



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0144352

(43) 공개일자 2014년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0065858

(22) 출원일자 2013년06월10일

심사청구일자 2013년06월10일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93

(72) 발명자

최한석

서울특별시 송파구 풍납동 현대해미리타운 B동 901호

구본경

서울 강동구 올림픽로 664, 102동 816호 (천호동, 대우한강베네시티)

부티투창

서울 송파구 올림픽로43길 88, 울산의대 생리학교실 (풍납동, 서울아산병원)

(74) 대리인

특허법인태백

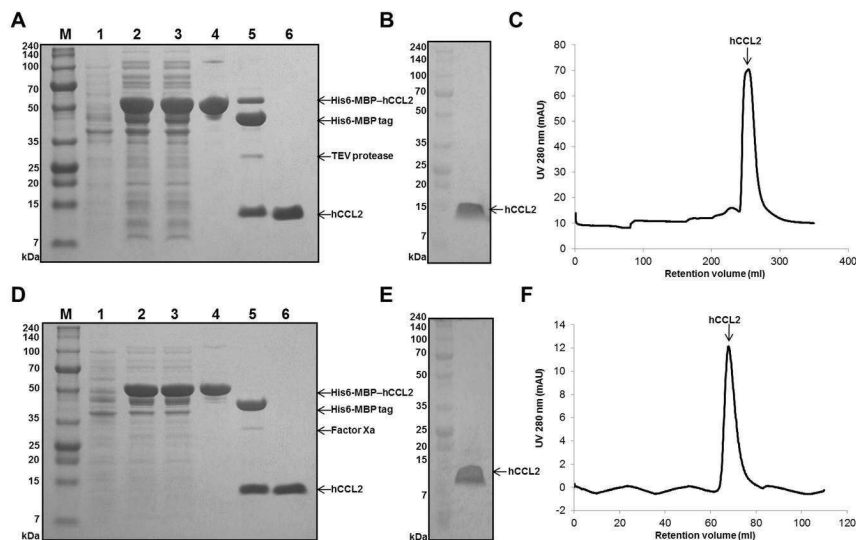
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 생물학적 활성을 가진 인간 CCL2 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법

(57) 요약

본 발명은 N-말단 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 CCL2 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것으로서, 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 케모카인 C-C 모티프 리간드 2(human Chemokine C-C motif ligand 2; hCCL2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다. 또한 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하며, 상기 hCCL2 재조합 단백질(rhCCL2)의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 hCCL2 재조합 단백질(rhCCL2)을 제공한다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0029522

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초의과학지원사업

연구과제명 인간지방줄기세포 이용 역분화 만능 줄기세포 개발연구

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2008.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 케모카인 C-C 모티프 리간드 2(human Chemokine C-C motif ligand 2; hCCL2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 또는 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 hCCL2 유전자는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 MBP 유전자는 서열번호 2이고, 상기 NusA 유전자는 서열번호 3이고, 상기 hPDI 유전자는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 도 1A(i) 또는 도 1B(i)의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 대장균은 BL21(DE3)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

제 6 항에 따른 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 수용성 향상 태그-hCCL2 재조합 단백질을 발현시키는 단계;
담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질 분해효소(protease) 또는 Factor Xa 단백질 분해효소를 처리하여 상기 수용성 향상 태그를 제거하는 단계; 및
상기 수용성 향상 태그가 제거된 hCCL2 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 hCCL2 재조합 단백질(rhCCL2) 생산방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 또는 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)인 것을 특징으로 하는 hCCL2 재조합 단백질(rhCCL2) 생산방법.

청구항 11

제 9 항에 따른 생산방법에 의해 생산된 hCCL2 재조합 단백질(rhCCL2).

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 N-말단 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 CCL2 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 케모카인은 염증성 또는 항상성 타입의 소형 화학주성(chemotaxic) 사이토카인이다. 이들이 분비되면, 반응성 세포가 높은 농도를 향하여 이동할 수 있도록 농도 구배를 형성한다. 염증성 케모카인은 인터루킨-1, 종양 괴사 인자- α , 지질다당체 또는 바이러스와 같은 전-염증 자극에 의해 분비되고, 순환성 백혈구(leukocytes)를 염증 또는 손상 부위로 모은다. 염증은 암, 알츠하이머 질병, 아테롬성 동맥경화증, 천식, 류마티스성 관절염 및 비만과 같은 여러 질병을 일으키는 주요 원인이다.

[0003] 케모카인은 CXC, CC, CX₃C 및 C의 4개 패밀리로 나뉘는데, 이는 이황화 결합을 형성하는 보존된 N-말단 시스템인 잔기를 기초로 한다. CC 케모카인은 2개의 연속적인 시스테인을 갖고, 적어도 26개 이상으로 이루어진다. 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2(Chemokine (C-C motif) ligand 2; CCL2)는 단핵구 화학주성인자 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) 또는 소형 유도성 사이토카인 A2로서 알려져 있으며, 이는 염증성 형태이고 CC 케모카인에서는 가장 잘 밝혀진 케모카인이다. 이는 단핵구/마크로파지(monocyte/macrophages)에서 크게 발현되고, 내피세포, 평활근, 섬유아세포, 상피세포, 혈관간막세포(mesangial), 성상세포(astrocytic) 및 미세교(microglial) 세포와 같은 항바이러스성 면역 반응 세포에서 폭넓게 발현된다. G-단백질-결합 7-트랜스메μβ레인 도메인 수용체인 CC 케모카인 수용체 2(CC chemokine receptor 2; CCR2) 및 CCR4 세포 수용체와 CCL2의 결합은 방향성을 가진 세포 움직임과 관련된 유전자 발현을 항상시켜 세포 내 칼슘을 방출하는 결과를 나타낸다. CCL2는 단핵구, 기억 T 세포, 자연살해(natural killer; NK) 세포, 호염기성 세포(basophils) 및 수지상세포를 조직 손상 및 감염 부위로 모으지만, 호중구(neutrophils) 또는 호산구(eosinophils)를 모으지는 않는다. 화학주성 외에, CCL2는 알레르기성 염증반응에 중요한 매개체인 호염기성 세포(basophils)로부터 히스타민을 방출하기 위한 필수적인 유도체이다. 또한, 효소 분비, 혈관 내피를 통한 단핵구 유출을 촉진하는 부착 분자의 발현과 같이 세포 상에 여러 영향을 미친다. CCL2는 건선, 류마티스성 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 다발성 경화증 및 인슐린-저항성 당뇨와 같은 단핵구성 침윤에 의한 발병 과정과 관련되어 있다고 보고하였다.

[0004] 성숙 CCL2는 76개의 아미노산으로 구성되어 있고, 다양한 포도당화(glycosylation)는 여러 분자량의 자연단백질(native proteins)을 나타낸다. 비록 고농도에서는 호모다이머(homodimer)를 형성할 수 있지만, 생리적 농도에서는 주로 단량체로 존재하고, 이량체는 CCR2와 결합하거나 활성화될 수 없다. 구조적 실험을 통해, 3개의 역-평행 β -가닥(anti-parallel β -strands) 및 가로놓인 카르복시-말단 α -헬릭스(carboxy-terminal α -helix)로 이루어진 CCL2의 2차 구조가 밝혀졌다. 4개의 시스테인 잔기는 Cys34와 Cys59 사이 및 Cys35와 Cys75 사이에 2개의 분자 내 이황화 결합을 형성한다. N-말단 부위는 수용체와의 상호작용에 중요한 것으로 나타났다. 2개의 잔기에 있어서의 변화는 단핵구 대신에 호중구(neutrophils)를 끌어 모으는 것으로 보고되었다.

[0005] 인간 CCL2는 곤충 세포와 같은 다양한 시스템에서 발현되고 분리되어 왔다. 또한, *E. coli*에서도 봉입체(inclusion body) 형태 또는 수용성 형태로 발현되고 분리되었다. 재접힘 과정을 제거한 수용성 발현을 위하여, 티오레독신 환원효소(thioredoxin reductase)가 제거된 CCL2 돌연변이를 *E. coli* 균주에서 발현시켰다.

[0006] 한편 한국공개특허 제2008-0045158호는 임의로 링커에 의해 면역글로불린에 융합된 MCP1을 포함하는 폴리펩타이드에 관해 개시하고 있지만, 본원발명의 CCL2의 수용성 발현 및 이를 분리하기 위한 태그 시스템에 대한 언급은 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 케모카인 C-C 모티프 리간드 2(human

Chemokine C-C motif ligand 2; hCCL2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 hCCL2 재조합 단백질(rhCCL2)의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 hCCL2 재조합 단백질(rhCCL2)을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 N-말단에 MBP-태그를 융합시킨 야생형 인간 CCL2를 BL21(DE3)에서 수용성으로 발현시켰고, 크로마토그래피 기술을 이용하여 분리, 정제하였다. N-말단의 태그는 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 또는 Factor Xa 단백질분해효소(Factor Xa proteases)에 의해 완전히 제거하고 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 발명은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 케모카인 C-C 모티프 리간드 2(human Chemokine C-C motif ligand 2; hCCL2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 hCCL2 재조합 단백질을 수용성 형태로 발현시킬수 있는 것이면 어느 것이든 제한 없이 이용가능하다. 예를 들어, 상기 수용성 향상 태그는 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 또는 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI) 중 어느 하나일 수 있다.

[0013] 상세하게는, 상기 hCCL2 유전자는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하고, 상기 MBP 유전자는 서열번호 2이고, 상기 NusA 유전자는 서열번호 3이고, 상기 hPDI 유전자는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 한다. 보다 상세하게는 상기 재조합 발현벡터는 도 1A(i) 또는 도 1B(i)의 개열지도로 갖는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명에 있어서, “벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[0015] 본 발명에서 있어서, “발현 벡터”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[0016] 본 발명에서 사용한 Gateway Vector system은 엔트리벡터와 목적벡터로 구성되며, 상기 엔트리벡터는 목적유전자의 양말단에 attL1, attL2를 갖는 벡터이며, 목적벡터는 attR1, attR2를 포함하는 벡터이다. 상기 엔트리벡터와 상기 목적벡터는 목적벡터의 attR1 및 attR2가 엔트리벡터의 attL1 및 attL2와 재조합효소에 의해 LR반응을 일으키며, 이 과정에서 엔트리벡터에 포함되어 있던 목적유전자가 목적벡터로 전달되게 되고, attR1과 attR2는 attB1과 attB2 서열로 치환되어진다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 상세하게는 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하고, 보다 상세하게는 대장균 BL21(DE3)인 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 수용성 향상 태그-hCCL2 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질 분해효소(protease) 또는 Factor Xa 단백질 분해효소를 처리하여 상기 수용성 향상 태그를 제거하는 단계; 및 상기 수용성 향상 태그가 제거된 hCCL2 재조합 단

백질을 회수하는 단계를 포함하는 hCCL2 재조합 단백질(rhCCL2) 생산방법을 제공한다.

[0019]

한편, 본 발명의 실시예에서는 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질 분해효소(protease) 또는 Factor Xa 단백질 분해효소를 사용했지만, 상기 단백질 분해효소(protease)는 당업계에서 통상적으로 사용될 수 있는 트롬빈(Thrombin), 엔테로키나제(Enterokinase), 유비퀴틴-특이적 단백질 분해효소(Ubiquitin-specific protease), 푸린(Furin), 유전자 분해효소 I(Genease I) 또는 단백질 분해효소 K(Proteinase K)등을 적용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020]

또한, 본 발명은 상기 생산방법에 의해 생산된 hCCL2 재조합 단백질(rhCCL2)을 제공한다.

[0021]

본 발명에서 사용한 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.(2001)) 및 프레드릭 등의 문헌 (Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1,2,3, John Wiley & Sons, Inc.(1994)) 등을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0022]

본 발명은 N-말단 태그를 이용한 인간 CCL2 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것으로서, N-말단에 MBP 태그를 통해 대장균 내에서 용해도 및 안정도가 증가된 CCL2 단백질을 분리, 정제하는 방법에 대한 것이다. 이렇게 얻어진 CCL2 단백질은 동맥경화, 다발성 경화증, 류마티스 관절염 등과 같은 단핵구 침윤 관련 질환 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 발현벡터의 제작 과정 및 도메인 구조의 모식도를 나타낸다. (A) His6-MBP-TEVrs-hCCL2 벡터 맵. (B) His6-MBP-Factor Xars-hCCL2 벡터 맵. (C) TEV 인식 사이트를 가진 7개의 융합 단백질들의 구조 모식도를 나타낸다.

도 2는 SDS-PAGE를 사용하여 *E. coli*에서 7개의 태그들로 융합된 hCCL2의 발현을 분석한 결과이다. 단백질 발현은 (A) 37℃ 및 (B) 18℃에서 0.7 mM IPTG로 유도되었다. M, 분자량 사이즈 마커; C, 대조군으로서 IPTG 유도 전의 총 세포 단백질; T, IPTG 유도 후의 총 세포 단백질; P, 비수용성 세포 펠렛; S, 세포 초음파 처리 후 수용성 상등액.

도 3은 *E. coli*에서 hCCL2의 분리에 대한 것이다. (A) *E. coli*로부터 His6-MBP-TEVrs-hCCL2의 분리는 SDS-PAGE에 의해 분석되었다. M, 분자량 마커; lane 1, 음성 대조군으로서 IPTG 유도 전 총 세포; lane 2, IPTG로 처리한 총 세포; lane 3, 세포 초음파 처리 후 수용성 분획; lane 4, His-trap HP column을 사용하여 분리한 His6-MBP-TEVrs-hCCL2 융합 단백질(53.3 kDa); lane 5, TEV 단백질 분해효소에 절단된 His6-MBP 태그 : His6-MBP (40.3 kDa) 및 hCCL2 (13 kDa); lane 6, 최종 정제된 hCCL2. (B 및 E) 정제된 hCCL2의 최종 순도를 확인하기 위하여, 비-환원 조건하에서 실버 염색된 10% SDS 젤 전기영동 사진이다. (C 및 F) hCCL2의 젤 여과 크로마토그램이다. (D) *E. coli*로부터 정제된 His6-MBP-FXrs-hCCL2는 SDS-PAGE에 의해 분석되었다. M, 분자량 마커; lane 1, 음성 대조군으로서 IPTG 유도 전 총 세포; lane 2, IPTG로 처리한 총 세포; lane 3, 세포 초음파 처리 후 수용성 분획; lane 4, His-trap HP column을 사용하여 분리한 His6-MBP-FXrs-hCCL2 융합 단백질(52.9 kDa); lane 5, Factor Xa 단백질 분해효소에 절단된 His6-MBP 태그 : His6-MBP (40.3 kDa) 및 hCCL2 (13 kDa); lane 6, 최종 정제된 hCCL2.

도 4는 His6-MBP-TEVrs-hCCL2 구조체를 이용하여 *E. coli*로부터 정제된 hCCL2의 MALDI-TOF MS 분석결과를 나타낸다. (A) hCCL2의 트립신 처리 펩타이드 맵(77 aa). (B) 환원 조건에서 정제된 hCCL2의 MALDI-TOF MS 결과.

도 5는 HEK293 G15 세포 및 THP-1 세포에서 정제된 hCCL2의 효과를 나타낸다. hCCR2 수용체에 있어서 정제된 hCCL2의 활성. HEK293 G15 세포는 SRE-luc 및 hCCR2를 포함하는 플라스미드로 48-웰 플레이트에서 동시-형질감염되었다. 형질감염 48시간 후, 세포들은 표시된 농도의 펩타이드로 6시간 동안 처리되었다(■ hCCL2; ▲ gCCL2). 그 후, 루시페라아제 활성을 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0025] <실시예 1> 발현백터의 제작 및 발현

[0026] hCCL2를 증폭하기 위해서, 정방향 프라이머 (5'-ggggacaagtttgtacaaaaagcaggcttcgccctgaaaatacaggttttccaacccgatgccattaatgctcc-3') 및 역방향 프라이머 (5'-ggggaccactttgtacaaaaagctgggtcttaggttttcggtgtctgcgtctgtttatc-3')가 사용되었다. 엔트리 벡터를 제작하기 위해서, 성숙한 인간 CCL2(Genebank: AAA60308.1)의 76개 아미노산을 코딩하는 DNA 서열은 *E. coli* 발현에 대한 코돈-최적화를 통해 합성되었다(Bioneer, Daejon, Korea). 코돈-최적화된 DNA 서열은 BP 재조합 클로닝 시스템을 사용하여 pDONR207 벡터로 삽입되었다(Invitrogen, CA, USA). hCCL2로부터 태그들을 분리하기 위해서, TEV 단백질 분해효소 인식 사이트(ENLYFQ↓G)는 hCCL2 아미노산 서열의 N-말단에 삽입되었다. 발현백터를 제작하기 위해서, hCCL2 유전자는 Dr. Waugh로부터 받은 pET22b-기반 목적 벡터인 pDEST-HGWA (His6-), -HXGWA (His6-Trx-), -HGGWA (His6-GST-), -HMGWA (His6-MBP-) 및 -HNGWA (His6-NusA-)로 LR 재조합 클로닝 시스템을 사용하여 재조합되었다(Invitrogen, CA, USA). 각 태그들의 N-말단에 His6를 가진 His8, Trx, GST, hPD1b'a', MBP, hPDI 및 NusA의 7개의 태그들을 사용하였고, 이는 태그 및 각 구조체를 코딩하는 서열 사이의 TEV(도 1A, 도 1C) 및 Factor Xa(도 1B) 인식 사이트에 결합시켰다. 최종 플라스미드는 *E. coli* BL21 (DE3)로 형질전환되었다.

[0027] Factor Xa 단백질 분해효소 인식 사이트(IEGR↓) 삽입과 관련하여, PCR을 위한 정방향 프라이머(5'-ggggacaagtttgtacaaaaagcaggcttcattgaggagacccaacccgatgccattaatgctcc-3')만을 다르게 사용하였고, 나머지 클로닝 단계는 TEV 인식 사이트의 제작과 유사하게 진행되었다.

[0028] 모든 형질전환체는 50ug/ml 앰피실린이 포함된 LB 배지에서 A₆₀₀이 0.4-0.6에 이르렀을 때까지 37℃로 배양하였고, 세포들은 0.7mM 이소프로필-β-D-티오갈락토시드(isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG)로 12h, 18℃에서 유도되었다. 세포들은 3,500 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 수확되었고, 사용시까지 얼려두었다.

[0029] IPTG 조절 하에서, 각 태그의 발현 수준 및 용해도는 *E. coli*에서 18℃ 및 37℃의 다른 두 온도 조건에서 확인되었다. 10% SDS-PAGE 겔에 의해 분석되었고, ImageJ 분석 프로그램에 의해 계산되었다. 여러 태그 단백질들을 가진 모든 hCCL2는 완전히 발현되었고, 18℃에서 수용성을 나타냈다(도 2 및 표 1). 분리를 위하여 MBP 구조체가 선택되었는데, 이는 His8 또는 hPD1b'a' 보다 더 높은 발현 수준과 높은 용해도를 보였고, hPDI 또는 NusA 보다 분자량이 작아서 다루기가 쉬웠기 때문이다.

표 1

[0030] 여러 태그를 가진 hCCL2의 발현 수준 및 용해도

		태그 크기 (kDa)	융합 크기 (kDa)	발현수준 (%)		용해도(%)	
				37℃	18℃	37℃	18℃
CCL2 (13 kDa)	His8	5.2	18.2	15.68	27.02	50.09	87.18
	His6-Trx-	11.8	24.8	37.29	30.07	12.57	69.43
	His6-GST-	25.7	38.7	37.31	19.99	12.55	54.12
	His6-hPDIb'a'-	35.6	48.6	38.72	40.86	10.24	65.13
	His6-MBP-	40.3	53.3	39.56	43.92	67.98	89.11
	His6-hPDI-	55.1	68.1	19.23	39.01	79.80	84.31
	His6-NusA-	54.9	67.9	33.60	48.68	19.21	87.16

[0031] <실시예 2> 재조합 CCL2의 분리 및 정제

- [0032] 1. TEV 단백질 분해효소 인식 사이트를 가진 재조합 hCCL2의 분리 및 정제
- [0033] His6-MBP-태그된 hCCL2를 발현하는 세포 펠렛을 용해 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM PMSF)에 재현탁하였고, 얼음에서 초음파 균질기(ultrasonic homogenizer; LifeScientz Biotech Co Ltd, Ningbo, China)로 20회 초음파처리하였다. 총 용해물은 세포 찌꺼기를 제거하기 위해서 15,000 rpm, 4℃에서 30분 동안 원심분리하였다. 여과된 수용성 분획은 AKTA Prime(Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, UK)을 이용하여, 완충액 A(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol)로 전평형화된 20-ml HisPrep™ FF 16/10 column (GE Healthcare)에 로딩되었다. 비-특이적 결합을 방지하기 위해서, 컬럼은 50mM 이미다졸(imidazole)이 첨가된 10 컬럼 볼륨(column volume; CV)의 완충액 A 으로 씻어냈고, 융합 단백질은 5 CV의 완충액 B(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 500 mM Imidazole)로 용출하였다.
- [0034] TEV 처리 전에, 14 kDa 컷-오프 멤브레인(Viskase Corporation, Illinois, USA)은 완충액 C(20 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 녹인 분리된 His6-MBP-hCCL2로부터 염 농도를 낮추기 위해서 사용되었다. 그 후, 융합단백질은 1:10 (w/w)의 비율로 TEV 단백질 분해효소로 처리되었다. 절단 조건은 18℃에서 14시간 동안 수행하였다.
- [0035] 절단된 hCCL2는 MBP Trap HP (GE life science, NJ, USA)에 적용되었다. 컬럼은 완충액 A로 전-평형되었다. 20 ml HisPrep™ FF 16/10 컬럼에 다시 직접 적용한 후에, MBP 컬럼으로부터 절단된 hCCL2가 포함된 분획이 수집되었다. 그 후, 절단된 hCCL2는 5 CV의 완충액 D(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 50 mM Imidazole)로 용출되었다.
- [0036] 완충액 A로 평형화된 HiLoad 16/600 Superdex 75 pre grade (GE life science, NJ, USA)는 순수 단량체 hCCL2를 수집하기 위해 최종적으로 사용되었다. 정제 과정 중의 모든 분획은 10% 트리신(tricine) SDS-PAGE 겔에 의해 분석되었다. 단백질의 농도는 표준방법으로 BSA를 이용한 Bradford method (Bradford 1976)에 의해 측정되었다.
- [0037] 2. Factor Xa 단백질 분해효소 인식 사이트를 가진 재조합 hCCL2의 분리 및 정제
- [0038] Factor Xa 인식 사이트를 포함하는 구조체는 TEV 인식 사이트를 포함하는 구조체 정제 과정과 거의 유사하게 수행되었다. 초기 20-ml HisPrep™ FF 16/10 column (GE Healthcare)에 의해 얻은 정제된 융합 단백질은 Factor Xa 절단 반응을 위해 완충액 E(20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5% Glycerol, pH 6.5)로 투석하였다. 융합 단백질은 절단을 위하여 1 (Factor Xa) : 15 (융합 단백질) (w/w) 비율의 Factor Xa로 처리되었다. 절단 조건은 상온에서 48시간 동안 처리하였다.
- [0039] 완전히 절단하기 위해서, 완충액 조건을 투석시 완충액 A로 변경하였는데, 이는 완충액 A가 추후에 MBP Trap HP (GE life science, NJ, USA)의 사용을 촉진시키기 때문이다. 그 후, 절단된 hCCL2를 포함하는 분획은 HiLoad 16/600 Superdex 75 pre grade (GE life science, NJ, USA)에 적용되었다. 최종 hCCL2는 10% 트리신(tricine) SDS-PAGE 겔에 의해 확인되었다.
- [0040] 3. 전기 영동 및 웨스턴 블랏
- [0041] 단백질은 SDS-PAGE 겔에서 분리되었다. 단백질 샘플은 100 mM DTT를 포함하는 샘플 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS (w/v), 0.04% Coomassie Brilliant Blue, 5% glycerol (v/v))에서 150℃, 10분 동안 변성되었다. 샘플은 10% 폴리아크릴아미드 겔에 로딩하였다. 단백질 밴드는 Coomassie Blue로 염색하였고, ImageJ software (Rasband, W., <http://imagej.nih.gov/ij>)를 사용하여 분석하였다.
- [0042] 정제된 hCCL2는 제조사의 지시에 따라 Silver Stain Plus® kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)에 의해 염색되고 확인하였다. 밴드가 완전히 나타난 후에, 반응은 아세트산 5% (v/v)으로 15분 동안의 처리를 통해 중단시켰다. 겔은 잔여 수분으로 씻어냈고, 글리세롤 5% (v/v) 및 소듐 아지드(sodium azide) 0.02% (w/v) 수용액에 보관하였다.
- [0043] 4. 결과

[0044] His6-MBP-TEVrs-hCCL2 융합 단백질은 His-trap HP column을 통해 분리, 정제되었고(도 3A, 라인 4), 약 75% 융합 단백질이 TEV 단백질 분해효소로 절단되었다(도 3A, 라인 5). hCCL2 및 His6-MBP 태그의 분리에 있어서 미절단 융합 형태를 제거하는 것은 꽤 어려운데, 이는 융합 단백질과 hCCL2 사이에 어떤 상호작용이 있을 가능성으로 설명된다. 두 번째 His-trap HP 컬럼 전의 MBP Trap HP를 이용한 단계는 미절단 형태 및 His6-MBP 태그 대부분을 처리하기 위한 것으로서, 분리, 정제 과정의 성공에 있어 결정적인 역할을 한다. 최종적으로 HiLoad 16/600 Superdex 75 pre grade에 적용한 후에는, 1L 배양으로부터 N-말단에 추가적인 글리신(Glycine)을 가진 1.89 mg의 순수한 13-kDa hCCL2를 얻었다(도 3A, 라인 6).

[0045] 또한, 본 발명자들은 TEVrs를 포함하는 구조체와 비교하기 위해서, His6-MBP-FactorXars-hCCL2를 분리, 정제하였는데, 이는 TEV에 의한 태그 절단 후, hCCL2 N-말단에 추가되는 하나의 Gly 잔기가 생물학적 활성에 영향을 미치는지 확인하기 위함이었다. His6-MBP-TEVrs-hCCL2의 최초 정제 과정과 유사하게, Factor Xa 인식 사이트를 가진 His6-MBP-hCCL2를 His-trap HP column을 통해 얻었다(도 3D, 라인 4). MBP를 가진 hCCL2는 추후에 Factor Xa로 절단되었고, 99%의 융합 단백질은 hCCL2 N-말단에 어떤 추가되는 잔기 없이 절단되었다(도 3D, 라인 5). Factor Xa에 의한 태그 절단 후의 정제 과정은 높은 절단율로 인해 단순화하였는데, 미절단 단백질이 거의 존재하지 않고, 절단 및 미절단 단백질 사이의 상호작용이 일어나지 않았다. 보존된 N-말단을 가진 순수 hCCL2는 HiLoad 16/600 Superdex 75 pre grade로부터 수집되었다(도 3D, 라인 6). hCCL2의 최종 순도를 확인하기 위해서, 최종 정제된 hCCL2는 실버 염색 방법에 의해 염색되었고, 다른 불순물은 없었다(도 3B 및 도 3E).

[0046] <실시예 3> MALDI-TOF MS 분석에 의한 재조합 CCL2의 확인

[0047] 트립신에 의해 샘플을 절단하기 위해서, 정제된 hCCL2 단백질(15 ug)을 10% (v/v) 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid; TCA)으로 침전시켰고, 20 mM 이오도아세트아미드(iodoacetamide; IAA, SigmaUltra, Sigma-Aldrich, MO, USA)로 1시간 동안 상온에서 처리한 후, IAA로 알킬화된 비-환원성 트립신 젤에 로딩하였다. 표적 단백질을 포함하는 젤 단편은 200 mM 암모늄 하이드로젠 카보네이트(ammonium hydrogen carbonate)-함유 완충액을 사용하여 추출한 후, 서열분석-등급 변형된 트립신(sequencing-grade modified trypsin; Promega, WI, USA)으로 37°C에서 밤새도록 처리하였다.

[0048] MALDI-TOF MS 분석은 Voyager-DE Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems Inc., CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 분석은 2,000-3,000 V, 120 nsec pulse delay time, 20,000 V acceleration voltage로 반사 모드-레이저 세기(reflector mode-laser intensity)에서 수행하였고, 데이터는 각 스펙트럼에 대해 평균화하였다. 50% 아세토니트릴에 녹인 α -시아노-4-하이드록시시나믹산(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid; α -CHCA, Sigma-Aldrich, MO, USA)을 최종 농도 0.05% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid; TFA, Fisher, PA, USA)이 포함된 탈이온화된 물에 녹여 매트릭스 용액으로 사용하였다. 0.5 ul의 샘플 및 매트릭스 혼합 용액(1:1 v/v)은 스테인레스 스틸 플레이트에 놓았고, 공기 중에서 건조시켰다. 데이터는 Voyager DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, CA, USA)을 사용하여 분석하였다.

[0049] 정제된 hCCL2를 확인하기 위해서, MALDI-TOF MS 분석을 환원된 hMCP1에서 수행하였다. 정제된 hCCL2의 MALDI-TOF MS 분석은 hCCL2와 관련된 트립신 처리 펩타이드 매스(mass)를 보였지만, 몇몇은 매우 낮은 세기를 나타냈다(도 4).

[0050] <실시예 4> CCL2 엔도톡신(endotoxin) 분석

[0051] 최종 정제된 hCCL2 내의 엔도톡신은 트리톤 X-114(Triton X-114)를 사용하여 환원되었고, 샘플은 1% Triton® X-114 (SigmaUltra, Sigma-Aldrich, MO, USA)(v/v)로 처리하였으며, 4°C에서 20분 동안 역전시켰다. 상온에서 15분 동안 반응시킨 후에, 샘플은 11,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 분획화하였고, 상등액을 수집하였다.

[0052] 잔여 엔도톡신의 양을 측정하기 위해서, 정량 시험인 Endpoint Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 시험 (Lonza, Basel, Switzerland)을 수행하였다. 10ug/ml의 샘플 또는 엔도톡신 표준액(1.0, 0.5, 0.25, 0.1 EU/ml) 50 ul을 37°C에서 미리 데워놓은 엔도톡신-프리 마이크로플레이트 웰에 분주하였다. 그 후, 50 ul의 limulus amebocyte lysate (LAL) 시약을 각 웰에 첨가하였다. 10분 동안 반응 후에, 미리 데워진 100 ul의 발

색 기질 용액을 각 웰에 첨가하였고, 37℃에서 6분 동안 반응하였다. 50 μ l의 중단 시약 (25% (v/v) 아세트산)을 반응을 끝내기 위해서 마지막으로 첨가하였다. 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 분석한 후에, 표준 용액에 의해 얻어진 표준 곡선으로 이용하여 엔도톡신 단위를 계산하였다.

[0053] 트리톤 X-114로 처리한 후에, His6-MBP-TEVrs-hCCL2 및 His6-MBP-FactorXars-hCCL2 구조체로부터 정제된 최종 hCCL2의 잔여 엔도톡신 수준은 1 μ g 당 0.10 EU 보다 낮았다. 이는 상업적으로 판매하는 재조합 단백질과 유사한 정도였다.

[0054] 또한, 본 발명자들은 His8 태그된 hCCL2를 정제하였는데, 이는 다른 구조체들보다 발현 수준이 낮았음에도 불구하고 높은 용해도를 나타냈기 때문이다. 하지만, 이는 N-말단의 태그를 완전하게 절단하기가 어려웠고, 고순도로 정제하는 데 어려움이 있었다.

[0055] <실시예 5> 정제된 hCCL2의 활성 측정

[0056] 1. 세포 형질감염 및 루시퍼라아제(luciferase) 분석

[0057] HEK293 G15 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)은 10% 우태아혈청(fetal bovine serum), 100 U/mL 페니실린 G(penicillin G) 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신(Invitrogen)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 유지되었다. 세포는 형질감염 하루 전에 웰 당 1.4×10^4 cells의 밀도로 48-웰 플레이트에 접종되었다. 75ng의 pGL3-CRE-루시퍼라아제 리포터 구조체, 75ng의 발현 플라스미드 및 2 μ l의 Effectene reagent (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)을 포함한 혼합물을 제조하였고, 제조사의 지시에 따라 각 웰에 첨가하였다. 형질감염 약 48시간 후에, 세포들은 각각의 리간드로 6시간 동안 처리되었다. 세포들은 100 μ l 용해 완충액을 첨가하여 용해시켰고, 40 μ l의 세포 추출물 내의 루시퍼라아제 활성은 Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Winooski, VT, USA)의 표준 프로토콜에 따라 루시퍼라아제 분석 시스템에서 측정되었다.

[0058] 2. 주화성(chemotaxis) 분석

[0059] THP-1 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum), 항생제(100 U/mL 페니실린 G 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신 섀페이트) 및 55 μ M 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, GIBCO Invitrogen, CA, USA)이 포함된 RPMI 1640에서 배양되었다. 주화성 분석을 위해, THP-1 세포는 주화성 배지, 0.2% BSA 및 20 mM HEPES가 포함된 RPMI 1640에 현탁되었다. 24-웰 세포 배양 삽입물은 구입하였다(SPL Life Science, Pocheon, South Korea). 여러 농도(0, 1, 10 및 100 ng/mL)의 정제된 hCCL2를 포함하는 1mL 주화성 배지를 챔버 아래쪽에 첨가하였고, 10^5 THP-1 cells을 포함하는 0.5 mL의 주화성 배지는 각 챔버 위쪽에 첨가하였으며, 5% CO₂, 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. 위쪽 및 아래쪽 챔버는 8- μ m 폴리카보네이트 멤브레인(polycarbonate membrane)에 의해 분리되었다. 멤브레인을 통해 이동한 세포들의 수는 현미경을 이용하여 계수함으로써 측정하였다.

[0060] 3. 데이터 분석

[0061] 데이터 분석은 에스자선량반응(sigmoidal dose-response)에 따른 비선형 회귀 분석(nonlinear regression)에 의해 수행되었다. 반-최대 자극(half-maximal stimulation; EC50)을 유도하는 길항제 농도는 GraphPad PRISM4 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)에 의해 계산되었다. 모든 데이터는 적어도 3번 이상의 독립적 실험을 통해 평균 $\pm$ S.E.로 나타났다. 그룹간 평균은 Student's t test 또는 Bonferroni's multiple comparison tests에 따른 일원 분산 분석에 의해 비교되었다. p < 0.05가 유의성으로 허용되었다.

[0062] 4. 결과

[0063] 정제된 hCCL2의 생물학적 활성을 시험하기 위해서, SRE-루시퍼라아제 활성 및 주화성 분석이 수행되었다. 우선, hCCL2 수용체인 CCR2가 HEK293 G15 세포로 형질감염되었다(도 5). 결과는 적어도 2번 이상의 독립적인 실험에

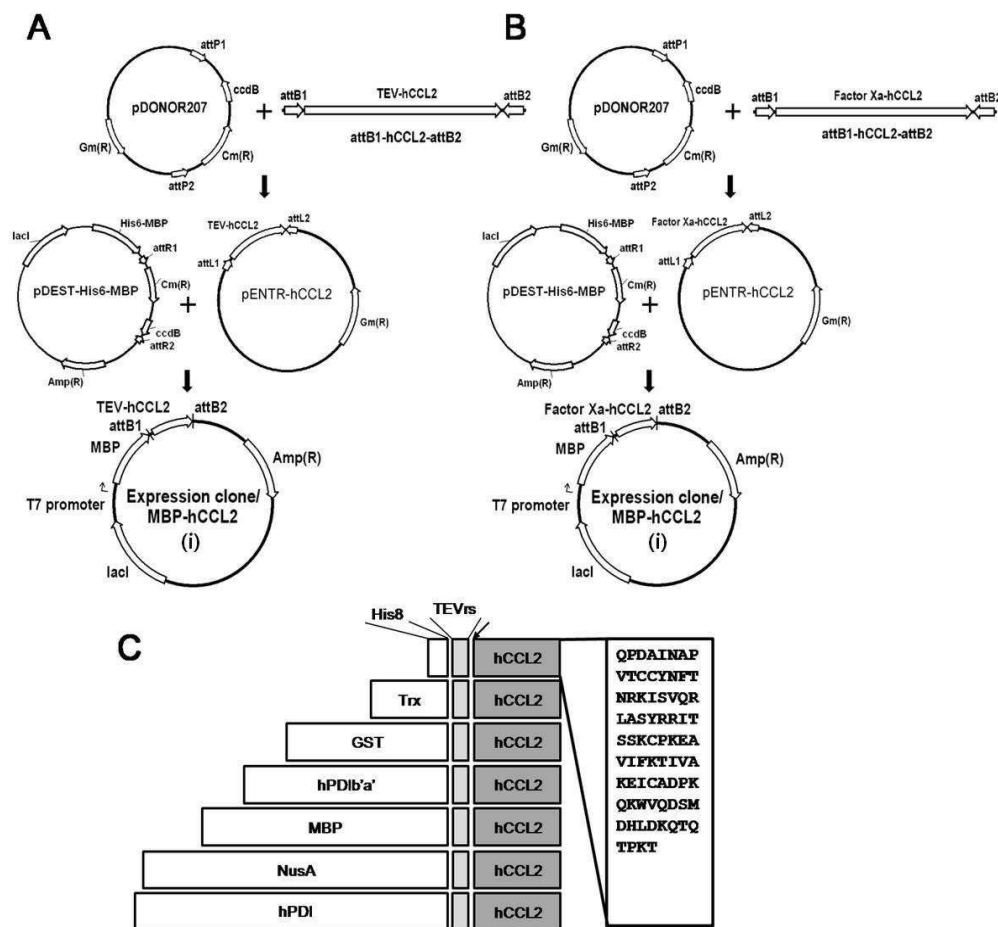
의해 얻어졌다. 도 5를 보면, 정제된 hCCL2(Factor Xa로 태그 절단된 추가 잔기 없는 CCL2)는 용량-의존적 활성을 나타냈는데, EC_{50} 은 $2.4 \pm 0.6nM$ 이었다. gCCL2(TEV에 의한 태그 절단 후, N-말단에 하나의 Gly 잔기가 추가된 CCL2)는 약한 활성을 보였다.

[0064]

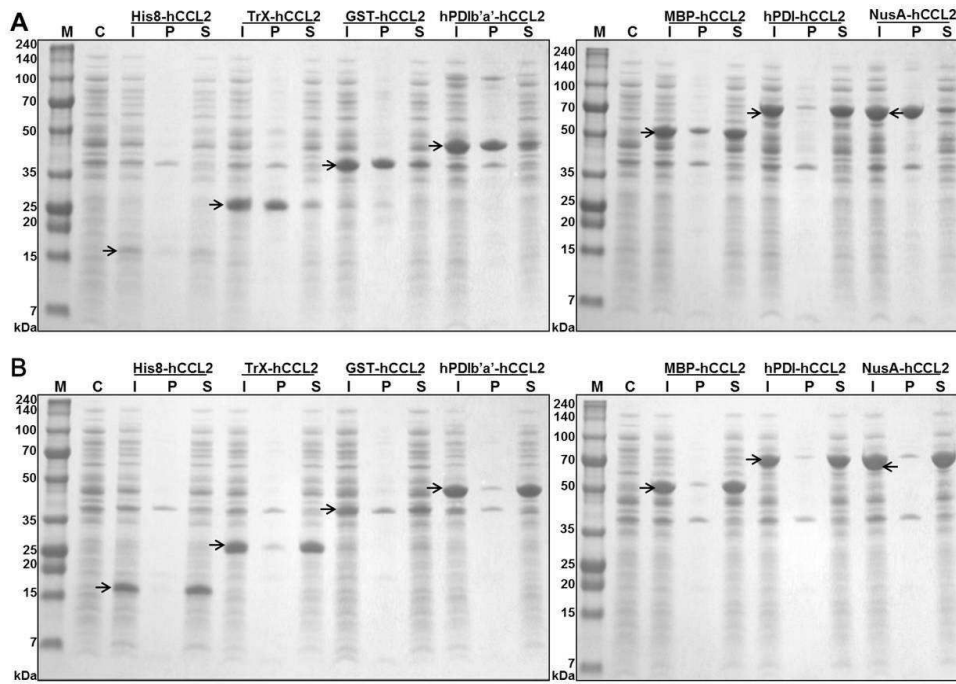
주화성 분석은 gCCL2 및 hCCL2 모두 주화성 활성을 나타냈다. 이동된 세포의 수는 각 정제된 단백질의 농도에 따라 증가하였다. 명백하게도, Factor Xa 단백질분해효소에 의해 정제된 hCCL2는 여러 단백질 농도 조건에서 모두 TEV 단백질 분해효소에 의해 정제된 gCCL2에 비해 더 많은 THP-1 세포를 멤브레인을 통해 이동시켜 끌어모았다.

도면

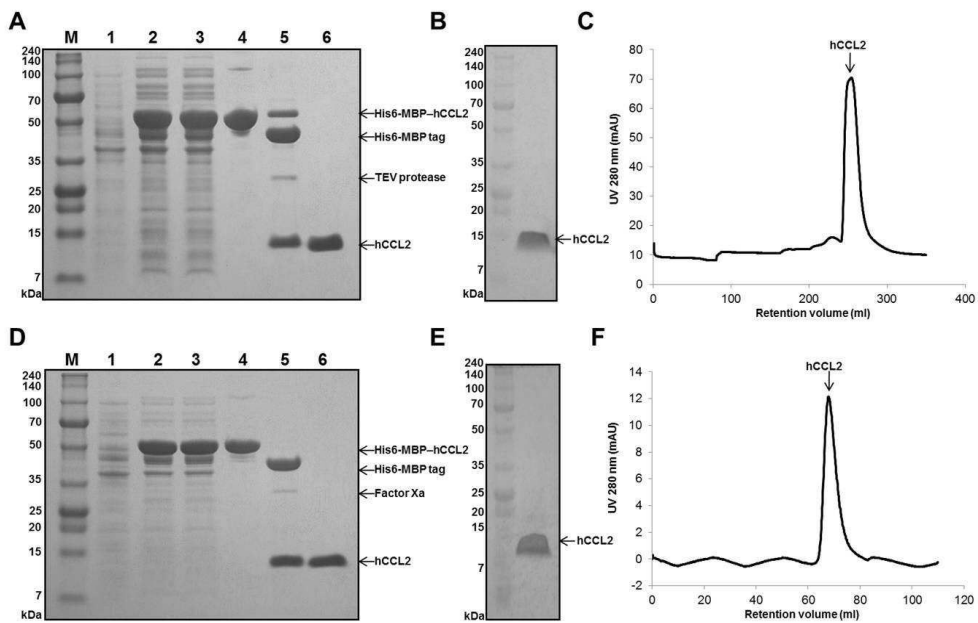
도면1



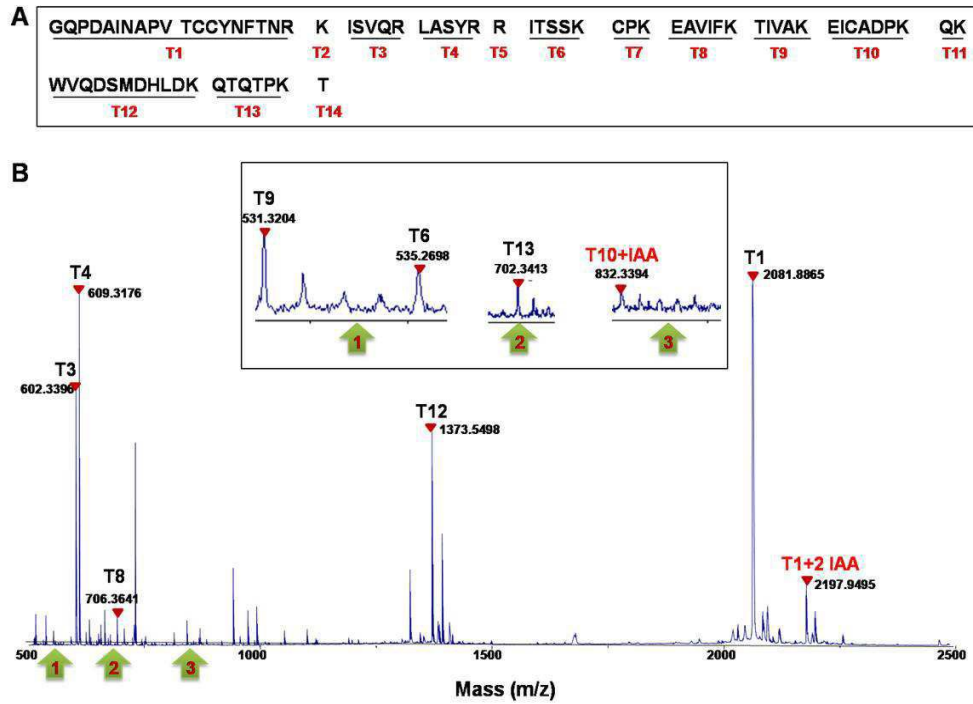
도면2



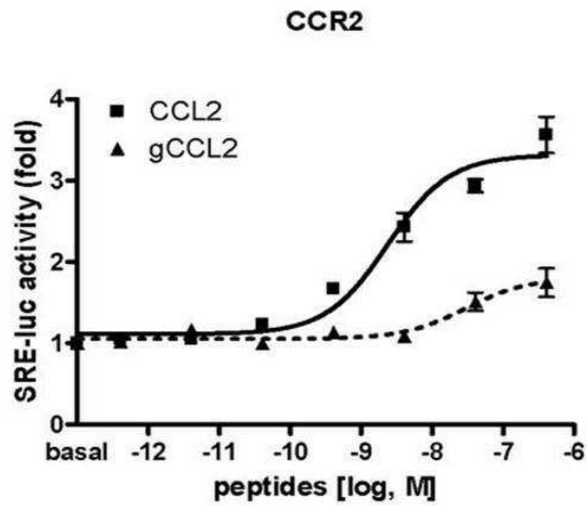
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Soluble expression and purification method of active recombinant human CCL2
- <130> ADP-2013-0237
- <160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 228

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

caacccgatg ccattaatgc tccagtcacg tgttggtaca actttacaaa ccgcaaaatt 60

agtgttcagc gcctggcgag ctatcgccgc atcacctcat ctaaatgccc gaaggaagca 120

gtaattttca aaactatagt ggccaaggaa atctgcgcgg accctaaca aaagtgggtg 180

caggactcca tggatcacct ggataaacag acgcagacac cgaaaacc 228

<210> 2

<211> 1022

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggtacaaaa ctgaagaagg taaactggta atctggatta acggcgataa aggctataac 60

ggtctcgctg aagtcggtaa gaaattcgag aaagataccg gaattaaagt caccgttgag 120

catccggata aactggaaga gaaattccca caggttgccg caactggcga tggccctgac 180

attatcttct gggcacacga ccgcttttgt ggctacgtc aatctggcct gttggctgaa 240

atcaccccg g acaaagcgtt ccaggacaag ctgtatccgt ttacctggga tgcctgacgt 300

tacaacggca agctgattgc ttacccgatc gctgttgaag cgttatcgct gatttataac 360

aaagatctgc tgccgaaccc gccaaaaacc tgggaagaga tcccggcgct ggataaagaa 420

ctgaaagcga aaggtaaag cgcgctgatg ttcaacctgc aagaaccgta cttcacctgg 480

ccgctgattg ctgctgacgg gggttatgct ttcaagtatg aaaacggcaa gtacgacatt 540

aaagacgtgg gcgtggataa cgctggcgcg aaagcgggtc tgaccttcct ggttgacctg 600

attaaaaaca aacacatgaa tgcagacacc gattactcca tcgcagaagc tgcctttaat 660

aaaggcgaaa cagcgatgac catcaacggc ccgtgggcat ggtccaacat cgacaccagc 720

aaagtgaatt atggtgtaac ggtactgccg accttcaagg gtcaaccatc caaacgttc 780

gttggcgctg tgagcgcagg tattaacgcc gccagtcga acaaagagct ggcaaaagag 840

ttcctcgaaa actatctgct gactgatgaa ggtctggaag cggttaataa agacaaaccg 900

ctgggtgccg tagcgctgaa gtcttacgag gaagagttgg cgaaagatcc acgtattgcc 960

gccacatgg aaaacgcca gaaagtgaa atcatgccga acatcccgca gatgtccgct 1020

tt	1022
<210> 3	
<211> 1506	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
ggtaccaaca aagaaat ttt ggctgtagtt gaagccgtat ccaatgaaaa ggcgctacct	60
cgcgagaaga ttttcgaagc attggaaagc gcgctggcga cagcaacaaa gaaaaaatat	120
gaacaagaga tcgacgtccg cgtacagatc gatcgcaaaa gcggtgattt tgacactttc	180
cgtcgctggg tagttgttga tgaagtcacc cagccgacca aggaaatcac cttgaagcc	240
gcacgttatg aagatgaaag cctgaacctg ggcgattacg ttgaagatca gattgagtct	300
gttacctttg accgtatcac taccagacg gcaaacagg ttatcgtgca gaaagtgcgt	360
gaagccgaac gtgcgatggg ggttgatcag ttccgtgaac acgaaggatga aatcatcacc	420
ggcgtggatga aaaaagtaaa ccgcgacaac atctctctgg atctgggcaa caacgtgaa	480
gccgtgatcc tgcggaaga tatgctgccg cgtgaaaact tccgccctgg cgaccgcgtt	540
cgtggcgtgc tctattccgt tcgcccggaa gcgcgtggcg cgcaactgtt cgtcactcgt	600
tccaagccgg aaatgctgat cgaactgttc cgtattgaag tgccagaaat cggcgaagaa	660
gtgattgaaa ttaaagcagc ggctcgcat ccgggttctc gtgcgaaaat cgcggtgaaa	720
accaacgata aacgtatcga tccggtaggt gcttgcttag gtatgcgtgg cgcgcgtgtt	780
caggcgggtg ctactgaact ggggtggcgag cgtatcgata tcgtcctgtg ggatgataac	840
ccggcgcagt tcgtgattaa cgcaatggca ccggcagacg ttgcttctat cgtgggtgat	900
gaagataaac acaccatgga catcgccgtt gaagccggtg atctggcgca ggcgattggc	960
cgtaacggtc agaacgtcgc tctggcttcg caactgagcg gttgggaact caacgtgatg	1020
accgttgacg acctgcaagc taagcatcag gcggaagcgc acgcagcgat cgacaccttc	1080
accaaatac tcgacatcga cgaagacttc gcgactgttc tggtagaaga aggcttctcg	1140
acgttggaag aattggccta tgtgccgatg aaagagctgt tggaaatcga aggccttgat	1200
gagccgaccg ttgaagcact gcgcgagcgt gctaaaaatg cactggccac cattgcacag	1260
gcccaggaag aaagcctcgg tgataacaaa ccggctgacg atctgctgaa ccttgaaggg	1320
gtagatcgtg atttggcatt caaactggcc gcccgtagcg tttgtacgt ggaagatctc	1380
gccgaacagg gcattgatga tctggctgat atcgaagggt tgaccgacga aaaagccgga	1440
gcactgatta tggtgccccg taatatattgc tggttcggtg acgaagcggg taccggatct	1500

tacatc	1506
<210> 4	
<211> 1461	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
gacgcaccgg aagaagagga tcatgtcctg gttctgcgca aaagcaactt cgcggaagca	60
ctggccgcac ataaatatct gctggtggaa ttttatgtc cttggtgcgg tcattgcaaa	120
gccttgcccc cggagtacgc caaagccgca ggtaaactga aagctgaagg tagcgaaatc	180
cgcttgccaa aggttgatgc tacggaagag agtgacctgg cgcagcagta tgggtgccgc	240
ggctatccta caattaaatt cttccgtaac ggtgataccg catctccaaa agaataatcc	300
gctggtcgcg aggcggacga tattgttaac tggctgaaga aacgcactgg ccctgccgca	360
accaccctgc ctgatggcgc tgctgccgaa agcctggctg aaagtagcga agttgccgtc	420
attggtttct ttaaggatgt agaatctgac agtgccaaac agtttctgca agcggcagag	480
gctatcgatg acatcccgtt cggcatcacc tctaacagtg acgtattcag taaataccaa	540
ctggataaag acggcgttgt gctgttcaag aaatttgatg aaggtcgcaa caactttgag	600
ggtgaggatg ccaaggagaa cctgctggat ttatttaagc acaaccaact gccgctggtt	660
attgaattta cagaacaac ggcgccgaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatatc	720
ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatgta aactgagtaa ttttaaaacc	780
gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac	840
aatcagcgta tcctggagtt ctttggctcg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg	900
attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa	960
cgtatcaccg aattttgtca tcgtttctcg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc	1020
caggaaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag ttctggtggg gaagaatttt	1080
gaagatgtgg ccttcgatga gaagaagaat gtgtttgtgg agttctacgc cccgtggtgt	1140
gggcactgta aacagctggc gccgatctgg gacaaactgg gcgaaacgta taaagatcac	1200
gaaaaatattg tgatcgcgaa aatggattct acccggaatg aagtagaagc ggtaaaagta	1260
cactcttttc cgacgctgaa attctttcca gcgagcgcg atcgtactgt cattgattat	1320
aatggcgaac gtactctgga cggttttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc	1380
gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag	1440
gatgacgacc agaaagcgggt c	1461