 발명자들은 2B8 단일클론 항체에 대한 오리지날 에피토프 태그를 특정 수단으로 변이시키는 경우 2B8 단일클론 항체에 대한 친화성이 향상된다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드를 항체의 인식 부위 또는 항체의 결합 부위로 포함하는 펩티드 태그를 제공한다. 상기 친수성 아미노산은 타이로신인 것이 바람직하다.
- [0009] 또한, 본 발명은 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 상기 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 32의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 33의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성되는 프라이머쌍 또는 서열번호 40의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 41의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성되는 프라이머쌍에 의해 합성될 수 있다.
- [0010] 또한, 본 발명은 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 합성하기 위한 프라이머쌍을 제공한다. 상기 프라이머쌍은 서열번호 32의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 33의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성되거나 서열번호 40의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 41의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성되는 것이 바람직하다.
- [0011] 또한, 본 발명은 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있다. 또한, 상기 발현 벡터는 바람직하게는 목적 단백질을 코딩하는 목적 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하고, 상기 목적 폴리뉴클레오타이드는 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드와 연결된 것을 특징으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 목적 단백질 및 이와 연결된 펩티드 태그를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 상기 융합 단백질을 구성하는 펩티드 태그는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드를 항체의 인식 부위 또는 항체의 결합 부위로 포함한다. 상기 친수성 아미노산은 타이로신인 것이 바람직하다.
- [0013] 또한, 본 발명은 전술한 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 전술한 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 전술한 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나가 도입된 것을 특징으로 하는 형질 전환체를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 전술한 융합 단백질을 펩티드 태그에 대한 항체와 접촉시켜 결합시키는 단계; 및 상기 항체에 결합된 융합 단백질의 존재를 확인하거나 양을 분석하는 단계를 포함하는 융합 단백질의 검출방법을 제공한다. 상기 융합 단백질은 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입되거나 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터가 도입된 형질 전환체에 의해 발현될 수 있다. 상기 항체는 수탁번호가 KCTC 12283BP인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단일클론 항체인 것이 바람직하다.
- [0016] 또한, 본 발명은 전술한 융합 단백질을 펩티드 태그에 대한 항체와 접촉시켜 결합시키는 단계; 및 상기 항체에 결합된 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 융합 단백질의 정제방법을 제공한다. 상기 융합 단백질은 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입되거나 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터가 도입된 형질 전환체에 의해 발현될 수 있다. 상기 항체는 수탁번호가 KCTC 12283BP인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단일클론 항체인 것이 바람직하다.
- [0017] 또한, 본 발명은 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 합성하기 위한 프라이머쌍, 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합

벡터, 전술한 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 전술한 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나; 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 및 상기 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주에서 선택된 어느 하나를 포함하는 융합 단백질 검출 또는 정제용 키트를 제공한다. 상기 하이브리도마 세포주는 바람직하게는 수탁번호가 KCTC 12283BP인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 펩티드 태그는 짧은 길이 및 비특이적 반응의 최소화와 같은 오리지널 에피토프 태그의 장점을 그대로 보유하면서 동시에 오리지널 에피토프 태그보다 항체에 대한 친화성이 우수하다. 따라서, 본 발명에 따른 펩티드 태그 및 이에 대한 항체를 이용하는 경우 재조합 세포 내에서 발현된 융합 단백질을 매우 효율적으로 검출 또는 정제할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩티드 태그 및 이에 대한 항체를 포함하는 에피토프 태깅 시스템은 특정 단백질의 세포 내 위치 확인, 기능성 규명, 검출, 정제 및 단백질 간의 상호작용 연구 등 다양한 분야에 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 His 태그 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 DrBphP 및 DrBphN을 정제한 결과를 나타내는 그림이다. 도 1의 (A)는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질을 발현시키는데 사용한 유전자 작제물을 개략적으로 나타낸 모식도이다[FL, 전장 (1-755 아미노산, BphP); ΔPHY/HKD (1-321 아미노산, BphN)]; 도 1의 (B)는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 아포단백질 및 BphN 아포단백질을 Ni^{+} -NTA 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하고 BV와 20분 동안 배양한 후, SDS-PAGE 수행하고, 아연(zinc)-유도 형광에 의한 BV 결합을 탐지한 결과(오른쪽) 및 Coomassie Blue로 염색한 결과(왼쪽)를 나타낸다. 1: BphP 조추출물, 2: 정제된 BphP, 3: BphN 조추출물, 4: 정제된 BphN. 정제 조건 - 결합 & 세척: pH 8.0, 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM 이미다졸/용출: pH 8.0, 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 150 mM 이미다졸

도 2는 선택된 단일클론 항체를 이용하여 정제된 BphP 및 BphN에 대해 수행한 웨스턴 블롯의 결과를 나타낸 그림이다. 정제된 BphP 및 BphN에 대해 SDS-PAGE를 수행하고 BphP의 정제된 단일클론 항체(2B8, 2C11, 3B2, 3D2, 3H7)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. P; BphP, N; BphN. 단일클론 항체 중 2B8 항체가 BphP 단백질의 N-말단에 존재하는 에피토프를 인식하는 것을 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

도 3은 N-말단 부위를 구성하는 PCD 구조가 DrBphP와 유사한 오프 피토크롬 단백질인 Oat PhyA가 BphP의 단일클론 항체 5가지와 반응하는지 여부를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 2B8 항체에 대한 에피토프 맵핑의 결과를 웨스턴 블롯을 통해 나타낸 것이다.

도 5는 오리지널 에피토프 태그 및 변이 펩티드의 2B8 항체에 대한 친화성을 웨스턴 블롯을 통해 나타낸 것이고, 도 6은 오리지널 에피토프 태그 및 변이 펩티드의 2B8 항체에 대한 친화성을 간접 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명의 일 측면은 목적 단백질의 정제 또는 검출 등을 위한 에피토프 태깅 시스템에 이용될 수 있는 펩티드 태그에 관한 것이다. 본 발명에 따른 펩티드 태그는 서열번호 10의 아미노산 서열을 가진 오리지널 에피토프 태그의 변이 태그로서 2B8 단일클론 항체와의 친화성이 향상된 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 펩티드 태그는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드를 항체의 인식 부위 또는 항체의 결합 부위로 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 펩티드 태그는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중 2번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드 중 6번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 친수성 아미노산으로 치환된 펩티드를 항체의 인식 부위 또는 항체의 결합 부위로 포함한다. 또한, 상기 친수성 아미노산은 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신과 같이 중성 전하를 가지는 친수성 아미노산에서 선택되는 것이 바람직하고, 이중 타이로신인 것이 더 바람직하다.

- [0021] 본 발명의 명세서에서 펩티드 태그는 단백질 태그 또는 에피토프 태그와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 발명에서 용어 "펩티드 태그"는 목적 단백질에 융합되어 태그로 사용될 수 있는 펩티드를 의미한다. 또한, 본 발명에서 용어 "에피토프"는 특정 항체에 의해 인식되는 항원결합부위나 B 세포나 T 세포와 반응하는 항원의 일정 부위를 의미한다.
- [0022] 또한, 본 발명에 따른 펩티드 태그는 그 길이가 크게 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따른 펩티드 태그는 통상적으로 사용되는 에피토프 태그의 아미노산 잔기 수를 고려할 때 9 내지 30개의 아미노산 잔기를 가진 펩티드인 것이 바람직하며, 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 또는 서열번호 26의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드인 것이 바람직하다. 상기 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3번째 위치부터 11번째 위치에 해당하는 아미노산 서열을 가지며 동시에 4번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드이다. 또한, 상기 서열번호 26의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3번째 위치부터 11번째 위치에 해당하는 아미노산 서열을 가지며 동시에 8번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 타이로신으로 치환된 펩티드이다.
- [0023] 또한, 본 발명의 펩티드 태그는 서열번호 22의 아미노산 서열 또는 서열번호 26의 아미노산 서열 외에 다 기능성을 확보하기 위해 공지된 다른 에피토프 태그와 결합된 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 펩티드 태그는 목적 단백질의 검출 능력, 정제 능력, 가용성 등을 향상시키기 위해 서열번호 22의 아미노산 서열 또는 서열번호 26의 아미노산 서열에 HA 태그, FLAG 태그, His 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein) 또는 MBP(maltose binding protein)가 결합된 이중 태그의 형태로 제공될 수 있다(미국공개특허공보 제20050221308호, 미국공개특허공보 제20060099710호, 미국등록특허공보 제6462254호 참조). 또한, 본 발명의 펩티드 태그는 서열번호 22의 아미노산 서열 또는 서열번호 26의 아미노산 서열에 HA 태그, 6×His 태그, c-myc 태그 및 V5 태그 중에서 선택된 2개 이상의 태그가 결합된 삼중 태그 또는 다중 태그의 형태로 제공될 수 있다(미국공개특허공보 제20100184612호 참조). 또한, 본 발명의 펩티드 태그는 3×FLAG 태그와 같이 서열번호 22의 아미노산 서열 또는 서열번호 26의 아미노산 서열이 반복된 형태 또는 반복된 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 치환 내지 결실된 형태로 제공될 수 있다(미국등록특허공보 제7135624호 참조).
- [0024] 본 발명에 따른 펩티드 태그가 서열번호 22의 아미노산 서열 또는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경우 이에 대응하는 항체의 이용이 가능하다. 예를 들어, 서열번호 22의 아미노산 서열 또는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 태그에 대한 항체로는 대한민국 등록특허공보 제10-1241666호 및 대한민국 등록특허공보 제10-1342974호 등에 개시된 2B8 단일클론 항체가 있다. 한편, 본 발명에 따른 펩티드 태그의 균등 범위에는 서열번호 22의 아미노산 서열 또는 서열번호 26의 아미노산 서열을 구성하는 일부 아미노산이 개별적으로 치환, 결실, 첨가 또는 변형되면서도 동시에 2B8 단일클론 항체에 대한 결합 활성을 소정 수준, 예를 들어 본래 결합 활성을 기준으로 적어도 75% 이상으로 보유하는 변이체 등이 포함될 수 있다. 상기 아미노산의 치환은 바람직하게는 펩티드의 특성이 바뀌지 않는 보존적 아미노산 치환(conservative amino acid replacement)에 의해 이루어진다. 또한, 상기 아미노산의 변형은 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등에 의해 이루어질 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩티드 태그는 표지된 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩티드 태그는 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 열, pH등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 항체에 대한 활성이 증가한 펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 펩티드 태그의 균등 범위에는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3번째 위치부터 11번째 위치에 해당하는 아미노산 서열을 가지며 동시에 4번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환되고 8번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 다른 소수성 아미노산(예를 들어, 알라닌)으로 치환된 타이로신으로 치환된 펩티드가 포함된다. 본 발명의 발명자는 "REPLPAFPP"의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 태그가 오리지널 에피토프 태그보다 2B8 단일클론 항체에 대한 친화성이 매우 크다는 것을 확인하였다(결과 미제시). 한편, 본 발명에 따른 펩티드 태그에는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3번째 위치부터 11번째 위치에 해당하는 아미노산 서열을 가지며 동시에 4번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환되고 8번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 타이로신으로 치환된 펩티드가 포함되지 않는다. 본 발명의 발명자들은 "REPLPYFPP"의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 태그가 오리지널 에피토프 태그에 비해 2B8 단일클론 항체에 대한 친화성이 낮다는 것

을 확인하였다(결과 미제시).

- [0025] 본 발명의 다른 측면은 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다. 본 발명에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 비변형(non-modified) 또는 변형된(modified) 모든 폴리리보뉴클레오티드(RNA) 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(DNA)를 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일- 또는 이중-가닥 DNA, 단일-및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 또는 이중-가닥 RNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일- 또는 이중 가닥, 또는 단일- 및 이중- 가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥의 RNA 또는 DNA로서 전술한 신규 펩티드 태그를 합성하는데 사용되는 프라이머 쌍을 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 핵산 분자 또는 올리고뉴클레오티드와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0026] 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 비번역된 서열(예를 들어, 인트론)을 포함할 수 있거나, 포함하지 않을 수 있다 (예를 들어, cDNA). 펩티드가 코딩되는 정보는 코돈을 사용하여 구체화된다. 전형적으로, 아미노산 서열은 유니버설 유전자 코드를 사용하여 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다. "코돈"은 폴리펩티드 사슬에서 아미노산 서열을 결정하는 뉴클레오티드의 트리플렛(triplet)을 나타낸다. 대부분의 유기체는 단백질 또는 단백질 전구체인 이들의 폴리펩티드를 제조하는데 20 또는 21개 아미노산을 이용한다. DNA에는 4개의 가능한 뉴클레오티드인 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C) 및 티민 (T)이 존재하기 때문에, 20개 아미노산과 말단 시그널을 코딩할 수 있는 64개의 가능한 트리플렛이 존재한다. 이러한 중복성으로 인해, 대부분의 아미노산은 1개 이상의 트리플렛에 의해 코딩된다. 이에 따라, 코딩되는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 영향을 주지 않으면서 뉴클레오티드 서열의 변화를 허용할 수 있고, 이를 "코돈 축퇴성(codon degeneracy)"에 의한 "침묵 변이"라 한다. 본 발명의 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 모든 침묵 변이는 본 발명의 범위 내에 있다. 한편, 단일 아미노산을 구체화하는 코돈은 동일한 빈도로 사용될 수 없고, 각 유기체는 종종 동일한 주어진 아미노산을 코딩하는 수개의 코돈 중 하나에 대해 특정한 "선호(codon-bias)"를 나타낸다. 코딩 영역이 희귀 코돈 또는 희귀 코돈의 클러스터(cluster)를 다수 함유하는 경우, 유전자의 재합성 또는 돌연변이 유발을 이용하여 희귀 코돈을 제거함으로써 발현 수준을 증가시킬 수 있다[J. Sambrook and D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), at 15.12 참조]. 따라서, "코돈 선택"은 선택된 숙주에서 발현을 최적화시키는데 이용될 수 있다. 가장 바람직한 코돈은 고도로 발현되는 유전자에서 주로 발견된 코돈이다. E.coli에서 "코돈 선호"는 Konigsberg, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 80:687-91 (1983)을 참조할 수 있다.
- [0027] 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체의 올리고뉴클레오티드 합성법 등을 들 수 있다.
- [0028] 따라서, 본 발명의 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 다양한 염기 서열로 구성될 수 있다. 또한, 본 발명의 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성하기 위한 프라이머 쌍은 서열번호 32의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 33의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머; 또는 서열번호 40의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 41의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성될 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 전술한 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 공지의 표준 방법을 사용하여 클로닝 벡터나 발현 벡터 내로 삽입한 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에서 용어, "벡터"는 숙주 세포로 염기의 클로닝 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말한다. 본 발명에서 벡터는 외래 DNA 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있다. "복제단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 말한다. 용어 "벡터"는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기를 도입하기 위한 바이러스 및 비 바이러스 매개물을 포함한다. 용어 "벡터"는 또한 미니구형 DNA를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 벡터는 박테리아 DNA 서열을 갖지 않는 플라스미드일 수 있다. CpG 영역에서 풍부한 박테리아 DNA 서열의 제거는 전이유전자 발현 사일런싱을 감소시키고 플라스미드 DNA 벡터로부터 보다 지속적인 발현을 가져오기 위해 행해지고 있다. 또한, 용어 "벡터"는 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty)와 같은 트랜스포존[Izsvak et al. J. Mol. Biol. 302:93-102

(2000)], 또는 인공 염색체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어 "클로닝 벡터"는 숙주 세포 내로 DNA 단편을 운반하고 이를 재생산할 수 있는 물질로 정의된다. 본 발명에서 클로닝 벡터는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal), 전사 종결 서열(transcription termination sequence) 및 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)는 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)를 포함한다. 또한, 클로닝 벡터는 프로모터를 더 포함할 수 있다. 일 예로, 본 발명에서 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있고, 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)가 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있다. 또한, 본 발명에서 용어 "발현 벡터"는 적절한 숙주 안에서 클로닝된 DNA의 전사와 번역을 위해 필요한 DNA 서열로 정의된다. 또한, 본 발명에서 용어 "발현 벡터"는 개체의 세포 내에 존재하는 경우 삽입물이 발현되도록 삽입물에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 표준적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 상기 발현 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고, 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다. 발현 벡터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 원하는 단백질을 코딩하는 유전자, 및 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 그 외에 시그널 펩티드를 코딩하는 DNA, 추가적 발현 조절 서열, 원하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 선택마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. "프로모터"는 전사를 지시하기에 충분한 최소 서열을 의미한다. 또한, 세포 유형 특이적 또는 외부의 신호 또는 제제에 의해 유도되는 조절 가능한 프로모터 의존적 유전자를 발현하도록 하는 데 충분한 프로모터 구성이 포함될 수 있으며, 이러한 구성들은 유전자의 5' 또는 3' 부분에 위치할 수 있다. 본 발명에 따른 발현 벡터는 보존적 프로모터 및 유도적 프로모터 둘 다 포함할 수 있다. 프로모터 서열은 원핵생물, 진핵생물 또는 바이러스로부터 유래될 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 단일 폴리뉴클레오티드 상의 폴리뉴클레오티드 서열 연관성으로 하나의 기능이 다른 것에 의해 조절된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 발현을 제어할 수 있는 경우(즉, 코딩 서열이 프로모터의 전사 조절하에 있는 경우) 프로모터는 코딩 서열과 연결되어 작동되거나, 리보솜 결합 자리가 번역을 촉진시킬 수 있도록 위치하고 있다면, 리보솜 결합 자리는 코딩 서열에 연결되어 작동되는 것이다. 코딩 서열은 센스 방향 또는 안티센스 방향에서 조절 서열에 연결되어 작동될 수 있다. 본 발명에 따른 발현 벡터는 바람직한 일 예로 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 목적 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이때, 상기 목적 단백질을 코딩하는 목적 폴리뉴클레오티드는 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 직접적으로 연결되거나 공지의 단백질 분해 효소 인식 부위를 코딩하는 염기서열 또는 링커로 작용하는 염기서열 등에 의해 간접적으로 연결된다.

[0030]

본 발명의 또 다른 측면은 전술한 펩티드 태그를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명에서 용어 "융합 단백질"은 기능이 다른 2 개 이상의 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질이 서로 연결된 형태의 중합체를 의미한다. 본 발명에서 융합 단백질은 융합 폴리펩티드, 융합 올리고펩티드, 재조합 폴리펩티드, 재조합 올리고펩티드 또는 재조합 단백질과 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질의 제1 부분은 전술한 펩티드 태그를 적어도 하나 포함하고, 융합 단백질의 제2 부분은 목적 단백질을 적어도 하나 포함한다. 본 발명에서 목적 단백질은 목적 펩티드, 목적 올리고펩티드 또는 목적 폴리펩티드와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질은 펩티드 태그가 목적 단백질의 코돈 영역에 연결되기 때문에 신규 펩티드 태그에 대한 항체를 이용하여 효율적으로 검출 또는 정제될 수 있다. 본 발명에 따른 펩티드 태그는 목적 단백질의 C-말단뿐만 아니라, N-말단 또는 단백질의 기능성에 실질적인 영향을 미치지 않는 한 단백질 내부의 어느 곳이라도 삽입될 수 있다. 여기에서 단백질의 기능성에 실질적인 영향을 미치지 않는다는 것은 상기 펩티드 태그를 융합시키기 전에 단백질이 갖는 활성을 80% 이상, 바람직하게는 95% 이상 유지한다는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 목적 단백질로는 임의의 단백질이 사용될 수 있으며, 예를 들어 암 관련 항원인 TAG-72에 대한 인간화항체 AKA/HzK의 단쇄 FV(ScFv), 트롬보포이에틴(TPO), B-림프구 자극인자(B-lymphocyte stimulator) 등을 예시할 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질은 2 이상의 펩티드 조합, 예를 들어 펩티드 태그 및 목적 단백질의 조합을 포함하며, 상기 2 이상의 펩티드는 공유결합 또는 비공유결합으로 연결될 수 있다. 이때, 상기 펩티드 태그 및 목적 단백질은 어떠한 매개자 없이 서로 직접적으로 연결될 수도 있고, 펩티드 링커와 같은 매개자에 의해 간접적으로 연결될 수도 있다. 바람직한 일 예로, 상기 융합 단백질이 적어도 하나의 절

단가능한 펩티드 링커를 포함하는 경우 절단가능한 링커를 화학적으로 및/또는 효소에 의해 절단하여 융합 단백질로부터 목적 단백질을 회수할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 융합 단백질은 바람직하게는 하나 이상의 태그, 절단가능한 펩티드 링커 및 목적 단백질을 포함하도록 설계될 수 있다. 링커는 일반적으로 단백질을 연합시키거나 이들 단백질 간의 최소 간격 또는 기타 공간적 관계를 유지시키는 것 이외에는 특이적인 생물학적 활성을 갖지 않지만, 펩티드 링커의 구성 아미노산은 분자의 특성 예컨대, 폴딩, 순전하, 또는 소수성에 일부 영향을 끼치도록 선택될 수 있다. 펩티드 링커는 선택적으로, 융합된 구성 폴리펩티드의 분리를 위한 부위, 예를 들어 프로테아제에 의한 절단될 수 있는 부위를 포함할 수 있다. 절단 가능한 펩티드 링커는 길이가 1개 내지 약 50개의 아미노산, 바람직하게는 1개 내지 약 20개의 아미노산일 수 있다. 효소에 의해 절단가능한 펩티드 링커는 예를 들어, 카스파아제-3 절단 서열을 포함할 수 있고, 산에 의해 절단가능한 펩티드 링커는 예를 들어, 아스파르트산-프롤린 다이펩티드 (D-P) 모이어티를 포함할 수 있다. 절단가능한 펩티드 링커는 당업계에서 잘 알려진 다양한 기술을 사용하여 융합 단백질 중에 혼입시킬 수 있다. 또한, 잘 구부러지는(flexible) 펩티드 링커를 사용할 수 있고, GGSGGT 아미노산 서열, GGGGS 아미노산 서열, GGGSGGGGS 아미노산 서열을 가지는 펩티드 링커를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 펩티드 링커는 상기 펩티드 링커를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 융합 단백질의 각 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드들 사이에 인프레임(in frame)으로 작동 가능하게 연결하고, 발현 벡터를 통해 발현시킬 수 있다.

[0031] 본 발명에서 펩티드(펩티드 태그, 절단가능한 펩티드 링커, 목적 펩티드, 및/또는 융합 펩티드)를 제조하기 위한 수단은 당업계에 잘 알려져 있다[Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984; Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York, 1984; 및 Pennington et al., Peptide Synthesis Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 1994 참조]. 본 명세서에 기재된 융합 펩티드의 다양한 구성요소들(태그 펩티드, 목적 펩티드, 및 절단가능한 링커 등/절단 서열)은 공지된 화학적 합성법으로 제조될 수 있으나[Hermanson, Greg T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, New York (1996)] 참조), 화학적 합성은 흔히 비용 및/또는 불순물 때문에 길이가 약 50개의 아미노산 미만인 펩티드로 제한된다. 본 명세서에 기재된 펩티드는 바람직하게는 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기술을 사용하여 제조될 수 있다[Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Silhavy, T. J., et al., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Press Spring Harbor, NY (1984); 및 Ausubel, F. M. et. al., Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed. Current Protocols and John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 2002 참조].

[0032] 본 발명의 다른 측면은 전술한 발현 벡터를 포함하는 형질전환체에 관한 것이다. 본 발명에서 용어, "형질전환체"는 하나 이상의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 갖는 발현 벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 세포를 의미한다. 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하기 위한 방법으로는 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 갈슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposemmiated transfection), DEAE 텍스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리방법, 유전자 총(gene gun) 등을 이용하는 방법 등이 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 영양 배지에서 배양하면 융합 단백질을 대량으로 제조할 수 있고, 분리도 가능하다. 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적절히 선택하여 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절하여야 한다. 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 숙주 세포로는 원핵 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 세포 등 당업계에 공지된 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 예를 들어, 숙주 세포로 에셰리키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스와 같은 주지의 원핵 숙주들이 사용될 수 있고, 바람직하게는 대장균이 사용될 수 있다. 숙주 세포에 의한 단백질의 발현은 유도 인자인 IPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside)를 사용하여 발현을 유도할 수 있고, 유도시간은 단백질의 양을 최대화되게 조절할 수 있다. 본 발명에서 재조합적으로 생산된 단백질은 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있다. 상기 재조합 단백질이 막 결합형인 경우, 적합한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하거나 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터 유리될 수 있다. 단백질 발현에 사용된 세포는 동결-해동 반복, 음과처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리 또는 정제가 가능하다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory

Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deucher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA, 1990). 예를 들어, 숙주 세포에 의해 발현된 단백질의 분리 또는 정제 방법으로는 전기영동, 원심분리, 겔여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 면역흡착 친화력 크로마토그래피, 역상 HPLC, 겔 침투 HPLC), 등전성 포커스 및 이의 다양한 변화 또는 복합 방법을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 한편, 본 발명에 따른 펩티드 태그를 포함하는 융합 단백질은 바람직하게는 상기 펩티드 태그에 대한 항체를 이용한 면역흡착 친화력 크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제될 수 있다.

[0033] 본 발명의 또 다른 측면은 전술한 펩티드 태그, 상기 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 등의 용도에 관한 것이다.

[0034] 예를 들어, 본 발명의 일 예는 전술한 융합 단백질의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 단백질의 제조방법은 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 형질 전환체를 배양하여 융합 단백질을 발현하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 재조합 벡터에 포함된 형태로 형질 전환체에 도입된다. 또한, 상기 재조합 벡터는 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이에 연결된 목적 단백질을 코딩하는 목적 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 이때 상기 2개의 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 단백질 분해 효소 등에 의해 절단될 수 있는 부위를 포함하는 펩티드 링커의 코딩 서열에 의해 연결된다.

[0035] 또한, 본 발명의 일 예는 전술한 융합 단백질의 검출방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 단백질의 검출방법은 펩티드 태그 및 목적 단백질이 연결된 융합 단백질을 상기 펩티드 태그에 대한 항체에 접촉시켜 결합시키는 단계; 및 상기 항체에 결합된 융합 단백질의 존재를 확인하거나 양을 분석하는 단계를 포함한다. 이때, 본 발명의 일 예에 따른 융합 단백질의 검출방법은 구체적으로 웨스턴 블롯, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), 면역침강(immunoprecipitation), 면역형광(immunofluorescence), 면역세포화학(immunocytochemistry) 또는 단백질 마이크로 어레이 등을 이용할 수 있다. 이때 단백질 마이크로 어레이는 유리 기판 또는 실리콘 기판 상에 본 발명의 펩티드 태그에 대한 특이 항체를 고정시킨 것으로 대규모 샘플의 분석에 사용될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 일 예는 전술한 융합 단백질의 정제방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 단백질의 정제방법은 펩티드 태그 및 목적 단백질이 연결된 융합 단백질을 상기 펩티드 태그에 대한 항체에 접촉시켜 결합시키는 단계; 및 상기 항체에 결합된 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다. 이때, 항체는 지지체, 바람직하게는 고체 지지체에 고정되어 있다. 항체를 고정화하기 위한 지지체의 예로는 칼럼, 비드, 흡착제, 니트로셀룰로오스 페이퍼 등이 있으며, 공지된 다양한 고정화 방법을 통해 항체를 지지체에 고정화시킬 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질의 정제방법에 대한 구체적인 예는 태깅된 단백질을 포함하는 샘플을 항체가 고정된 지지체에 접촉(contact)시키는 과정을 포함한다. 이때, 상기 태깅된 단백질은 펩티드 태그에 목적 단백질이 공유결합적으로 연결된 단백질이고, 상기 펩티드 태그는 항체에 대한 특이적 결합 활성을 가지며, 상기 접촉은 항체가 펩티드 태그에 결합하는 조건하에서 이루어진다. 이후 본 발명에 따른 융합 단백질의 정제방법은 상기 항체에 결합되지 않은 성분들은 제거하는 과정 및 지지체로부터 태깅된 단백질을 분리하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 지지체 및 이에 고정된 항체는 면역 친화성 크로마토그래피의 매질로 사용된다. 상기 매질로 팩킹(pack)된 칼럼을 이용하여 면역 친화성 칼럼 크로마토그래피를 수행할 수 있다. 본 발명의 정제방법을 이용하면 고순도로 정제된 융합 단백질을 얻을 수 있고, 나아가 융합 단백질에 포함된 목적 단백질은 고유한 기능을 유지할 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 일 예는 융합 단백질의 발현, 검출 또는 정제용 키트를 제공한다. 본 발명에 따른 융합 단백질의 발현, 검출 또는 정제용 키트는 전술한 펩티드 태그, 상기 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 합성하기 위한 프라이머 쌍, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 폴리뉴클레오티드나 재조합 벡터로 형질 전환된 형질 전환체에서 선택되는 어느 하나를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 융합 단백질의 발현, 검출 또는 정제용 키트는 전술한 펩티드 태그에 대한 항체 또는 상기 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주에서 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 융합 단백질의 발현용 키트는 바람직하게는 본 발명의 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 융합 단백질의 검출 또는 정제용 키트는 바람직하게는 본 발명의 펩티드에 대한 항체를 포함한다. 이때 상기 키트를 구성하는 재조합 벡터는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이거나, 사용자가 발현 벡터를 쉽게 제조할 수 있는 형태로 제공되는 것이 바람직하다. 상기 융합 단

백질은 펩티드 태그와 목적 단백질이 연결된 폴리펩티드이다. 또한, 상기 키트를 구성하는 항체는 적절한 지지체 상에 고정된 형태로 제공되는 것이 바람직하다. 또한, 융합 단백질 검출용 키트는 펩티드 태그에 대한 항체를 검출할 수 있는 수단을 더 포함하는 것이 바람직하다. 이때, 본 발명의 펩티드 태그에 대한 항체를 검출할 수 있는 수단은 바람직하게는 이차 항체이다. 또한, 상기 융합 단백질 검출용 키트를 구성하는 본 발명의 펩티드 태그에 대한 항체 또는 이차 항체는 바람직하게는 효소, 방사성 물질, 형광물질 등과 같은 표지 물질로 표지될 수 있고, 표지 방법은 접합(conjugation)인 것이 바람직하다. 또한, 융합 단백질 정제용 키트는 펩티드 태그의 분리를 위한 단백질 분해 효소를 더 포함할 수 있다. 아울러, 본 발명에 따른 키트는 설명서, 제한 효소, 리가제, 버퍼 용액 등을 더 포함할 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 보호범위를 제한하는 것은 아니다.

[0039] **실시예 1: 데이노코커스 라디오듀란스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 유전자 및 BphN 유전자의 클로닝**

[0040] 데이노코커스 라디오듀란스(Deinococcus radiodurans) 박테리오피토크롬 단단백질(BphP; 서열번호 1) 전체 길이를 코딩하는 유전자(서열번호 2)와 DrBphP의 N-말단을 기준으로 1~321 위치의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드(BphN; 서열번호 3)를 코딩하는 유전자(서열번호 4)를 PCR을 이용하여 클로닝하였다. 구체적으로 데이노코커스 라디오듀란스(Deinococcus radiodurans) 박테리오피토크롬 단백질(BphP) 전체 길이를 코딩하는 유전자(서열번호 2)를 주형으로 하고, BphP 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머 또는 BphN 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머 및 Ex-Taq(TAKARA) 중합효소를 이용하여 PCR을 30 사이클 전후로 수행하고, 증폭된 BphP DNA 산물과 BphN DNA 산물을 얻었다. 하기 표 1은 증폭된 BphP DNA 산물과 BphN DNA 산물을 얻기 위해 사용된 프라이머를 나타낸 것이다. 하기 표 1에 나타난 프라이머 및 후술하는 모든 프라이머는 Bioneer co.(KR)에 의뢰하여 제작하였다.

표 1

서열번호	프라이머 종류	염기 서열(5'→3')	프라이머에 포함된 제한 효소 인식 부위
5	BphP 클로닝용 forward primer	GCCATATGATGAGCCGGGACCCGTTGCC	Nde I
6	BphP 클로닝용 reverse primer	GCCTCGAGTCAGGCATCGGCGCTCCCGG	Xho I
7	BphN 클로닝용 forward primer	GCCATATGATGAGCCGGGACCCGTTGCC	Nde I
8	BphN 클로닝용 reverse primer	GCCTCGAGCGCTTCCTTGACCTGAACCTG	Xho I

[0042] 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel(QA-Agarose gel TM, Q-BIO, CAT#AGAH0250)에서 running하고, 자외선 조사를 통하여 증폭시킨 DNA의 크기를 확인하였다. 그 후 DNA 증폭 산물에 해당하는 gel상의 band만을 내려내고 gel elution kit(FavorPrep GEL/PCR purification mini kit, FAVORGEN, CAT#FAGCK001-1)를 이용하여 원하는 DNA만을 분리한 후 Easy T-벡터(promega)에 결합하고, Bioneer co.(KR)에 위탁하여 염기 서열을 측정하였다. 그 결과, PCR을 통해 생성된 DNA 산물이 원하는 목적 염기 서열인 BphP DNA와 BphN DNA를 가지는 것을 확인하였다.

[0043] 이후, 제한효소 Nde I과 Xho I을 이용하여 증폭된 BphP DNA 산물과 BphN DNA 산물을 각각 pET28a(+) 벡터(제조사 : Novagen)에 삽입하고, 대장균인 BL21 컴피턴트 세포(제조사 : RBC, Taipei, Taiwan)에 42℃에서 1분 동안 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환시키고, 이를 카나마이신이 포함된 LB 배지 상에서 배양하여 BphP 단백질과 BphN 단백질을 발현시켰다.

[0044] **실시예 2 : 데이노코커스 라디오듀란스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질 및 BphN 단백질의 발현**

[0045] BL21 컴피턴트 세포에 형질전환되어 LB 배지 상에서 자란 콜로니(colony)들을 카나마이신이 포함된 LB 배지에 접종하고 37℃에서 약 8시간 이상 종배양(seed culture)하였다. 종배양한 세포를 카나마이신이 포함된 LB 배지에 접종하고 OD₆₀₀에서의 값이 0.6이 될 때까지의 농도로 키운 후 전체 농도가 0.5mM이 되도록 IPTG(isopropyl-

1-thio- β -D-galactopyranoside)를 첨가하고 25℃에서 6시간 동안 단백질 발현을 유도했다. 그 후 세포들을 원심분리하여 상층액을 버리고 펠렛을 바인딩 버퍼(100mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 및 10mM 이미다졸, pH 8.0)로 재현탁 시켰다. 다음으로 펠렛 재현탁을 소니케이션하여 세포를 깨뜨리고, 다시 원심분리하여 상층액만을 따로 분리한 후 Ni^{+} -NTA 칼럼(QIAGEN)을 이용하여 단백질을 정제하였다. 그 이후 정제된 단백질을 -70℃에서 보관하였다.

[0046] 도 1의 (A)는 데이노코커스 라디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질 및 BphN 단백질을 발현시키는데 사용한 유전자 작제물을 개략적으로 나타낸 모식도이다[FL, 전장 (1-755 아미노산, BphP); Δ PHY/HKD (1-321 아미노산, BphN)]. 도 1에서 보이는 바와 같이 BphP 단백질과 BphN 단백질에는 BV의 결합에 중요한 역할을 하는 PAS와 GAF 도메인 및 Cys-24 잔기가 모두 포함되어 있기 때문에 그 자체로만으로 BV와의 결합이 가능하다. holo-BphP 단백질을 획득하기 위해 정제된 Apo-BphP 단백질과 Apo-BphN 단백질에 빌리버딘(BV, 2 μ g/ml, Frontier, Scientific, Carnforth, UK)을 첨가하고 10분간 실온에서 반응시켰다. 이후 반응 샘플들에 대해 SDS-PAGE를 실시한 다음 zinc acetate 용액(20mM zinc acetate, 150mM Tris-Cl, pH 7.0)에 20분간 반응시킨 후 UV 아래서 단백질의 형광 신호를 관찰하였다. 또한, 반응 샘플들에 대해 SDS-PAGE를 실시한 다음 coomassie 염색을 실시하였다. 도 1의 (B) 중 왼쪽은 coomassie 염색의 결과를 나타낸 것이고, 도 1의 (B) 중 오른쪽은 zinc 블롯의 결과를 나타낸 것이다. 도 1의 (B)에서 보이는 바와 같이 BphP 단백질 및 BphN 단백질의 발현 및 정제가 원활하게 이루어짐을 확인할 수 있었다.

[0047] **실시예 3: 데이노코커스 라디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질 및 BphN 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체의 제조**

[0048] 3-1 : 면역처리

[0049] 정제된 BphP 단백질 또는 BphN 단백질을 항원으로 하고, 여기에 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 생후 6주된 암컷 BALB/c 마우스의 복강 내에 주사하였다. Immersion은 vortexer로 1시간 혼합 후 같은 방법으로 Incomplete Freund's adjuvant와 항원을 혼합하여 복강 내에 주사하였다. 2주 후에 마우스의 꼬리로부터 채혈하여 ELISA 테스트 후 항체의 역가가 1/1000에서 1.0 이상이면 세포 융합에 사용하였다. 세포융합을 위한 2차 면역 처리로부터 4주째에 동량의 항원을 PBS에 희석하여 복강 내에 주사하였다. 3일 후에 마우스를 희생시켜 세포 융합시켰다.

[0050] 3-2 : 단일클론 항체 생산을 위한 세포융합

[0051] B 림프구 세포원으로서, 복부 절개 후 지방이나 다른 장기가 최대한 분리되도록하며 과다출혈되지 않도록 비장을 무균적으로 적출하여 세포 strainer로 균질화한 후 기본 배지로 희석하고 원심분리를 2회 반복하여 세척하였다. B 림프구와 골수종 세포를 적정비율로 혼합하고 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 남은 세포 혼합물을 가볍게 흔들어 주고, 미리 데워놓은 RBC lysis 완충용액 10mL을 넣고 현탁시킨 후 20분간 37℃에 배양한 후 FBS를 넣고 원심분리하였다. 세포융합은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 원심분리된 세포 혼합물에 PEG(polyethylene glycerol) 1500 용액을 37℃를 유지한 상태에서 천천히 첨가하고, 다시 기본 배지를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이후, 신속하게 원심분리하여 상층액을 버리고 남은 세포 혼합물을 마크로파지 배지에 조심스럽게 현탁시키고 96 well 조직배양판에 분주한 후 37℃의 조건으로 이산화탄소 항온배양기에서 배양하였다.

[0052] 3-3 : 융합세포의 선택

[0053] 세포융합 실시 5일 후에 융합세포의 선택배지인 HAT배지를 각 well에 첨가하였다. 그 후 3일 간격으로 HAT 배지를 같은 방법으로 첨가해주고, 세포융합 11일 후 완전 배지에 HT supplement를 첨가한 HT 배지로 갈아주며 현미경으로 매일 관찰하여 융합세포의 성장 정도를 확인하였다. 성장이 확인된 well의 상층액을 취해 ELISA에 의해 항체 생성을 확인하고, 일단 원하는 항체를 분비한다고 판단되는 융합 세포주는 제한 희석법으로 1,2,3차 클로닝을 수행하여 융합 세포 집단이 하나의 세포주로부터 유래되는 클론이 되게 하였다.

[0054] 3-4 : ELISA에 의한 융합세포 선별

[0055] 면역시킨 항원에 대한 면역성 여부와 단일클론 항체의 제작을 위한 세포융합 후 융합세포 선별을 위해 96 well

조직 배양판에 ELISA 코팅 완충용액으로 희석시킨 항원 단백질 용액을 가하고 4℃에서 반응시켰다. 이후 항원 단백질 용액을 흡입하여 제거하고 각 well의 나머지 표면에 블로킹 용액을 가하고 1시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 그 후 블로킹 용액을 제거하고, PBST 용액으로 3회 세척하였다. 융합세포 배양 상층액을 각 well에 가하고 37℃에서 반응시킨 후, 그 용액을 제거하고 PBST 용액으로 3회 세척하였다. Horseradish peroxidase(HRP) conjugated anti-mouse immunoglobulin(anti-mouse IgG)을 PBS로 희석한 용액을 각 well에 첨가하였다. OPD(orthophenylenediamine dihydrochloride) 기질 용액을 well에 넣고 상온에서 10분간 반응하고, stop 용액으로 반응을 정지시켰다. 이때 반응하여 발색된 정도를 확인하기 위하여 ELISA 판독기로 흡광도를 492nm에서 측정하였고, 측정된 결과를 기초로 총 24개의 후보 하이브리도마 세포주 클론을 선별하였다.

[0056]

3-5 : Fusion plate ELISA 테스트를 통한 항원과의 결합 정도 재확인 및 항체의 정제

[0057]

총 24개의 후보 하이브리도마 세포주 클론에 대하여 항원으로 주사하였던 BphP 단백질과 BphN 단백질로 Fusion plate ELISA 테스트를 실시하여 그 결합 정도를 확인하였고, 그 결과를 하기의 표 2에 나타내었다. 하기의 표 2에서 보이는 바와 같이 2B8 클론과 2C11 클론은 데이노코커스 라디오듀렌스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질과 BphN 단백질에서 모두 높은 수치로 발색되는 것으로 보아 BphP 단백질의 N-말단 부위를 인식하는 것으로 추정되었다. 하지만 3B2 클론 및 3D2 클론은 BphP 단백질에서는 높은 수치를 보이고, BphN 단백질에서는 0에 가까운 수치를 나타내는 것으로 보아 BphP 단백질의 C-말단 부위를 인식하는 것으로 추정되었다. 이들과는 다르게 3H7 클론의 경우에는 BphP단백질에서 높은 수치를 보이고 BphN 단백질에서도 어느 정도의 낮은 수치를 나타내는 것으로 보아 BphP 단백질 C-말단 쪽 외에 N-말단 부위도 어느 정도 인식하는 것으로 추정되었다.

표 2

[0058]

하이브리도마 세포주 클론	항원 단백질과의 결합 정도(492nm에서의 흡광도)	
	BphN	BphP(full)
1B6	0.0660	1.3190
1B11	0.1560	2.3700
1D6	0.0550	2.3180
2B8	2.3400	2.4200
2C11	2.3480	2.4040
2D9	0.1430	2.2730
2E3	2.1720	1.8020
2F7	0.1220	2.4430
2H8	0.0650	1.3440
3A4	1.9180	2.3770
3B2	0.0980	2.2900
3B3	0.0700	2.1650
3C11	1.9730	2.2590
3D2	0.0640	2.2830
3D10	0.1180	2.4280
3D11	1.6850	2.3130
3F10	0.0730	2.3570
3G2	0.0880	2.0510
3G9	0.0800	1.5580
3H1	1.7840	2.0950
3H7	0.4640	2.3490
4B7	1.9730	2.2620
4E2	0.2050	2.3770
4E3	0.0550	2.2650

[0059]

그 후 상기 5개의 하이브리도마 세포주 클론에 대하여 1차 cloning plate ELISA 테스트, 2차 cloning plate ELISA 테스트를 실시하였고 최종적으로 ascites를 생성하여 항체의 정제를 진행하였다. 그 결과 5개의 단일클론 항체인 2B8 항체, 2C11 항체, 3B2 항체, 3D2 항체 및 3H7 항체를 확보하였다. 항체의 정제는 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 8주 이상 된 BALB/c 마우스에 pristane 0.5ml를 복강주사 한 후, 1주 내지 10일 뒤에 하이

브리도마 세포를 배양하여 PBS로 3회 세척하고 5×10^6 cell/0.5ml의 농도가 되도록 PBS로 희석한 후 주사기를 사용하여 복강에 주사하였다. 1주에서 10일 후 복수가 차오르는 것을 관찰하여 마우스를 경추탈골로 희생시켜 복부에 작은 구멍을 내고 복수가 흐르지 않도록 유의하면서 혈청 분리관을 이용하여 복수를 채취하였다. 실온에서 약 1 시간 정도 정치하고 원심분리하여 RBC를 제거하였다. 채취한 복수에 적당량의 PBS를 넣은 후, 4℃에서 ammonium sulfate와 서서히 혼합하였다. 4℃에서 원심분리한 후, 필터를 통과시켰다. Protein A와 DFME 섞은 비드를 적당량 넣은 다음, Tris 완충용액을 bed vol의 10배로 세척하였다. 항체를 넣어서 protein A/G와 잘 섞이면 fraction을 받고, Tris 완충용액으로 세척한 뒤, glycine을 넣어 여러 번에 걸쳐 elution하였다. 이렇게 정제된 항체를 dialysis bag에 넣고 PBS 완충용액에서 3시간 동안 투석하고, PBS 완충용액으로 다시 교체하여 하룻밤 동안 투석하고, 투석이 끝난 항체는 정량하여 보관하였다.

[0060] 실시예 4 : 단일클론 항체의 특이성 분석

상기 확보한 항체들이 기발현 및 정제한 BphP 단백질과 BphN 단백질에 대해서도 같은 결과를 나타내는지 확인해 보기 위하여 웨스턴 블롯(Western blot)을 실시하였다. 정제된 BphP 단백질과 BphN 단백질 5 μ g 대해 1차 항체로서 농도가 1mg/ml인 각각의 단일클론 항체들을 2% 스킵밀크에 대해 1:1000의 비율로 사용한 후 2차 항체로서 HRP-마우스 항체(SIGMA)를 1:10000 비율로 처리하여 웨스턴 블롯을 실시하였다. 그 결과, 2B8 항체와 2C11 항체는 하이브리도마 세포주 클론에 대한 ELISA 테스트와 마찬가지로의 결과로 BphP 단백질과 BphN 단백질에 모두 결합하는 결과가 나왔다(도 2). 따라서 상기 2가지 항체는 모두 BphP의 N-말단 부위에 결합하는 것이라고 생각할 수 있었다. 그리고 3B2 항체 및 3D2 항체는 BphP 단백질에 대해서는 밴드가 나왔으나 BphN 단백질에 대해서는 밴드가 나오지 않는 것으로 보아 BphP 단백질의 C-말단 부위에 결합할 것이라는 결과를 얻을 수 있었다. 하지만 3H7 항체의 경우에는 ELISA 테스트에서의 결과와는 다르게 오로지 BphP 단백질만을 인식하는 결과가 나왔다. 또한 각각의 항체들의 결합 정도는 N-말단 부위에 결합하는 2B8 항체 및 2C11 항체가 가장 강하게 결합하였으며 C-말단 부위를 인식한다고 생각되는 3D2 항체는 그보다는 약하게 인식하는 밴드를 보였다. 그 다음으로 3H7 항체 및 3B2 항체 순으로 강하게 결합하는 밴드가 나왔다.

한편, DrBphP는 식물 피토크롬과 유사한 구조를 가지고 있는데, 특히 N-말단 부위를 구성하는 PCD는 둘 다 모두 PAS, GAF, PHY 도메인을 포함하는 매우 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 상기 항체들이 오토(oat) 피토크롬 단백질과 반응하는지 여부를 확인해보았다. 하지만 상기 데이노코커스 라디오듀런스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질에 대한 단일클론 항체들 5가지 모두 오토 피토크롬 단백질(Oat PhyA)에는 결합하지 않는 결과를 보였다(도 3). 따라서 상기 데이노코커스 라디오듀런스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질에 대한 단일클론 항체들은 기존의 Oat 피토크롬 단백질에 대한 항체들과는 다른 에피토프를 인식하는 BphP 특이적인 새로운 항체임을 확인할 수 있었다.

본 발명자들은 데이노코커스 라디오듀런스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질에 대한 단일클론 항체들 중 가장 강하게 결합한 2B8 항체의 하이브리도마 세포주 2B8을 2012년 9월 24일자로 한국생명공학연구원 생명자원 센터(KCTC)에 기탁하였고, 하이브리도마 세포주 2B8의 수탁번호는 KCTC 12283BP이다. 그리고, 2B8 항체의 아이소타입(isotype)을 마우스 항체를 이용한 ELISA 방법으로 결정하였다. 2B8 항체의 중쇄 아이소타입은 IgG 2a이었고, 경쇄 아이소타입은 κ (kappa)이었다.

[0064] 실시예 5 : 2B8 단일클론 항체의 에피토프 확인을 위한 에피토프 맵핑

상기 데이노코커스 라디오듀런스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질에 대한 단일클론 항체인 2B8 항체의 에피토프를 확인하기 위하여 DrBphP 제조합 부분 펩티드(recombinant partial peptide)를 제작하고, 에피토프 맵핑을 실시하였다.

먼저, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3~12 위치의 아미노산 서열(서열번호 9)을 코딩하는 DNA, 3~11 위치의 아미노산 서열(서열번호 10)을 코딩하는 DNA, 3~10 위치의 아미노산 서열(서열번호 11)을 코딩하는 DNA 및 4~12 위치의 아미노산 서열(서열번호 12)을 코딩하는 DNA를 클로닝하기 위하여 각각에 대한 프라이머를 제작하였다. 제작한 프라이머 및 PrimeSTAR HS(TAKARA, R040) 중합효소를 이용하여 PCR을 30 사이클 전후로 수행하고, 증폭된 DNA 산물을 얻었다. 상기 DNA 클로닝을 위한 PCR 반응은 별도의 주형을 필요로 하지 않으며, 1 사이클의 PCR 시 순방향 프라이머(Forward Primer)와 역방향 프라이머(Reverse primer)의 결합에 의해 증폭을 위한 주형을 얻을 수 있다. 하기 표 3은 상기 4개의 DrBphP 제조합 부분 펩티드

(recombinant partial peptide)를 코딩하는 DNA 증폭 산물을 얻기 위해 PCR 시 사용한 프라이머를 나타낸 것이다.

표 3

[0067]

서열 번호	프라이머 종류	염기서열(5'→3')	프라이머에 포함 된 제한효소 인식 부위
13	BphP 3-12 a.a. 클로닝 용 forward primer	GC CTCGAG GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I
14	BphP 3-12 a.a. 클로닝 용 reverse primer	GC GAGCTC GAATTC TCA AAGCGGTGAAAAAAGGGCAA	EcoR I
15	BphP 3-11 a.a. 클로닝 용 forward primer	GC CTCGAG GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I
16	BphP 3-11 a.a. 클로닝 용 reverse primer	GC GAGCTC GAATTC TCA CGGTGAAAAAAGGGCAACGG	EcoR I
17	BphP 3-10 a.a. 클로닝 용 forward primer	GC CTCGAG GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I
18	BphP 3-10 a.a. 클로닝 용 reverse primer	GC GAGCTC GAATTC TCA TGGAAAAAAGGGCAACGGGTC	EcoR I
19	BphP 4-12 a.a. 클로닝 용 forward primer	GC CTCGAG GGATCC ATG GACCCGTTGCCCTTTTTTCCA	BamH I
20	BphP 4-12 a.a. 클로닝 용 reverse primer	GC GAGCTC GAATTC TCA AAGCGGTGAAAAAAGGGCAA	EcoR I

[0068]

증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel(QA-Agarose gel TM, Q-BIO, CAT#AGAH0250)에서 running하고, 자외선 조사를 통하여 증폭시킨 DNA의 크기를 확인하였다. 그 후 DNA 증폭 산물에 해당하는 gel상의 band만을 내려내고 gel elution kit(FavorPrep GEL/PCR purification mini kit, FAVORGEN, CAT#FAGCK001-1)를 이용하여 원하는 DNA만을 분리한 후 pJET(CloneJET PCR cloning kit, Fermentas, #K1232) 벡터에 결합(ligation) 시켰다. 이후, 10~20 μ l 정도의 결합 벡터에 30~50 μ l 정도의 대장균인 DH5 α 컴피턴트 세포(제조사 : Invitrogen)를 첨가하고, 20분 동안 얼음 상에서 배양한 후 42℃에서 1분간 열 충격(heat shock)을 준 후 다시 20분 동안 얼음 상에서 회복시키고, 암피실린이 포함된 LB 배지 플레이트에 스프레딩(spreading) 한 후 37℃에서 하룻밤 동안 배양하여 형질전환이(상) incubation 시키는 방법으로 형질전환시켰다. 이 후, 콜로니(colony)가 자라면 암피실린이 포함된 LB 배지에 접종하고 하룻밤 동안 37℃에서 배양하여 세포를 키운 후 플라스미드 추출 키트(FavorPrep Plasmid Extraction kit, FAVORGEN, cat#FAPDE300)를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 이후, 추출된 플라스미드(plasmid)를 Bioneer co.,KR에 위탁하여 염기 서열을 측정하였다. 그 결과, PCR을 통해 생성된 DNA 산물이 원하는 목적 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.

[0069]

또한, 제한효소를 이용하여 추출된 플라스미드 및 자체적으로 GST 태그를 가지고 있는 pGEX4T1 벡터((GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)를 절단한 후 목적 DNA인 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-12 위치의 아미노산 서열(서열번호 9)을 코딩하는 DNA, 3-11 위치의 아미노산 서열(서열번호 10)을 코딩하는 DNA, 3-10 위치의 아미노산 서열(서열번호 11)을 코딩하는 DNA, 4-12 위치의 아미노산 서열(서열번호 12)을 코딩하는 DNA를 각각 단백질 발현 벡터인 pGEX4T1 벡터에 결합(ligation) 시켰다. 이후, 목적 DNA를 포함하는 pGEX4T1 벡터로 대장균인 BL21 컴피턴트 세포(제조사 : RBC, Taipei, Taiwan)를 형질전환시킨 후 암피실린이 포함된 LB 배지 상에서 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 이후, 배양된 세포를 소니케이션을 이용하여 파쇄하고 원심분리에 의해 얻은 상층액을 따로 분리한 후 GST resin(Glutathion Sepharose™ High Performance, GE Healthcare)을 이용하여 단백질을 정제하였다. 정제된 단백질 및 데이노코커스 라디오듀런스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질에 대해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이때 1차 항체로는 2B8 단일클론 항체 및 anti-GST 항체를 사용하였고, 2차 항체로 Horseradish peroxidase(HRP) conjugated anti-mouse immunoglobulin(anti-mouse IgG; Sigma)를 사용하였다. 또한, SDS-PAGE 후 셀룰로오스 멤브레인에 트랜스퍼된 샘플을 현상하기 위해 Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents(GE Healthcare, RPN21060L/AF)를 사용하였다. 도 4는 2B8 항체에 대한 에피토프 맵핑의 결과를 웨스턴 블롯을 통해 나타낸 것이다. 도 4에서 보이는 바와 같이 2B8 항체의 에피토프는 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치에 해당하는 9개의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드(서열번호 10)이고, 이를 에피토프 태그로 사용할 수 있다. 또한, 서열번호 10의 아미노산 서열에 대해 블라스트 검색(Blast search)을 수행하였고, 일부 박테리아

등을 제외하고는 일반적인 대장균이나 식물에서 중복되는 아미노산 서열이 존재하지 않음을 확인하였다. 이로부터 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 에피토프 태그로 사용시 비특이적 결합의 가능성이 매우 낮음을 알 수 있다.

[0070] 실시예 6 : 오리지날 에피토프 태그의 변이 및 변이된 펩티드의 2B8 단일클론 항체에 대한 친화성 분석

[0071] 상기 2B8 항체에 대한 친화성을 향상시키기 위해 오리지날 에피토프 태그(서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드)를 구성하는 아미노산 잔기들 중 일부를 다른 아미노산으로 치환하여 변이 펩티드를 제조하고, 웨스턴 블롯 등을 이용하여 변이 펩티드의 2B8 항체에 대한 친화성을 분석하였다.

[0072] 먼저, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드('3-11-ori'로 표시함, 서열번호 10)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어지고 동시에 3번째 아미노산 잔기인 아르기닌이 라이신으로 치환된 펩티드('3-11-R3K'로 표시함, 서열번호 21)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어지고 동시에 4번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드('3-11-D4E'로 표시함, 서열번호 22)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어지고 동시에 4번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 아스파라긴으로 치환된 펩티드('3-11-D4N'로 표시함, 서열번호 23)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어지고 동시에 6번째 아미노산 잔기인 류신이 아이소류신으로 치환된 펩티드('3-11-L6I'로 표시함, 서열번호 24)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어지고 동시에 6번째 아미노산 잔기인 류신이 발린으로 치환된 펩티드('3-11-L6V'로 표시함, 서열번호 25)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어지고 동시에 8번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 타이로신으로 치환된 펩티드('3-11-F8Y'로 표시함, 서열번호 26)를 코딩하는 DNA 및 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어지고 동시에 9번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 타이로신으로 치환된 펩티드('3-11-F9Y'로 표시함, 서열번호 27)를 코딩하는 DNA를 클로닝하기 위하여 각각에 대한 프라이머를 제작하였다. 제작한 프라이머 및 PrimeSTAR HS(TAKARA, R040) 증합효소를 이용하여 PCR을 30 사이클 전후로 수행하고, 증폭된 DNA 산물을 얻었다. 상기 DNA 클로닝을 위한 PCR 반응은 별도의 주형을 필요로 하지 않으며, 1 사이클의 PCR 시 순방향 프라이머(Forward Primer)와 역방향 프라이머(Reverse primer)의 결합에 의해 증폭을 위한 주형을 얻을 수 있다. 하기 표 4는 상기 오리지날 에피토프 태그 및 7개의 변이 펩티드를 코딩하는 DNA 증폭 산물을 얻기 위해 PCR 시 사용한 프라이머를 나타낸 것이다.

표 4

[0073]

서열 번호	프라이머 종류	염기 서열(5'→3')	프라이머에 포함 된 제한효소 인 식 부위
28	3-11-ori 클로닝용 forward primer	GC GGATCC CGGGACCCGTTGCCCTTTTTCACCG	BamH I
29	3-11-ori 클로닝용 reverse primer	GC GAATTC CGGTGAAAAAAGGGCAACGGGTCCCG	EcoR I
30	3-11-R3K 클로닝용 forward primer	GC GGATCC ATGAAAGACCCGTTGCCCTTTTTCACCG	BamH I
31	3-11-R3K 클로닝용 reverse primer	GC GAATTC TCACGGTGGAAAAAAGGGCAACGGGTCTTT	EcoR I
32	3-11-D4E 클로닝용 forward primer	GC GGATCC ATGCGGGAACCGTTGCCCTTTTTCACCG	BamH I
33	3-11-D4E 클로닝용 reverse primer	GC GAATTC TCACGGTGGAAAAAAGGGCAACGGGTCCCG	EcoR I
34	3-11-D4N 클로닝용 forward primer	GC GGATCC ATGCGGAACCCGTTGCCCTTTTTCACCG	BamH I
35	3-11-D4N 클로닝용 reverse primer	GC GAATTC TCACGGTGGAAAAAAGGGCAACGGGTCCCG	EcoR I
36	3-11-L6I 클로닝용 forward primer	GC GGATCC ATGCGGGACCCGATTCCCTTTTTCACCG	BamH I

37	3-11-L6I 클로닝용 reverse primer	GC GAATTC TCACGGTGGAAAAAGGGAATCGGGTCCCG	EcoR I
38	3-11-L6V 클로닝용 forward primer	GC GGATCC ATGCGGGACCCGGTGCCTTTTTCACCG	BamH I
39	3-11-L6V 클로닝용 reverse primer	GC GAATTC TCACGGTGGAAAAAGGGCACCGGGTCCCG	EcoR I
40	3-11-F8Y 클로닝용 forward primer	GC GGATCC ATGCGGGACCCGGTGCCTATTTCACCG	BamH I
41	3-11-F8Y 클로닝용 reverse primer	GC GAATTC TCACGGTGGAAATAGGGCAACGGGTCCCG	EcoR I
42	3-11-F9Y 클로닝용 forward primer	GC GGATCC ATGCGGGACCCGGTGCCTTTTATCCACCG	BamH I
43	3-11-F9Y 클로닝용 reverse primer	GC GAATTC TCACGGTGGATAAAAGGGCAACGGGTCCCG	EcoR I

[0074] 이후, DNA 증폭 산물에 해당하는 gel상의 band만을 내려내고 gel elution kit(FavorPrep GEL/PCR purification mini kit, FAVORGEN, CAT#FAGCK001-1)를 이용하여 원하는 DNA만을 분리한 후 pJET(CloneJET PCR cloning kit, Fermentas, #K1232) 벡터에 결합(ligation) 시켰다. 이후, 10~20 μ l 정도의 결합 벡터에 30~50 μ l 정도의 대장균인 DH5 α 컴피턴트 세포(제조사 : Invitrogen)를 첨가하고, 20분 동안 얼음 상에서 배양한 후 42℃에서 1분간 열 충격(heat shock)을 준 후 다시 20분 동안 얼음 상에서 회복시키고, 암피실린이 포함된 LB 배지 플레이트에 스프레딩(spreading) 한 후 37℃에서 하룻밤 동안 배양하여 형질전환시켰다. 이 후, 콜로니(colony)가 자라면 암피실린이 포함된 LB 배지에 접종하고 하룻밤 동안 37℃에서 배양하여 세포를 키운 후 플라스미드 추출 키트(FavorPrep Plasmid Extraction kit, FAVORGEN, cat#FAPDE300)를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 이후, 추출된 플라스미드(plasmid)를 Bioneer co.,KR에 위탁하여 염기 서열을 측정하였다. 그 결과, PCR을 통해 생성된 DNA 산물이 원하는 목적 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.

[0075] 또한, 제한효소를 이용하여 추출된 플라스미드 및 자체적으로 GST 태그를 가지고 있는 pGEX4T1 벡터((GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)를 절단한 후, 오리지날 에피토프 태그 및 7개의 변이 펩티드를 코딩하는 목적 DNA를 각각 단백질 발현 벡터인 pGEX4T1 벡터에 결합(ligation) 시켰다. 이후, 목적 DNA를 포함하는 pGEX4T1 벡터로 대장균인 BL21 컴피턴트 세포(제조사 : RBC, Taipei, Taiwan)를 형질전환시킨 후 암피실린이 포함된 LB 배지 상에서 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 이후, 배양된 세포를 PBS 용액(Phosphate buffered saline solution; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4)에 현탁하고 소니케이션을 이용하여 세포를 파쇄하고 원심분리에 의해 얻은 상층액만을 따로 분리한 후 GST resin(Glutathion Sepharose™ High Performance, GE Healthcare)을 이용하여 단백질을 정제하였다. 정제된 단백질에 대해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이때, 1차 항체로는 2B8 단일클론 항체 및 anti-GST 항체를 사용하였고, 2차 항체로 Horseradish peroxidase(HRP) conjugated anti-mouse immunoglobulin(anti-mouse IgG; Sigma)를 사용하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE 후 이를 폴리플루오린화비닐리덴(PVDF) 멤브레인에 트랜스퍼하였다. 이후, PVDF 멤브레인을 5% 스킴 밀크(skim milk)로 30분 동안 처리하고, 여기에 1차 항체 및 2차 항체를 순차적으로 2시간 및 1시간 동안 처리하였다. 이후, Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents(GE Healthcare, RPN21060L/AF)를 사용하여 현상하였다. 또한, 정제된 단백질에 대해 간접 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하였다. 정제된 단백질을 0.05M 카보네이트 버퍼(carbonate buffer, pH 9.6)에 1 μ g/ml의 농도로 용해하고, 이를 96 웰 플레이트(96-well plate)에 넣은 다음 약 4℃에서 12시간 동안 배양하여 웰 표면을 코팅하였다. 이후, 웰 표면을 5% 스킴 밀크(skim milk)로 1시간 동안 처리하고 여기에 1차 항체 및 2차 항체를 순차적으로 2시간 및 1시간 동안 처리하였다. 이후, TMB One Component HRP Microwell substrate(SurModics BioFx, Eden Prairie, MN, USA)을 첨가하여 발색반응을 진행하고 2M 황산(H₂SO₄) 용액으로 반응을 정지시킨 후, ELISA microplate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 도 5는 오리지날 에피토프 태그 및 변이 펩티드의 2B8 항체에 대한 친화성을 웨스턴 블롯을 통해 나타낸 것이고, 도 6은 오리지날 에피토프 태그 및 변이 펩티드의 2B8 항체에 대한 친화성을 간접 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 나타낸 것이다. 도 5 및 도 6에서 보이는 바와 같이 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어지고 동시에 4번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된 펩티드('3-11-D4E'로 표시함, 서열번호 22) 및 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어지고 동시에 8번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 타이로신으로 치환된 펩티드('3-11-F8Y'로 표시함, 서

열번호 26)는 오리지널 에피토프 태그인 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 1) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드('3-11-ori'로 표시함, 서열번호 10)보다 2B8 단일클론 항체에 대한 친화성이 더 높은 것으로 나타났다. 따라서, 3-11-D4E 및 3-11-F8Y는 2B8 단일클론 항체에 대한 신규 펩티드 태그로 사용될 수 있다.

[0076] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0077]

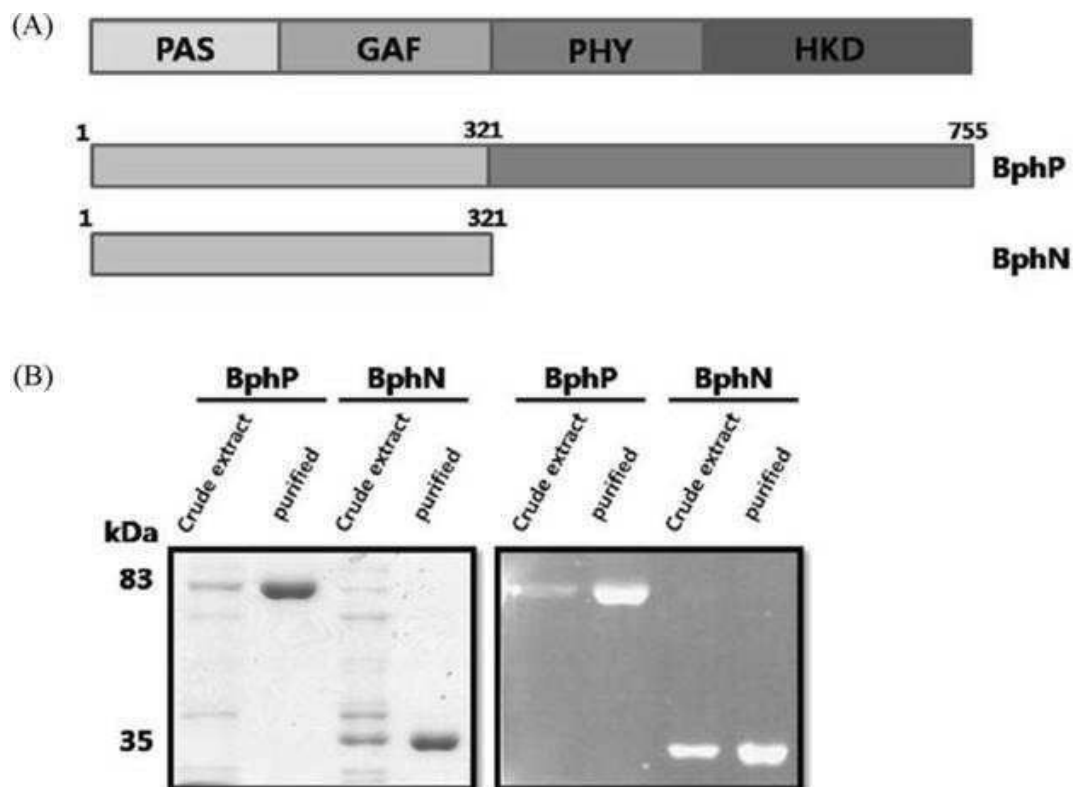
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12283BP

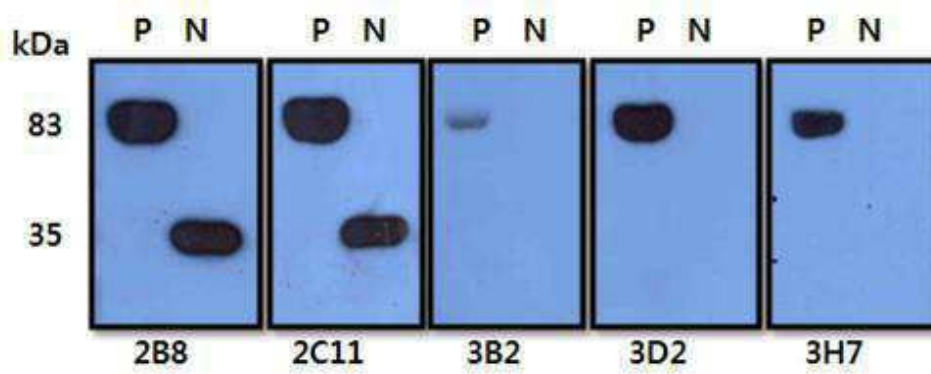
수탁일자 : 20120924

도면

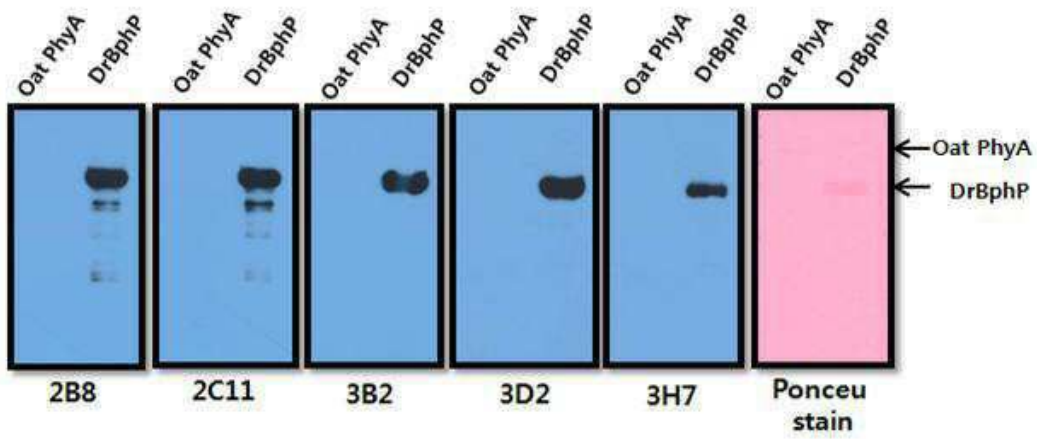
도면1



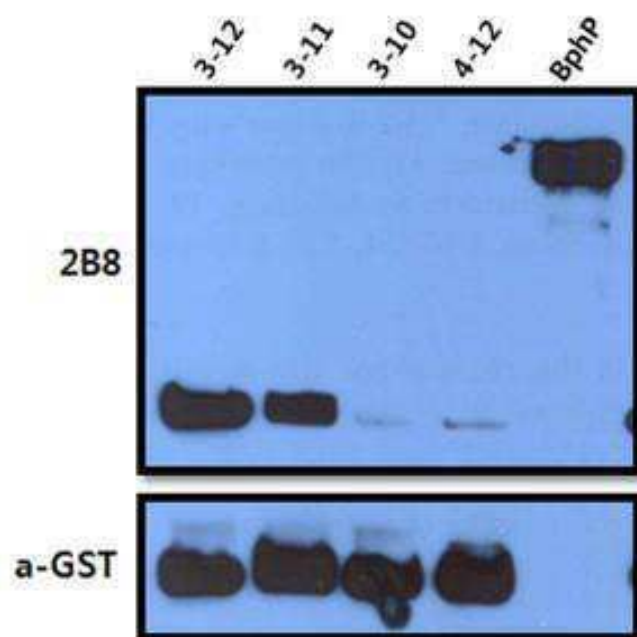
도면2



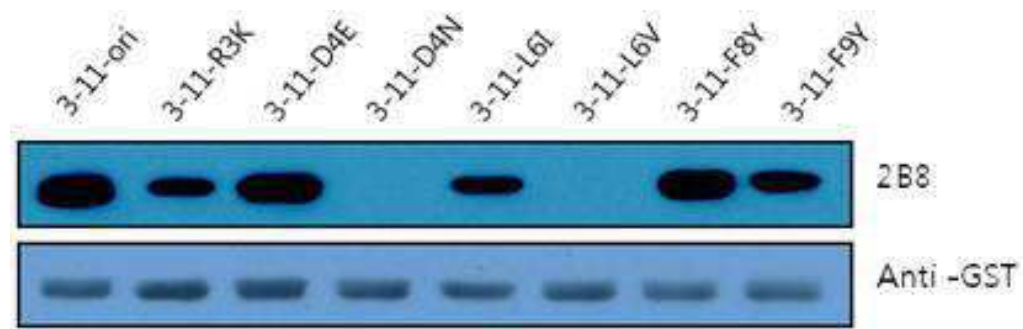
도면3



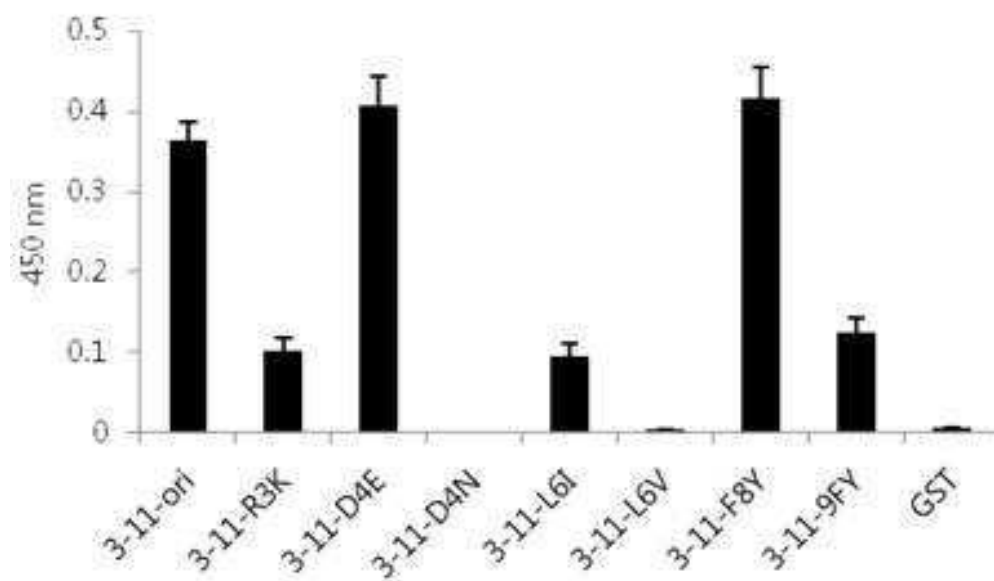
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
Myongji University Industry and Academia Cooperation Foundation
- <120> Peptide tag with improved affinity toward 2B8 antibody and use thereof
- <130> DP-15-111
- <160> 43
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 755
- <212> PRT
- <213> Deinococcus radiodurans BphP
- <400> 1

Met Ser Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro Leu Tyr Leu Gly Gly
1 5 10 15

Pro Glu Ile Thr Thr Glu Asn Cys Glu Arg Glu Pro Ile His Ile Pro
20 25 30

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

Gly Glu Val Leu Gln Met Ser Leu Asn Ala Ala Thr Phe Leu Gly Gln
50 55 60

Glu Pro Thr Val Leu Arg Gly Gln Thr Leu Ala Ala Leu Leu Pro Glu
65 70 75 80

Gln Trp Pro Ala Leu Gln Ala Ala Leu Pro Pro Gly Cys Pro Asp Ala
85 90 95

Leu Gln Tyr Arg Ala Thr Leu Asp Trp Pro Ala Ala Gly His Leu Ser
100 105 110

Leu Thr Val His Arg Val Gly Glu Leu Leu Ile Leu Glu Phe Glu Pro
115 120 125

Thr Glu Ala Trp Asp Ser Thr Gly Pro His Ala Leu Arg Asn Ala Met
130 135 140

Phe Ala Leu Glu Ser Ala Pro Asn Leu Arg Ala Leu Ala Glu Val Ala
145 150 155 160

Thr Gln Thr Val Arg Glu Leu Thr Gly Phe Asp Arg Val Met Leu Tyr
165 170 175

Lys Phe Ala Pro Asp Ala Thr Gly Glu Val Ile Ala Glu Ala Arg Arg
180 185 190

Glu Gly Leu His Ala Phe Leu Gly His Arg Phe Pro Ala Ser Asp Ile
195 200 205

Pro Ala Gln Ala Arg Ala Leu Tyr Thr Arg His Leu Leu Arg Leu Thr
210 215 220

Ala Asp Thr Arg Ala Ala Ala Val Pro Leu Asp Pro Val Leu Asn Pro
225 230 235 240

Gln Thr Asn Ala Pro Thr Pro Leu Gly Gly Ala Val Leu Arg Ala Thr

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

 Leu Glu Tyr Leu Gly Arg Leu Leu Ser Leu Gln Val Gln Val Lys Glu
 305 310 315 320
 Ala Ala Asp Val Ala Ala Phe Arg Gln Ser Leu Arg Glu His His Ala
 325 330 335
 Arg Val Ala Leu Ala Ala Ala His Ser Leu Ser Pro His Asp Thr Leu
 340 345 350
 Ser Asp Pro Ala Leu Asp Leu Leu Gly Leu Met Arg Ala Gly Gly Leu
 355 360 365
 Ile Leu Arg Phe Glu Gly Arg Trp Gln Thr Leu Gly Glu Val Pro Pro

 370 375 380
 Ala Pro Ala Val Asp Ala Leu Leu Ala Trp Leu Glu Thr Gln Pro Gly
 385 390 395 400
 Ala Leu Val Gln Thr Asp Ala Leu Gly Gln Leu Trp Pro Ala Gly Ala
 405 410 415
 Asp Leu Ala Pro Ser Ala Ala Gly Leu Leu Ala Ile Ser Val Gly Glu
 420 425 430
 Gly Trp Ser Glu Cys Leu Val Trp Leu Arg Pro Glu Leu Arg Leu Glu
 435 440 445

 Val Ala Trp Gly Gly Ala Thr Pro Asp Gln Ala Lys Asp Asp Leu Gly
 450 455 460
 Pro Arg His Ser Phe Asp Thr Tyr Leu Glu Glu Lys Arg Gly Tyr Ala
 465 470 475 480
 Glu Pro Trp His Pro Gly Glu Ile Glu Glu Ala Gln Asp Leu Arg Asp
 485 490 495
 Thr Leu Thr Gly Ala Leu Gly Glu Arg Leu Ser Val Ile Arg Asp Leu

500 505 510
 Asn Arg Ala Leu Thr Gln Ser Asn Ala Glu Trp Arg Gln Tyr Gly Phe

 515 520 525
 Val Ile Ser His His Met Gln Glu Pro Val Arg Leu Ile Ser Gln Phe
 530 535 540
 Ala Glu Leu Leu Thr Arg Gln Pro Arg Ala Gln Asp Gly Ser Pro Asp
 545 550 555 560
 Ser Pro Gln Thr Glu Arg Ile Thr Gly Phe Leu Leu Arg Glu Thr Ser
 565 570 575
 Arg Leu Arg Ser Leu Thr Gln Asp Leu His Thr Tyr Thr Ala Leu Leu
 580 585 590

 Ser Ala Pro Pro Pro Val Arg Arg Pro Thr Pro Leu Gly Arg Val Val
 595 600 605
 Asp Asp Val Leu Gln Asp Leu Glu Pro Arg Ile Ala Asp Thr Gly Ala
 610 615 620
 Ser Ile Glu Val Ala Pro Glu Leu Pro Val Ile Ala Ala Asp Ala Gly
 625 630 635 640
 Leu Leu Arg Asp Leu Leu Leu His Leu Ile Gly Asn Ala Leu Thr Phe
 645 650 655
 Gly Gly Pro Glu Pro Arg Ile Ala Val Arg Thr Glu Arg Gln Gly Ala

 660 665 670
 Gly Trp Ser Ile Ala Val Ser Asp Gln Gly Ala Gly Ile Ala Pro Glu
 675 680 685
 Tyr Gln Glu Arg Ile Phe Leu Leu Phe Gln Arg Leu Gly Ser Leu Asp
 690 695 700
 Glu Ala Leu Gly Asn Gly Leu Gly Leu Pro Leu Cys Arg Lys Ile Ala
 705 710 715 720
 Glu Leu His Gly Gly Thr Leu Thr Val Glu Ser Ala Pro Gly Glu Gly
 725 730 735

 Ser Thr Phe Arg Cys Trp Leu Pro Asp Ala Gly Pro Leu Pro Gly Ala
 740 745 750

Ala Asp Ala

755

<210> 2

<211> 2268

<212> DNA

<213> nucleotides for *Deinococcus radiodurans* BphP

<400> 2

atgagccggg acccgttgcc cttttttcca ccgctttacc ttggtggccc ggaaattacc	60
accgagaact gcgagcgca gccgattcat attcccggca gcatccagcc gcacggcgcc	120
ctgctcactg ccgacgggca cagcggcgag gtgctccaga tgagcctcaa cgcggccact	180
tttctgggac aggaaccac agtgctgcgc ggacagaccc tcgccgact gctgcccgag	240
cagtggcccg cgctgaagc ggccctgccc cccggctgcc ccgacgcct gcaataccgc	300
gcaacgctgg actggcctgc cgccgggcac ctttcgctga cggcgcaccg ggtcggcgag	360
ttgctgattc tggaattcga gccgacggag gcctgggaca gcaccgggcc gcacgcgctg	420
cgcaacgcga tgctcgctc cgaaagtgcc cccaacctgc gggcgctggc cgaggcggcg	480
accagacgg tccgcgagct gacgggcttt gaccgggtga tgctctaaa atttgcccc	540
gacgccaccg gcgaagtgat tgccgaggcc cgccgtgagg ggctgcacgc ctttctgggc	600
caccgttttc ccgcgtcgga cattccggcg caggcccgcg cgctctacac ccggcacctg	660
ctgcgcctga ccgccgacac ccgcgccgcc gccgtgccgc tcgatcccg cctcaaccg	720
cagacgaatg cgccacccc gctgggcggc gccgtgctgc gcgccacct gcccatgcac	780
atgcagtacc tcggaacat gggcgctggg tcgagcctgt cgggtgcggt ggtggctggc	840
ggccagctct ggggcctgat cgctgccac caccagacgc cctacgtgtt gccgccgac	900
ctgcgaacca cgctcgaata cctgggccgc ttgctgagcc tgcaagttca ggtcaaggaa	960
gcggcggacg tggcgccctt tcgccagagc ctgcgggagc accacgcgcg ggtggccctc	1020
gcggcggcgc actcgtctc gccgcacgac accctcagtg acccggcgt tgacctgctg	1080
ggcctgatgc gggccggggg cctgattctg cgtttcgagg gccgtggca gacgttgggt	1140
gaagtgccg ctgccccgc ggtggacgcg ctgctggcgt ggctcgaac ccagccgggc	1200
gccctggtcc agaccgacgc gctgggcaa ctgtggccc cggcgccga tctcgcccc	1260
agcgcagcgg gcctgctgc catcagcgtg ggcgaggct ggtcggagt cctcgtctgg	1320
ctgcggcccc aactgcggct ggaggtgcc tggggcggg ccactcctga ccaggcga	1380
gacgacctcg ggccgcgcca ctattcgac acctacctg aagaaaaac cggtacgcc	1440

gagccctggc atccccggcg aatcgaggag gcgcaggatc tacgtgacac attgaccggg 1500

gcgctgggcg agcgccctgag cgtgattcgt gacctcaacc gggcgctcac acagtgaac 1560

gccgagtggc ggagctacgg ctctgttatt agccaccaca tgcaggagcc ggtgcggctc 1620

atctcgagct tcgccgagtt gctgacgcgc cagccccgcg cccaggacgg gtctccggac 1680

tctccgcaga ccgagcgcat caccggcttt ctgctgcgcg aaacgtcgcg cctgcgcagc 1740

ctgacgaag acctccacac ctacaccgcg ctgctctcgg caccgcgcgc ggtgcgccgc 1800

cccacgccgc tgggccgcgt ggtggacgat gtgctgcaag acctcgaacc ccgattgcc 1860

gacaccggag cgagcatcga ggtggcgccc gatttgcccg tcctcgtgc cgacgtggc 1920

ctgctgcgcg acctgctgct gcatctgac ggcaacgcgc tgacgtttgg tggcccggag 1980

ccgcgtattg ccgtaaggac cgaacggcaa ggcgcgggtt ggtctatcgc ggtcagtgac 2040

cagggcgctg gcatcgccgc cgagtatcag gaacgaatct ttctgctgtt tcagcggtc 2100

ggttcgctcg atgaggcgtt gggcaacggc ctgggcctgc cgctgtgccg caagatcgcc 2160

gaactgcatg gcggcaccct gaccgtggag tccgcgccag gcgagggcag caccttcgt 2220

tgctggctgc ccgatgctgg gcctcttcgc ggagccgccg atgcctga 2268

<210> 3

<211> 321

<212> PRT

<213> Deinococcus radiodurans BphP 1-321 a.a.

<400> 3

Met Ser Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro Leu Tyr Leu Gly Gly

1 5 10 15

Pro Glu Ile Thr Thr Glu Asn Cys Glu Arg Glu Pro Ile His Ile Pro

20 25 30

Gly Ser Ile Gln Pro His Gly Ala Leu Leu Thr Ala Asp Gly His Ser

35 40 45

Gly Glu Val Leu Gln Met Ser Leu Asn Ala Ala Thr Phe Leu Gly Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Trp Pro Ala Leu Gln Ala Ala Leu Pro Pro Gly Cys Pro Asp Ala

85 90 95

Leu Gln Tyr Arg Ala Thr Leu Asp Trp Pro Ala Ala Gly His Leu Ser
 100 105 110
 Leu Thr Val His Arg Val Gly Glu Leu Leu Ile Leu Glu Phe Glu Pro
 115 120 125
 Thr Glu Ala Trp Asp Ser Thr Gly Pro His Ala Leu Arg Asn Ala Met
 130 135 140
 Phe Ala Leu Glu Ser Ala Pro Asn Leu Arg Ala Leu Ala Glu Val Ala
 145 150 155 160
 Thr Gln Thr Val Arg Glu Leu Thr Gly Phe Asp Arg Val Met Leu Tyr
 165 170 175
 Lys Phe Ala Pro Asp Ala Thr Gly Glu Val Ile Ala Glu Ala Arg Arg
 180 185 190
 Glu Gly Leu His Ala Phe Leu Gly His Arg Phe Pro Ala Ser Asp Ile
 195 200 205
 Pro Ala Gln Ala Arg Ala Leu Tyr Thr Arg His Leu Leu Arg Leu Thr
 210 215 220
 Ala Asp Thr Arg Ala Ala Ala Val Pro Leu Asp Pro Val Leu Asn Pro
 225 230 235 240
 Gln Thr Asn Ala Pro Thr Pro Leu Gly Gly Ala Val Leu Arg Ala Thr
 245 250 255
 Ser Pro Met His Met Gln Tyr Leu Arg Asn Met Gly Val Gly Ser Ser
 260 265 270
 Leu Ser Val Ser Val Val Val Gly Gly Gln Leu Trp Gly Leu Ile Ala
 275 280 285
 Cys His His Gln Thr Pro Tyr Val Leu Pro Pro Asp Leu Arg Thr Thr
 290 295 300
 Leu Glu Tyr Leu Gly Arg Leu Leu Ser Leu Gln Val Gln Val Lys Glu
 305 310 315 320
 Ala

<210> 4

<211> 963

<212> DNA

<213> nucleotides for *Deinococcus radiodurans* BphP 1-321 a.a.

<400> 4

atgagccggg acccgttgcc cttttttcca ccgctttacc ttggtggccc ggaaattacc 60

accgagaact gcgagcgga gccgattcat attcccggca gcatccagcc gcacggcgcc 120

ctgctcactg ccgacgggca cagcggcgag gtgctccaga tgagcctcaa cgcggccact 180

tttctgggac aggaaccac agtgctgcgc ggacagacc tcgccgact gctgcccag 240

cagtggcccc cgctgcaagc ggccctgccc cccggctgcc ccgacgcct gcaataccgc 300

gcaacgctgg actggcctgc cgccgggcac ctttcgctga cggcgcacg ggtcggcgag 360

ttgctgattc tggaattcga gccgacggag gcctgggaca gcaccgggcc gcacgcgctg 420

cgcaacgcga tgttcgcgct cgaaagtgcc cccaacctgc gggcgctggc cgaggtggcg 480

accagacgg tcgcgagct gacgggcttt gaccgggtga tgctctaaa atttgcccc 540

gacgccaccg gcgaagtgat tgccgaggcc cgccgtgagg ggctgcacgc ctttctgggc 600

caccgttttc ccgcgtcgga cattccggcg caggcccgcg cgctctacac ccggcacctg 660

ctgcgcctga ccgccgacac ccgcgccgcc gccgtgccgc tcgatcccg cctcaaccg 720

cagacgaatg cccccaccc gctgggcggc gccgtgctgc gcgccacct gcccatgcac 780

atgcagtacc tcggaacat gggcgctggg tcgagcctgt cgggtgctgg ggtggtcggc 840

ggccagctct ggggcctgat cgccctgccac caccagacgc cctacgtgtt gccgcccgc 900

ctgcgaacca cgctcgaata cctgggcccgc ttgctgagcc tgcaagttca ggtcaaggaa 960

gcg 963

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for *Deinococcus radiodurans* BphP

<400> 5

gccatatgat gagccgggac ccgttgccc 29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Deinococcus radiodurans BphP

<400> 6

gcctcgagtc aggcacgcgc ggctcccg 29

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Deinococcus radiodurans BphP 1-321 a.a.

<400> 7

gccatgatg gagccgggac ccgttgccc 29

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Deinococcus radiodurans BphP 1-321 a.a.

<400> 8

gcctcgagcg cttccttgac ctgaacttg 29

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Deinococcus radiodurans BphP 3-12 a.a.

<400> 9

Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro Leu

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.

<400> 10

Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Deinococcus radiodurans BphP 3-10 a.a.

<400> 11

Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Deinococcus radiodurans BphP 4-12 a.a.

<400> 12

Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro Leu

1 5

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Deinococcus radiodurans BphP 3-12 a.a.

<400> 13

gcctcgaggg atccatgcgg gaccggttgc cctttttt 38

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Deinococcus radiodurans BphP 3-12 a.a.

<400> 14

gcgagctcga attctcaaag cgggtggaaaa aagggcaa 38

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.

<400> 15

gcctcgaggg atccatgcgg gaccggttgc cctttttt 38

<210> 16
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.
 <400> 16
 gcgagctcga attctcacgg tggaaaaaag ggcaacgg 38

<210> 17
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for Deinococcus radiodurans BphP 3-10 a.a.
 <400> 17
 gcctcgaggg atccatgcgg gaccgttgc ctttttt 38

<210> 18
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for Deinococcus radiodurans BphP 3-10 a.a.
 <400> 18
 gcgagctcga attctcatgg aaaaaagggc aacgggtc 38

<210> 19
 <211> 38
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for Deinococcus radiodurans BphP 4-12 a.a.
 <400> 19
 gcctcgaggg atccatggac ccgttgccet tttttcca 38

<210> 20
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for Deinococcus radiodurans BphP 4-12 a.a.

<400> 20

gcgagctcga attctcaaag cgggtggaaaa aagggcaa

38

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3rd Arg-substituted Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.

<400> 21

Lys Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4th Asp-substituted Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.

<400> 22

Arg Glu Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4th Asp-substituted Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.

<400> 23

Arg Asn Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6th Leu-substituted Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.

<400> 24

Arg Asp Pro Ile Pro Phe Phe Pro Pro

1 5
 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 6th Leu-substituted Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.
 <400> 25
 Arg Asp Pro Val Pro Phe Phe Pro Pro

1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 8th Phe-substituted Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.
 <400> 26
 Arg Asp Pro Leu Pro Tyr Phe Pro Pro

1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9th Phe-substituted Deinococcus radiodurans BphP 3-11 a.a.
 <400> 27
 Arg Asp Pro Leu Pro Phe Tyr Pro Pro

1 5
 <210> 28
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for 3-11-ori
 <400> 28
 gcg gatcccg ggacc cgttg ccc ttttttc caccg
 <210> 29

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for 3-11-ori
 <400> 29
 gcgaattccg gtggaaaaaa gggcaacggg tcccg 35
 <210> 30
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for 3-11-R3K
 <400> 30
 gcggatccat gaaagaccg ttgccctttt ttccaccg 38
 <210> 31
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for 3-11-R3K
 <400> 31
 gcgaattctc acggtggaaa aaagggaac gggtcttt 38
 <210> 32
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for 3-11-D4E
 <400> 32
 gcggatccat gcgggaaccg ttgccctttt ttccaccg 38
 <210> 33
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for 3-11-D4E
 <400> 33

gcgaattctc acggtggaaa aaagggaac ggttcccg 38

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for 3-11-D4N

<400> 34

gcggatccat gcggaaccg ttgccctttt ttccaccg 38

<210> 35

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for 3-11-D4N

<400> 35

gcgaattctc acggtggaaa aaagggaac gggttccg 38

<210> 36

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for 3-11-L6I

<400> 36

gcggatccat gcgggaccg attccctttt ttccaccg 38

<210> 37

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for 3-11-L6I

<400> 37

gcgaattctc acggtggaaa aaagggaatc gggtcccg 38

<210> 38

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for 3-11-L6V
 <400> 38
 gcggatccat gcgggaccgc gtgccctttt ttccaccg 38
 <210> 39
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for 3-11-L6V
 <400> 39
 gcgaattctc acggtggaaa aaagggcacc gggtcccg 38
 <210> 40
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for 3-11-F8Y
 <400> 40
 gcggatccat gcgggaccgc ttgccctatt ttccaccg 38
 <210> 41
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for 3-11-F8Y
 <400> 41
 gcgaattctc acggtggaaa atagggaac gggtcccg 38
 <210> 42
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for 3-11-F9Y
 <400> 42
 gcggatccat gcgggaccgc ttgccctttt atccaccg 38
 <210> 43
 <211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for 3-11-F9Y

<400> 43

gcgaattctc acgttgata aaagggaac gggtcccg

38