

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0096889 (43) 공개일자 2016년08월17일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/74 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01) (52) CPC특허분류 C12N 15/74 (2013.01) C12Q 1/025 (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0018513 (22) 출원일자 2015년02월06일 심사청구일자 2015년02월06일 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교) (72) 발명자 최철희 대구광역시 동구 국제보상로 861 현대하이페리온 아파트 101동 206호 오만환 서울특별시 영등포구 도신로47가길 4-1 192-55호 18동 3반 이재철 대구광역시 달서구 조암남로32길 13 월배쌍용예가 아파트 102동 1806호 (74) 대리인 특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 7 항

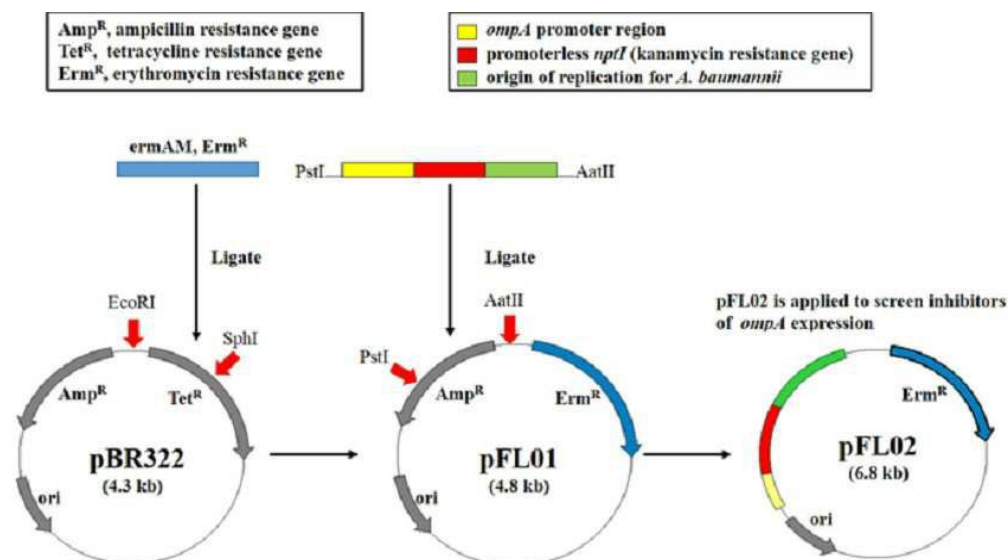
(54) 발명의 명칭 세균 외막 단백질 A의 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드

(57) 요약

본 발명은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)의 ompA의 프로모터 영역; 리포터 유전자로서, 프로모터 영역이 없는 항생제 저항성 유전자; 및 아시네토박터 바우마니에 대한 복제개시점 부위;가 작동가능하게 연결된 융합유전자를 포함하는 ompA 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드, 이를 이용하여 형질전환된 아시네토박터 바우마니 균주 및 이들을 이용한 ompA 발현 저해물질 탐색방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명은 항생제가 첨가된 배지에서 균의 성장을 측정함으로써 고속대량으로 손쉽게 ompA의 발현 저해를 탐색할 수 있으므로, 화합물 라이브러리를 이용한 ompA 발현 저해물질의 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2800/101 (2013.01)

C12R 1/01 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C0257

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건복지부

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 병원성인자를 표적으로 한 다제내성 *Acinetobacter baumannii* 균 감염차단 물질 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경북대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)의 외막 단백질 A(ompA)의 프로모터 영역;

리포터 유전자로서, 프로모터 영역이 없는 항생제 저항성 유전자; 및 아시네토박터 바우마니에 대한 복제개시점 부위;가 작동가능하게 연결된 융합유전자를 포함하는, ompA 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항생제 저항성 유전자는 카나마이신 저항성 유전자인 것을 특징으로 하는 재조합 플라스미드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 융합유전자는 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 플라스미드.

청구항 4

제 1항에 있어서, 아시네토박터 바우마니를 선별하기 위한 특이적인 항생제 마커로서 상기 리포터 유전자로 사용된 항생제 저항성 유전자와 다른 종류의 항생제 저항성 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 플라스미드.

청구항 5

제 1항에 있어서, 도 1에 개시된 개열지도를 갖는 pFL02 벡터인 것을 특징으로 하는 재조합 플라스미드.

청구항 6

제 1항에 따른 재조합 플라스미드로 형질전환된 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주.

청구항 7

하기 단계들을 포함하는 아시네토박터 바우마니의 ompA 발현 저해물질의 탐색 방법:

- 제1항에 따른 재조합 플라스미드로 형질전환된 아시네토박터 바우마니 균주를 화합물 라이브러리로부터 선택된 후보물질 및 항생제를 포함하는 배양매지에서 배양시키는 단계; 및
- 배양 후 상기 균주가 성장하지 못하는 경우 매지에 포함된 후보물질을 ompA 발현 저해물질로 판단하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세균외막 단백질 A(ompA)의 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드에 관한 것으로, 더욱 구체적으

로는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)의 ompA의 프로모터 영역; 리포터 유전자로서, 프로모터 영역이 없는 항생제 저항성 유전자; 및 아시네토박터 바우마니에 대한 복제개시점 부위;가 작동가능하게 연결된 융합유전자를 포함하는 ompA 발현 저해물질 탐색용 제조합 플라스미드, 이를 이용하여 형질전환된 아시네토박터 바우마니 균주 및 이들을 이용한 ompA 발현 저해물질 탐색방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 다양한 병원균에서 병원성 인자의 저해물질에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 대표적인 예로서 병원균의 독성인자 발현 조절 시스템인 퀴럼센싱(quorum sensing) 저해물질을 탐색하는 방법인 루시페라아제 분석(luciferase assay) 및 베타갈락토시다아제 분석(beta galactosidase assay) 방법이 널리 사용이 되고 있다 (Kim SW et al. 2009 *FEMS Microbiol Lett.* 301:224-31; Choi CH et al. 2008 *BMC Microbiol.* 8:216; Jin JS et al. 2011 *PLoS One.* 6:e17027; Choi CH et al. 2008 *Cell Microbiol.* 10:309-19). 그러나 이러한 방법들은 고속대량 스크리닝에 적용되어 세균의 독성 저해물질을 스크리닝 하는데 있어서 많은 어려움을 야기시키고 있다. 특히, 클로닝 과정에 있어서 항생제 마커 사용이 제한되는 다제내성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균에 대해서는 리포터 플라스미드(reporter plasmid) 및 리포터 균주(reporter strain) 개발에 관한 연구는 많은 어려움이 있다. 그 결과 지금까지는 다제내성 *A. baumannii*에 대한 주요 병원성 인자로서 ompA의 역할 규명에 관한 연구만 이루어졌을 뿐, ompA의 발현 저해물질 발굴에 관한 방법은 전무한 실정이다.

[0003] 이에 본 발명자들은 타겟 유전자로서 ompA의 프로모터(promoter) 부위와 프로모터 부위가 없는 항생제 저항성 유전자를 이용하여 빠르고 경제적으로 ompA 저해물질을 탐색할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은, 별도의 추가적인 화합물, 기질 등의 첨가 없이 간편하게 세균의 성장을 측정함으로써 타겟 병원성 인자의 발현 조절을 확인할 수 있는 ompA 발현 저해물질 탐색용 제조합 플라스미드를 제공하는데 있다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은, 상기 제조합 플라스미드로 형질전환된 아시네토박터 바우마니 균주를 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 제조합 플라스미드를 이용한 ompA 발현 저해물질 탐색방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)의 외막 단백질 A(ompA)의 프로모터 영역; 리포터 유전자로서, 프로모터 영역이 없는 항생제 저항성 유전자; 및 아시네토박터 바우마니에 대한 복제개시점 부위가 작동가능하게 연결된 융합유전자를 포함하는, ompA 발현 저해물질 탐색용 제조합 플라스미드를 제공한다.

[0008] 본 발명에서, 상기 ompA 단백질은 외막의 구조단백질인 omp 단백질(Outer Membrane Protein) 패밀리의 하나로서 작은 분자들(small molecule)의 통로 역할을 수행함과 동시에 *A. baumannii* 균 감염 시 숙주세포 부착과 침입에 관여하고 보체활성의 대체경로(alternative pathway)를 저해하여 균의 생존에 필수적인 단백질로 알려져 있다 (Kim SW et al. 2009 *FEMS Microbiol Lett.* 301:224-31; Choi CH et al. 2008 *BMC Microbiol.* 8:216). 또한 외막소포체(outer membrane vesicle)를 통해 균체 외로 분비된 OmpA는 숙주세포로 전달되어 세포소기관에 타겟팅되어 세포사를 유도하는 등 *A. baumannii*의 중요한 병원성 인자로 알려져 있다 (Jin JS et al. 2011 *PLoS One.* 6:e17027; Choi CH et al. 2008 *Cell Microbiol.* 10:309-19). 따라서 *A. baumannii*의 ompA 발현 저해물질은 *A. baumannii* 균의 생존과 ompA에 의해 매개되는 각종 숙주 병리기전을 차단할 수 있는 물질이므로, 본 발명의 ompA 발현 저해물질의 탐색 기술은 *A. baumannii*의 감염을 예방하거나 치료하기 위한 목적뿐만 아니라, *A. baumannii*의 감염 기전을 연구하기 위한 수단으로서 매우 유용한 가치가 있다고 판단된다.

- [0009] 본 발명에서 용어, “프로모터”는 이에 작동 가능하게 연결된 유전자의 전사를 허용하고 조절하는 폴리뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 프로모터는 RNA 중합효소를 결합시키기 위한 인식 서열 및 전사 개시 부위(전사 개시 부위)를 함유한다. 특정 세포 유형 또는 숙주 세포 내에서 타겟 유전자를 발현시키기 위해서는 적합한 기능성 프로모터를 선택해야 한다. 이들은 예를 들면, GenBank와 같은 데이터뱅크에 기탁되어 있으며, 시판되거나 개개의 공급원으로부터 폴리뉴클레오티드 서열 내에 클로닝된 별개의 요소 또는 요소들로서 입수할 수 있다.
- [0010] 본 발명에 있어서, 상기 “ompA 프로모터 영역”은 타겟 유전자인 ompA의 유전정보를 지니고 있는 DNA 염기서열 앞부분에 위치하여 유전자의 전사를 조절하는 부위로서, ompA 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자는 ompA 프로모터 영역에 의해 발현이 조절되게 된다. 이러한 ompA 프로모터 영역은 *A. baumannii*의 게노믹(genomic) DNA를 주형으로 하여 ompA 프로모터 영역에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 PCR 반응을 통해 얻을 수 있다. 구체적으로 본 명세서에 첨부된 서열목록의 서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머쌍을 이용하여 ompA 프로모터 영역을 용이하게 증폭할 수 있다.
- [0011] 본 발명에 있어서, 상기 “프로모터 영역이 없는 항생제 저항성 유전자”는 공지의 항생제 저항성 유전자가 그 발현을 조절하는 프로모터 없이 재조합 플라스미드에 도입되는 것을 의미한다. 구체적으로 재조합 플라스미드에 도입되는 항생제 저항성 유전자는 ORF(open reading frame) 영역일 수 있다. 상기 ompA 프로모터와 연결된 항생제 저항성 유전자는 ompA 프로모터에 의해 발현이 조절되어 항생제 저항성 유전자의 발현 정도를 쉽게 측정할 수 있기 때문에 본 발명의 재조합 플라스미드에서 리포터 유전자(reporter gene)의 역할을 한다.
- [0012] 본 발명에서 용어, “항생제 저항성 유전자”는 항생제에 대하여 저항성을 가지는 유전자로서, 이것을 가지고 있는 세균은 해당 항생제를 처리한 환경에서도 생존하므로, 본 발명에서 ompA 프로모터에 의해서 발현이 조절되는 항생제 저항성 유전자를 포함하는 플라스미드를 얻는 과정에 선별 마커(또는 리포터 마커)로 사용된다. 구체적인 예로는, 암피실린(ampicilin), 테트라사이클린(tetracyclin), 카나마이신(kanamycin), 클로람페니콜(chloroamphenicol), 스트렙토마이신(streptomycin), 또는 네오마이신(neomycin)에 대한 저항성 유전자 등을 사용할 수 있고, 바람직하게는 카나마이신 저항성 유전자일 수 있다.
- [0013] 본 발명에서 용어, “작동 가능하게 연결된(operably linked)”이란 일반적으로 기능을 수행하도록 유전자의 발현조절 서열과 타겟 단백질을 코딩하는 염기서열이 작동 가능하게 연결되어 코딩하는 염기서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 재조합 플라스미드에 있어서, 상기 “융합유전자”는 *A. baumannii*의 ompA 프로모터 영역; 프로모터가 없는 항생제 저항성 유전자; 및 복제개시점 부위가 순차적으로 연결된 DNA 절편을 의미한다. 하나의 바람직한 실시예로서, 상기 융합유전자는 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 DNA 절편일 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 플라스미드는 추가적으로 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii*)를 선별하기 위한 특이적인 항생제 마커로서 상기 리포터 유전자로 사용된 항생제 저항성 유전자와 다른 종류의 항생제 저항성 유전자를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 리포터 유전자로 카나마이신(kanamycin) 저항성 유전자를 사용하면, 이와 다른 종류로서 에리스로마이신(erythromycin) 저항성 유전자를 *A. baumannii* 선별용 항생제 마커로 사용하는 것이 바람직하다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 플라스미드로 형질전환된 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주를 제공한다.
- [0017] 본 발명에서, 아시네토박터 바우마니 세포 내로 본 발명의 플라스미드를 도입하는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 일렉트로포레이션(electroporation), 칼슘 포스페이트 공동-침전(calcium phosphate co-precipitation), 레트로바이러스 감염(retroviral infection), 미세주입법(microinjection), DEAE-덱스트란(DEAE-dextran), 양이온 리포솜(cationic liposome) 법 등이 있고, 이로 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 재조합 플라스미드로 형질전환된 리포터 균주(reporter strain)는 카나마이신 항생제 저항성 유전자(nptI)가 ompA의 프로모터에 의해 조절이 되기 때문에 카나마이신 존재 환경에서 성장이 가능한 반면, 재조합 플라스미드를 갖고 있지 않은 균주는 성장하지 못했다. 이는 재조합 플라스미드 내에 존재하는 카나마이신 저항성 유전자가 *A. baumannii*의 ompA 유전자 발현조절 시스템에 의해 조절됨을 의미한다.

따라서 본 발명에서 구축된 리포터 균주는 ompA의 발현 저해물질을 고속대량으로 탐색하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) 상기 재조합 플라스미드로 형질전환된 아시네토박터 바우마니 균주를 화합물 라이브러리로부터 선택된 후보물질 및 항생제를 포함하는 배양배지에서 배양시키는 단계; 및 b) 배양 후 상기 균주가 성장하지 못하는 경우 배지에 포함된 후보물질을 ompA 발현 저해물질로 판단하는 단계를 포함하는 아시네토박터 바우마니의 ompA 발현 저해물질의 탐색 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 탐색 방법에서, 상기 항생제는 재조합 플라스미드에 도입된 항생제 저항성 유전자가 저항성을 나타내는 항생제이다. 따라서 화합물 라이브러리로부터 선택된 후보물질이 ompA 발현 저해물질이라면 ompA 프로모터에 의해 발현이 조절되는 항생제 저항성 유전자가 발현되지 못하기 때문에 성장할 수 없게 되는 것이다. 따라서 본 발명의 탐색 방법은 간편하게 해당 균주의 성장을 측정하여 ompA의 발현 저해물질을 탐색할 수 있는 장점이 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따르면, 타겟 유전자(ompA)의 프로모터 부위와 프로모터가 없는 항생제 저항성 유전자를 이용하여 빠르고 경제적으로 ompA 저해물질을 탐색할 수 있는 벡터시스템을 개발하였다. 본 발명에 적용된 프로모터 부위가 없는 항생제 저항성 유전자는 *A. baumannii* ompA의 프로모터에 의해서 발현이 조절되므로, 저해물질 탐색과정에서 효소반응을 위한 화합물이나 기질을 첨가해줄 필요가 없다. 따라서 본 발명은 항생제가 첨가된 배지에서 균의 성장을 측정함으로써 고속대량으로 손쉽게 ompA의 발현 저해를 탐색할 수 있으므로, 화합물 라이브러리를 이용한 ompA 발현 저해물질의 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명에 따른 재조합 플라스미드(pFL02)의 개발 모식도이다.
 도 2는 본 발명에 따른 재조합 플라스미드(pFL02)를 제한효소 처리 및 DNA 시퀀싱을 통해 도입 유전자들을 확인한 결과이다.
 도 3은 본 발명에 따른 재조합 플라스미드(pFL02)로 형질전환된 균주가 카나마이신 항생제 첨가된 배지에서 성장할 수 있음을 확인한 결과이다.
 도 4는 도 1에 개시되어 있는 융합유전자의 각 영역을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 실시예 1. 항생제 저항성 유전자가 도입된 플라스미드의 제조

[0025] 리포터 플라스미드의 구축을 위해서는 리포터 유전자로 사용되는 nptI (카나마이신 저항성 유전자) 이외의 항생제 마커가 반드시 필요하다. 유전자 클로닝 과정에 널리 사용되는 pBR322 벡터는 암피실린(ampicillin)과 테트라사이클린(tetracycline) 저항성 유전자를 갖고 있다. 그러나 다제내성 *A. baumannii*는 암피실린에 대한 내성을 나타내며 테트라사이클린의 경우는 세포내 독성이 강한 항생제이기 때문에 클로닝 과정에서 심각한 문제를 발생시킨다.

[0026] 따라서, pBR322의 테트라사이클린 저항성 유전자 부위에 *A. baumannii*를 위한 특이적인 항생제 마커로 에리스로마이신(erythromycin) 저항성 유전자(ermAM)를 삽입하여 새로운 클로닝 벡터 pFL01을 구축하였다.

[0027] 구체적인 제조과정은 다음과 같다.

[0028] 에리스로마이신 저항성 유전자인 ermAM는 5' -TCG TGT TCG TGC TGA CTT GC-3' 정방향(forward) 프라이머(E03)와 5' -GAC CTC TTT AGC TCC TTG GAA GC-3' 역방향(reverse) 프라이머(E04), 및 ermAM 유전자를 내재하고 있는 pIL252 플라스미드(ori_{pAM}β1; for amplification of ermAM; Erm^r; Simon D, et al. 1988. *Biochimie* 70:559566)를 주형으로 하여 PCR 산물이 평할말단이 되게 해주는 PrimerSTAR GXL Taq DNA 중합효소 (다카라)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. 증폭된 ermAM DNA 절편(1,040 bp)은 겔 추출키트(gel extraction kit)를 사용하여 정제하였다.

[0029] 백본 플라스미드인 pBR322 (Cloning vector; Amp^rTet^r; Bolivar F, et al. 1977. *Gene* 2:95113)를 제한효소 *EcoRI*과 *SphI*으로 처리한 후 DNA 중합효소 I (Large [Klenow] Fragment)를 이용하여 벡터(vector)의 양 말단을 평활화하였다. 상기 pBR322 벡터에 PCR 반응을 통하여 증폭된 ermAM 유전자를 라이게이션(ligation)하여 클로닝하였다. 이렇게 제조된 벡터를 도 1과 같이 pFL01이라 명명하였다.

[0030] 실시예 2. ompA 저해물질 탐색용 리포터 플라스미드의 제조

[0031] *A. baumannii*의 ompA 프로모터에 의해 항생제 저항성 유전자 발현이 조절되는 리포터 플라스미드(reporter plasmid) 시스템을 구축하였다. 전체적인 실험 개요는 3쌍의 프라이머 세트(005/006, K03/K04, R01/R02)와 두 단계의 PCR 실험을 통하여 *A. baumannii* ompA의 프로모터 부위, nptI (kanamycin 항생제 저항성 유전자)의 ORF(open reading frame) 및 *A. baumannii* 내에서 플라스미드의 복제를 야기시키는 복제개시점 부위를 하나의 DNA 절편으로 순차적으로 연결시키는 것이다. 순차적으로 연결된 DNA 절편은 상기 실시예 1에서 제조된 pFL01 벡터에 클로닝함으로써 ompA의 프로모터에 의해 항생제 저항성 유전자의 발현이 조절되는 리포터 플라스미드를 구축하는 것이다. 실험에 사용된 프라이머들의 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

프라이머	서열 (5' → 3')	서열번호
E03	TCGTGTTTCGTGCTGACTTGC	1
E04	GACCTCTTTAGCTCCTTGAAGC	2
005	GGGCTGCAGGTATAAATAGAGCAATTTTATGTTTCTGAC	3
006	ACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAGTAGCAAGTGAATACGACTCAAT	4
K03	ATGAGCCATATCAACGGGAA	5
K04	ATAATCATAGATATTCTACGATCAACTTTTGCTTTGCCACGG	6
R01	GATCGTAGAAATATCTATGATTATCTTGAAG	7
R02	GGGACGTCGGATTTTAACATTTTGC GTTGTTTC	8

[0033] 구체적인 제조과정은 다음과 같다.

[0034] 첫 번째 PCR 반응은, *A. baumannii*의 염색체상에서 ompA 유전자의 프로모터 부위를 증폭할 수 있는 프라이머 세트(005/006); nptI의 ORF를 증폭할 수 있는 프라이머 세트(K03/K04); 그리고 *A. baumannii* 내에서 플라스미드의 복제를 야기시키는 복제개시점 부위를 증폭할 수 있는 프라이머 세트(R01/R02)를 이용하고, 각각의 주형으로서 *A. baumannii*의 genomic DNA; pUC4K 플라스미드(pUC4 with nptI, for amplification of nptI; Amp^r, Km^r; Pharmacia); 및 pWH1266 플라스미드(Source of a replication origin and tet^r for *A. baumannii*, *E. coli*-*Acinetobacter* shuttle vector; Amp^r, Tet^r; Hunger M, et al. 1990. *Gene* 87:4551)를 사용하였다. 사용된 모든 프라이머들의 Tm 값은 54-56℃가 되도록 디자인되었다. 특히 ompA의 프로모터와 nptI의 ORF를 증폭할 때 사용되는 각각 역방향 프라이머(006, K04)의 5' 말단 부위에는 nptI와 복제개시점 부위에 각각 상동성이 있는 25개의 뉴클레오티드를 추가하여 제작하였다. 이는 Overlap extension PCR을 통하여 ompA의 프로모터 부위, nptI의 ORF, 플라스미드 복제개시점 부위를 순차적으로 결합시키기 위한 것이다. 또한 증폭된 PCR 산물을 손쉽게 pFL01 벡터에 클로닝하기 위해, ompA 프로모터 부위를 증폭하는 데 사용되는 정방향 프라이머(005)의 5' 말단 부위에는 제한효소 *PstI*이 인지하는 염기서열 CTGCAG을 추가하였으며, 복제개시점 부위를 증폭하는 데 사용되는 역방향 프라이머(R02)의 5' 말단 부위에는 제한효소 *AatII*가 인지하는 염기서열 GACGTC을 추가하였다. PCR을

통하여 증폭된 각각의 DNA는 겔 추출키트를 사용하여 DNA를 정제하였다 (도 2의 lane 2, 3, 4).

[0035] 상기 정제된 각각의 DNA를 두 번째 PCR 단계인 overlap extension PCR 반응에서 주형 DNA로 사용하였다. PCR 반응에 사용된 DNA 농도는 각각 100 ng이었다. 증폭된 3개의 서로 다른 DNA 절편(ompA 프로모터, nptI의 ORF, 복제개시점 부위)을 하나의 평할 말단 DNA로 순차적으로 결합시키기 위해, 첫 번째 PCR 반응에서 사용된 005와 R02 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 실시하였다. 두 번째 단계의 PCR 반응에서 증폭된 DNA 절편은 겔 추출키트를 사용하여 DNA를 정제하였다 (도 2의 lane 5).

[0036] 정제된 DNA 절편은 제한효소 *Pst*I과 *Aat*II를 처리한 후 동일한 제한효소로 처리된 pFL01 플라스미드에 라이게이션하여 클로닝하였다. 새롭게 구축된 벡터는 제한효소 처리(도 2의 lane 6) 및 DNA 시퀀싱을 통하여 확인하였다. 이렇게 구축된 벡터를 pFL02라고 명명하였다.

[0037] 실시예 3. ompA 저해물질 탐색용 리포터 균주의 제조

[0038] 상기 실시예 2에서 제조된 재조합 플라스미드 pFL02는 helper plasmid pRK2013(helper plasmid for conjugation; Km^r; Figurski DH, et al. 1979. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1648-1652)을 갖고 있는 균을 이용하여 *A. baumannii* 세포내로 형질전환 시켰다. 이러한 형질전환은 helper plasmid 중 하나인 pRK2013을 사용하여 스스로 전이되지 못하는 플라스미드 pFL02를 *A. baumannii* 세포내로 도입시키는 방법이다. 형질전환된 *A. baumannii*는 암피실린 (100 µg/ml)과 에리스로마이신 (30 µg/ml) 항생제가 첨가된 LB(Luria Bertani) 고체 배지에서 선별하였다.

[0039] 구축된 리포터 균주(reporter strain)가 갖고 있는 카나마이신 항생제 저항성 유전자(nptI)가 ompA의 프로모터에 의해 조절이 되는지 확인하였다.

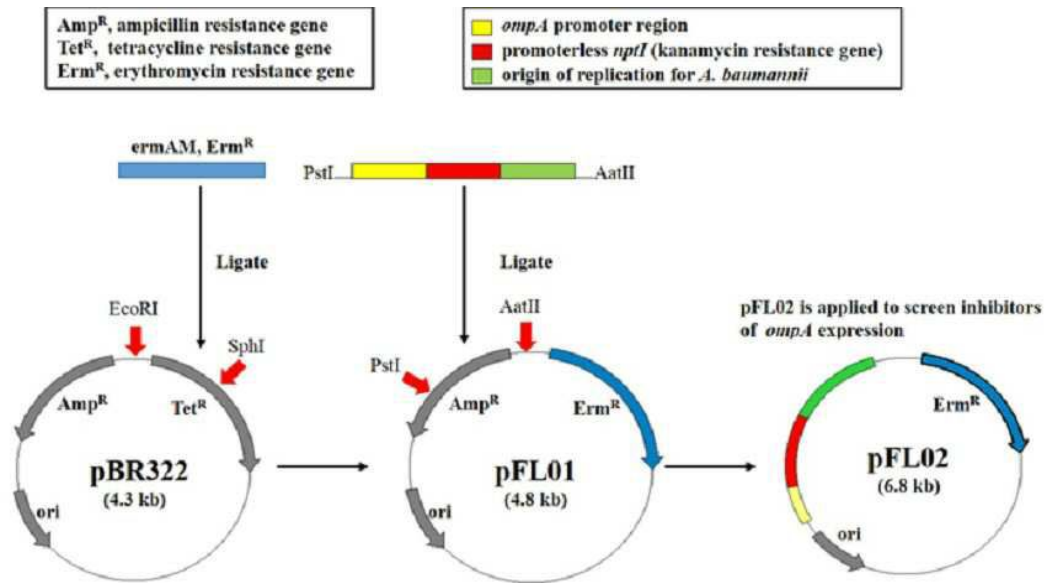
[0040] 구체적으로, 본 발명에 따른 pFL02 플라스미드를 갖고 있는 *A. baumannii* 균과 pFL02 플라스미드를 가지고 있지 않은 *A. baumannii* 균을 LB broth와 에리스로마이신 (30 µg/ml)이 첨가된 LB broth에 각각 접종하여 37°C에서 12시간 동안 진탕배양 하였다. 각각 진탕배양된 균을 LB broth을 이용하여 600 nm에서 흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 희석하였다. 희석된 각각의 균(10 µl)을 카나마이신 (50 µg/ml)이 첨가된 LB 고체 배지에 도말하여 균의 성장을 확인하였다 (도 3).

[0041] 도 3에 나타난 바와 같이, pFL02를 갖고 있지 않은 *A. baumannii*는 카나마이신이 첨가된 배지에서 성장하지 못했다. 그러나 pFL02를 내포하고 있는 *A. baumannii* 균의 경우 카나마이신이 첨가된 배지에서 성장하였다. 이러한 결과는 pFL02 내에 존재하는 카나마이신 저항성 유전자(nptI)가 *A. baumannii*의 ompA 유전자 발현조절시스템에 의하여 조절된다는 것을 의미한다. 따라서 본 발명에서 구축된 리포터 균주는 ompA의 발현 저해 물질을 고속 대량으로 탐색하는데 유용하게 사용될 수 있다.

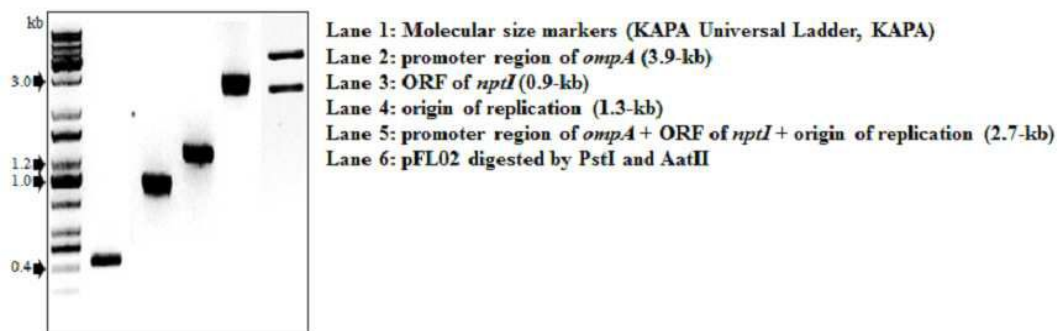
[0042] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

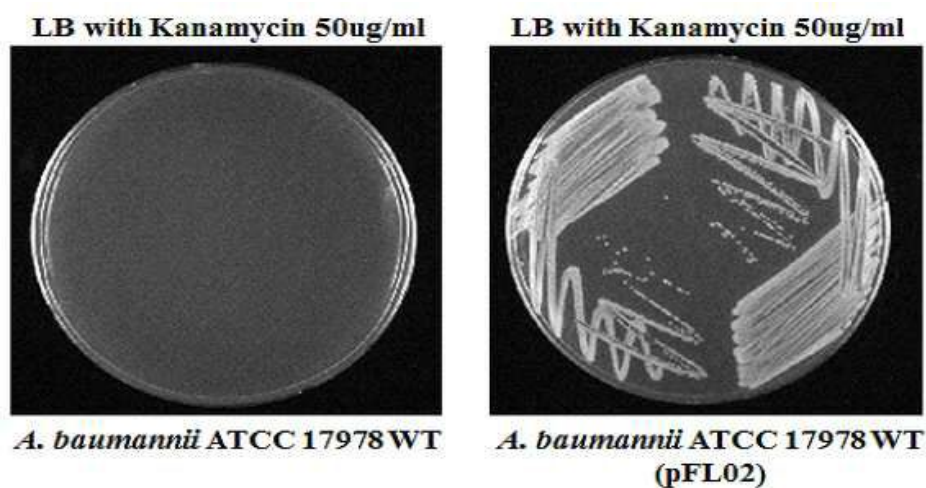
도면1



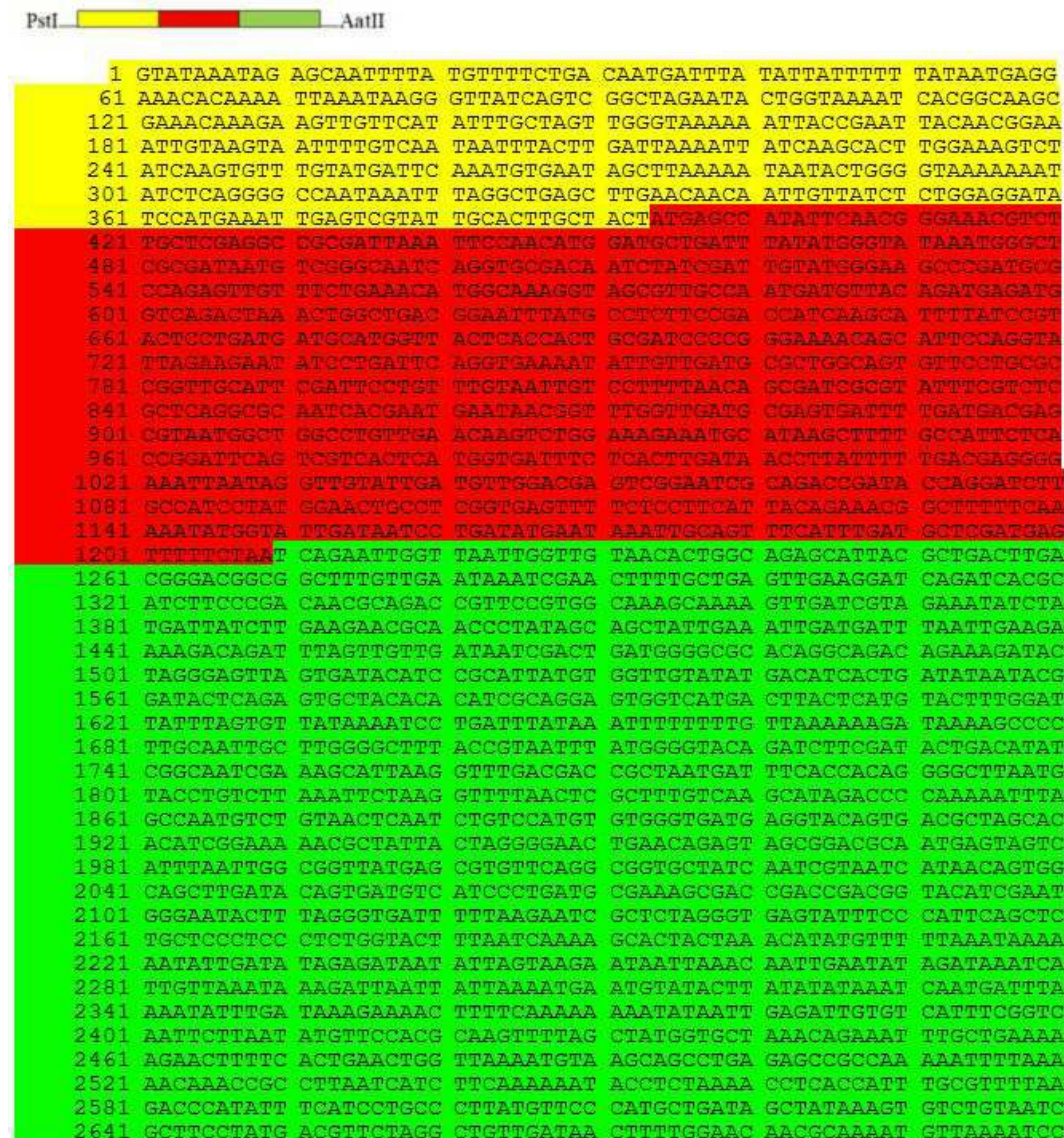
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Recombinant plasmid for screening inhibitors of ompA expression
- <130> NP14-1337
- <160> 11
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> forward primer for ermAM
- <400> 1

tcgtgttcgt gctgacttgc	20
<210> 2	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for ermAM	
<400> 2	
gacctcttta gctccttgga agc	23
<210> 3	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for promoter region of ompA	
<400> 3	
gggctgcagg tataaataga gcaattttat gttttctgac	40
<210> 4	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for promoter region of ompA	
<400> 4	
acgtttcccg ttgaatatgg ctcatagtag caagtgcaat acgactcaat	50
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for nptI	
<400> 5	
atgagccata ttcaacggga a	21
<210> 6	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> reverse primer for nptI

<400> 6

ataatcatag atatttctac gatcaacttt tgctttgccg cgg 43

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for origin of replication for A. baumannii

<400> 7

gatcgtagaa atatctatga ttatcttgaa g 31

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for origin of replication for A. baumannii

<400> 8

gggacgtcgg attttaacat ttgctgtgt tc 32

<210> 9

<211> 2700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> inserted fusion gene

<400> 9

gtataaatag agcaatttta tgttttctga caatgattta tattattttt tataatgagg 60

aaacacaaaa ttaaataagg gttatcagtc ggctagaata ctggtaaaat cacggcaagc 120

gaaacaaaga agttgttcat atttgctagt tgggtaaaaa attaccgaat tacaacggaa 180

attgtaagta atttgtcaa taatttactt gattaaaatt atcaagcact tggaaagtct 240

atcaagtgtt tgtatgattc aaatgtgaat agcttaaaaa taatactggg gtaaaaaaat 300

atctcagggg ccaataaatt taggctgagc ttgaacaaca attgttatct ctggaggata 360

tccatgaaat tgagtcgtat tgcacttgct actatgagcc atattcaacg ggaaacgtct 420

tgctcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct 480

cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat tgtatgggaa gcccgatgcg 540

ccagagtgtt tttctgaaaca tggcaaaggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg	600
gtcagactaa actggctgac ggaatttatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt	660
actcctgatg atgcatggtt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta	720
ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc	780
cggttgcatt cgattccigt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgctt atttcgtctc	840
gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag	900
cgtaatggct ggctgttga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca	960
ccggattcag tcgtcactca tgggtgatttc tcaattgata acctattttt tgacgagggg	1020
aaattaatag gtgtgattga tgttggacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt	1080
gccatcctat ggaactgcct cggtagtitt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa	1140
aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag	1200
tttttctaat cagaattggt taattggttg taacactggc agagcattac gctgacttga	1260
cgggacggcg gctttgttga ataaatcgaa cttttgctga gttgaaggat cagatcacgc	1320
atcttccga caacgcagac cgttccgtgg caaagcaaaa gttgatcgta gaaatatcta	1380
tgattatctt gaagaacga accctatagc agctattgaa attgatgatt taattgaaga	1440
aaagacagat ttagttgttg ataactgact gatggggcgc acaggcagac agaaagatac	1500
tagggagtta gtgatacatc cgcatatgtt ggttgtatat gacatcactg atataatagc	1560
gatactcaga gtgtacaca catcgagga gtggtcatga cttactcatg tactttggat	1620
tatttagtgt tataaaatcc tgatttataa attttttttg ttaaaaaaga taaaagcccc	1680
ttgcaattgc ttggggcttt accgtaattt atggggtaca gatcttcgat actgacatat	1740
cggcaatcga aagcattaag gtttgacgac cgctaagatg ttcaccacag gggcttaatg	1800
tacctgtctt aaattctaag gttttaactc gctttgtcaa gcatagaccc caaaaattta	1860
gccaatgtct gtaactcaat ctgtccatgt gtgggtgatg aggtacagtg acgctagcac	1920
acatcggaac aacgctatta ctaggggaac tgaacagagt agcggacgca atgagtagtc	1980
atttaattgg cggttatgag cgtgttcagg cggtgctatc aatcgtaac ataacagtgg	2040
cagcttgata cagtgatgtc atccctgatg cgaaagcgac cgaccgacgg tacatcgaat	2100
gggaatactt tagggtgatt tttaagaatc gctctagggt gagtatttcc catttcagtc	2160
tgctccctcc ctctggfact ttaatcaaaa gcactactaa acatatgttt ttaataaaaa	2220
aatattgata tagagataat attagtaaga ataattaaac aattgaatat agataaatca	2280
ttgttaaata aagattaatt attaaaatga atgtatactt atatataaat caatgattta	2340
aaatatattg taaagaaaac ttttcaaaaa aaatataatt gagatttgtt catttcggtc	2400

aattcttaat atgttcacg caagtttttag ctatgggtgct aaacagaaat ttgctgaaaa	2460
agaacttttc actgaactgg ttaaaatgta agcagcctga gagccgcaa aaattttaaa	2520
aaacaaaccgc cttaatcatc ttcaaaaaat acctctaaaa cctcaccatt tgcgttttaa	2580
gacccatatt tcacctgcc cttatgttcc catgctgata gctataaagt gtctgtaatc	2640
gcttcctatg acgttctagg ctgttgataa cttttggaac aacgcaaat gttaaaatcc	2700
	2700
<210> 10	
<211> 1040	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ermAM gene	
<400> 10	
tcgtgttcgt gctgacttgc accatatcat aaaaatcgaa acagcaaaga atggcggaaa	60
cgtaaaagaa gttatggaaa taagacttag aagcaaatc aagagtgtgt tgatagtgca	120
gtatcttaaa attttgata ataggaattg aagttaaatt agatgctaaa aatttgtaat	180
taagaaggag tgattacatg aacaaaaata taaaatattc tcaaaacttt ttaacgagtg	240
aaaaagtact caaccaaata ataaaaaat tgaatttaaa agaaaccgat accgtttacg	300
aaattggaac aggtaaaggg catttaacga cgaaactggc taaaataagt aaacaggtaa	360
cgtctattga attagacagt catctattca acttatcgtc agaaaaatta aaactgaata	420
ctcgtgtcac ttaattcac caagatattc tacagtttca attccctaac aaacagaggt	480
ataaaattgt tgggagtatt ccttaccatt taagcacaca aattattaaa aaagtggttt	540
ttgaaagcca tgcgtctgac atctatctga ttgttgaaga aggattctac aagcgtacct	600
tggatattca ccgaacacta gggttgctct tgcacactca agtctcgatt cagcaattgc	660
ttaagctgcc agcggaatgc ttctaccta aacaaaaagt aaacagtgtc ttaataaaac	720
ttaccgcga taccacagat gtccagata aatattggaa gctatatacg tactttgttt	780
caaatgggt caatcgagaa tatcgtcaac tgtttactaa aaatcagttt catcaagcaa	840
tgaaacacgc caaagtaaac aatttaagta ccgttactta tgagcaagta ttgtctattt	900
ttaatagtta tciattatit aacgggagga aataattcta tgagtcgctt ttgtaaattt	960
ggaaagttac acgttactaa agggaaatgta gataaattat taggtatact actgacagct	1020
tccaaggagc taaagaggtc	1040
<210> 11	

<211> 6860

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pFL02 vector

<400> 11

tcgtgttcgt gctgacttgc accatatcat aaaaatcgaa acagcaaaga atggcggaaa	60
cgtaaaagaa gttatggaaa taagacttag aagcaaacctt aagagtgtgt tgatagtgca	120
gtatcttaaa attttgtata ataggaattg aagttaaatt agatgctaaa aatttgtaat	180
taagaaggag tgattacatg aacaaaaata taaaatattc taaaactttt ttaacgagtg	240
aaaaagtact caaccaaata ataaaacaat tgaatttaaa agaaaccgat accgtttacg	300
aaattggaac aggtaaaggg catttaacga cgaaactggc taaaataagt aaacaggtaa	360
cgtctattga attagacagt catctattca acttatcgtc agaaaaatta aaactgaata	420
ctcgtgtcac ttaattcac caagatattc tacagtttca attccctaac aaacagaggt	480
ataaaattgt tgggagtatt ccttaccatt taagcacaca aattattaaa aaagtggttt	540
ttgaaagcca tgcgtctgac atctatctga ttgttgaaga aggattctac aagcgtacct	600
tggatattca ccgaacacta gggttgctct tgcacactca agtctcgatt cagcaattgc	660
ttaagctgcc agcggaatgc ttctaccta aacaaaagt aaacagtgtc ttaataaaac	720
ttaccgcca taccacagat gttccagata aatattggaa gctatatacg tactttgttt	780
caaatgggt caatcgagaa tatcgtcaac tgtttactaa aaatcagttt catcaagcaa	840
tgaaacacgc caaagtaaac aatttaagta ccgttactta tgagcaagta ttgtctattt	900
ttaatagtta tctattattt aacgggagga aataattcta tgagtcgctt ttgtaaat	960
ggaaagtac acgttactaa agggaaatgta gataaattat taggtatact actgacagct	1020
tccaaggagc taaagaggtc accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg cctcaaccta	1080
ctactgggct gtttctaat gcaggagtgc cataaggag agcgtcgacc gatgcccttg	1140
agagccttca acccagtcag ctcttccgg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca	1200
cttatgactg tcttctttat catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc gctctgggtc	1260
atcttcggcg aggaccgctt tcgctggagc gcgacgatga tcggcctgtc gcttgcggta	1320
ttcggaatct tgcacgcct cgctcaagcc ttcgtcactg gtcccgccac caaacgtttc	1380
ggcgagaagc aggccattat cgccggcatg gcggccgacg cgctgggcta cgtcttgctg	1440
gcgttcgcga cgcgaggctg gatggccttc ccattatga ttcttctcgc ttccggcggc	1500
atcgggatgc ccgcgttgca ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga ccatcaggga	1560

cagcttcaag gatcgctcgc ggctcttacc agcctaactt cgatcactgg accgctgac	1620
gtcacggcga tttatgccgc ctccgagcgc acatggaacg ggttggcatg gattgtaggc	1680
gccgccctat acctgtctg cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag cggggccacc	1740
tcgacctgaa tggaagccgg cggcacctcg ctaacggatt caccactcca agaattggag	1800
ccaatcaatt ctgctggaga actgtgaatg cgcaaaccaa cccttggcag aacatatcca	1860
tcgcgtcgc catctccagc agccgcacgc ggcgcatctc gggcagcgtt gggctctggc	1920
cacgggtgcg catgatcgtg ctctgtctgt ttaggacccg gctaggctgg cggggttgcc	1980
ttactggtta gcagaatgaa tcaccgatac gcgagcgaac gtgaagcgac tgctgtcga	2040
aaacgtctgc gacctgagca acaacatgaa tggctcttcgg tttccgtgtt tcgtaaagtc	2100
tggaaacgcg gaagtcagcg ccctgcacca ttatgttccg gatctgcac gcaggatgct	2160
gctggctacc ctgtggaaca cctacatctg tattaacgaa gcgctggcat tgacctgag	2220
tgatttttct ctggtccgc cgcatccata ccgccagttg tttaccctca caacgttcca	2280
gtaaccgggc atgttcatca tcagtaacc gtatcgtgag catcctctct cgtttcatcg	2340
gtatcattac ccccatgaac agaaatcccc ctacacgga ggcatcagtg accaaacagg	2400
aaaaaacgc ccttaacatg gcccgttta tcagaagcca gacattaacg cttctggaga	2460
aactcaacga gctggacgcg gatgaacagg cagacatctg tgaatcgctt caccaccag	2520
ctgatgagct ttaccgcagc tgccctcgcg gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac	2580
acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag	2640
cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg acccagtcac	2700
gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag	2760
agtgcacat atgcgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag	2820
gcgtcttcc gcttctcgc tcaactgactc gctgcgtcgc gtcgttcggc tgcggcgagc	2880
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg	2940
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct	3000
ggcgttttcc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtea	3060
gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct	3120
cgtgcgtct cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgct tctcccttc	3180
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt	3240
tcgtccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag cccgaccgt gcgccttacc	3300
cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc	3360
cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagt	3420

gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc	3480
agttaccttc ggaanaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag	3540
cggtgggttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga	3600
tcctttgata ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat	3660
tttggtcagt agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaanaatgaag	3720
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat	3780
cagtgggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc	3840
cgctgttag ataactaca tacgggaggg ctaccatct ggccccagt ctgcaatgat	3900
accgcgagac ccacgtcac cggctccaga ttatcagca ataaccagc cagccggaag	3960
ggccgagcgc agaagtggc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg	4020
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc	4080
tgcaggtata aatagagcaa tttatgttt tctgacaatg atttatatta tttttataa	4140
tgaggaaaca caaanaaaa taagggttat cagtcggcta gaatactggt aaatcacgg	4200
caagcgaac aaagaagttg ttcatatttg ctagtgggt aaaaaattac cgaattaca	4260
cggaaattgt aagtaatttt gtcaataatt tacttgatta aaattatcaa gcaattgga	4320
agtctatcaa gtgtttgtat gattcaaatg tgaatagctt aaaaataata ctggggtaaa	4380
aaaatatctc aggggccaat aaatttaggc tgagcttgaa caacaattgt tatctctgga	4440
ggatatccat gaaattgagt cgtattgcac ttgctactat gagccatatt caacgggaaa	4500
cgtcttgctc gaggcgcga ttaaatcca acatggatgc tgatttatat gggatataat	4560
gggctcgcga taatgtcggg caatcagggt cgacaatcta tcgattgtat gggaagccc	4620
atgcgccaga gttgtttctg aaacatggca aaggtagcgt tgccaatgat gttacagatg	4680
agatggtcag actaaactgg ctgacggaat ttatgcctct tccgaccatc aagcatttta	4740
tccgtactcc tgatgatgca tggttactca cactgcgat ccccggaac acagattcc	4800
aggtattaga agaatatcct gattcagggt aaaatatgt tgatgcgctg gcagtgttc	4860
tgcccggtt gcattcgatt cctgtttgta attgtccttt taacagcgat cgcgtatttc	4920
gtctcgctca ggcgcaatca cgaatgaata acggtttggg tgatgcgagt gattttgatg	4980
acgagcgtaa tggtggcct gttgaacaag tctggaaaga aatgcataag cttttgcat	5040
tctaccgga ttcatcgctc actcatgggt atttctcact tgataacctt attttgacg	5100
aggggaaatt aatagttgt attgatgttg gacgagtcgg aatcgagac cgataccagg	5160
atcttgcat cctatggaac tgcccggtg agttttctcc ttcattacag aaacggttt	5220

ttcaaaaata tggattgat aatcctgata tgaataaatt gcagtttcat ttgatgctcg	5280
atgagttttt ctaatcagaa ttggttaatt ggttgtaaca ctggcagagc attacgtga	5340
cttgacggga cggcggtttt gttgaataaa tcgaactttt gctgagttga aggatcagat	5400
cacgcatctt cccgacaacg cagaccgttc cgtggcaaag caaaagtga tcgtagaaat	5460
atctatgatt atcttgaaga acgcaaccct atagcagcta ttgaaattga tgatttaatt	5520
gaagaaaaga cagatttagt tgttgataat cgactgatgg ggcgcacagg cagacagaaa	5580
gatactaggg agttagtga acatccgcat tatgtggttg tatatgacat cactgatata	5640
atacggtac tcagagtgt acacacatcg caggagtgg catgacttac tcatgtactt	5700
tggattatth agtggtataa aatcctgatt tataaattht ttgtgtaaa aaagataaaa	5760
gccccttgca attgcttggg gctttaccgt aatttatggg gtacagatct tcgatactga	5820
catatcgga atcgaaagca ttaaggtttg acgaccgcta atgatttcac cacaggggt	5880
taatgtacct gtcttaaat ctaaggtht aactcgcttt gtcaagcata gaccccaaaa	5940
atthagccaa tgtctgtaac tcaatctgtc catgtgtggg tgatgagga cagtgcgct	6000
agcacacatc ggaaaaacgc tattactagg ggaactgaac agagtagcgg acgcaatgag	6060
tagtcattta attggcggtt atgagcgtgt tcaggcggtg ctatcaatcg taatcataac	6120
agtggcagct tgatacagt atgtcatccc tgatgcgaaa gcgaccgacc gacggtacat	6180
cgaatgggaa tactttaggg tgatttttaa gaatcgctct aggttgagta ttcccatc	6240
agctctgtc cctccctctg gtactttaat caaaagcact actaacata tgtttttaa	6300
taaaaaatat tgatatagag ataatttag taagaataat taaacaattg aatatagata	6360
aatcattgtt aaataaagat taattattaa aatgaatga tacttatata taaatcaatg	6420
atttaaaata ttgataaag aaaacttttc aaaaaaata taattgagat tgtgtcattt	6480
cggatcaattc ttaatatgtt ccacgaagt tttagctatg gtgctaaaca gaaatttgc	6540
gaaaaagaac ttttactga actggttaaa atgtaagcag cctgagagcc gccaaaaatt	6600
ttaaaaacaa accgccttaa tcatcttcaa aaaatacttc taaaacctca ccatttgcgt	6660
tttaagacc atatttcac ctgcccttat gttcccatgc tgatagctat aaagtgtctg	6720
taatcgcttc ctatgacgt ctagctgtt gataactttt ggaacaacgc aaaatgttaa	6780
aatccgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca	6840
cgaggccctt tcgtcttcaa	6860