(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0006828
(43) 공개일자 2017년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *C07K 14/245* (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
C07K 14/245 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0098095
(22) 출원일자 2015년07월10일
심사청구일자 2015년07월10일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김영록
경기도 용인시 기흥구 한보라2로 93, 305동 1801호(보라동, 한보라마을화성파크드림아파트)
이관형
경기도 수원시 영통구 매영로415번길 32, B05호(영통동)
임민철
경기도 수원시 영통구 청명로59번길 30, 202호(영통동)
(74) 대리인
김연권

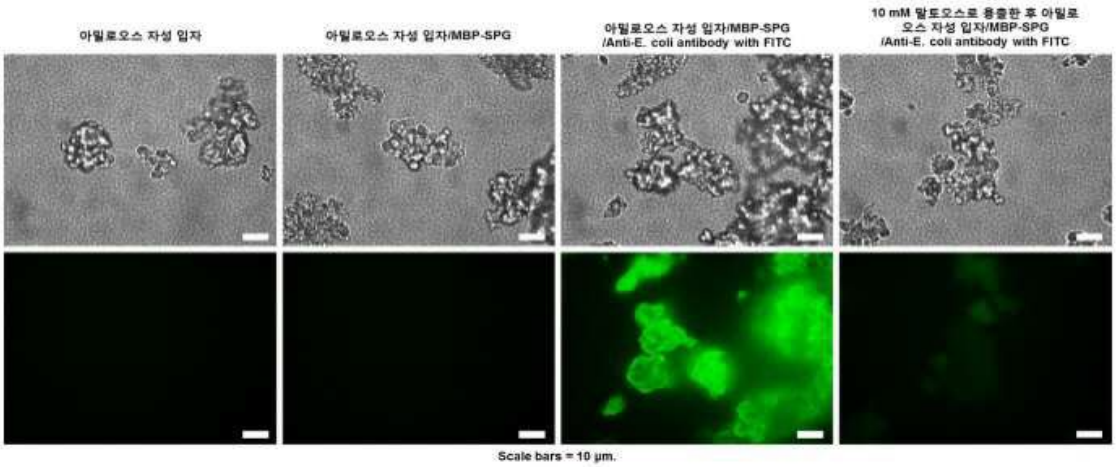
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **융합 단백질 및 이를 이용한 표적항원 검출방법**

(57) 요 약

본 발명은 말토오스 결합 단백질(maltose binding protein) 및 연쇄상 구균 단백질 G(Streptococcal protein G)를 포함하는 표적 항원 검출용 융합 단백질, 이를 포함하는 표적 항원을 검출할 수 있는 바이오 센서 및 바이오 센서를 이용한 표적 항원의 검출방법에 관한 것이다. 본 발명의 융합 단백질은 아밀로오스 비드 표면에 항체를 고정화하여 표적 항원을 검출 및 분리할 수 있을 뿐만 아니라, 간단한 방법으로 검출하고자 하는 표적 항원의 용해 현상을 최소화하면서 시료로부터 선택적으로 분리된 항원을 온전히 분리할 수 있어 높은 민감도로 항원인 생균을 분리 및 검출할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C07K 14/315 (2013.01)
G01N 33/54306 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 S2176081
부처명 중소기업청
연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원
연구사업명 중소기업 융복합기술개발사업
연구과제명 핵산미세추출, 고체지지상 유전자 증폭 및 비표지 핵산 전기적 검출이 통합적으로 구현된 분자진단 랩온어칩 시스템 개발
기 여 율 1/1
주관기관 옴니시스템(주)
연구기간 2014.06.17 ~ 2016.06.16

명 세 서

청구범위

청구항 1

말토오스 결합 단백질(maltose binding protein) 및 연쇄상 구균 단백질 G(Streptococcal protein G)를 포함하는 표적 항원 검출용 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 말토오스 결합 단백질 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 연쇄상 구균 단백질 G가 융합된 것인 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 것인 융합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 6

제5항의 발현벡터로 형질전환된, 인간을 제외한 형질전환체.

청구항 7

(a) 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 G가 융합된 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계;

(b) 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계;

(c) 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제조하는 단계; 및

(d) 상기 형질전환체로부터 융합 단백질을 발현 및 정제하는 단계를 포함하는 표적 항원 검출용 융합 단백질의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (b) 단계의 발현벡터는 도 2에 기재된 개열지도를 가지는 것인 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 표적 항원 검출용 바이오 센서.

청구항 10

제9항에 있어서, 융합 단백질이 아밀로오스, 말토오스, 및 올리고사카라이드로 구성된 군으로부터 선택된 입자에 고정된 것인 바이오 센서.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 아밀로오스 입자는 아밀로오스 자성 입자인 것인 바이오 센서.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 융합 단백질에 표적 항원에 특이적인 항체가 고정화된 것인 바이오 센서.

청구항 13

(a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 제조하는 단계; 및

(b) 제조된 융합 단백질을 아밀로오스, 말토오스, 및 올리고사카라이드로 구성된 군으로부터 선택된 입자와 반응시켜, 상기 입자에 융합 단백질을 고정화하는 단계를 포함하는, 표적 항원 검출용 바이오 센서의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 융합 단백질이 고정화된 아밀로오스, 말토오스, 및 올리고사카라이드로 구성된 군으로부터 선택된 입자에 검출하고자 하는 표적균에 특이적인 항체를 고정화하는 단계를 추가로 포함하는, 표적 항원 검출용 바이오 센서의 제조방법.

청구항 15

(a) 제9항의 바이오 센서에 검출 대상의 표적 항원에 특이적인 항체를 고정화하는 단계;

(b) 상기 고정화된 항체를 포함하는 바이오 센서에 검출 대상의 표적 항원을 반응시키는 단계; 및

(c) 표적 항원과 결합한 항체를 분리하는 단계를 포함하는, 표적 항원의 검출방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 말토오스(maltose)가 포함된 용출용액을 처리하여 표적 항원과 결합한 항체를 분리하는 것인 검출방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 말토오스 결합 단백질(maltose binding protein) 및 연쇄상 구균 단백질 G(Streptococcal protein

G)를 포함하는 표적 항원 검출용 융합 단백질, 이를 포함하는 표적 항원을 검출할 수 있는 바이오 센서 및 바이오 센서를 이용한 표적 항원의 검출방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 항체-항원의 특이적 반응을 기본으로 하는 면역분석법은 고민감도와 고선택성 때문에 광범위하게 사용되는 중요한 기술 중에 하나이다. 이러한 면역분석법에서 항체가 고체 기질 상에 안정적으로 고정화되었을 때, 그 구조 및 기능을 유지할 수 있게 되고 이에 따라 용액 내에 존재하는 여타의 목적 항원을 효과적으로 포획할 수 있다는 연구 결과들이 발표되면서 지난 10년 동안 항체를 비롯한 단백질 고정화 기술은 바이오나노 기술 분야에서 핵심적인 부분을 차지하게 되었다. 이를 위해 항체를 고체 기질상에 고정화시키기 위한 많은 기술들이 개발되었으나, 부착된 항체가 임의적인 방향성을 나타내고 변성되는 등의 문제점을 가지고 있다. 또한, 기존의 항체 기반 바이오 센서 등에서 항체를 고체 지지체에 고정화하기 위해서는 복잡한 화학반응을 통해 이뤄졌으며 고정화된 항체의 배향성의 문제로 인해 검출 민감도가 저해되는 단점이 있었다.

[0004] 또한, 항체를 고체 기질상에 바람직한 방향성을 가지도록 고정화하더라도, 항체-항원 반응 후, 항원-항체를 손상시키지 않으면서 항원이 결합된 항체만을 분리하는데 어려움이 있어왔다.

[0005] 특히, 면역자기 분리(Immunomagnetic separation; IMS) 기술을 이용한 표적균 분리 및 검출 기술에 있어서 항원-항체간 선택적 결합에 의해 분리된 균을 사용된 비드(bead) 표면으로부터 용출(elution)하기 위해서는 항원-항체간 결합을 떨어뜨리는 방식이 주로 사용되어 오고 있다. 이렇게 항원-항체간 결합을 떨어뜨리기 위해서 반응 용액을 가열(Rapid detection of Escherichia coli O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR 참고), 포름아미드(formamide) 용액(combined immunomagnetic separation and lateral flow method for a sensitive on-site detection of Bacillus anthracis spores-assessment in water and dairy products 참고), 혹은 NaOH 용액(Design of a core-shell type immuno-magnetic separation system and multiplex PCR for rapid detection of pathogens from food samples 참고)과 같이 높은 농도의 염 용액을 사용하여 결합을 떨어뜨리고 있다. 하지만 이런 방법들을 이용하는 경우 항원-항체간 결합을 떨어뜨려 비드로부터 항원인 균을 용출할 수도 있지만 균이 용해(lysis)되는 현상도 발생하기 때문에, 검출하고자 하는 균을 온전히 분리할 수 없을 뿐만 아니라, 높은 민감도로 생균을 검출하지 못하는 문제점을 가지고 있다.

[0006] 이러한 배경하에, 본 발명자는 고체 지지체에 고정되는 항체의 배향성 증진을 통해 검출하고자 하는 표적균의 항체-항원 반응률을 높이면서, 선택적으로 결합된 균을 간단히 용출시키면서 균 자체가 용해되는 문제점을 줄일 수 있는 방법을 찾고자 예의 노력한 결과, 상기와 같은 문제점을 해결하면서 표적 항원을 높은 민감도로 검출하는데 사용할 수 있는 융합 단백질을 개발하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2011-0051778호 (2011.05.18 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 고체 지지상에 고정화하는 항체의 배향성을 증진시킬 수 있으며, 표적 항원의 활성을 가장 잘 유지하면서 높은 효율로 표적 항원을 검출할 있는 융합 단백질 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 발현벡터, 및 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합 단백질을 포함하는 표적 항원 검출용 바이오 센서 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오 센서를 이용하여 표적 항원의 검출방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 말토오스 결합 단백질(maltose binding protein; MBP) 및 연쇄상 구균 단백질 G(Streptococcal protein G; SPG)를 포함하는 표적 항원 검출용 융합 단백질을 제공한다.

[0015] 본 발명의 신규한 융합 단백질은 바이오 센서의 고체 지지체와 표적 항원에 특이적인 항체와 결합하여, 표적 항원을 검출하기 위한 용도로 사용된다. 구체적으로, 본 발명의 융합 단백질은 표적 항원에 특이적인 항체를 바이오 센서의 고체 지지체에 고정화하는데 항체의 배향성을 증진시켜주고, 선택적으로 결합된 항원의 용출 및 용해 현상을 최소화하여 높은 민감도로 표적 항원을 검출할 수 있다.

[0016] 본 발명의 융합 단백질에서 연쇄상 구균 단백질 G는 면역글로불린 Fc 부분과 결합하는 특성을 가지고 있어, 항원과 결합하는 Fab의 부분의 배향성을 향상시켜 표적균을 높을 효율로 검출할 수 있으며, 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0017] 또한 말토오스 결합 단백질은 고체 지지체 특히, 아밀로오스 입자에 결합하는 특성을 가지고 있으므로, 복잡한 화학반응 없이 표적균에 특이적인 항체를 고체 지지체에 고정화가 가능하며, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 융합 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지는 말토오스 결합 단백질(MBP)과 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 연쇄상 구균 단백질 G(SPG)가 융합된 형태이다. 또한, 본 발명의 융합 단백질은 N-말단에 히스티딘이 결합된 형태일 수 있으며, MBP-SPG-히스티딘 태그 형태일 수 있다. 바람직하게는, 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 융합 단백질 형태일 수 있다.

[0019] 상기 검출 대상이 되는 항원은 면역분석 방법에 의하여 검출 가능한 모든 생체활성물질(bioactive materials)로서 특별한 제한이 없으며, 예컨대, 자가항체(autoantibody), 리간드, 천연 추출물, 펩타이드, 단백질, 금속 이온, 합성 약물, 천연 약물, 대사체, 유전체, 바이러스 및 바이러스에 의한 생성 물질, 및 박테리아 및 바이러스에 의한 생성 물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0022] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 연결된 신규한 융합 단백질을 코딩하는 DNA, RNA 등의 폴리뉴클레오티드로서, MBP-SPG-히스티딘 태그-스탑 코돈일수 있다. 바람직하게는 서열번호 8의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0023] 발현벡터는 본 발명의 신규 단백질을 발현시키는 형질전환체를 만들기 위하여 숙주세포에 DNA를 도입하여 상기 단백질을 발현시키기 위한 수단으로서, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 등이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 플라스미드 벡터를 사용할 수 있다. 본 발명의 목적상 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서 같은 발현조절 엘리먼트를 포함할 수 있다. 바람직하게는 도 2에 기재된 개열지도를 갖는 것이다.

[0024] 본 발명의 실시예에서는 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 G가 연결된 융합 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 발현벡터 pMal-c2x::MBP-SPG-His6를 제조하였다(실시예 1). 본 발명의 신규 단백질의 분리를 편하게 하기 위하여 N-말단에 단백질 정제를 위한 태그를 포함할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 헥사 히스티딘(6His)을 N-말단에 결합시켰으나, 본 발명의 목적상 단백질 정제를 위한 태그는 공지된 태그를 제한 없이 사용할 수 있다.

[0025] 형질전환체는 본 발명의 융합 단백질을 발현할 수 있는 대장균(*E.coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 등의 임의의 숙주세포를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 대장균을 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서, 표적 항원 검출용 융합 단백질의 제조방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 융합 단백질은 하나의 벡터 내에서 재조합 형태로 제작되거나, 각기 서로 다른 벡터에서 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 G을 발현시킨 후, 효소나 화학적 방법에 의해 결합하여 제작될 수 있다.

[0029] 본 발명의 융합 단백질은 펩티드 합성법에 의해 제조할 수도 있으나, 유전공학적 방법에 의해 특히 효율적으로 제조할 수 있다. 유전공학적 방법은 유전자조작에 의해 원하는 단백질을 대장균(*E.coli*) 등의 숙주세포에서 다량으로 발현시키는 방법이다.

[0030] 보다 구체적으로, 표적 항원 검출용 융합 단백질의 제조방법은, (a) 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 G가 융합된 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계; (b) 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계; (c) 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제조하는 단계; 및 (d) 상기 형질전환체로부터 융합 단백질을 발현 및 정제하는 단계를 포함한다.

[0031] 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환하는 방법은 바람직하게 본 발명의 DNA를 포함하는 발현 벡터를 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposemmediated ransfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation) 등의 공지 방법으로 숙주세포에 도입하여 형질전환시킬 수 있다.

[0032] 상기 발현벡터는 바람직하게는 도 2에 기재된 개열지도를 가지는 것이다 .

[0034] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서, 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 G가 연결된 융합 단백질을 포함하는 바이오 센서 및 바이오 센서의 제조방법을 제공한다.

[0035] 본 발명의 융합 단백질을 구성하는 말토오스 결합 단백질은 고체 지지체에 결합할 수 있으며, 연쇄상 구균 단백질 G는 면역글로불린 Fc 부분과 결합하는 특성을 가지고 있어, 항원과 결합하는 Fab의 부분이 표적 항원의 방향으로 향하는 적절한 배향성을 유지할 수 있게 됨으로써, 이는 면역분석 분야에서 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 융합 단백질을 사용하면, 간단한 방법으로 항체를 고체 지지상에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 고체 지지상으로부터 항원-항체를 높은 효율로 용출할 수 있어, 표적 항원의 검출 민감도를 향상시킬 수 있다.

[0036] 바이오 센서(biosensor)는 생물이 가지고 있는 기능을 이용하여 물질의 성질 등을 조사하는 기계로서, 효소 분석법과 면역 분석법에 사용하는 바이오 센서, 광학적 바이오 센서와 전기화학적 바이오센서 등이 있으며, 본 발명의 바이오 센서는 샘플 주입, 혼성화 반응과 검출 등 실험의 전 과정을 하나의 작은 칩으로 자동적으로 처리하는 랩온어칩(lab-on-a-chip)일 수 있다.

[0037] 본 발명의 바이오 센서는 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 G를 포함하는 융합 단백질은 고체 지지체의 하나인 말토오스 그룹으로 구성된 분자와는 결합력이 있다. 따라서, 본 발명의 융합 단백질은 바람직하게는, 아밀로오스, 말토오스, 및 올리고사카라이드로 구성된 군으로부터 선택된 입자에 고정된 형태일 수 있다. 보다 바람직하게는, 상기 고체 지지체는 아밀로오스 입자일 수 있으며, 아밀로오스 입자는 아밀로오스 자성 비드인 것이다.

[0038] 본 발명의 바이오 센서에는 검출하고자 하는 표적 항원에 특이적인 항체가 추가적으로 포함된 것일 수 있다. 고체 지지상에 본 발명의 융합 단백질이 고정화되고, 융합 단백질의 연쇄상 구균 단백질 G가 표적 항원에 특이적인 항체와 결합한 형태일 수 있다.

[0039] 본 발명의 바이오 센서는 검출하고자 하는 표적 항원의 용해 현상을 최소화할 수 있어 시료로부터 선택적으로 분리된 항원을 온전히 분리할 수 있을 뿐 아니라, 항원인 생균을 분리 및 검출하는 용도로도 적합한 특징이 있다. 기존에는 면역 반응을 통한 표적 항원의 분리 및 검출을 하기 위해서는 가열 또는 높은 농도의 염을 사용하여 항원-항체간 결합을 떨어뜨림에 따라, 항원인 균이 용해되는 현상이 발생하여 온전한 균을 검출할 수 없는 어려움이 있었다. 그러나, 본 발명은 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 G를 포함하는 융합 단백질을 사용함으로써, 말토오스가 포함된 용출 용액만을 추가함으로써 간단한 방법으로 항원의 용출 및 손상을 최소화한 상태에서 표적 항원을 검출할 수 있는 특성이 있다.

[0040] 구체적으로, 본 실시예에서는 본 발명의 융합 단백질로 아밀로오스 자성입자에 항체를 고정화하여 표적균과 반

응시켰을 때, 말토오스를 포함하는 용액의 처리만으로도 95% 이상의 표적균이 검출될 수 있음을 확인할 수 있었다(실시예 3, 도 6). 또한, 항원-항체간의 결합을 떨어뜨리는 방식이 아니기 때문에 균의 용해 없이 온전한 상태의 균을 검출할 수 있었다. 또한, 10^2 CFU/mL의 농도까지 검출이 가능함으로써(도 8), 표적균 검출에 높은 민감도를 가지는 바이오 센서임을 확인할 수 있었다.

[0041] 본 발명의 바이오 센서의 제조방법은,

[0042] (a) 제1항의 융합 단백질을 제조하는 단계; 및 (b) 제조된 융합 단백질을 아밀로오스, 말토오스, 및 올리고사카라이드로 구성된 군으로부터 선택된 입자와 반응시켜, 입자에 융합 단백질을 고정화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0043] 상기 방법에서, 융합 단백질이 고정화된 아밀로오스, 말토오스, 및 올리고사카라이드로 구성된 군으로부터 선택된 입자에 검출하고자 하는 표적 항원에 특이적인 항체를 고정화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0044] 상기 융합 단백질은, (a) 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 G가 융합된 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계; (b) 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계; (c) 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제조하는 단계; 및 (d) 상기 형질전환체로부터 융합 단백질을 발현 및 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

[0046] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 바이오센서를 이용한 표적 항원의 검출방법을 제공한다.

[0047] 구체적으로, (a) 말토오스 결합 단백질 및 연쇄상 구균 단백질 G가 연결된 융합 단백질을 포함하는 바이오 센서에 검출 대상의 표적 항원에 특이적인 항체를 고정화하는 단계; (b) 상기 고정화된 항체를 포함하는 바이오 센서에 검출 대상의 표적 항원을 반응시키는 단계; 및 (c) 표적 항원과 결합한 항체를 분리하는 단계를 포함한다.

[0048] 상기 (c) 단계에서는 말토오스(maltose)가 포함된 용출용액을 처리하여 항체를 분리할 수 있다.

[0049] 항원-항체의 특이적 결합을 확인하는 것을 특징으로 하는 표적 항원의 검출방법은 가시적(visually), 광학적(optically), 전기화학적(electrochemically) 방법을 통해 수행할 수 있다. 표적 항원에 특이적인 항체에 형광물질을 라벨링하여, 항체와 결합된 항체의 검출을 용이하게 확인할 수 있다. 형광물질은 특정 파장을 쪼였을 때 고유의 파장의 빛을 방출하는 물질로서, 구체적으로는 fluorescein 계열의 TRITC(Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate), FITC(Fluorescein-5-isothiocyanate), DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), 피렌, 프로피디움 요오드화물 또는 RITC(Rhodamine isothiocyanate)이 될 수 있다

[0050] 본 발명의 일 실시예에서는 FITC 형광이 라벨된 항체를 사용했으며, 현미경 이미지를 통해 표적 항원의 결합 및 용출과정을 관찰하였다.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 융합 단백질은 아밀로오스 비드 표면에 항체를 고정화하여 표적 항원을 검출 및 분리할 수 있을 뿐만 아니라, 간단한 방법으로 검출하고자 하는 표적 항원인 균의 용해 현상을 최소화하면서 시료로부터 선택적으로 분리된 항원을 온전히 분리할 수 있어 높은 민감도로 항원인 생균을 분리 및 검출할 수 있는 효과가 있다. 이러한 높은 표적 항원 및 항체의 결합력과 표적균이 결합된 항체의 분리율을 이용하여 바이오 센서로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 재조합 플라스미드 pET-21a(+)::GBP-SPG-His6를 주형 DNA 로 하여 PCR 을 수행한 후, 아가로즈 젤 전기영동을 통해 648 bp 크기의 DNA 절편을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 융합 단백질 MBP-SPG를 합성하는 재조합 플라스미드 pMal-c2x::MBP-SPG-His6의 유전자 개열지도를 나타낸 것이다.

도 3은 MBP-SPG-His6 융합 단백질을 Ni-NTA레진을 이용하여 분리 및 정제하고 각각의 분획 산물을 SDS-PAGE 분

석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 재조합 융합 단백질 MBP-SPG-His6에 의해 anti-*E. coli* O157 항체가 아밀로오스 자성입자 표면에 고정화됨에 따라 병원균을 검출하는 아밀로오스 면역자성입자의 모식도를 나타낸 것이다.

도 5는 재조합 융합 단백질 MBP-SPG-His6에 의해 anti-*E. coli* O157 항체가 아밀로오스 자성입자 표면에 고정화된 후, 말토오스에 의한 선택적 용출과정을 형광현미경 관찰을 통해 확인한 결과이다.

도 6은 면역 아밀로오스 자성 입자를 이용한 대장균 O157:H7을 선택적으로 분리할 수 있는 능력을 콜로니 계수 방법을 통해 확인한 결과 그래프이다.

도 7은 면역 아밀로오스 자성 입자를 회수하여 전계방사형 주사전자현미경(FE-SEM)으로 관찰한 결과를 나타낸 것으로서, 면역 아밀로오스 자성 입자에 부착된 대장균의 모습이다.

도 8은 면역 아밀로오스 자성 입자를 이용한 대장균 O157:H7을 분리하고 PCR방법을 통해 민감도를 확인한 결과를 나타낸 것이다(Control 1-6 레인: 10^6-10^1 CFU/mL의 양성 대조군, 7-12 레인: 10^6-10^1 CFU/mL의 면역 아밀로오스 자성 입자 기반 농축 샘플, N: 음성 대조군(H_2O)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0057] **실시예 1: MBP-SPG 융합 단백질 클로닝 및 발현 정제**

[0058] MBP-SPG를 발현시키는 유전자를 재조합 대장균에 클로닝하기 위하여, 기존에 보고된 SPG의 아미노산 서열을 참고하였다. 재조합 플라스미드 pET-21a(+)::GBP-SPG-His6를 주형 DNA로 사용하여 SPG 및 His6가 융합된 형태로 발현되도록 하기 위하여 서열번호 1~2의 프라이머를 사용하였다. 클로닝을 위해서 제한효소 *EcoR* I의 절단위치가 서열번호 1의 프라이머에 삽입되었고, 합성된 서열번호 2의 프라이머에는 제한효소 *BamH* I의 절단위치가 삽입되었다.

[0060] [서열번호 1] pET-21a(+)::SPG-His6의 SPG-His6의 증폭을 위한 정방향 프라이머(forward primer)

[0061] 5'- CCG GAATTC GGTACCATTCAGTCTCCATGG - 3'(프라이머 1)

[0062] [서열번호 2] pET-21a(+)::SPG-His6의 SPG-His6의 증폭을 위한 역방향 프라이머(reverse primer)

[0063] 5'- CGC GGATCC CTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATC - 3' (프라이머 2)

[0065] 상기 재조합 플라스미드 pET-21a(+)::GBP-SPG-His6를 주형 DNA로 서열번호 1, 2의 프라이머들을 사용하여 PCR을 진행하였다. PCR조건으로는 첫 번째 변성(denaturation)은 95℃에서 5분간 한번 수행하였으며, 이후 두 번째 변성은 95℃에서 30초간, 교잡(annealing)은 60.5℃에서 30초간, 연장(extention)은 72℃에서 70초간 수행하였으며 이를 30회 반복하였다.

[0066] 상기 PCR을 통해 증폭된 DNA를 아가로즈 젤 전기영동을 통하여 648 bp 크기의 DNA 절편을 분리하였으며(도 1), 이를 프라이머 1 및 2에 삽입된 제한효소 염기서열에 부합되는 제한효소 *EcoR* I 및 *BamH* I을 처리하여 절단한 다음, 상기 제한효소 처리된 DNA 절편을 동일한 효소로 절단된 pMal-c2x에 클로닝 하여 재조합 플라스미드 pMal-c2x::MBP-SPG-His6를 제작하였다. 재조합 플라스미드 pMal-c2x::MBP-SPG-His6의 자세한 유전자 지도는 도 2와 같다.

[0067] 상기 제작된 플라스미드 pMal-c2x::MBP-SPG-His6를 대장균 DH5α에 전기청공법(electroporation)을 이용하여 도입하였다. 이를 0.1 μg/ml의 앰피실린(ampicillin)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하여 재조합 대장균 DH5α/pMal-c2x::MBP-SPG-His6를 제조하였다.

[0068] 재조합 플라스미드 pMal-c2x::MBP-SPG-His6로 형질전환된 대장균 DH5α를 배양하여 MBP-SPG-His6 융합 단백질

을 발현하였다. 형질전환된 재조합 대장균을 0.1 μg/ml의 앰피실린(ampicillin)이 첨가된 LB 액체 배지 200 mL에 접종하여 37℃에서 교반 배양하였다. 그리고 융합단백질의 과발현은 tac 프로모터를 IPTG 첨가를 통해 유도하였다. 과발현 유도는 600 nm에서의 흡광도 측정을 통해 광학밀도(Optical density)가 0.8일 때, 0.4 mM의 IPTG를 첨가함으로써 시행하였다. 추가적으로 16시간 동안 교반 배양함으로써 융합 단백질의 과발현하였다.

[0069] 상기 과발현된 MBP-SPG-His6 융합 단백질을 정제하기 위해서 His6 tag를 이용하였다. 먼저, 세포들을 원심분리(4,000 rpm, 4℃, 20 min)를 통해 회수하고 용해버퍼(10 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 재분산한 후 초음파 분쇄를 통해 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포와 용출된 MBP-SPG-His6 융합 단백질을 분리하기 위해 원심분리를 (4,000 rpm, 4℃, 20 min)를 2회 연속하여 실시하고 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액은 Ni-NTA 레진을 이용하여 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 MBP-SPG-His6 융합 단백질을 분리 및 정제하였다(도 3).

[0071] **실시예 2: MBP-SPG-His6 융합 단백질을 이용한 항체의 아밀로오스 입자 표면에의 고정화 및 말토오스에 의한 선택적 용출**

[0072] 실시예 1을 통해 분리·정제된 MBP-SPG-His6 융합 단백질을 이용하여 항체의 아밀로오스 입자 표면에의 고정화 및 말토오스에 의한 선택적 용출을 실시하였다. 이때, 융합 단백질의 분리·정제는 His6 태그로 실시하였으므로 MBP 태그의 활성을 이용하여 아밀로오스 입자 표면에 MBP-SPG-His6 융합 단백질을 먼저 고정화하였다. 25 mg/ml의 아밀로오스 입자가 포함된 PBS 버퍼(pH7.4, 0.05% Tween 20)에 10 μg/ml의 MBP-SPG-His6 융합 단백질을 첨가하고 4℃에서 60분간 동안 반응하였다. 그리고 PBS 버퍼(pH7.4, 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 1 μg/ml의 anti-*E. coli* O157 항체(FITC 라벨)을 첨가하고 4℃에서 90분간 반응하였다. 그리고 PBS 버퍼(pH7.4, 0.05% Tween 20)로 3회 세척하였다. MBP-SPG-His6 융합단백질에 의해 아밀로오스 입자 표면에 고정화된 anti-*E. coli* O157 항체(FITC 라벨)는 형광현미경 관찰을 통해 고정화 유무를 판별하였다. 재조합 융합 단백질 MBP-SPG-His6에 의해 anti-*E. coli* O157 항체가 아밀로오스 자성입자 표면에 고정화됨에 따라 병원균을 검출하는 아밀로오스 면역 자성입자의 모식도는 도 4와 같다.

[0073] 상기 아밀로오스 입자 표면에 고정화된 anti-*E. coli* O157 항체(FITC 라벨)의 선택적 용출은 10 mM 말토오스를 포함하는 용출버퍼를 이용하여 실시하였다. Anti-*E. coli* O157 항체(FITC 라벨)가 표면에 기능화된 아밀로오스 입자를 10 mM 말토오스를 포함하는 용출버퍼에 분산시키고 5분간 반응하였다. 그리고 아밀로오스 입자를 회수하여 형광현미경을 통해 관찰함으로써 *E. coli* O157 항체(FITC 라벨)의 선택적 용출 현상을 확인하였다.

[0074] 구체적으로, 현미경 이미지를 통해 관찰한 결과, FITC로 라벨링된 Anti-*E.coli* 항체까지 결합된 아밀로오스 자성 입자 표면에서는 녹색의 형광이 관찰되는 반면, 10 mM의 말토오스로 용출한 결과 녹색형광이 사라지는 현상을 관찰하였다 (도 5). 이는 본 발명에서 MBP-SPG 융합단백질을 사용하였을 때, 목적으로 하는 표적 균의 용이한 용출이 가능하다는 것을 보여준다. 또한, 상기 결과는 사용된 MBP-SPG 융합단백질이 항체를 고정화하는 용도뿐 아니라 항체를 분리 정제하는 용도로 사용이 가능함을 보여준다.

[0076] **실시예 3: MBP-SPG 융합 단백질을 이용한 항체의 고정화 및 표적 균의 분리·농축 및 검출**

[0077] 실시예 2를 통해 anti-*E. coli* O157 항체(FITC 라벨)가 기능화된 아밀로오스 자성 입자 (이하, 면역 아밀로오스 입자라 함)를 이용하여 표적 균을 분리·농축 및 검출하는 실험을 진행하였다. 대장균 O157:H7을 10^1 에서 10^5 CFU/mL이 되도록 희석한 다음 400 μL를 취하여 면역 아밀로오스 자성 입자 2 mg와 실온에서 30분간 반응하였다. 그리고 아밀로오스 자성 입자는 자석에 의해 분리하였으며 결합되지 않은 균을 포함한 상층액을 LB 평판 배지에 도말하여 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 생성된 콜로니 수 확인을 통해 면역 아밀로오스 자성 입자의 표적 균 결합 능력을 확인하였다(도 6). 콜로니 계수 방법을 통해 확인된 면역 아밀로오스 자성 입자의 표적 균 분리율은 95% 이상이였다.

[0078] 상기 면역 아밀로오스 자성 입자를 회수하여 전계방사형 주사전자현미경(FE-SEM)으로 관찰하였을 때, 면역 아밀로오스 자성 입자에 부착된 대장균을 관찰할 수 있었다(도 7). 이는 MBP-SPG-His6 융합 단백질을 이용한 항체의 아밀로오스 표면 고정화 및 제작된 아밀로오스 자성 입자의 표적 균 분리 능력을 가시적으로 보여주는 결과이다.

[0079]

[0080] **실시예 4: 표적균 검출 민감도 확인**

[0081] 상기 면역 아밀로오스 자성 입자에 결합된 표적 균은 10 mM 말토오스를 포함하는 용출버퍼에 분산시키고 5분간 반응하였다. 그리고 용출된 표적 균은 10 ㎕로 농축하였으며 이를 85℃에서 10분간 가열함으로써 균을 용해시키고 용액을 취하여 PCR를 수행하였다. PCR을 통해 증폭하고자 한 유전자는 쉬가 독소 유전자 2(shiga toxin gene 2; stx2)로써 하기의 염기서열 3과 4를 프라이머로 사용하여 증폭을 실시하였다. PCR조건으로는 첫 번째 변성(denaturation)은 94℃에서 5분간 한번 수행하였으며, 이후 두 번째 변성은 94℃에서 10초간, 교잡(annealing)은 54℃에서 10초간, 연장(extention)은 72℃에서 25초간 수행하였으며 이를 40회 반복하였다.

[0083] [서열번호 3] stx2의 정방향 프라이머(forward primer)

[0084] 5'- AGTTCTGCGTTTTGTCACTGTC - 3' (프라이머 1)

[0085] [서열번호 4] stx2의 역방향 프라이머(reverse primer)

[0086] 5' -CGGAAGCACATTGCTGATT - 3' (프라이머 2)

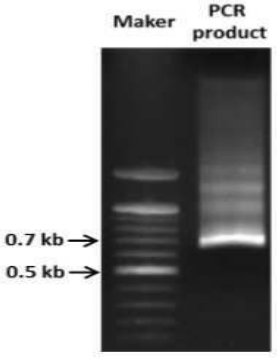
[0088] 상기 PCR을 통해 증폭된 DNA를 아가로즈 젤 전기영동을 통하여 160 bp 크기의 표적 DNA 절편의 증폭 산물 확인을 통해 표적균의 분리·농축 및 검출 결과를 확인하였다. 비교 실험에서는 10^5 CFU/mL의 농도까지 PCR을 통해 확인된 반면, 면역 아밀로오스 자성 입자를 이용하여 표적 균을 분리·농축한 결과 10^2 CFU/mL의 농도까지 검출이 가능함을 보여주었다(도 8).

[0089] 상기 PCR 결과를 통해 본 발명에서 개발한 MBP-SPG-His6 융합 단백질을 이용하게 되면, 항체를 높은 효율로 고정화할 뿐만 아니라, 간단한 방법으로도 항체 및 표적균의 활성을 가장 잘 유지한 상태로 용출시킴으로써, 표적균의 분리 농축효과가 매우 우수함을 알 수 있다.

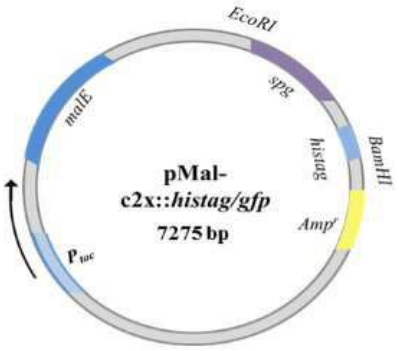
[0091] 이상에서 실시예를 중심으로 설명하였으나 이는 단지 예시일 뿐 본 발명을 한정하는 것이 아니며, 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 본 실시예의 본질적인 특성을 벗어나지 않는 범위에서 이상에 예시되지 않은 여러 가지의 변형과 응용이 가능함을 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 실시예에 구체적으로 나타난 각 구성요소는 변형하여 실시할 수 있는 것이다. 그리고 이러한 변형과 응용에 관계된 차이점들은 첨부된 청구범위에서 규정하는 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

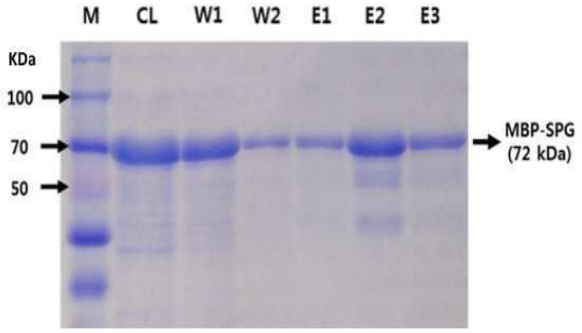
도면1



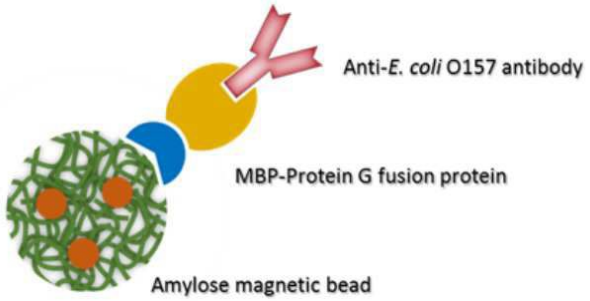
도면2



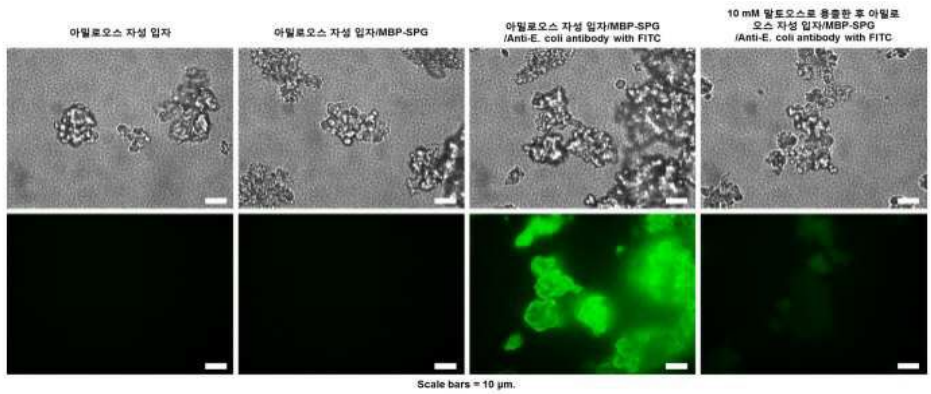
도면3



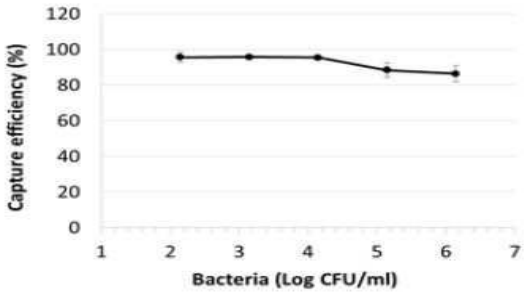
도면4



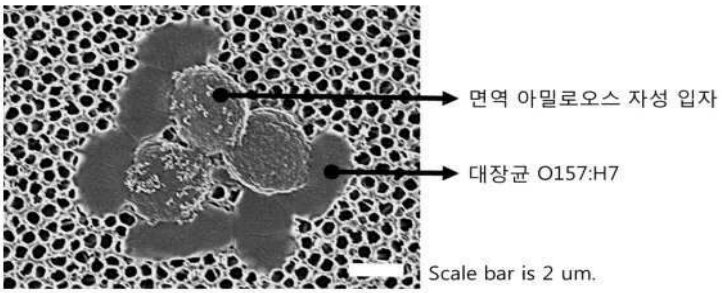
도면5



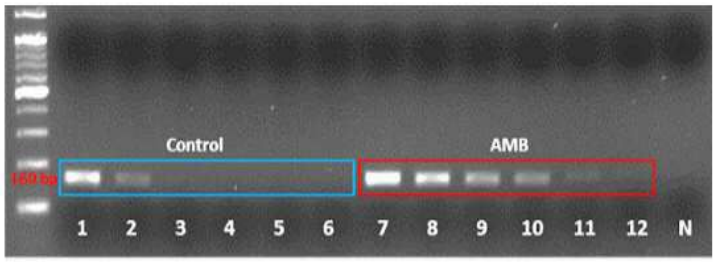
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Fusion protein and method for detecting target antigen using the

<130> GKH15P-0071KR

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for SPG-His6

<400> 1

ccggaattcg gtaccattca gtctccatgg 30

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for SPG-His6

<400> 2

cgcggatccc tttcgggctt tgttagcagc cggatc 36

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for stx2

<400> 3

agttctgcgt tttgtcactg tc 22

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for stx2

<400> 4

cggaagcaca ttgctgatt 19

<210> 5

<211> 367

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 5

Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
1 5 10 15

Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
20 25 30

Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
35 40 45

Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala

50 55 60

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

130 135 140
Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro
145 150 155 160
Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys
165 170 175
Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly
180 185 190
Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp
195 200 205

Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala
210 215 220
Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys
225 230 235 240
Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser
245 250 255
Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro
260 265 270
Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp

275 280 285
Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala
290 295 300

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

Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr
355 360 365

<210> 6
<211> 185
<212> PRT
<213> Streptococcus sp. G148
<400> 6

Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu
1 5 10 15
Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp
20 25 30
Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu

35 40 45
Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu
50 55 60
Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn
85 90 95
Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr
100 105 110

Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala
115 120 125
Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu
130 135 140
Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys

145 150 155 160

Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp

165 170 175

Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu

180 185

<210> 7

<211> 558

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gou

<400> 7

Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys

1 5 10 15

Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr

20 25 30

Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe

35 40 45

Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala

50 55 60

His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile

65 70 75 80

Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp

85 90 95

Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu

100 105 110

Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys

115 120 125

Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly

130 135 140

Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly

180 185 190

Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp

195 200 205

Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala

210 215 220

Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys

225 230 235 240

Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser

245 250 255

Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro

260 265 270

Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp

275 280 285

Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala

290 295 300

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

305 310 315 320

Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln

325 330 335

Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala

340 345 350

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

355 360 365

Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys

370 375 380

Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr

385 390 395 400

Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val

405 410 415

Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val
420 425 430

Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp
435 440 445

Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly
450 455 460

Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val
465 470 475 480

Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val
485 490 495

Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr
500 505 510

Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln
515 520 525

Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala
530 535 540

Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu His His His His His His
545 550 555

<210> 8

<211> 1674

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gouu

<400> 8

atgaaaatcg aagaaggtaa actggtaatc tggattaacg gcgataaagg ctataacggt 60

ctcgctgaag tcggtaagaa attcgagaaa gataccggaa ttaaagtcac cgttgagcat 120

ccggataaac tggaagagaa attcccacag gttgcggcaa ctggcgatgg ccctgacatt 180

atcttctggg cacacgaccg ctttggtggc tacgctcaat ctggcctgtt ggctgaaatc 240

accccggaca aagcgttcca ggacaagctg tatccgttta cctgggatgc cgtacgttac 300

aacggcaagc tgattgctta cccgatcgct gttgaagcgt tatcgctgat ttataacaaa 360

gatctgctgc cgaacccgcc aaaaacctgg gaagagatcc cggcgctgga taaagaactg 420

aaagcgaaag gtaagagcgc gctgatgttc aacctgcaag aaccgtactt cacctggccg 480

ctgattgctg ctgacggggg ttatgcgttc aagtatgaaa acggcaagta cgacattaaa 540

gacgtgggcg tggataacgc tggcgcgaaa gcgggtctga ccttcctggt tgacctgatt 600

aaaaacaaac acatgaatgc agacaccgat tactccatcg cagaagctgc ctttaataaa 660

ggcgaaacag cgatgaccat caacggcccg tgggcatggt ccaacatcga caccagcaaa 720

gtgaattatg gtgtaacggt actgccgacc ttcaagggtc aaccatccaa accgttcgtt 780

ggcgtgctga gcgcaggtat taacgccgcc agtccgaaca aagagctggc aaaagagttc 840

ctcgaaaact atctgctgac tgatgaaggt ctggaagcgg ttaataaaga caaaccgctg 900

ggtgccgtag cgctgaagtc ttacgaggaa gagttggcga aagatccacg tattgccgcc 960

actatggaaa acgcccagaa aggtgaaatc atgccgaaca tcccgcagat gtccgctttc 1020

tggtatgccg tgcgtactgc ggtgatcaac gccgccagcg gtcgtcagac tgtcgatgaa 1080

gccctgaaag acgcgcagac tttgaaaggc gaaacaacta ctgaagctgt tgatgctgct 1140

actgcagaaa aagtcttcaa acaatacgct aacgacaacg gtgttgacgg tgaatggact 1200

tacgacgatg cgactaagac ctttacagtt actgaaaaac cagaagtgat cgatgcgtct 1260

gaattaacac cagccgtgac aacttacaaa cttgttatta atggtaaaac attgaaaggc 1320

gaaacaacta ctgaagctgt tgatgctgct actgcagaaa aagtcttcaa acaatacgct 1380

aacgacaacg gtgttgacgg tgaatggact tacgacgatg cgactaagac ctttacagtt 1440

actgaaaaac cagaagtgat cgatgcgtct gaattaacac cagccgtgac aacttacaaa 1500

cttgttatta atggtaaaac attgaaaggc gaaacaacta ctaaagcagt agacgcagaa 1560

actgcagaaa aagccttcaa acaatacgct aacgacaacg gtgttgatgg tgtttggact 1620

tatgatgatg cgactaagac ctttacggta actgaacacc accaccacca ccac 1674