



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0052910
(43) 공개일자 2009년05월27일

(51) Int. Cl.

C12N 15/52 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0119460

(22) 출원일자 2007년11월22일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

조명제

경남 진주시 강남동 7-24

전진수

경남 진주시 주악동 한주럭키아파트 12동 1504호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

권오식, 박창희, 김중관

전체 청구항 수 : 총 7 항

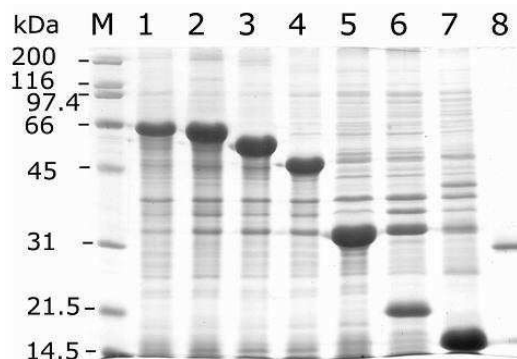
(54) I g A 항체와 반응하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소항원결정기제조합 단백질 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 영·유아의 헬리코박터 파이로리 감염의 진단을 목적으로 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)가 생성하는 요소분해효소 단백질 중 사람에게서 항원성을 보이는 항원결정기만 생성하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질 제조방법에 관한 것이다.

이차원전기영동과 면역블롯 분석법으로 헬리코박터 파이로리 항원결정기를 맵핑(mapping)하여 요소분해효소가 IgA 항체에 강하게 반응함을 통해 혈청학적 진단에 있어서 특이도를 높였으며, 항원 성분의 정제를 용이하게 하는 장점이 있다. 또한, 영·유아의 헬리코박터 파이로리 감염 여부 진단에 있어서 모체로부터 전달되는 항체와는 구별되어 혈청학적으로 특이하게 감별함으로써 영·유아의 보건관리를 보다 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이우곤

경남 진주시 상봉동 상봉한주아파트 2동 307호

윤희상

경남 진주시 칠암동 505-33

서지현

경남 진주시 주악동 금호아파트석류마을 101동
1003호

이광호

경남 진주시 상평동 축석아파트 가동 101동

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 RT104-03-07

부처명 산업자원부

연구사업명 지방기술혁신사업

연구과제명 Helicobacter pylori 항원결정기 재조합 단백질을 이용한진단소재 개발

주관기관 (재)경남테크로파크

연구기간 2005년 10월 01일 ~ 2008년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)의 요소분해효소 항원결정기.

청구항 2

제 1항에 따른 항원결정기를 포함하는 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 항원결정기는 B 아단위의 3' 마지막 도메인에 위치하는 것을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질.

청구항 4

제 2항에 있어서,

서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질.

청구항 5

제 2항에 있어서,

IgA 항혈청에 반응하는 것을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질.

청구항 6

- 1) 헬리코박터 파이로리 항원 유전자와 결손변이 항원 유전자를 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 DNA를 증폭하는 단계;
- 2) 상기 증폭된 DNA를 서브-클로닝 하여 클론을 얻은 후, 제한효소를 처리하여 DNA를 절단하는 단계;
- 3) 상기 절단된 DNA를 전기영동 하여 분리한 후, DNA를 정제하는 단계;
- 4) 상기 2) 단계에서 처리한 동일한 제한효소를 벡터에 처리하는 단계;
- 5) 상기 3) 단계의 정제된 DNA와 상기 4) 단계의 벡터를 클로닝 하여 클론을 얻는 단계;
- 6) 상기 5) 단계의 클론을 단백질 발현시켜 항원성을 검토하고 항원결정기 서열을 맵핑하는 단계;
- 7) 상기 6) 단계의 맵핑된 항원결정기 서열을 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 증폭하고 융합대상 벡터와 클로닝 하여 클론을 얻는 단계; 및
- 8) 상기 7) 단계의 클론을 발현하여 제조합 융합단백질을 정제하는 단계:

를 포함하는 헬리코박터 파이로리 항원결정기요소분해효소 제조합 단백질 제조방법.

청구항 7

제 6에 있어서,

상기 2) 단계 또는 4) 단계에서 제한효소는 5' 말단은 *NdeI*를 사용하고, 3' 말단은 *BamHI*, *HindIII*, *ClaI*, *EcoRI*으로부터 선택되어져 사용하는 것을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질 제조방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 IgA 항체와 반응하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 영·유아의 헬리코박터 파이로리 감염 여부의 진단을 목적으로 헬리코박터 파이로리가 생성하는 요소분해효소 단백질 중 사람에게서 항원성을 보이는 항원결정기만 생성하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 한국인은 헬리코박터 파이로리 보균율이 높아 영·유아시절부터 헬리코박터 파이로리에 감염되기 때문에 이 시기의 감염을 진단할 수 있는 수단이 필요하다. 헬리코박터 파이로리는 위점막에 서식하기 때문에 감염을 진단하기 위해서는 위내시경을 통한 위점막 생검체가 필요하다. 그런데 위 내시경술을 시행하기 위해서는 훈련된 의료진과 시설이 필요하다. 그 뿐만 아니라 위 내시경술은 환자에게 신체적 고통을 수반하기 때문에 쉽게 권장할 수 없으며 더욱이 영·유아를 대상으로 위 내시경술을 시술한다는 것은 의료현장에서 현실적으로 쉽지 않다. 따라서 헬리코박터 파이로리 진단에 있어 보다 현실적이고 효과적인 진단법의 적용이 필요하다. 그 대안으로 제안된 것이 혈청학적 진단법이다. 혈청학적 진단법은 모든 의료기관에서 널리 사용하고 있기 때문에 특이한 항원만 개발되면 쉽게 사용할 수 있다. 현재 의료기관에서 사용되고 있는 이 혈청학적 진단법은 항원으로 헬리코박터 파이로리 세포추출단백질, 정제항원단백질, 또는 발현항원단백질을 사용하고 있다. 그러나 이와 같이 현재 사용하고 있는 혈청학적 진단법은 사람의 항체 클래스를 구분하지 못하는 문제점이 있다.
- <3> 또한, 한국인 성인은 대부분 헬리코박터 파이로리에 감염되었거나 감염된 적이 있어 헬리코박터 파이로리에 대한 항체를 보유하고 있다. 이런 이유로 모든 산모는 헬리코박터 파이로리에 반응하는 항체를 보유하고 있으며, 이 중 신생아에 전달되는 면역글로불린 중 IgG 항체는 태아에게 전달되므로 신생아는 대부분 모체로부터 전달받은 헬리코박터 파이로리에 대한 IgG 항체를 생후 1년 정도까지는 보유하게 된다. 상기와 같은 이유 때문에 영·유아가 헬리코박터 파이로리에 감염 되었을지라도 헬리코박터 파이로리에 대한 IgG 항체가로는 혈청검사에서 양성반응을 보여도 헬리코박터 파이로리에 감염의 결과인지 아니면 모체로부터 전달받은 항체인지를 구분할 수 없다. IgA 항체는 모체로부터 전달되지 않기 때문에 IgA 항체에 반응하는 요소분해효소의 항원결정기제조합단백질을 이용하면 영·유아의 감염을 특이하게 진단할 수 있다.
- <4> 종래에는 헬리코박터 파이로리 감염시 초기에는 복통이 수반된다고 알려져 있다. 그러나 영·유아는 인지능력이 없기 때문에 헬리코박터 파이로리에 감염되었을지라도 일반적인 병증을 호소함으로써 그 원인이 헬리코박터 파이로리 감염 때문인지 다른 원인인지 알 수가 없어 치료지침을 마련하기가 쉽지 않다.
- <5> 따라서 영·유아 시기의 감염을 진단하기 위해서는 모체로부터 전달받은 항체와 영아의 생후 감염에 따른 항체를 구분할 수 있는 혈청학적 방법의 개발이 절실히 필요하다.
- <6> 또 다른 종래의 혈청학적 진단의 문제점은, 항원 분자 내에 있는 다양한 항원 결정기가 존재함으로써 비특이적인 반응을 피할 수 없는데 이것이 혈청학적 진단에 있어서 특이도를 저하시킨다는 것이다. 또한 헬리코박터 파이로리의 항원 성분은 정제하기가 어렵고 대장균에 유전자 재조합하여 발현하였을 경우 발현이 되지 않거나 비용해성 단백질로 생성됨으로써 정제가 불가능한 경우가 많아 혈청학적 진단법에 사용할 수 있는 항원의 범위가 그만큼 한정되어 있다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 항원의 발명이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명은 상기한 바와 같은 문제점을 해결하기 위한 안출된 것으로서, 영·유아의 헬리코박터 파이로리의 감염 여부를 혈청학적으로 특이하게 진단하기 위해서 모체 유래 IgG 항체와 구분할 수 있는 IgA 항체와 반응하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질 및 그의 제조방법을 제공하고자 한다. 보다 상세하게는 헬리코박터 파이로리 항원성 단백체를 분석하여 IgA 항체와 강하게 반응할 수 있는 헬리코박터 파이로리 유전자 산물이 요소분해효소임을 확인하고, 요소분해효소 유전자를 순차적으로 결손시켜 항원결정기가 위치하는 곳을 매핑(mapping)함으로써 영·유아의 헬리코박터 파이로리 감염을 진단하는데 사용할 수 있는 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질을 제조하여, 본 발명을 완성하였다.
- <8> 따라서 본 발명의 제 1목적은 IgA 항체와 반응하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기를 제공하는 것이다.
- <9> 본 발명의 제 2목적은 항원결정기를 포함하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질을 제

공하는 것이다.

<10> 또한, 본 발명의 제 3목적은 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질 제조방법을 제공하는 것이다.

<11>

과제 해결수단

<12> 상기와 같은 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 IgA 항체와 반응하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질 및 그의 제조방법을 제공하고자 한다.

<13> 본 발명은 하기의 서열번호 1로 표시되는 아이노산 서열로 구성되는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)의 요소분해효소 항원결정기에 관한 것이다.

<14> 본 발명에서 확인한 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 B 아단위 융합단백질 중 사람에게서 항원결정기로 작용하는 부위의 아미노산 서열은 다음과 같다.

<15> VDGKEVTSKPANKVSLAQLFSIF (서열번호 1)

<16> 본 발명은 상기의 아미노산 서열을 갖는 항원결정기를 포함하는 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질에 관한 것이다. 상기 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기는 B 아단위의 3' 마지막 도메인에 위치한다.

<17> 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질에 관한 것이다. 상기 서열번호 2의 아미노산 서열 다음과 같다.

<18> MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID

<19> GDNKLTQSMALIRYIADKHNLGGCPKERAELSMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKV

<20> DFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFK

<21> KRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLLVPRGSPEFPPIVPVDGKEV

<22> TSKPANKVSLAQLFSIF (서열번호 2)

<23> 상기 단백질은 IgA 항체와 반응하는 것을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질이다.

<24> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<25> 이 때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가진다.

<26> 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.

<27> 본 발명은,

<28> 1) 헬리코박터 파이로리 항원 유전자와 결손변이 항원 유전자를 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 DNA를 증폭하는 단계;

<29> 2) 상기 증폭된 DNA를 서브-클로닝 하여 클론을 얻은 후, 제한효소를 처리하여 DNA를 절단하는 단계;

<30> 3) 상기 절단된 DNA를 전기영동 하여 분리한 후, DNA를 정제하는 단계;

<31> 4) 상기 2) 단계에서 처리한 동일한 제한효소를 벡터에 처리하는 단계; 및

<32> 5) 상기 3) 단계의 정제된 DNA와 상기 4) 단계의 벡터를 클로닝 하여 클론을 얻는 단계;

<33> 6) 상기 5) 단계의 클론을 단백질 발현시켜 항원성을 검토하고 항원결정기 서열을 맵핑하는 단계;

<34> 7) 상기 6) 단계의 맵핑된 항원결정기 서열을 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 증폭하고 융합대상 벡터와 클로닝 하여 클론을 얻는 단계; 및

<35> 8) 상기 7) 단계의 클론을 발현하여 제조합 융합단백질을 정제하는 단계;

- <36> 를 포함하는 헬리코박터 파이로리 항원결정기요소분해효소 제조합 단백질 제조방법에 관한 것이다.
- <37> 상기 1) 단계에서 헬리코박터 파이로리 항원 유전자를 중합효소연쇄반응을 통해 오픈리딩프레임(open reading frame)의 시작부위와 3' -말단의 종결 서열까지 포함하도록 증폭하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 2) 단계 또는 4) 단계에서 제한효소는 특별한 제한이 있는 것은 아니나, 3' 말단은 *Bam*HI, *Hind*III, *Cla*I, *Eco*RI 으로부터 선택하여 사용할 수 있다. 더 바람직하게는 발현에 필요한 시작코돈을 삽입하기 위해서는 5' 말단에는 *Nde*I를 사용하며, 3' 말단은 *Bam*HI을 사용한다.
- <38> 본 발명은 헬리코박터 파이로리 세포성분 중 환자의 혈청과 반응하는 항원 단백체를 분석하여 항원별로 반응하는 면역글로불린 클래스를 분석하여 사람의 Ig와 더불어 IgA 또는 IgM 항체가 반응하는 항원을 확인하였다. 헬리코박터 파이로리 항원 유전자와 결손변이 항원 유전자는 헬리코박터 파이로리 균주로부터 세포를 파쇄 하여 그로부터 정량한 세포단백을 시료로 하여 고정화 pH 구배(Immobilized pH Gradient: IPG) 스트립(strip) (Bio-Rad Inc.) 겔을 이용하여 이차원 전기영동을 하였다. 이후, 환자 혈청혼합액으로 면역블롯 분석을 실시한 후, 말디-토프(MALDI-TOF-MS) 분석 방법을 이용하여 항원의 단백질 동정을 함으로써, 요소분해 효소 B 아단위 단백질이 IgA 항체와 강하게 반응하는 것을 확인하였다.
- <39> 상기의 동정된 단백질의 유전자를 클로닝하고 전체 유전자를 단계적으로 결손 시켜 발현한 단백질을 이용하여 사람의 항체와 반응하는 항원결정기를 확인하였다. 상기와 같이 단백질 동정을 통해 확인된 헬리코박터 파이로리의 아미노산 서열을 기초로 하여 요소분해효소 항원결정기 모티프를 분석하였으며, 이를 토대로 하여 결손변이클론을 제작하기 위한 프라이머 위치를 기획하였고 요소분해효소 B 아단위의 3' 말단 쪽이 결손된 변이주 5개를 제조하였다.
- <40> 즉, 본 발명에서는 상기의 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 제조합 단백질을 통해 항원결정기를 맵핑(mapping)하였고, 맵핑된 항원결정기에 해당하는 염기서열을 융합대상 벡터에 클로닝 하여 요소분해효소의 항원결정기를 포함하는 제조합 융합단백질을 제조하고 이를 정제하여 효소면역법으로 헬리코박터 파이로리에 감염된 영·유아 환자를 대상으로 하는 진단의 효능을 평가하는 척도로서 사용할 수 있음을 확인하였다.

효 과

- <41> 이상과 같이, 본 발명은 IgA 항혈청에 반응하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기제조합 단백질 및 그의 제조방법을 제공함으로써, 헬리코박터 파이로리 항원결정기를 맵핑(mapping)하여 혈청학적 진단에 있어서 특이도를 높였으며, 항원 성분의 정제를 용이하게 하는 장점이 있다. 또한, 영·유아의 헬리코박터 파이로리 감염 여부 진단에 있어서 모체로부터 전달되는 항체와는 구별되어 혈청학적으로 특이하게 감별함으로써 영·유아의 보건의관리를 보다 향상시킬 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <42> 이하, 본 발명을 구체적인 실시 예에 의해 보다 더 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 사상과 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 분야에서 당업자에게 명백한 것이다.

<43> [실시예 1] 이차원 전기영동

<44> (1) 등전점 전기영동(isoelectric focusing)

- <45> 정량한 헬리코박터 파이로리 균주 51의 세포 파쇄액을 대상으로, 세포단백 50 ug에 대하여 리하이드레이션 버퍼(rehydration buffer, 8 M urea, 4% CHAPS, 10 mM DTT, 0.2% ampholite, pH 4 ~ 7) 320 ul을 혼합하였다. 여기에 고정화 pH 구배(Immobilized pH Gradient: IPG) 스트립(strip) (Bio-Rad Inc.) 겔(pH5 ~ 8)을 얹었다. 단백질 등전점 전기영동 세포(Protein IEF(Isoelectric Focusing) Cell, Bio-Rad Inc.)에서 0 volts, 20℃에서 14 ~ 16시간 동안 재수화 시켰다. 수화 후 겔을 등전점 전기영동 포커싱 트레이에 올려 30,000 볼트-시간이 될 때까지 전기영동을 실시하였다. 일차원 전기 영동한 스트립을 평형 완충액(6 M 요소(urea), 0.375 M 트리스-염산(Tris-HCl) [pH 8.8], 2% SDS(Sodium dodecyl sulfate), 20% 글리세롤(glycerol), 2%(w/v) DTT) 15 ml이 들어 있는 시험관에 넣은 후 두 차례 평형화시켰다.

<46> (2) SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

- <47> 평형화된 스트립을 증류수로 씻고 말린 후 12.5% 아크릴아마이드(acrylamide)가 포함된 separating gel 위에 올

렸다. 나머지 공간은 러닝 버퍼(running buffer)에 녹인 0.5% 로우 멜팅 아가로스(low melting agarose)로 채웠다. 분자량을 나타내는 표준 단백질 스트립을 +측에 삽입시켰다. 러닝 버퍼로 채운 후 20 mA에서 15분간, 30 mA에서 브로모페놀 마커(bromophenol marker)가 바닥에 닿을 때까지 전기영동 하였다. 이러한 겔을 2장 만들어 한개는 면역블롯 분석에 다른 겔은 단백질 동정을 위하여 은 염색을 실시하였다.

<48> [실시예 2] 단백질 동정

<49> 상기 실시예 1과 같이 헬리코박터 파이로리 균주 51의 세포 과쇄액을 고정화 pH 구배 스트립을 이용하여 이차원 전기영동을 한 후 이를 나이론 여과지에 블롯한 다음 환자 혈청혼합액으로 면역블롯 분석을 실시한 결과, 하기 도 1과 같이 요소분해 효소 B 아단위 단백질이 IgA에 강하게 반응하였다.

<50> 면역블롯에서 확인된 스팟은 은 염색한 다른 겔을 이용하여 동일한 위치의 스팟을 잘라내어 탈색하고 트립신이 포함된 디제션 버퍼(digestion buffer)를 섞어 재수화 시켰다. 디제션 버퍼를 겔 조각이 충분히 잠기도록 첨가하여 얼음에 45 분간 두었다. 효소 용액을 제거하고 효소가 들어있지 않은 디제션 버퍼를 20 μ l 넣어 겔이 젖은 상태로 37°C에서 효소에 의해 잘리도록 24시간 동안 두었다. 이후 30분간 볼텍싱(vortexing) 시킨 후 20 μ l를 에펜돌프 튜브에 넣은 후 1시간 동안 스피드백(speed vac) 하여 말렸다. 말린 시료를 0.1% TFA 2 μ l에 녹였다.

<51> 매트릭스(matrix) 용액(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid(4 mg/ml)), 50% 아세토나이트릴(acetonitril, 0.1 % TFA) 2 μ l와 시료용액 2 μ l를 섞어서 타겟 웰(target well)을 올린 후 재빨리 말리고 30초간 파이펫(pipette)을 이용하여 증류수로 2회 세척하였다. Voyager Biospectrometry Workstation(PE Biosystem, Foster city, CA)를 이용하여 20 kV 가속전압(accelerating voltage), 75% 그리드 전압(grid voltage), 0.02% 가이드 와이어 전압(guide wire voltage), 150 ns 딜레이(delay)하고 800에서 25,000 사이의 메스 게이트(mass gate)로 말디-토프-MS(MALDI-TOF-MS) 분석을 실시하였다.

<52> 단백질 프로스펙터 패키지 프로그램 MS-FIT(Protein prospector Package program MS-FIT, <http://prospector.ucsf.edu/>)을 이용하여, MALDI-TOF-MS로 지문 분석한 펩타이드 절편의 메스(mass) 값을 입력한 후 'NCBI 데이터베이스'의 자료를 이용하여 단백질을 동정하였다.

<53> [실시예 3] 헬리코박터 파이로리 요소분해효소의 염기서열을 이용한 항원결정기 모티프 분석

<54> 헬리코박터 파이로리 요소분해효소의 항원결정기 분석을 수행하기 위하여 균주 51의 아미노산 서열을 기초로 한 모티프 분석을 실시하였다. 항원성 인덱스(Antigenic index), 소수성 구성(Hydrophobicity plot), 알파-나선 구성(alpha-helix plot), 3-10 나선 구성(3-10 helix plot), 강도 구성(intensity plot), 모티프(motif), 자유 에너지 분포도(free energy region)를 윈도우형 생물정보소프트웨어인 '레이저진(Lasergene) 프로그램'을 이용하여 분석한 결과는 하기 도 2와 같으며, 사각형 속의 번호는 결손변이클론 제조를 위한 결손위치이다.

<55> [제조예 1] 헬리코박터 파이로리 항원 제조 및 결손변이항원 제조

<56> 상기 실시예 3의 결과를 근거로 하여 결손변이클론을 제작하기 위한 프라이머 위치를 기획하였고, 요소분해효소 B 아단위의 3'말단 쪽이 결손된 변이주 5개를 제조하였다. 이를 위한, 본 발명에서 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다.

<57> 순방향 프라이머 : 5' -CATATGAAAAAGATTAGCAG- 3' (서열번호 3)

<58> 역방향 프라이머 : 5' -CGCGGATCTAGAAAATGCTAAA- 3' (서열번호 4)

<59> 헬리코박터 파이로리 항원은 유전자재조합 방법을 이용하여 대장균의 발현 벡터인 pET15b를 이용하여 생산하였다. 전체 오픈리딩프레임(open reading frame)이 함유 되도록 항원 유전자의 염기서열을 이용하여 시발체 올리고머를 만들고 PCR 방법으로 유전자 DNA를 증폭시켰다. 시발체에는 5'말단에는 NdeI자리와 3'말단에는 BamHI자리를 삽입하였다. PCR 증폭 후에는 바로 pGEM-T 벡터에 클로닝 하여 클론을 얻었다. pGEM-T 벡터에 삽입된 유전자 DNA를 NdeI와 BamHI로 절단하여 1% 아가로스 젤에 전기영동 하여 분리하고 절편 DNA를 아가로스 겔로부터 분리하여 정제한 후, 상기와 동일한 제한효소를 처리한 pET15b 벡터를 상기 정제한 DNA와 클로닝 하였다.

<60> 또한, 결손변이항원 클론 생산은 3'말단 전체 유전자를 이용하여 적절한 자리에 해당하는 역시발체를 제조하여 증합효소연쇄반응 방법으로 결손 DNA를 증폭시키고 상기와 동일한 방법으로 pET15b에 삽입하여 요소분해 효소 B 아단위의 3'말단 쪽이 결손된 변이주 5개를 제조하였다. 하기 도 3에 나타난 요소분해효소 B 아단위의 아미노산 서열 중에서 밑줄로 표기된 부분이 역시발체 서열 위치이다. 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 B 아단위의

결손변이주를 pET15b/UreB134, pET15b/UreB244, pET15b/UreB412, pET15b/UreB495, pET15b/UreB546과 같이 제조하여 하기 도 4에 결손위치 요약도를 나타내었다.

<61> [실시예 4] 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 단백질과 결손변이단백질의 발현

<62> 상기 제조예 1과 같이 제조된 단백질과 결손변이단백질의 발현 여부를 확인하기 위하여 이를 발현 숙주에 형질 전환 시키고 이소프로필티오갈락토시드(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)를 첨가하여 발현을 유도한 결과 모두 효율적으로 발현하였다. 그러나 상기 변이 단백질은 수용성상태가 아니고 비수용상태인 봉입체로 발현되었다.

<63> 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 염기서열과 및 결손변이 염기서열이 삽입된 pET15b 클론은 대장균 DH10B/r에 형질 전환시켜 클로닝된 플라스미드 클론을 얻고 이를 다시 발현 숙주인 대장균 BL21에 형질전환 시켜 이소프로필티오갈락토시드를 처리하여 삽입된 유전자를 발현시켰다. 단백질의 발현여부는 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacryamide gel electrophoresis)를 통하여 확인하였고 항원성은 환자의 혈청을 이용하여 면역블롯으로 분석하였다. 또한, 항원결정기를 최종으로 확인하기 위해서 pGEX4T1 벡터를 사용하였다. 융합단백질의 정제는 글루타치온 겔을 이용하였다.

<64> [실시예 5] 면역블롯 분석법에 의한 결손변이단백질의 항원성 분석

<65> 결손변이단백질을 환자혈청을 이용하여 면역블롯 분석법으로 항원성을 분석하였다. 요소분해효소 B 아단위와 결손변이주 단백질의 SDS-PAGE 결과를 하기 도 5에 나타내었다. 항원의 분석결과는 도 6과 같이 IgA 항체는 요소분해 효소 B 아단위 전체 오픈리딩프레임이 클로닝된 대장균 클론은 항체가 결합하였으나 3'쪽을 결손 시킨 변이주인 pET15b/UreB134, pET15b/UreB244, pET15b/UreB412, pET15b/UreB495, pET15b/UreB546 모두 항체 반응성을 나타내지 않았다. 이러한 결과로써 UreB의 546번 잔기와 마지막인 569 사이에 항원결정기가 자리하고 있다고 판단되었다. 이를 확인하기 위하여 요소분해 효소 B 아단위 아미노산 잔기 448번에서 마지막 잔기까지를 삽입시킨 pET15b/UreB448를 제작하고 발현시킨 결과 항체 반응성을 나타내었다. 상기과 같은 결과를 통해, IgA 항체가 반응하는 요소분해효소 B 아단위의 항원결정기는 아미노산 잔기 546에서 마지막인 569번 사이에 있다는 것을 확인할 수 있었다. 즉 IgA 항체가 특이하게 반응하는 항원결정기는 요소분해 효소 B 아단위의 3' 마지막 도메인으로, 요소분해효소 B 아단위의 IgA 항체에 반응하는 항원결정기는 SKPANKVSLAQLFSIF에 포함되어 있다는 것을 확인하였다.

<66> [실시예 6] 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 B 아단위 항원결정기 서열과 융합단백질 서열 분석

<67> 연결부위를 감안하여 하기 서열번호 1에 해당하는 염기서열을 PCR로 증폭하여 PstI으로 절단한 pGEX4T1에 클로닝 하여 벡터에 있는 글루타치온 S-전달효소(Glutathione S-Transferase; GST) 단백질 3'말단에 항원결정기를 융합시켰다.

<68> VDGKEVTSKPANKVSLAQLFSIF (서열번호 1)

<69> 또한, 하기 도 6에 나타낸 바와 같이 상기 서열번호 1로 표기되는 아미노산 서열을 포함하는 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 항원결정기를 포함하는 재조합 단백질(GST/UreBEnd 융합단백질)의 아미노산 서열은 다음과 같다.

<70> MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID

<71> GDVKLTQSMAIIRYIADKHNLGGCPKERAELSMLEGAVLDIRYGVSRAYSKDFETLKV

<72> DFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFK

<73> KRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLLVPRGSPEFPIVPVDGKEV

<74> TSKPANKVSLAQLFSIF (서열번호 2)

<75> [제조예 2] 요소분해효소 항원결정기 융합단백질 GST/UreBEnd 제조

<76> 상기의 항원결정기에 해당하는 염기서열을 포함하여 클로닝된 클론을 포함하는 pGEX4T1 벡터에 삽입하여 글루타치온 S-전달효소(Glutathione S-Transferase; GST)에 연결시켜, 항원결정기 융합단백질인 요소분해효소 B 아단위 항원결정기 융합단백질 GST/UreBEnd을 생산하였고 항원성을 확인하기 위하여 환자혈청을 이용한 면역블롯 분석을 하여, SDS-PAGE한 결과는 하기 도 5에 나타내었고, IgA에 대한 항원성 결과는 하기 도 6에 나타내었다.

[실시예 7] 효소면역측정

요소분해효소 항원결정기 융합단백질 GST/UreBEnd를 정제하고, 상기 단백질을 이용하여 정상인과 환자혈청의 IgA 항체가를 효소면역측정법으로 측정하였다. 헬리코박터 파이로리 감염이 확인된 환자 37명 감염음성으로 확인된 9명을 대상으로 효소면역측정법을 실시하였다. 항원의 부착은 10 ug/ml의 농도로 환자혈청은 1:100으로 희석하였다. 그 결과, 감염환자의 평균흡광도는 1.637± 0.909이었고 감염음성군은 0.233± 0.159이었다. 항원과 항체 미처리 웰(well)의 평균 흡광도가 0.143이었고 이 흡광도의 3배를 컷-오프(cut-off) 값으로 사용하였을 경우 하기 도 8에 나타난 바와 같이 감염환자는 모두 양성으로 판정이 났고 음성 환자 중 한명이 양성으로 판정되어 특이성은 89%를, 민감도는 100%의 결과를 얻었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 이차원전기영동 면역블롯 분석이다.

도 2는 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 B 아단위의 항원성 인덱스, 소수성구성, 알파나선구성, 3-10 나선구성, 강도구성, 모티프, 그리고 자유에너지분포도이다.

도 3는 요소분해효소 B 아단위의 아미노산 서열 중 밑줄로 표기된 부분이 역시발체 서열 위치이며, 염기서열 번호 표시는 결손단백질의 3'말단의 위치이다.

도 4은 헬리코박터 파이로리의 요소분해효소 B 아단위의 결손변이주의 결손위치 요약도이다.

도 5는 요소분해효소 B 아단위와 결손변이주 단백질의 SDS-PAGE이다.

M은 마커(Marker);

1은 요소분해효소 B아단위;

2는 결손단백질 ureB546 ;

3은 결손단백질 ureB 495;

4는 결손단백질 ureB 412;

5는 결손단백질 ureB 244;

6은 결손단백질 ureB 134;

7은 결손단백질 ureB 448; 및

8은 요소분해효소 항원결정기재조합단백질 GST/UreBEnd 이다.

도 6은 환자혈청을 이용한 면역블롯 분석이다.

M은 마커(Marker);

1은 요소분해효소 B아단위;

2는 결손단백질 ureB546 ;

3은 결손단백질 ureB 495;

4는 결손단백질 ureB 412;

5는 결손단백질 ureB 244;

6은 결손단백질 ureB 134;

7은 결손단백질 ureB 448; 및

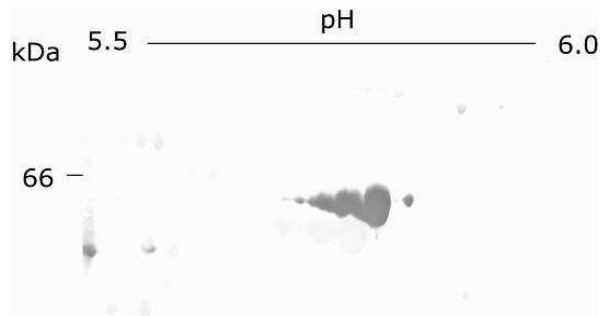
8은 요소분해효소 항원결정기재조합단백질 GST/UreBEnd 이다.

도 7은 IgA 항체와 반응하는 헬리코박터 파이로리 요소분해효소 항원결정기재조합 단백질의 아미노산 서열이다.

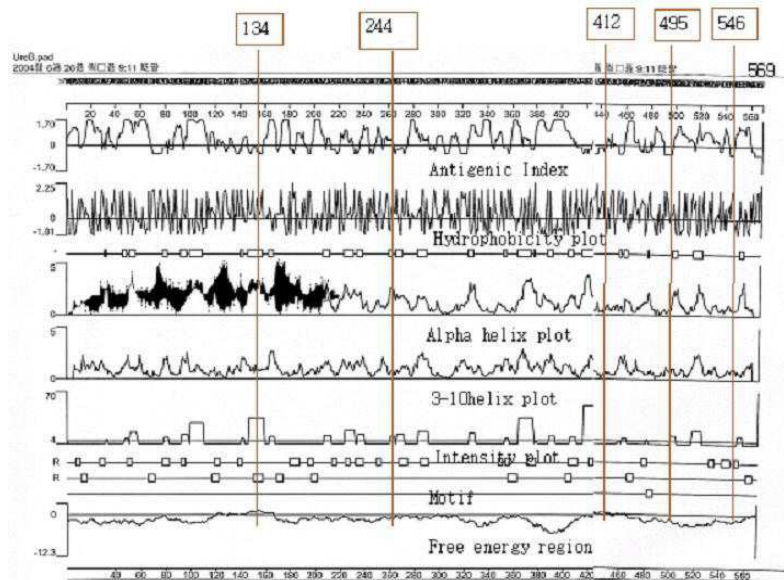
도 8은 GST/UreBEnd 단백질을 이용한 효소면역측정 결과로 정상인과 환자의 IgA 항체가이다.

도면

도면1



도면2



도면3

UREASE BETA SUBUNIT

1 70
 MKKISRKEYVSMYGPTTGDVKRLGDTDLIAEVENHDYTIYGEELKFGGKTLREGMSQSNPNPSKEELDLII

134 140
 TNALIVDYTGIIKADIGIKDGKIGAGIKGGNKDMQDGVKNNLSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFI

210
 SPQQIPTAFASGVTTMIGGGTGPADGTNATTITPGRRLKWMRLRAAEYSNNLGFLAKGNASNDASLADQ

244 280
 IEAGAIGFKIHEDWGTTPSAINHALDVADKYDVQVAIHDTLNEAGCVEDTMAAIGRTMHTFHTEGAGG

350
 GHAPDI IKVAGEHNILPASTNPTIPFTVNTAEAHMDMLMVCHLDKSIKEDVQFADSRIRPQTIAAEDTL

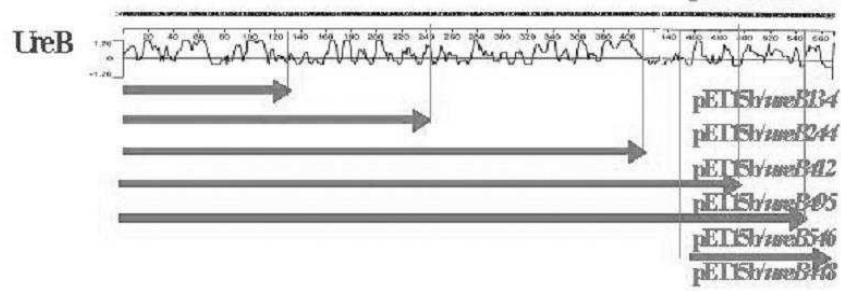
412 420
 HDMGIFSITSSDSQAMGRVGEVITRTWQTADKNKKEFGRLKEEKGDNDNFRIKRYLSKYTINPAIANGIS

448 490
 EYVGSVEVGKVADLVLSPAFFGVKPNMIKGGFIALSQMGDANASIPTPQPVYYREMFANHGKAKYDAN

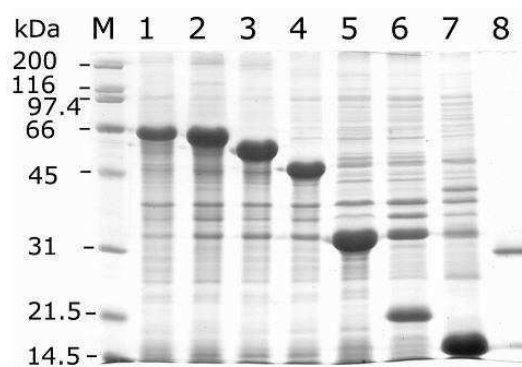
495 560
 ITFVSQAAYDKGIKEELGLERQVLPVKNCRNITKKDMQFNDTTAHIEVNPETYHVFVDGKEVTSKPANKV

569
 SLAQLFSIF

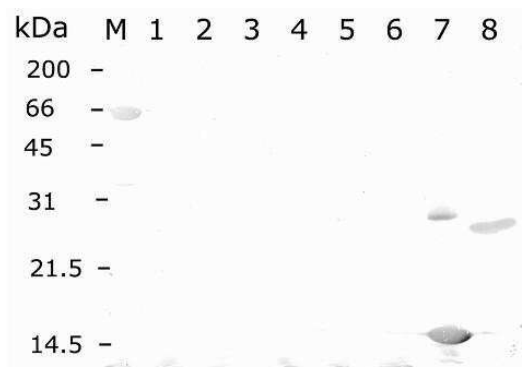
도면4



도면5



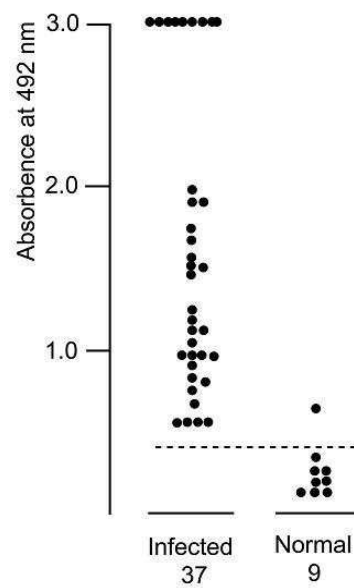
도면6



도면7

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEHLIERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID
 GDVKLTQSMAIIRYIADKHNLGGCPKERABISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKV
 DFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFK
 KRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLLVPRGSPEPPIVPVDGKEV
TSKPANKVSLAQLESIF

도면8



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> The recombinant protein containing antigenic determinant of
 Helicobacter pylori urease to which IgA antibodies are reactive
 and its methods

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Helicobacter pylori

<400> 1

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

1 5 10 15

Ala Gln Leu Phe Ser Ile Phe
20

<210> 2
<211> 257
<212> PRT
<213> Helicobacter pylori

<400> 2
Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

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

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Leu Val Pro
210 215 220

Arg Gly Ser Pro Glu Phe Pro Ile Val Pro Val Asp Gly Lys Glu Val
225 230 235 240

Thr Ser Lys Pro Ala Asn Lys Val Ser Leu Ala Gln Leu Phe Ser Ile
245 250 255

Phe

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
catatgaaaa agattagcag 20

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
cgcgatccta gaaaatgcta aa 22