



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/465 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0124457

(22) 출원일자 2012년11월05일

심사청구일자 2012년11월05일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

최양호

경남 합천군 쌍백면 대현1길 31,

김지민

울산광역시 남구 삼호로 127번길 22 (무거동)

(74) 대리인

특허법인 동원

전체 청구항 수 : 총 18 항

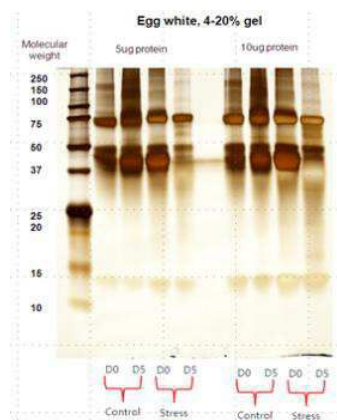
(54) 발명의 명칭 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질

(57) 요약

본 발명은 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 스트레스를 받은 가금류가 생산한 난(卵, 알)과 스트레스를 받지 않은 가금류가 생산한 난에서 차등 발현되는 단백질을 바이오마커 단백질로 개발하고, 이를 이용한 가금류의 환경 스트레스 진단 키트, 가금류의 환경 스트레스 분석방법 및 최종적으로 난의 품질과 가금류의 복지를 평가하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의하면, 난 단백질의 차등발현 분석을 통하여 특정 난 단백질 성분의 발현의 증감 여부를 분석할 수 있기 때문에 가금류의 희생 없이도 산란 당시의 가금류의 스트레스의 유무를 판단할 수 있으며 상기 단백질은 난질 분석에 새로운 지표(바이오마커 단백질)로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008049

부처명 농촌진흥청

연구사업명 동물유전체육종사업단

연구과제명 닭에서 스트레스 저항성 기능유전체 연구

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2012.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

가금류의 환경 스트레스에 특이적으로 발현하는 난 단백질 또는 그 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 난 단백질은 난백 단백질인 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 난백 단백질은 서열번호 1의 Ovoinhibitor, 서열번호 2의 Ovalbumin-related protein X, 서열번호 3의 TENP, 서열번호 4의 Hemopexin, 서열번호 5의 IGY-FCU3-4 및 서열번호 6의 Extracellular fatty acid-binding protein(Ex-FABP)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가금류는 닭인 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질.

청구항 5

제4항의 바이오마커 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 가금류의 환경 스트레스 진단용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스 진단용 조성물.

청구항 7

제4항의 바이오마커 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 가금류의 환경 스트레스 진단 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스 진단 키트.

청구항 9

가금류의 환경 스트레스를 분석하는 방법으로서,

가금류의 환경 스트레스에 특이적으로 발현하는 난 단백질 또는 그 단편의 발현양의 변화 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스를 분석하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 난 단백질은 난백 단백질인 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스를 분석하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 난백 단백질은 서열번호 1의 Ovoinhibitor, 서열번호 2의 Ovalbumin-related protein X, 서열번호 3의 TENP, 서열번호 4의 Hemopexin, 서열번호 5의 IGY-FCU3-4 및 서열번호 6의 Extracellular fatty acid-binding protein(Ex-FABP)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스

트레스를 분석하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 서열번호 1의 Ovoinhibitor 또는 서열번호 2의 Ovalbumin-related protein X의 발현 증가는 가금류의 스트레스 가능성이 높음을 나타내는 표지로 사용하는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스를 분석하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 서열번호 3의 TENP, 서열번호 4의 Hemopexin, 서열번호 5의 IGY-FCU3-4 및 서열번호 6의 Extracellular fatty acid-binding protein(Ex-FABP)에서 선택되는 1종 이상의 난백 단백질의 발현 감소는 가금류의 스트레스 가능성이 높음을 나타내는 표지로 사용하는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스를 분석하는 방법.

청구항 14

난의 품질을 분석하는 방법으로서,

가금류의 환경 스트레스에 특이적으로 발현하는 난 단백질 또는 그 단편의 발현량의 변화 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는 난의 품질을 분석하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 난 단백질은 난백 단백질인 것을 특징으로 하는 난의 품질을 분석하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 난백 단백질은 서열번호 1의 Ovoinhibitor, 서열번호 2의 Ovalbumin-related protein X, 서열번호 3의 TENP, 서열번호 4의 Hemopexin, 서열번호 5의 IGY-FCU3-4 및 서열번호 6의 Extracellular fatty acid-binding protein(Ex-FABP)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 난의 품질을 분석하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 서열번호 1의 Ovoinhibitor 또는 서열번호 2의 Ovalbumin-related protein X의 발현 증가는 스트레스 가능성이 높은 가금류가 생산한 난인 것을 특징으로 하는 난의 품질을 분석하는 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 서열번호 3의 TENP, 서열번호 4의 Hemopexin, 서열번호 5의 IGY-FCU3-4 및 서열번호 6의 Extracellular fatty acid-binding protein(Ex-FABP)에서 선택되는 1종 이상의 난백 단백질의 발현 감소는 스트레스 가능성이 높은 가금류가 생산한 난인 것을 특징으로 하는 난의 품질을 분석하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 스트레스를 받은 가금류가 생산한 난(卵, 알)과 스트레스를 받지 않은 가금류가 생산한 난에서 차등 발현되는 단백질을 바이오마커 단백질로 개발하고, 이를 이용한 가금류의 환경 스트레스 진단 키트, 가금류의 환경 스트레스 분석방법 및 최종적으로 난의 품질과 가금류의 복지를 평가하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 스트레스는 동물의 면역력을 감소시키고 양적 및 질적 생산성을 저하시킨다 {Choi, Y.-H. 2007. Management of Stress in Poultry Production. Korean Journal of Poultry Science 34:295-300.}. 스트레스 받은 산란계에서 산란율과 난질이 저하된다 {Henriksen, R., T. G. Groothuis, and S. Rettenbacher. 2011. Elevated plasma

corticosterone decreases yolk testosterone and progesterone in chickens: linking maternal stress and hormone-mediated maternal effects. PLoS one 6:e23824. doi 10.1371/journal.pone.0023824; Mashaly, M. M., G. L. Hendricks, 3rd, M. A. Kalama, A. E. Gehad, A. O. Abbas, and P. H. Patterson. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. Poult Sci 83:889-894.}. 산란계에게 스트레스를 가하면 혈중 코르티코스테론(corticosterone), 글루코스, 콜레스테롤의 농도가 변화되고, 비장, 간 및 F-낭의 무게가 변한다는 것이 알려져 있다 {Mumma, J. O., J. P. Thaxton, Y. Vizzier-Thaxton, and W. L. Dodson. 2006. Physiological stress in laying hens. Poult Sci 85:761-769.; Puvadolpirod, S., and J. P. Thaxton. 2000. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. Poult Sci 79:363-369.; Rochester, J. R., K. C. Klasing, L. Stevenson, M. S. Denison, W. Berry, and J. R. Millam. 2009. Dietary red clover (*Trifolium pratense*) induces oviduct growth and decreases ovary and testes growth in Japanese quail chicks. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 27:63-71. doi 10.1016/j.reprotox.2008.11.056; Shini, S., P. Kaiser, A. Shini, and W. L. Bryden. 2008. Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 149:324-333.}.

[0003] 스트레스는 산란계의 초산일령을 지연시키고 산란 피크기간을 단축시키며 {Shini, S., A. Shini, and G. R. Huff. 2009. Effects of chronic and repeated corticosterone administration in rearing chickens on physiology, the onset of lay and egg production of hens. Physiology & behavior 98:73-77.}, 계란을 생산하는 기관, 즉 난관과 난소의 무게를 감소시킨다 {Shini, S., A. Shini, and G. R. Huff. 2009. Effects of chronic and repeated corticosterone administration in rearing chickens on physiology, the onset of lay and egg production of hens. Physiology & behavior 98:73-77.; Mumma, J. O., J. P. Thaxton, Y. Vizzier-Thaxton, and W. L. Dodson. 2006. Physiological stress in laying hens. Poult Sci 85:761-769.}. 이러한 결과와 일치하게 스트레스는 난소에서 대형 난포수를 감소시키고 폐색난포수를 증가시키며, 그럼으로써 번식관련 스테로이드 호르몬 (테스토스테론, 프로제스테론 및 에스트로젠)의 혈장농도를 감소시킨다 {Henriksen, R., T. G. Groothuis, and S. Rettenbacher. 2011. Elevated plasma corticosterone decreases yolk testosterone and progesterone in chickens: linking maternal stress and hormone-mediated maternal effects. PLoS one 6:e23824. doi 10.1371/journal.pone.0023824}. 스트레스는 난소의 유전자발현을 감소시키며 {Rozenboim, I., E. Tako, O. Gal-Garber, J. A. Proudman, and Z. Uni. 2007. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. Poult Sci 86:1760-1765.}, 난관과 난소에서 단백질발현에 영향을 미칠 수 있음이 보고되었다 {Rozenboim, I., E. Tako, O. Gal-Garber, J. A. Proudman, and Z. Uni. 2007. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. Poult Sci 86:1760-1765.; Sargan, D. R., M. J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1986. hsp108, a novel heat shock inducible protein of chicken. Biochemistry 25:6252-6258.}. 그러나 이러한 스트레스 표식들은 산란계의 희생이 필요하지만 계란을 이용한다면 산란계의 희생 없이도 스트레스 표식을 측정할 수 있다.

[0004] 최근에, 프로테옴(proteome) 분석이 단백질 레벨에서 차등적(differential) 유전자 발현을 분석하고 바이오마커를 동정하는 수단으로 소개되고 있다 {Matt, P., Z. Fu, Q. Fu, and J. E. Van Eyk. 2008. Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. Physiol Genomics 33:12-17.}. 그러나, 단백질체(Proteomics) 연구는 현재까지 질병관련 연구를 위주로 발달하여 왔으며 {Burgess, S. C. 2004. Proteomics in the chicken: tools for understanding immune responses to avian diseases. Poult Sci 83:552-573.}, 환경 스트레스에 대한 단백질 연구는 극히 미비한 실정이다.

[0005] 따라서, 산란계를 포함한 가금류의 다양한 환경적 생리적 및 유전적 차이가 난 단백질의 발현에 미치는 영향을 연구하여 스트레스 표지로 이용할 필요가 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Burgess, S. C. 2004. Proteomics in the chicken: tools for understanding immune responses to avian diseases. Poult Sci 83:552-573.

(비특허문헌 0002) Choi, Y.-H. 2007. Management of Stress in Poultry Production. Korean J Poult Sci 34:295-300.

- (비특허문헌 0003) Henriksen, R., T. G. Groothuis, and S. Rettenbacher. 2011. Elevated plasma corticosterone decreases yolk testosterone and progesterone in chickens: linking maternal stress and hormone-mediated maternal effects. PLoS one 6:e23824. doi 10.1371/journal.pone.0023824
- (비특허문헌 0004) Mashaly, M. M., G. L. Hendricks, 3rd, M. A. Kalama, A. E. Gehad, A. O. Abbas, and P. H. Patterson. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. Poult Sci 83:889-894.
- (비특허문헌 0005) Matt, P., Z. Fu, Q. Fu, and J. E. Van Eyk. 2008. Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. Physiol Genomics 33:12-17.
- (비특허문헌 0006) Mumma, J. O., J. P. Thaxton, Y. Vizzier-Thaxton, and W. L. Dodson. 2006. Physiological stress in laying hens. Poult Sci 85:761-769.
- (비특허문헌 0007) Puvadolpirod, S., and J. P. Thaxton. 2000. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. Poult Sci 79:363-369.
- (비특허문헌 0008) Rochester, J. R., K. C. Klasing, L. Stevenson, M. S. Denison, W. Berry, and J. R. Millam. 2009. Dietary red clover (Trifolium pratense) induces oviduct growth and decreases ovary and testes growth in Japanese quail chicks. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 27:63-71.
- (비특허문헌 0009) Rozenboim, I., E. Tako, O. Gal-Garber, J. A. Proudman, and Z. Uni. 2007. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. Poult Sci 86:1760-1765.
- (비특허문헌 0010) Sargan, D. R., M. J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1986. hsp108, a novel heat shock inducible protein of chicken. Biochemistry 25:6252-6258.
- (비특허문헌 0011) Shini, S., P. Kaiser, A. Shini, and W. L. Bryden. 2008. Biological response of chickens (Gallus gallus domesticus) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 149:324-333.
- (비특허문헌 0012) Shini, S., A. Shini, and G. R. Huff. 2009. Effects of chronic and repeated corticosterone administration in rearing chickens on physiology, the onset of lay and egg production of hens. Physiology & behavior 98:73-77.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질을 제공하는 데에 있다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 상기 바이오마커 단백질에 대한 항체 및 이를 이용한 진단 키트를 제공하는 데에 있다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 상기 바이오마커 단백질 발현양의 변화 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스를 분석하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 상기 바이오마커 단백질 발현양의 변화 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는 난의 품질을 분석하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기와 같은 기술적 과제를 달성하기 위한 본 발명은, 가금류의 환경 스트레스에 특이적으로 발현하는 난 단백질 또는 그 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 가금류의 환경

스트레스 진단용 조성물 또는 진단 키트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 가금류의 환경 스트레스에 특이적으로 발현하는 난 단백질 또는 그 단편의 발현양의 변화 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스를 분석하는 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 가금류의 환경 스트레스에 특이적으로 발현하는 난 단백질 또는 그 단편의 발현양의 변화 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는 난의 품질을 분석하는 방법을 제공한다.

[0015] 이하에서는 상기 본 발명의 과제 해결 수단과 관련하여 도면, 실시예 등을 통하여 구체적으로 설명하기로 하겠다.

발명의 효과

[0016] 이와 같이 본 발명에 의하면, 난 단백질의 차등발현 분석을 통하여 특정 난 단백질 성분의 발현의 증감 여부를 분석할 수 있기 때문에 가금류의 회생 없이도 산란 당시의 가금류의 스트레스의 유무를 판단할 수 있으며 상기 단백질은 난의 품질 분석에 새로운 지표(바이오마커 단백질)로 사용될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 바이오마커 단백질을 기초로 제조된 항체는 가금류의 환경 스트레스를 진단 및 난의 품질을 분석할 수 있는 immunoassay 키트(ELISA, antibody coated tube test, lateral-flow test, potable biosensor 등)에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 보다 높은 특이도와 민감도를 나타내는 항체의 개발을 통해 다양한 환경 스트레스 진단 및 난의 품질 분석 스펙트럼을 갖는 단백질 칩 개발에 이용될 수도 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 산란계의 스트레스(corticosterone) 처리에 따른 난백 단백질의 발현양을 SDS-PAGE 분석한 결과이다.

도 2는 대조구 산란계에서 급여 개시 당일(Day 0)에 채란한 계란의 난백 단백질을 이차원 전기영동 분석한 결과이다.

도 3은 대조구 산란계에서 급여 5일째(Day 5)에 채란한 계란의 난백 단백질을 이차원 전기영동 분석한 결과이다.

도 4는 실험구 산란계에서 급여 개시 당일(Day 0)에 채란한 계란의 난백 단백질을 이차원 전기영동 분석한 결과이다.

도 5는 실험구 산란계에서 급여 5일째(Day 5)에 채란한 계란의 난백 단백질을 이차원 전기영동 분석한 결과이다.

도 6은 대조구에서 난백 단백질 스팟 번호 9 (ovoinhibitor 단백질)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 7은 대조구에서 난백 단백질 스팟 번호 21 (hemopexin 단백질)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8은 대조구에서 난백 단백질 스팟 번호 28 (TENP 단백질)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9는 실험구에서 난백 단백질 스팟 번호 12 (ovalbumin-related protein X)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10은 실험구에서 난백 단백질 스팟 번호 18 (TENP, ovalbumin-related protein X)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 11은 실험구에서 난백 단백질 스팟 번호 19 (chondrogenesis-associated lipocalin)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 12는 실험구에서 난백 단백질 스팟 번호 22 (hemopexin)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 13은 실험구에서 난백 단백질 스팟 번호 24 (ovalbumin-related protein X)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 14는 실험구에서 난백 단백질 스팟 번호 27 (TENP, IGY FCU 3-4)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 15는 실험구에서 난백 단백질 스팟 번호 28 (TENP)의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 16은 실험구에서 난백 단백질 스팟 번호 29 (extracellular fatty acid-binding protein)의 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하 본 발명에 따른 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질, 이러한 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 가금류의 환경 스트레스 진단용 조성물과 진단 키트, 및 상기 바이오마커 단백질을 이용하여 가금류의 환경 스트레스를 분석하는 방법 및 난의 품질을 분석하는 방법에 대해 보다 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명은 가금류의 환경 스트레스에 특이적으로 발현하는 난 단백질 또는 그 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 가금류의 환경 스트레스 진단용 조성물 또는 진단 키트를 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 "단편"이란 본 발명의 난 단백질에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프(epitope)를 가지고 있는 난 단백질의 단편을 의미한다.
- [0023] 본 발명의 난 단백질은 난백, 난황, 난각, 난각막 등 난의 모든 부분에서 발현되는 단백질을 의미하며, 이에 제한되는 것은 아니나 본 발명의 실시예에서는 난백 단백질을 이용하였다.
- [0024] 본 발명의 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 재조합 항체일 수 있으나, 본 발명의 항체는 모노클로날 항체인 것이 바람직하다.
- [0025] 폴리클로날 항체는 당업자에 알려진 종래방법에 따라 면역원인 바이오마커 단백질을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등과 같은 포유동물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 면역원은 근대 주사, 복강내 주사, 피하 주사 등의 방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리정제한다.
- [0026] 모노클로날 항체는 당업자에 잘 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술(Koeher and Milstein (1975) Nature, 256:495 및 Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511)에 의해 제조될 수 있다. 보다 구체적으로, 먼저 순수한 바이오마커 단백질을 약 20 μ g을 얻어서 Balb/C 쥐 등과 같은 적합한 숙주 동물에 면역화를 시키거나 펩타이드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 숙주 동물에 면역화시킨다. 그 후에 쥐 등의 숙주 동물에서 분리된 항체-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 폴리에틸렌글리콜 이용법과 같은 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 융합시켜 불멸화된 하이브리도마를 생성한다. 이 후, ELISA 방법을 사용하여 원하는 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 모노클로날 항체를 분리 정제한다. 상기 하이브리도마가 생산하는 모노클로날 항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 고순도로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다.
- [0027] 또한 모노클로날 항체는 당업자에게 잘 알려진 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 보다 구체적으로, 파지 항체 라이브러리 방법은 바이오마커 단백질에 대한 항체 유전자(Single chain fragment variable, scFv 형태)를 획득하여 이를 파자의 표면에 융합 단백질 형태로 발현함으로써 항체 라이브러리를 시험관 내에서 제작하고, 이 라이브러리로부터 상기 바이오마커 단백질과 결합하는 모노클로날 항체를 분리, 제작하는 방법이다.
- [0028] 상기 방법으로부터 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물 또는 키트에 포함되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 있다.
- [0030] 본 발명의 진단 키트는 당업자에 알려진 종래의 제조방법에 의해 제조되며, 이러한 키트에 통상적으로 포함되는 동결건조형태의 항체, 버퍼, 안정화제, 불활성 단백질 등 이외에 항원-항체 결합체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질, 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 항체는 방사종(radionuclides), 형광원(fluorescours), 효소(enzymes) 등에 의해 표지화될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 가금류의 환경 스트레스에 특이적으로 발현하는 난 단백질 또는 그

단편의 발현양의 변화 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는 가금류의 환경 스트레스를 분석하는 방법을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 가금류의 환경 스트레스에 특이적으로 발현하는 난 단백질 또는 그 단편의 발현양의 변화 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는 난의 품질을 분석하는 방법을 제공한다.

[0033] 본 발명의 분석 방법들에서, 상기 난백 단백질의 발현양의 변화 여부를 검출하는 단계는 가금류의 알로부터 이차원 전기영동(2-DE)으로 바이오마커 단백질의 존재를 직접 검출하거나, 가금류의 알을 상기 바이오마커 단백질에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시켜 항원항체반응을 통해 바이오마커 단백질의 존재를 간접적으로 확인한다.

[0034] 항체를 이용하여 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 항체결합 magnetic particle을 tube에 결합시킨 다음 antigen-tracer와 난분해성 오염 물질을 서로 경쟁적으로 반응시켜 효소반응을 유발시켜 정량하는 magnetic particle법, 항체결합 latex particle을 이용한 latex particle법, 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기 분석 방법들을 통하여, 스트레스를 받은 가금류가 생산한 난과 스트레스를 받지 않은 가금류가 생산한 난에서 차등 발현되는 난 단백질의 변화를 판단하여서 가금류의 환경 스트레스 및 난의 품질을 분석할 수 있다.

[0036] 특히, 이러한 분석에 난백을 이용하는 장점은, 암탉의 난소에서 성숙 난황의 생성에 7-10일 정도 소요되지만 난백의 생성에는 2-3시간 밖에 걸리지 않기 때문에 난백의 상태는 난백이 생성되는 시기의 암탉의 사육상태 (즉 스트레스 상태)를 반영할 수 있다는 것이다.

[0037] 본 발명에서 난 단백질의 발현양이 변화한다는 것은 난 단백질의 발현양이 증가 또는 감소된다는 것을 의미한다.

[0038] 본 발명에서 Ovoinhibitor, Ovalbumin-related protein X의 발현은 증가한 반면, TENP, Hemopexin, IGY-FCU3-4 및 Extracellular fatty acid-binding protein(Ex-FABP)의 발현은 감소하였다.

[0039] 이하 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명한다.

[0040] 단, 하기 실시 예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0041] 실시 예 1 : 동물실험 (산란계의 스트레스 모델)

[0042] 47주령의 Single Comb Brown Hy-Line Leghorn hens 20수를 크기가 동일한 2개의 사육실에 설치된 4칸이 한 조인 3단 직립형 케이지에 1칸에 1수씩 개별적으로 수용하였다. 사육실의 온도는 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 내외로 유지하였고, 오전 6시에 점등되어 오후 9시에 소등되었다 (15시간 점등). 시험기간 동안 사료와 물은 제한 없이 공급되었다. 산란계들은 무작위로 2개의 처리구(대조구, 실험구)로 분리 후 나누어져 사육환경에 대한 2주간의 적응기간 후, 한 처리구(대조구)에는 control 사료 (사료 1kg에 0mg의 corticosterone 포함)가, 나머지 한 처리구(실험구)에는 실험사료 (사료 1kg에 30mg의 corticosterone 포함)가 2주 동안 공급되었다.

[0043] Control 사료는 에탄올(EtOH) 500ml를 실험사료는 99.5% EtOH 500ml에 815mg corticosterone (92%, C2505, 시그마, 미국)을 완전히 녹인 후, 25kg 일반사료와 함께 혼합기에서 30분 이상 배합하여 제조되었다.

[0044] 실시 예 2 : 계란의 채란

[0045] Control 사료 또는 실험사료 급여 개시 시(Day 0) 그리고 급여 5일째(Day 5)에 동일한 개체가 산란한 계란을 수거한 후 난백만 수집하여 동결 건조시키고 분석시 때까지 -80°C 에 보관하였다.

[0046] 실시 예 3 : 난백 단백질 추출 및 SDS-PAGE 분석

[0047] 동결 건조된 난백을 막자사발로 분쇄한 후 난백 샘플 양의 25배에 해당하는 용해 버퍼(lysis buffer) A (1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), protease inhibitor cocktail, 100 mM Tris-HCl (pH 6.8))에 용해시켰다. 용해 버퍼 A와 같은 양의 용해 버퍼 B (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.1 M dithiothreitol (DTT), 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail, 40 mM Tris-HCl (pH 6.8))를 넣고 상온에서 1시간 동안 혼합하였다. 혼합물을 잠시 동안 초음파 파쇄(sonication) 시킨 후 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 15,000×g, 4 °C, 20 분 동안 원심분리하고 4 °C에서 1시간 동안 배양한 후 15,000×g, 4 °C, 20 분 동안 한번 더 원심분리하였다. 상층액인 수용성 단백질을 2DE Quant kit (GE Healthcare Life Sciences, 업살라, 스웨덴)를 이용하여 정량을 하였다. SDS-PAGE 분석은 다음과 같이 수행되었다. 5 µg의 soluble protein 을 sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 500 mM Tris-HCl, (pH 6.8))와 혼합하여 12% SDS polyacrylamide gel에 20 mA에서 3시간 동안 전기영동을 한 후 은 염색(silver stain)하였다.

[0048] 실시 예 4 : 이차원 전기영동 (2DE) 분석

[0049] 200µg의 수용성 단백질을 재수화 버퍼(rehydration buffer) (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 2.5% DTT, 10% isopropanol, 5% glycerol 및 2% IPG buffer)와 혼합하였다. pH 4-10, non-linear (NL)의 18cm IPG 스트립을 이용하여 18 시간 동안 단백질을 재수화(rehydration) 하였다. 단백질을 pH 별로 1차 분리하기 위해 IPGphor 3 시스템 (GE amersham)을 사용하여 50 V 에서 30 분, 100 V 에서 30 분, 250 V 에서 1 시간, 9시간 동안 8,000 V 까지 천천히 전압을 올린 후 8,000V 에서 6 시간 동안 등전점 전기영동(isoelectric focusing) 하였다. 등전점 전기영동이 끝난 IPG 스트립을 15 분 동안 평형 버퍼(equilibration buffer) (6M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS 및 bromophenol blue)와 1% DTT를 넣고 1차 평형화(equilibration)를 실시하였고, 2차 평형화(equilibration)는 2.5 % iodoacetamide을 넣고 실시하였다. 그리고 단백질을 크기별로 2차 분리를 하기 위하여 7.5% SDS polyacrylamide gels using Gradi-Gel™ II gradient PAGE analysis kit (EBA-1015, Elpis, Daejeon, Korea)를 이용하여 SDS-PAGE 겔을 제조하였다.

[0050] SDS-PAGE 겔을 이용하여 20 mA에서 18시간 동안 전기영동을 한 후 은 염색(silver stain) 하였다. Image master (Image Master 2D Platinum v7.0, GE)를 이용하여 두 처리구(대조구, 실험구)간의 단백질 발현을 비교 분석하였으며 한 처리구당 3개의 겔 이미지의 스팟(spot) 강도를 측정하였다. 같은 처리구에서 급여 개시 당일 (Day 0)과 급여 5일째(Day 5) 사이의 차등발현 유무는 t-test로 유의성이 검증되었고, 그 차이가 $P \leq 0.05$ 이면 유의성이 인정되었다. 모든 실험 데이터는 평균 ± 표준오차로 표시하였다.

[0051] 실시 예 5 : 질량 분석 (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) 와 MALDI-TOF/TOF/MS/MS 분석)

[0052] 피펫 팁(pipet tip)을 이용해 원하는 스팟을 잘라내어 튜브에 수집하였다. 30mM potassium ferricyanide, 100 mM sodiumthiosulfate pentahydrate을 첨가하여 은 염료(silver dye)를 gel에서 빠지게 한 후 완전히 건조시켰다. 50~100 µl의 10mM DTT / 0.1 M ABC를 첨가한 후 56°C에서 약 45분 동안 반응시켰다. 상층액을 제거하고 50~100 µl의 55 mM iodoacetamide / 0.1 M ABC를 첨가한 후 약 30분 동안 반응시킨 후 완전히 건조시켰다. 트립신 절단 버퍼(Trypsin digestion buffer) (0.0012 ug/ul in 25 mM NH₄HCO₃, pH 7.8)를 3 µl 첨가 후 37°C에서 하루 밤 동안 방치하였다. 샘플에 추출 용액(extraction solution) (acetonitrile: water: TFA=66:33:0.1)을 처리하여 겔에서 펩타이드를 추출하였다. 추출된 펩타이드 용액 과 기질 용액(matrix solution) (α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)을 혼합한 후 MALDI TOF/TOF sample plate에 분주하고 ABI 4800 Plus TOF-TOF Mass Spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)를 이용하여 분석하였으며 하기 표 1에 나타내었다. 이들 단백질의 아미노산 서열은 MS/MS spectra를 NCBI database를 이용하여서 검색하였다.

표 1

스팟 번호	단백질 이름	Accession No.	분자량	PI	Score (MOWSE)	Sequence coverage (%)	Matched peptides	질량 분석	데이터베이스
-------	--------	---------------	-----	----	---------------	-----------------------	------------------	-------	--------

4	Ovoinhibitor	P10184	54,394	6.16	58	32	14	MS	Uni/Swiss
5	Ovoinhibitor	P10184	54,394	6.16	47	23	14	MS	Uni/Swiss
6	Ovoinhibitor	P10184	54,394	6.16	46	22	13	MS	Uni/Swiss
7	Ovoinhibitor	P10184	54,394	6.16	362	33	19	MS/MS	Uni/Swiss
8	Ovoinhibitor	P10184	54,394	6.16	46	17	10	MS	Uni/Swiss
11	Ovoinhibitor	P10184	54,394	6.16	37	20	11	MS	Uni/Swiss
12	Ovalbumin-related protein X	P01013	26,331	5.1	79	30	7	MS/MS	Uni/Swiss
17	TENP	O42273	47,804	5.53	39	13	6	MS/MS	Uni/Swiss
18	TENP	O42273	47,804	5.53	147	23	10	MS/MS	Uni/Swiss
18	Ovalbumin-related protein X	P01013	26,331	5.1	103	27	8	MS/MS	Uni/Swiss
21	Hemopexin	Q90WR3	29,765	5.92	35	24	9	MS/MS	Uni/Tr
22	Hemopexin	Q90WR3	29,765	5.92	340	48	18	MS/MS	Uni/Tr
24	Ovalbumin-related protein X	P01013	26,331	5.1	108	27	8	MS/MS	Uni/Swiss
24	Ovotransferrin	P02789	79,551	6.69	63	21	10	MS/MS	Uni/Swiss
27	TENP	O42273	47,804	5.53	246	24	10	MS/MS	Uni/Swiss
27	IGY FCU3-4	UPI00018BF9C1	25,466	5.57	112	30	4	MS/MS	UniParc
28	TENP	O42273	47,804	5.53	232	20	13	MS/MS	Uni/Swiss
29	EX-FABP	P21760	20,359	5.56	351	52	17	MS/MS	Uni/Swiss

[0054] * 스팟 번호는 이차원 전기영동(2DE) 겔 이미지 라벨에 상응함.

[0055] * 스팟 번호 1, 2, 3, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23, 25, 26, 30은 데이터베이스에 없거나 검출한계 때문에 동정되지 않았음.

[0056] * 검색 번호(Accession No)의 출처는 Uniprot (universal protein resource) 데이터베이스임.

[0057] * Score (MOWSE)는 MASCOT PMF (peptide mass fingerprint)에 사용되었고, NCBI Inr 데이터베이스의 MS 데이터를 나타냄. 스코어가 84보다 큰 경우 유의성이 있음 ($P \leq 0.05$).

[0058] 상기 실시예들의 결과는 아래와 같이 도면 및 표에 도시하였다.

[0059] 먼저 SDS-PAGE 분석에서 5일 동안 corticosterone으로 처리된 산란계(실험구)의 계란에서 난백 단백질의 발현양은 급여 개시 당일 (Day 0)에 비해 현저히 낮았다. 그러나 이러한 변화는 대조구에서는 관찰되지 않았다 (도 1).

[0060] 시험 시작 후 급여 개시 당일(Day 0)과 급여 5일째(Day 5)에 채란된 계란의 난백을 이용해 이차 전기영동을 실시하고, Image Master로 2DE 겔을 분석한 결과 대조구와 실험구 사이에 106개의 스팟들이 일치하였다. 그 중 corticosterone을 5일 동안 섭취한 산란계(실험구)의 난백 단백질에서 30개의 스팟들이 그렇지 않은 대조구에 비해 1.2배 증가 또는 감소되었다.

[0061] Image master를 이용하여 한 처리구당 3개의 겔 이미지의 스팟 강도를 측정하였고 t-test로 통계적으로 분석하였다. Corticosterone을 처리한 그룹(실험구)에서 3개의 단백질 스팟들(번호 12, 18, 24)이 유의하게 증가 ($P \leq 0.05$)하였고, 5 개의 스팟들(번호 19, 22, 27, 28, 29)은 유의하게 감소하였다. 반면에 대조구에서는 급여 개시 당일(Day 0)에 비교해서 급여 5일째(Day 5)에 적은 차이지만 2개의 스팟(번호 21, 28)이 증가하였고 한 개(스팟

번호 9)가 감소하였다 (표 2).

표 2

[0062]

처리구	$P \leq 0.05$ 의 유의성 있는 발현변화를 보이는 스팟 번호	
	감소	증가
대조구	9	21, 28
실험구	19, 22, 27, 28, 29	12, 18, 24

[0063]

단백질 스팟들을 MALDI TOF/MS 또는 MALDI TOF-TOF/MS/MS로 분석하여 MASCOT database로 분류(taxonomy)를 gallus gallus로 검색하였다. MASCOT database의 경우 MOWSE 알고리즘을 베이스로 한 스코어링(scoring)을 실시하였고 스코어(score)가 84 이상인 것을 통계학적으로 유의한 배열이라고 정의하였다 ($P < 0.05$). MOWSE 스코어를 배제하여 분류를 gallus gallus로만 검색한 결과 30개의 단백질 스팟들 중 15개 스팟의 단백질이 동정되었고, 그 결과를 도 2 내지 도 5 및 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0064]

단백질 이름	스팟 번호	단백질 동정 또는 추정	급여 개시 당일(Day 0)과 급여 5일째(Day 5)사이의 단백질 차등 발현			
			대조구		실험구	
				유의확률 (p-value)		유의확률 (p-value)
Ovoalbumin	3	추정	-	0.24	-	0.23
	4	동정	-	0.30	-	0.19
	5	동정	-	0.21	-	0.24
	6	동정	-	0.28	↑	0.07
	7	동정	-	0.23	↑	0.07
	8	동정	-	0.33	↑	0.07
	9	추정	↓	0.03	↑	0.07
	10	추정	-	0.22	↑	0.08
	11	동정	↓	0.07	↑	0.07
	12	동정	-	0.36	↑	0.05
	18	동정	-	0.41	↑	0.01
Ovalbumin-related protein X	23	추정	-	0.08	-	0.19
	24	동정	-		↑	0.06
	26	추정	-	0.27	-	0.13
	20	추정	-	0.33	-	0.35
Hemopexin	21	동정	↑	0.05	-	0.12
	22	동정	-	0.11	↓	0.05
	13	추정	↑	0.06	↓	0.07
TENP	14	추정	-		-	0.28
	15	추정	-	0.46	↓	0.09
	16	추정	-	0.15	-	0.16
	17	동정	-	0.41	-	0.20
	18	동정	-	0.41	↑	0.01
	27	동정	-	0.06	↓	0.01
	28	동정	↑	0.02	↓	0.03
	19	추정	↑	0.09	↓	0.05
Chondrogenesis-associated lipocalin	30	추정	-	0.36	-	0.18
IGY-FCU 3-4	27	동정	-	0.06	↓	0.01
Extracellular fatty acid-binding protein	29	동정	-	0.33	↓	0.01

[0065]

* 모든 스팟은 $P < 0.09$ 의 유의성을 보임, -, 변화 없음; ↑, 증가; ↓, 감소

[0066]

15개의 스팟들은 ovoalbumin (스팟 번호 4-8, 11), ovalbumin-related protein X (스팟 번호 12, 18, 24),

hemopexin (스팟 번호 21, 22), TENP (스팟 번호 17, 18, 27, 28), IGY FCU3-4 (스팟 번호 27), 그리고 extracellular fatty acid-binding protein (스팟 번호 29) 으로 총 6가지의 단백질이 동정되었다.

[0067] 대조구 산란계의 계란에서 급여 개시 당일(Day 0)에 비해 급여 5일째(Day 5)에 ovoinhibitor로 추정되는 단백질 (스팟 번호 9)이 적은 차이지만 유의적으로 감소되었고 ($P < 0.05$), 또 다른 단백질 (스팟 번호 11)도 감소하였다 ($P < 0.07$). hemopexin (스팟 번호 21)과 TENP로 추정되는 단백질 (스팟 번호 28)은 유의적으로 증가하였다 (도 6 내지 도 8).

[0068] 한편 corticosterone으로 처리된 산란계(실험구)의 계란에서 급여 개시 당일(Day 0)에 비해 급여 5일째(Day 5)에 ovalbumin-related protein X (스팟 번호 12, 18, 24)와 TENP (스팟 번호 18)이 증가되었고, hemopexin (스팟 번호 22), TENP (스팟 번호 27, 28), IGY-FCU 3-4 (스팟 번호 27), extracellular fatty acid-binding protein (스팟 번호 29) 그리고 동정되지 않았지만 chondrogenesis-associated lipocalin로 추정되는 단백질 (스팟 번호 19)이 적은 차이지만 유의적으로 감소되었다 (도 9 내지 도 16). Ovoinhibitor로 동정되거나 (스팟 번호 6, 7, 8 및 11) ($P = 0.07$) 추정된 (스팟 번호 9 및 10) ($P = 0.08$) 단백질 스팟들은 corticosterone의 처리로 증가되는 경향이 있었다. 반면에 TENP로 추정되는 단백질 (스팟 번호 13 및 15)은 감소하는 경향이 있었다 (각각, $P < 0.07$, $P < 0.09$).

[0069] Hemopexin (HPX) (스팟 번호 21 및 22)은 주로 간에서 발현되어 혈액으로 분비되는 당단백질이다. HPX는 헴(heme)과 매우 강한 친화력을 가지며 같은 몰 비(equimolar ratio)로써 결합하며 헤모글로빈(hemoglobin)으로부터 생성되는 헴을 제거함으로써 유리 헴에 의해 유발될 수 있는 산화적인 손상으로부터 신체를 보호한다 {Tolosano, E., and F. Altruda. 2002. Hemopexin: structure, function, and regulation. DNA and cell biology 21:297-306. doi 10.1089/104454902753759717}. 헴과의 결합은 단백질 분해 소화에 대한 저항성을 부여한다 {Goldfarb, V., R. B. Trimble, M. De Falco, H. H. Liem, S. A. Metcalfe, D. Wellner, and U. Muller-Eberhard. 1986. An avian serum alpha 1-glycoprotein, hemopexin, differing significantly in both amino acid and carbohydrate composition from mammalian (beta-glycoprotein) counterparts. Biochemistry 25:6555-6562.}. HPX는 급성단계단백질(acute phase protein)에 속하며 염증이나 스트레스에 의해 이 단백질의 합성이 증가된다 {Tolosano, E., and F. Altruda. 2002. Hemopexin: structure, function, and regulation. DNA and cell biology 21:297-306. doi 10.1089/104454902753759717}. 닭의 혈청에서 발견되는 HPX는 분자량 52 kDa 당단백질(α_1 -glycoprotein)의 일종이다 {Goldfarb, V., R. B. Trimble, M. De Falco, H. H. Liem, S. A. Metcalfe, D. Wellner, and U. Muller-Eberhard. 1986. An avian serum alpha 1-glycoprotein, hemopexin, differing significantly in both amino acid and carbohydrate composition from mammalian (beta-glycoprotein) counterparts. Biochemistry 25:6555-6562.}. 닭에서 HPX는 부화 수일 전부터 측정되기 시작하여 부화 이후 혈장의 그 농도가 급격하게 증가되며 4일령의 농도는 성체(3.5 개월령) 수준의 약 반정도 된다. terpentine의 투여와 같은 스트레스에 의해 혈장의 농도가 급격하게 증가된다 {Grienering, G., T. J. Liang, G. Beuving, V. Goldfarb, S. A. Metcalfe, and U. Muller-Eberhard. 1986. Hemopexin is a developmentally regulated, acute-phase plasma protein in the chicken. The Journal of biological chemistry 261:15719-15724.}. 또한 이와 유사하게 lipopolysaccharide의 복강투여나 인간혈청알부민의 피하투여와 같은 면역도전(immune challenge)에 의해서도 hemopexin 합성의 증가가 보고되었다 {Barnes, D. M., Z. Song, K. C. Klasing, and W. Bottje. 2002. Protein metabolism during an acute phase response in chickens. Amino acids 22:15-26.; Buyse, J., Q. Swennen, T. A. Niewold, K. C. Klasing, G. P. Janssens, M. Baumgartner, and B. M. Goddeeris. 2007. Dietary L-carnitine supplementation enhances the lipopolysaccharide-induced acute phase protein response in broiler chickens. Veterinary immunology and immunopathology 118:154-159. doi 10.1016/j.vetimm.2007.04.014; Buyse, J., Q. Swennen, F. Vandemaele, K. C. Klasing, T. A. Niewold, M. Baumgartner, and B. M. Goddeeris. 2009. Dietary beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation influences performance differently after immunization in broiler chickens. Journal of animal physiology and animal nutrition 93:512-519. doi}. 대장균에 감염된 오리에서 분리된 완전한 길이의 IgY와 짧은 IgY를 감염되지 않은 오리에 정맥 투여했을 때, 혈장 HPX의 농도는 두 항체의 비가 다를 때(즉 100:0 또는 0: 100)는 대장균 단독투여나 항체의 비가 같을 때(즉 50: 50)보다 훨씬 높았다는 것이 관찰되었다 {Humphrey, B. D., C. C. Calvert, and K. C. Klasing. 2004. The ratio of full length IgY to truncated IgY in immune complexes affects macrophage phagocytosis and the acute phase response of mallard ducks (Anas platyrhynchos). Developmental and comparative immunology 28:665-672. doi 10.1016/j.dci.2003.11.003}.

- [0070] 본 연구에서 corticosterone 처리된 산란계(실험구)로부터 생산된 계란의 난백에서 HPX가 유의적 ($P < 0.05$) 으로 낮게 발현되었고 (스팟 번호 22), 반대로 대조구에서는 유의적 ($P < 0.05$) 으로 증가하였다 (스팟 번호 21) 는 것은 다음과 같은 사실을 제시한다. 첫째, 이들 스팟들(스팟 번호 21 및 22)은 다른 기능을 가진 단백질일지 도 모른다. 비록 이 스팟들(스팟 번호 21 및 22)은 MALDI-TOF/TOF 분석 및 bioinformatics를 통하여 HPX로 결정 되었지만 이들 두 스팟들은 corticosterone의 처리에 정반대의 반응을 보였기 때문이다. 둘째, corticosterone 은 난관에서 HPX의 분비를 감소시킨다. 대조구에서 HPX의 미미하지만 유의적인 증가와 대조적으로 corticosterone의 처리는 HPX의 발현을 유의적으로 감소시켰다. 비록 본 연구에서는 혈중 HPX의 농도는 측정되 지 않았지만, 문헌적인 증거는 혈중 HPX의 농도는 염증과 같은 급성 스트레스에 의해 증가한다는 것을 고려한다 면 난백에서의 HPX의 발현감소는 주목할만한 변화이다.
- [0071] Ovoidinhibitor (스팟 번호 4, 5, 6, 7, 8 및 11)는 난백에서 발견되는 4개의 단백질가수분해효소 억제제 (또는 항단백질가수분해효소 라고도 불림) 중의 하나로 분자량이 48.6 - 49 kDa 이며 {Saxena, I., and S. Tayyab. 1997. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cell Mol Life Sci* 53:13-23.}, 이 단백질의 유전자는 조류의 간, 난관 및 난황에서 강하게 발현되며 {Bourin, M., J. Gautron, M. Berges, S. Attucci, G. Le Blay, V. Labas, Y. Nys, and S. Rehaute-Godbert. 2011. Antimicrobial potential of egg yolk ovoidinhibitor, a multidomain Kazal-like inhibitor of chicken egg. *Journal of agricultural and food chemistry* 59:12368-12374. doi 10.1021/jf203339t; Yen, C. F., E. C. Lin, Y. H. Wang, P. H. Wang, H. W. Lin, J. C. Hsu, L. S. Wu, Y. N. Jiang, and S. T. Ding. 2009. Abundantly expressed hepatic genes and their differential expression in liver of prelaying and laying geese. *Poult Sci* 88:1955-1962.}, 닭에서 는 산란중기 보다 산란 개시 전에, 그러나 거위에서는 산란개시 전보다 산란 중에 더 강하게 발현되었다 {Bourin, M., J. Gautron, M. Berges, S. Attucci, G. Le Blay, V. Labas, Y. Nys, and S. Rehaute-Godbert. 2011. Antimicrobial potential of egg yolk ovoidinhibitor, a multidomain Kazal-like inhibitor of chicken egg. *Journal of agricultural and food chemistry* 59:12368-12374.; Yen, C. F., E. C. Lin, Y. H. Wang, P. H. Wang, H. W. Lin, J. C. Hsu, L. S. Wu, Y. N. Jiang, and S. T. Ding. 2009. Abundantly expressed hepatic genes and their differential expression in liver of prelaying and laying geese. *Poult Sci* 88:1955-1962.}. 또한 Ovoidinhibitor는 F-낭에서도 발현되는 것이 보고되었다 {Moore, R. W., B. M. Hargis, T. E. Porter, D. Y. Caldwell, C. M. Oubre, F. Vandesande, and L. R. Berghman. 2004. Ovoidinhibitor in the chicken bursa of Fabricius: identification, isolation, and localization. *Cell and tissue research* 317:247-251. doi 10.1007/s00441-004-0910-x}. 난단백질에서 ovoidinhibitor의 농도는 총단백질의 약 1.5%이며 {Kinoshita, K., T. Shimogiri, S. Okamoto, K. Yoshizawa, H. Mannen, H. R. Ibrahim, H. H. Cheng, and Y. Maeda. 2004. Linkage mapping of chicken ovoidinhibitor and ovomucoid genes to chromosome 13. *Animal genetics* 35:356-358. doi 10.1111/j.1365-2052.2004.01159.x}, trypsin, chymotrypsin elastase 등과 같은 serine 단백질가수분해효소들을 억제한다 {Feeney, R. E., F. C. Stevens, and D. T. Osuga. 1963. The specificities of chicken ovomucoid and ovoidinhibitor. *The Journal of biological chemistry* 238:1415-1418.; Rehaute, S. 2007. Antiproteases. Pages 85-92 in *Bioactive Egg Compounds*. R. Huopalahti, R. L. M. Anton, and R. Schade eds. Springer Berlin Heidelberg.}. 이 단백질의 합성과 분비는 estrogen과 progesterone에 의해 제어된다 {Saxena, I., and S. Tayyab. 1997. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cell Mol Life Sci* 53:13-23.; Zhu, Y., M. Wang, H. Lin, Z. Li, and J. Luo. 2001. Identification of estrogen-responsive genes in chick liver. *Cell and tissue research* 305:357-363.}. 본 연구에서 corticosterone 처리된 산란계(실험구)의 계란에서 ovoidinhibitor의 발현이 증가하였다 (스팟 번호 6, 7, 8 및 11) ($P < 0.07$). 그러나 대조구의 산란계에서는 ovoidinhibitor로 추정되는 스팟(번호 9)은 적은 차이기 는 하지만 유의적으로 감소하였고, 또 다른 단백질 스팟(번호 11)의 발현은 감소하는 경향을 보였다 ($P < 0.07$). 이러한 결과는 스트레스가 난백에서 ovoidinhibitor의 발현을 증가시킨다는 것을 시사한다.
- [0072] TENP 단백질은 처음에 부화중인 닭 배아의 망막과 뇌에만 일시적으로 발현되고, 다른 기관 (즉 심장, 간 및 신 장)에는 발현되지 않는 것으로 미루어 배아의 초기 신경발달에 관여하는 것으로 추정되었다 {Yan, R. T., and S. Z. Wang. 1998. Identification and characterization of tenp, a gene transiently expressed before overt cell differentiation during neurogenesis. *Journal of neurobiology* 34:319-328.}. 그러나 TENP 단백 질이 무정난의 난백 {Guerin-Dubiard, C., M. Pasco, D. Molle, C. Desert, T. Croguennec, and F. Nau. 2006. Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of agricultural and food chemistry* 54:3901-3910.; Mann, K. 2007. The chicken egg white proteome. *Proteomics* 7:3558-3568.; D'Ambrosio, C., S. Arena, A. Scaloni, L. Guerrier, E. Boschetti, M. E. Mendieta, A. Citterio, and P. G. Righetti. 2008. Exploring

the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. *J Proteome Res* 7:3461-3474.} 과 난황 {Mann, K., and M. Mann. 2008. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics* 8:178-191.; Farinazzo, A., U. Restuccia, A. Bachi, L. Guerrier, F. Fortis, E. Boschetti, E. Fasoli, A. Citterio, and P. G. Righetti. 2009. Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of chromatography. A* 1216:1241-1252.} 에도 존재하는 것이 확인됨에 따라 이러한 추정은 사실이 아님이 밝혀졌다. 최근에는 타조의 유정란 및 무정란 난단백에서도 TENP는 발견되었다 {Maehashi, K., M. Matano, T. Irisawa, M. Uchino, Y. Itagaki, K. Takano, Y. Kashiwagi, and T. Watanabe. 2010. Primary Structure of Potential Allergenic Proteins in Emu (*Dromaius novaehollandiae*) Egg White. *Journal of agricultural and food chemistry*. doi 10.1021/jf103239v; Takeuchi, J., K. Maehashi, Y. Yasutake, Y. Muramatsu, K. Miyata, T. Watanabe, and T. Nagashima. 2012. Properties of emu (*Dromaius novaehollandiae*) albumen proteins. *Food Research International* 49:567-571. doi 10.1016/j.foodres.2012.07.045}. TENP는 건조 난백 단백질의 0.1~0.5%를 차지하며 {Mann, K. 2007. The chicken egg white proteome. *Proteomics* 7:3558-3568.} 분자량이 약 47-50 kDa 인 단백질이다 {Guerin-Dubiard, C., M. Pasco, D. Molle, C. Desert, T. Croguennec, and F. Nau. 2006. Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of agricultural and food chemistry* 54:3901-3910.}. 이 단백질의 기능은 여전히 불명하지만 BPI (Bactericidal Permeability-Increasing Protein)가족에 속하는 것으로 미루어 항박테리아 활성을 가지는 것을 추정된다 {Guerin-Dubiard, C., M. Pasco, D. Molle, C. Desert, T. Croguennec, and F. Nau. 2006. Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of agricultural and food chemistry* 54:3901-3910.}. TENP (스팟 번호 28)은 스트레스 받은 산란계(실험구)에서 유의적으로 감소하였지만 대조구에서는 이 단백질(스팟 번호 28)의 발현이 유의적으로 증가하였다. TENP 또는 OVAX로 분석된 다른 스팟(번호 18)에서는 스트레스 후에 난백에서의 발현이 유의적으로 증가되었지만, TENP 또는 IGY-FCU3-4로 분석된 또 다른 스팟(번호 27)은 스트레스 후에 작지만 유의적으로 감소하였다. 그러나 대조구의 산란계에서 유래된 난백에서는 이들(스팟 번호 18 및 27)의 변화는 발견되지 않았다.

[0073]

Ovalbumin-related protein X (OVAX) (스팟 번호 12)은 Gene X protein이라고도 하고 232개의 아미노산으로 구성되어 이 단백질의 유전자는 SERPINB14C로 명명되어 있다 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P01013>). Serpin 명명법에 따르면 ovalbumin, gene Y 및 gene X은 각각 serpinb14, serpinb14b 및 serpinb14c이 된다 {Benarafa, C., and E. Remold-O'Donnell. 2005. The ovalbumin serpins revisited: perspective from the chicken genome of clade B serpin evolution in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11367-11372. doi 10.1073/pnas.0502934102}. OVAX는 난백단백질에서 존재하며 ovalbumin과 77% 상동성을 가진다 {Poirier, J. C., V. Herve-Grepinet, Y. Nys, and S. Rehault-Godbert. Year. Development of an ELISA for quantifying egg white ovalbumin-related protein X (OVAX) [Conference poster]. Paris.}. 최근 연구에서 OVAX는 "ovalbumin-related protein Y 와 유사(similar to Ovalbumin-related protein Y; IPI00585021)" 하며 {Mann, K. 2007. The chicken egg white proteome. *Proteomics* 7:3558-3568.; D'Ambrosio, C., S. Arena, A. Scaloni, L. Guerrier, E. Boschetti, M. E. Mendieta, A. Citterio, and P. G. Righetti. 2008. Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. *J Proteome Res* 7:3461-3474.}, 후자는 알려진 cDNA 에 유래된 Ovalbumin-related protein X 완전한 서열을 포함하고 있다 {Mann, K. 2007. The chicken egg white proteome. *Proteomics* 7:3558-3568.}. 또한 ovalbumin-related protein Y는 난황에서도 존재한다 {Farinazzo, A., U. Restuccia, A. Bachi, L. Guerrier, F. Fortis, E. Boschetti, E. Fasoli, A. Citterio, and P. G. Righetti. 2009. Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of chromatography. A* 1216:1241-1252.}. 난백에서 OVAX의 평균함량은 약 2.4 mg/mL이며 항미생물활성을 보인다 {Poirier, J. C., V. Herve-Grepinet, Y. Nys, and S. Rehault-Godbert. Year. Development of an ELISA for quantifying egg white ovalbumin-related protein X (OVAX) [Conference poster]. Paris.}. 본 연구에서 스트레스 받은 산란계의 난백에서 OVAX의 발현이 유의적으로 증가되었지만(스팟 번호 12, 18 및 24) 대조구 산란계의 난백에서는 이러한 변화가 관찰되지 않았다. OVAX 또는 TENP로 분석된 또 다른 스팟(번호 18)에서도 스트레스 후에 난백에서의 발현이 유의적으로 증가되었다.

[0074]

지방산은 에너지, 필수지방산을 제공하는 영양소로서 뿐만 아니라, 세포막의 구성소, 및 대사조절을 위한 신호 전달의 매개체로서 중요하다 {Hotamisligil, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.; Kalish, B. T., E. M. Fallon, and M. Puder. 2012. A tutorial on fatty acid biology. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* 36:380-388. doi 10.1177/01486071122449650; Saltiel, A. R.,

and C. R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.}. 지방산은 소수성이기 때문에 생체액에서 용해되고 대사를 위해 이동하기 위해서는 유리 지방산의 상태로 존재하기보다는 지방산결합단백질들과 결합된 상태로 존재할 것으로 생각되고 있다. Extracellular fatty acid-binding protein (Ex-FABP) (스팟 번호 29)은 닭에서 처음으로 발견되었으며, protein Ch21, quiescence-specific protein 또는 p20K로 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P21760>) 또는 chondrogenesis-associated lipocalin로 불리며 {Cancedda, F. D., M. Malpeli, C. Gentili, V. Di Marzo, P. Bet, M. Carlevaro, S. Cermelli, and R. Cancedda. 1996. The developmentally regulated avian Ch21 lipocalin is an extracellular fatty acid-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 271:20163-20169.}, chondrogenesis-associated lipocalin의 superfamily에 속한다. 이 구성원들은 분자량이 약 20 kDa 이며 20-30% 상동성을 가진다(Larsen et al., 1999). 이 단백질은 발달중인 닭 배아의 뼈와 연골에서 처음으로 동정되었으며 {Cancedda, F. D., B. Dozin, F. Rossi, F. Molina, R. Cancedda, A. Negri, and S. Ronchi. 1990. The Ch21 protein, developmentally regulated in chick embryo, belongs to the superfamily of lipophilic molecule carrier proteins. *The Journal of biological chemistry* 265:19060-19064.}, 이후 근섬유와 혈액의 과립성백혈구 (granulocytes)에서도 발견되었다 {Descalzi Cancedda, F., B. Dozin, B. Zerega, S. Cermelli, and R. Cancedda. 2000. Ex-FABP: a fatty acid binding lipocalin developmentally regulated in chicken endochondral bone formation and myogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1482:127-135.}. Ex-FABP는 세포외액과 혈청에서 긴 긴사슬 불포화지방산지방산 (짧은 사슬지방산에는 결합하지 않음)에 결합하여 운반할 수 있다 {Cancedda, F. D., M. Malpeli, C. Gentili, V. Di Marzo, P. Bet, M. Carlevaro, S. Cermelli, and R. Cancedda. 1996. The developmentally regulated avian Ch21 lipocalin is an extracellular fatty acid-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 271:20163-20169.}. Ex-FABP는 심장의 발달, 지방산 운반 및 지질대사 등에 관여하며 지방축적에서 오는 지질독성으로부터 세포를 보호하는 세포생존단백질로 작용할 가능성이 있다 {Gentili, C., G. Tutolo, B. Zerega, E. Di Marco, R. Cancedda, and F. D. Cancedda. 2005. Acute phase lipocalin Ex-FABP is involved in heart development and cell survival. *Journal of cellular physiology* 202:683-689. doi 10.1002/jcp.20165}. Ex-FABP는 닭의 간에서 발현되며 염증유발인자 (LPS; IL6)에 의해 발현이 증가되고 이러한 발현은 항염증인자의 처리에 의해 감소되어 급성단계단백질과 같은 역할을 한다 {Cermelli, S., B. Zerega, M. Carlevaro, C. Gentili, B. Thorp, C. Farquharson, R. Cancedda, and F. D. Cancedda. 2000. Extracellular fatty acid binding protein (Ex-FABP) modulation by inflammatory agents: "physiological" acute phase response in endochondral bone formation. *European journal of cell biology* 79:155-164.; Di Marco, E., N. Sessarego, B. Zerega, R. Cancedda, and F. D. Cancedda. 2003. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by ExFABP gene targeting. *Journal of cellular physiology* 196:464-473. doi 10.1002/jcp.10310}. Ex-FABP의 발현은 Ex-FABP에 대한 항체 처리의 의해 감소되며, Ex-FABP의 유전자 발현을 억제했을 때 세포사가 증가하였고, 세포활성이 감소되었으며 분화와 증식이 억제되었다 {Di Marco, E., N. Sessarego, B. Zerega, R. Cancedda, and F. D. Cancedda. 2003. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by ExFABP gene targeting. *Journal of cellular physiology* 196:464-473. doi 10.1002/jcp.10310}. 따라서 Ex-FABP는 기본적인 구성생존단백질 (constitutive survival protein)로서의 역할이 제안되었다 {Di Marco, E., N. Sessarego, B. Zerega, R. Cancedda, and F. D. Cancedda. 2003. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by ExFABP gene targeting. *Journal of cellular physiology* 196:464-473. doi 10.1002/jcp.10310}. SNP분석을 통해서 Ex-FABP는 닭에서 복부지방증량과 관계 있으며 복부지방특성을 조절하는 주된 유전자로 제안되었다 {Qiu, X. M., N. Li, X. M. Deng, Z. X. Lian, Q. G. Wang, X. L. Wang, and C. X. Wu. 2005. Study of Ex-FABP as a main candidate gene on abdominal fat traits in chicken. *Prog Biochem Biophys* 32:429-434.}. 3 주령의 백색레그혼을 E. coli로 감염 처리한 연구에서 Ex-FABP의 유전자발현은 대조구에 비해 폐와 간과 비장에서 유의적으로 증가하였고 특히 폐와 간에서의 증가는 현저하였다 {Garenaux, A., S. Houle, B. Folch, G. Dallaire, M. Truesdell, F. Lepine, N. Doucet, and C. M. Dozois. 2012. Avian lipocalin expression in chickens following Escherichia coli infection and inhibition of avian pathogenic Escherichia coli growth by Ex-FABP. *Veterinary immunology and immunopathology*. doi 10.1016/j.vetimm.2012.09.018}. 유사한 연구 결과는 다른 연구자들에 의해서도 보고되었다 {Cermelli, S., B. Zerega, M. Carlevaro, C. Gentili, B. Thorp, C. Farquharson, R. Cancedda, and F. D. Cancedda. 2000. Extracellular fatty acid binding protein (Ex-FABP) modulation by inflammatory agents: "physiological" acute phase response in endochondral bone formation. *European journal of cell biology* 79:155-164.; Di Marco, E., N. Sessarego, B. Zerega, R. Cancedda, and F. D. Cancedda. 2003. Inhibition of cell proliferation and induction of

apoptosis by ExFABP gene targeting. *Journal of cellular physiology* 196:464-473. doi 10.1002/jcp.10310}. 또한 Ex-FABP는 철의 이용이 제한되는 in vitro 연구 조건에서 E. coli의 성장을 억제하였다 {Garenaux, A., S. Houle, B. Folch, G. Dallaire, M. Truesdell, F. Lepine, N. Doucet, and C. M. Dozois. 2012. Avian lipocalin expression in chickens following Escherichia coli infection and inhibition of avian pathogenic Escherichia coli growth by Ex-FABP. *Veterinary immunology and immunopathology*. doi 10.1016/j.vetimm.2012.09.018}.

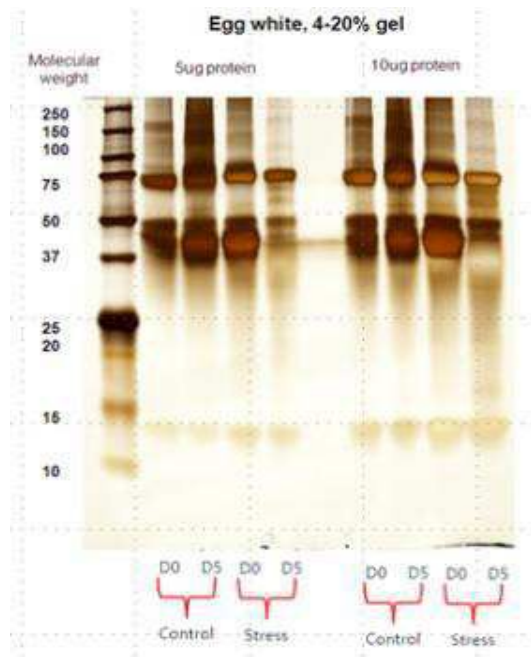
[0075] 본 연구에서는, corticosterone으로 처리된 산란계(실험구)로부터 생산된 계란의 난백에서 Ex-FABP의 발현이 유의적 ($P < 0.01$) 으로 감소하였지만 대조구에서는 그러한 변화가 검출되지 않았다. 비록 난백에서 Ex-FABP의 발현과 폐나 간에서 Ex-FABP의 유전자발현과의 사이에 인과관계가 연구되지는 않았지만, 본 연구의 결과는 감염된 닭의 기관 (예를 들면, 폐, 간, 및 비장)에서 Ex-FABP 유전자의 발현과 난백에서의 Ex-FABP의 발현은 반비례할 수 있다는 것을 시사한다. 다른 관점에서 현재의 결과는 스트레스에 의해 난관에서 Ex-FABP 유전자의 발현이 감소되고 그 결과 난백으로의 Ex-FABP의 분비가 감소되었을 수 있음을 시사한다. 이러한 관점에서 계란의 보관 온도가 증가함에 따라 Ex-FABP의 전구체의 함량이 감소한다는 최근의 proteomics 연구 결과 {Qiu, N., M. Ma, L. Zhao, W. Liu, Y. Li, and Y. Mine. 2012. Comparative Proteomic Analysis of Egg White Proteins under Various Storage Temperatures. *Journal of agricultural and food chemistry* 60:7746-7753. doi 10.1021/jf302100m}는 Ex-FABP가 난질의 평가에 사용될 수 있음을 시사한다.

[0076] Chondrogenesis associated lipocalin (CAL)은 Lipocalin-type prostaglandin D synthase 으로서도 보고되었고, 닭에서 처음으로 발견되었다. 유전자의 L-PGDS 이며 이 단백질은 185개의 아미노산서열을 가지며, calycin superfamily/ Lipocalin family에 속한다 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8QFM7>). Lipocalin 단백질가족은 Ex-FABP, chondrogenesis-related lipocalin β (CAL β) 및 chondrogenesis-related lipocalin γ (CAL γ)를 포함하며 {Pagano, A., P. Giannoni, A. Zambotti, N. Randazzo, B. Zerega, R. Cancedda, and B. Dozin. 2002. CALbeta, a novel lipocalin associated with chondrogenesis and inflammation. *European journal of cell biology* 81:264-272.; Pagano, A., R. Crooijmans, M. Groenen, N. Randazzo, B. Zerega, R. Cancedda, and B. Dozin. 2003. A chondrogenesis-related lipocalin cluster includes a third new gene, CALgamma. *Gene* 305:185-194.}, 하나의 유전체 다발에서 각각의 유전자로 나누어진다. chondrogenesis associated lipocalin 은 연골내골화 동안에 연골세포 성숙과정의 비대화 단계에서 특이적으로 발현되며, 면역자극으로 유도될 수 있고 간과 뇌에서 발현된다 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AAL99254>). Pagano 등은 닭 배아의 CAL β 를 발견하였다 {Pagano, A., P. Giannoni, A. Zambotti, N. Randazzo, B. Zerega, R. Cancedda, and B. Dozin. 2002. CALbeta, a novel lipocalin associated with chondrogenesis and inflammation. *European journal of cell biology* 81:264-272.}. CAL β 는 닭 배아의 심장에서 높게 발현되며 좀 덜한 정도로 골격근, 폐 및 간에서 발현되며 위, 뇌 및 피부에서 가장 낮게 발현된다. 또한 CAL β 는 연골의 생성 동안에 분화가 끝난 세포에서 거의 발현되지 않았지만 Ex-FABP는 약하게 발현되었다. 반면에 비대화 단계에서 CAL β 는 약하게 발현되었지만 Ex-FABP는 강하게 발현되었다. LPS 처리에 대해 분화가 끝난 연골세포에서 Ex-FABP는 강하게 발현되었고 비대화단계에서 더 강하게 발현되었지만 전자에서 CAL β 는 약하게 후자에서는 좀더 강하게 발현되었다 (Ex-FABP의 약 반정도) {Pagano, A., P. Giannoni, A. Zambotti, N. Randazzo, B. Zerega, R. Cancedda, and B. Dozin. 2002. CALbeta, a novel lipocalin associated with chondrogenesis and inflammation. *European journal of cell biology* 81:264-272.}. 이러한 사실은 염증자극에 대한 Ex-FABP와 CAL β 의 반응이 다르다는 것을 시사한다. CAL γ 은 닭 배아의 간, 뇌 및 뼈에서 높은 농도로 발현되며 닭 배아의 뼈형성에 있어서 Ex-FABP와 상승작용하는 것으로 알려져 있다 {Pagano, A., R. Crooijmans, M. Groenen, N. Randazzo, B. Zerega, R. Cancedda, and B. Dozin. 2003. A chondrogenesis-related lipocalin cluster includes a third new gene, CALgamma. *Gene* 305:185-194.}. 이 단백질의 존재는 무정란의 난백에서 처음으로 보고되었다 {Guerin-Dubiard, C., M. Pasco, D. Molle, C. Desert, T. Croguennec, and F. Nau. 2006. Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of agricultural and food chemistry* 54:3901-3910.}. 한편, 3주령의 백색레그혼을 E. coli로 감염 처리한 연구에서 CAL β 와 CAL γ 의 유전자발현은 대조구에 비해 폐와 간과 비장에서 유의적으로 증가하였지만 그들의 발현 양상은 조직에 따라 달랐다 {Garenaux, A., S. Houle, B. Folch, G. Dallaire, M. Truesdell, F. Lepine, N. Doucet, and C. M. Dozois. 2012. Avian lipocalin expression in chickens following Escherichia coli infection and inhibition of avian pathogenic Escherichia coli growth by Ex-FABP. *Veterinary immunology and immunopathology*. doi 10.1016/j.vetimm.2012.09.018}. 즉, CAL β 는 폐와 간에서 15배 이상 증가하였지만 비장에서는 변화가 없었다. CAL γ 발현의 변화는 폐에서는 발견되지 않았지만 폐와 간에서 적어도 4.8배 이상 증가하였다.

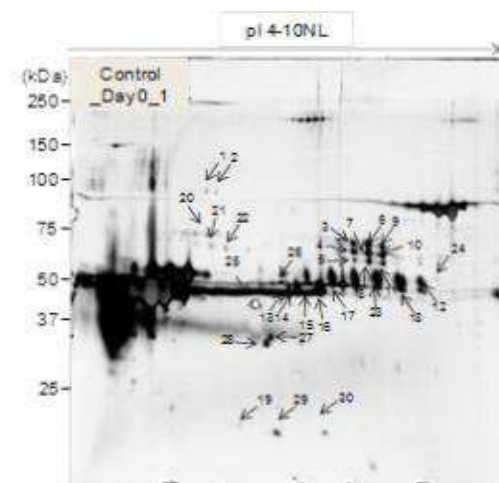
- [0077] 본 연구에서 corticosterone 처리된 산란계(실험구)의 난백에서 CAL로 추정되는 단백질 (스팟 번호 19)의 발현이 유의적 ($P < 0.05$) 으로 감소하였지만 대조구에서는 오히려 증가하는 경향을 보였다 ($P < 0.09$). 그러나 또 다른 단백질 스팟 (번호 30)에서는 대조구 및 실험구 공히 변화가 없었다. 이러한 결과는 스트레스가 닭 배아의 뼈 형성에 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사한다. 그러나 본 연구에서는 이들 스팟들(번호 19 및 30)속에 포함된 미량의 단백질을 검출할 수 있는 분석기기의 검출한계 때문에 단백질이 동정되지 못했으며 따라서 이들이 CAL β 인지 혹은 CAL γ 인지 검정되지 않았다.
- [0078] 신선란에서 난황 단백질은 총난황 무게의 약 16%를 차지한다. 난황의 Livetin 분획은 난황단백질의 일종이며 α -, β - 및 γ - livetin을 포함한다. 난황의 α -livetinin과 닭 혈청 알부민은 같은 것이며, β - livetin은 분자량 45 kDa의 α -2-glycoprotein으로 알려져 있다. 세 번째 단백질 γ - livetin 은 IgY이며 분자량이 약 167 kDa로 알려져 있다. 조류의 IgY는 포유류와의 IgG와 IgE의 선조와 밀접하게 연계되어 있다 {Taylor, A. I., S. M. Fabiane, B. J. Sutton, and R. A. Calvert. 2009. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry* 48:558-562. doi 10.1021/bi8019993}. IgY는 모체에서 계란으로 부여되는 피동면역의 형태로, 혈액에서 난황으로 수용체에 의해 운송되며 이 양은 혈중 난황의 농도에 연계되어 있는 듯하다. IgY의 구조 중에서 정상적인 Fc 부분과 연결지역은 IgY가 혈청에서 난황으로 수송되는 데 필수불가결하다. 산란계의 정맥에 투여된 human IgG가 난황에서 최대로 분비되는 데는 약 5 일정도 소요된다 {Mohammed, S. M., S. Morrison, L. Wims, K. R. Trinh, A. G. Wildeman, J. Bonselaar, and R. J. Etches. 1998. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology* 4:115-125.}. 이 저자들은 난백에서 IgG를 검출하지 못했지만 본 연구에서는 IGY-FCU3-4 단백질의 존재가 난백에서 확인되었다. 닭에서 IGY-FCU3-4의 조각은 두 개의 사슬 (A 및 B)로 구성되어 있으며 이들은 각각 231개의 아미노산을 가진 단백질이다 (PDB: 2W59_A & 2W59_B) {Taylor, A. I., S. M. Fabiane, B. J. Sutton, and R. A. Calvert. 2009. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry* 48:558-562. doi 10.1021/bi8019993}. 따라서 난백에서 IGY-FCU3-4의 발현이 적다는 것은, 비록 본 연구에서 난황에서의 IgY 함량이 동정되지는 않았지만 스트레스 받은 닭의 계란에서 면역항체의 함량이 적을 수 있다는 것을 뜻하며 종란의 경우 부화되었을 때 질병에 저항성이 약한 병아리 생산의 원인이 될 수 있다.
- [0079] 본 연구의 결과는 corticosterone으로 처리 (스트레스)가 난 단백질의 발현에 영향을 미칠 수 있다는 증거를 처음으로 제시한다. 계란의 질은 다양한 요인에 의해 영향 받을 수 있다. 본 연구의 결과는 계란의 보관조건 {Qiu, N., M. Ma, L. Zhao, W. Liu, Y. Li, and Y. Mine. 2012. Comparative Proteomic Analysis of Egg White Proteins under Various Storage Temperatures. *Journal of agricultural and food chemistry* 60:7746-7753. doi 10.1021/jf302100m}, 사료와 같은 영양적인 요인 {Kirunda, D. F., S. E. Scheideler, and S. R. McKee. 2001. The efficacy of vitamin E (DL-alpha-tocopheryl acetate) supplementation in hen diets to alleviate egg quality deterioration associated with high temperature exposure. *Poult Sci* 80:1378-1383.} 뿐만 아니라 그 외의 사양조건, 즉 환경 스트레스가 직접 난 단백질의 발현에 영향을 미칠 수 있다는 것을 제시한다. 이것은 다시 말해서 환경에 의해 난 단백질을 구성하는 개별 단백질의 함량이 변할 수 있다는 것을 의미하며 따라서 환경 조건이 난의 품질에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0080] 이러한 단백질은 난질의 평가에 이용될 수 있을 뿐만 아니라 나아가 산란 당시 산란계의 스트레스 상태를 추정하는 지표로 이용될 수 있다. 따라서 계란의 난 단백질을 검정함으로써 사후에 사육단계의 환경에 대한 동물복지를 추정할 수 있는 표식으로 활용될 수 있다.
- [0081] 따라서, 본 발명의 난 단백질은 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 바이오마커 단백질로서 활용될 수 있다.

도면

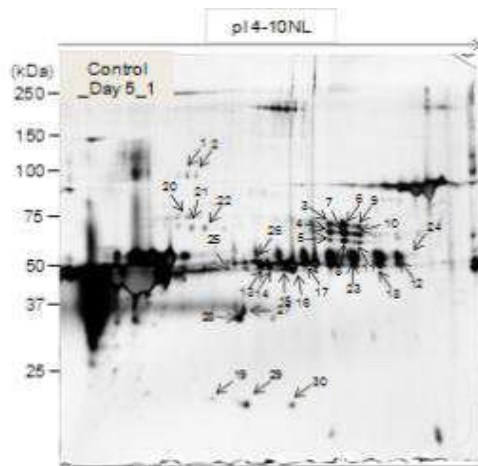
도면1



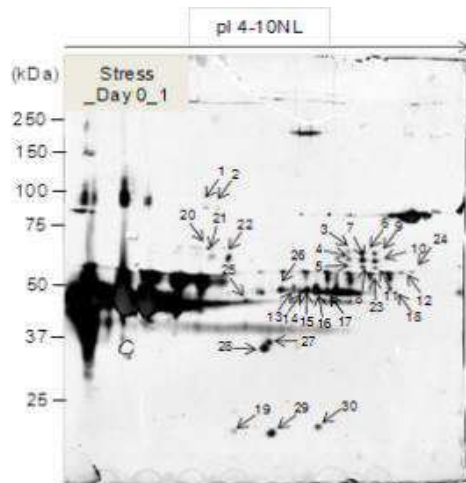
도면2



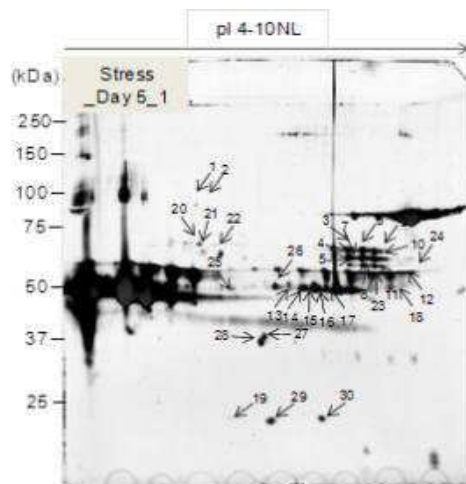
도면3



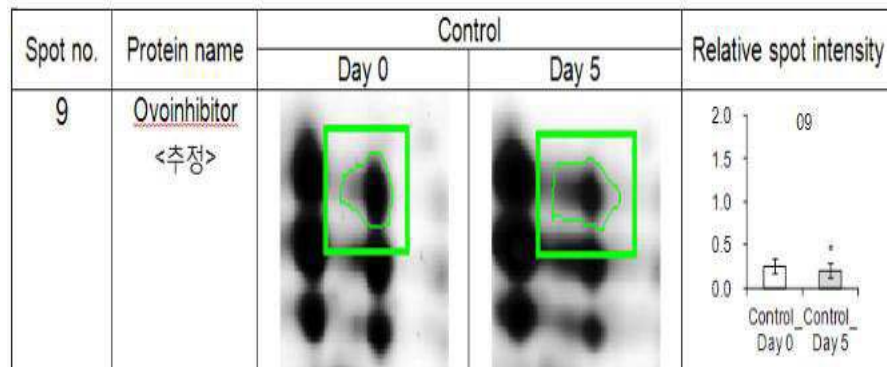
도면4



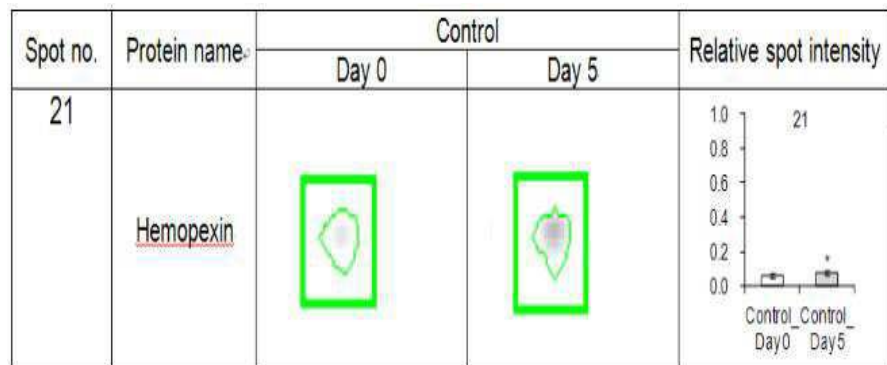
도면5



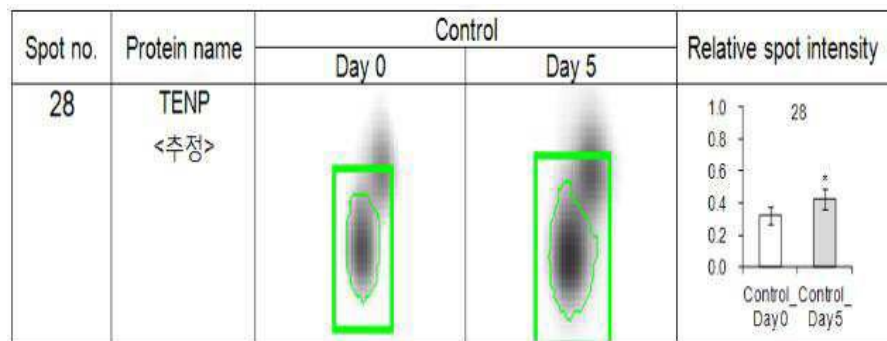
도면6



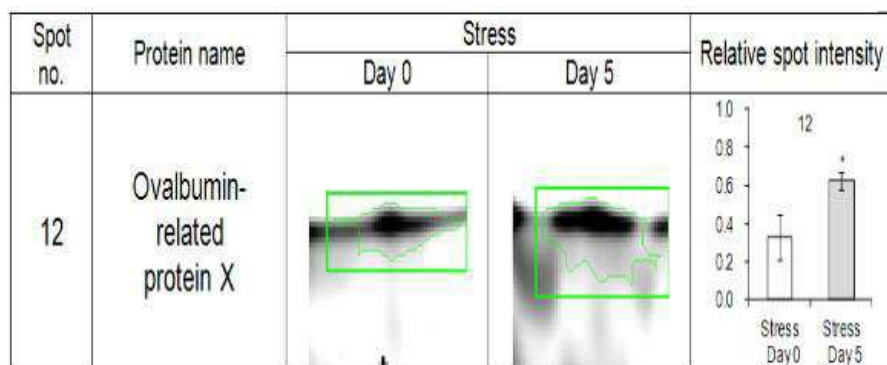
도면7



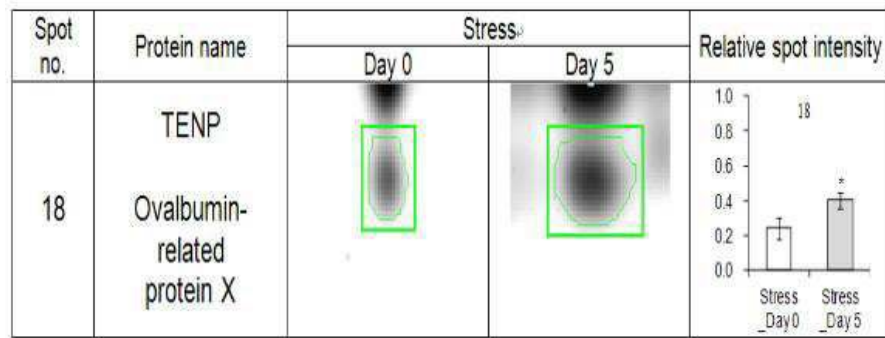
도면8



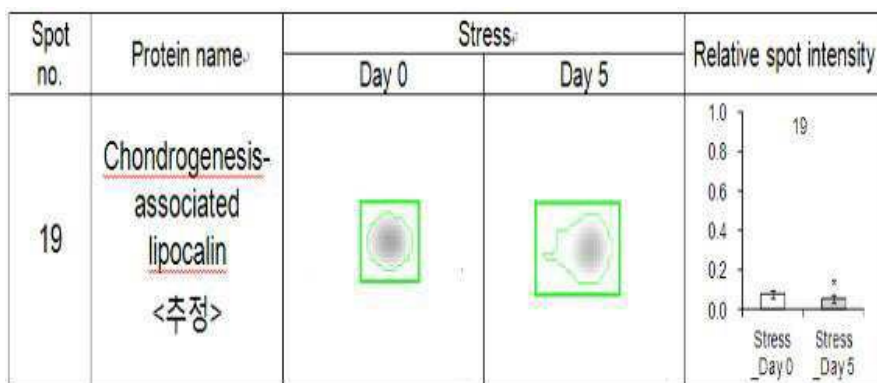
도면9



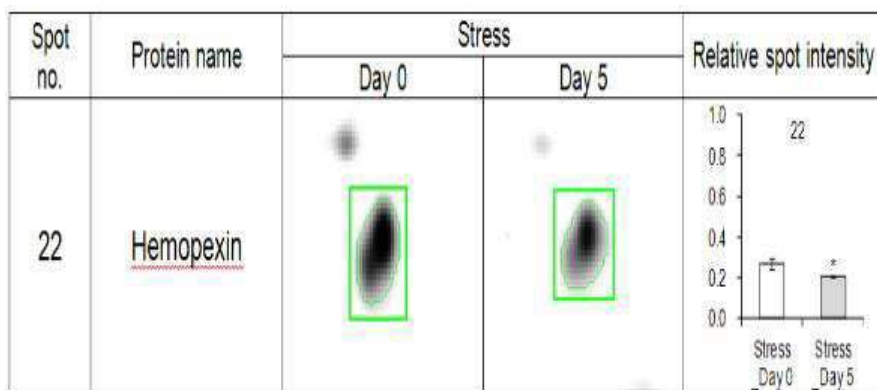
도면10



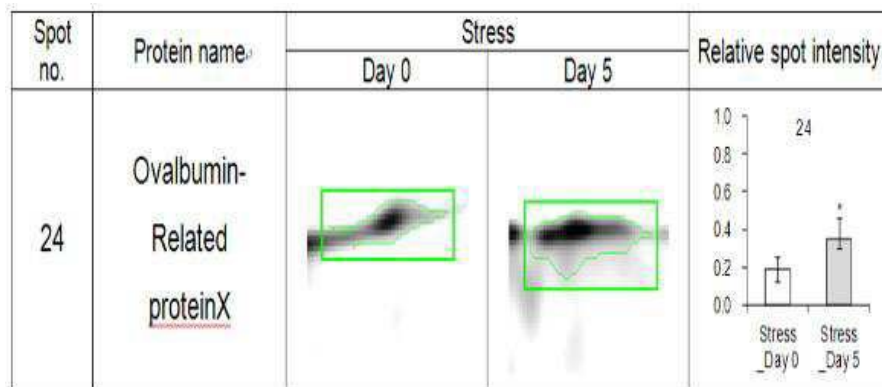
도면11



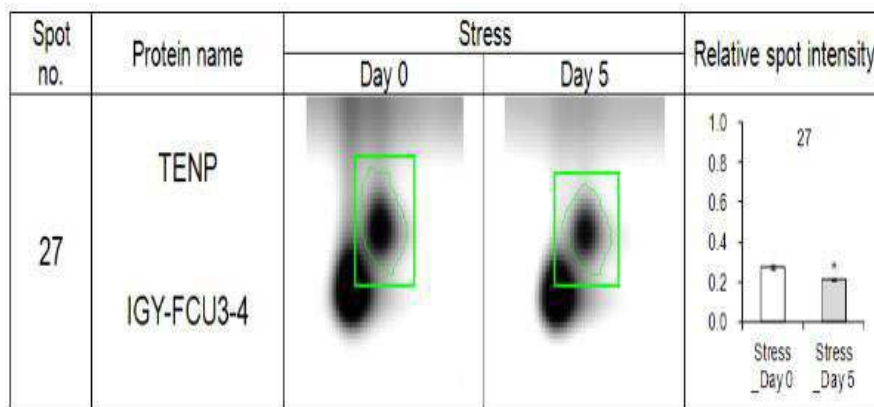
도면12



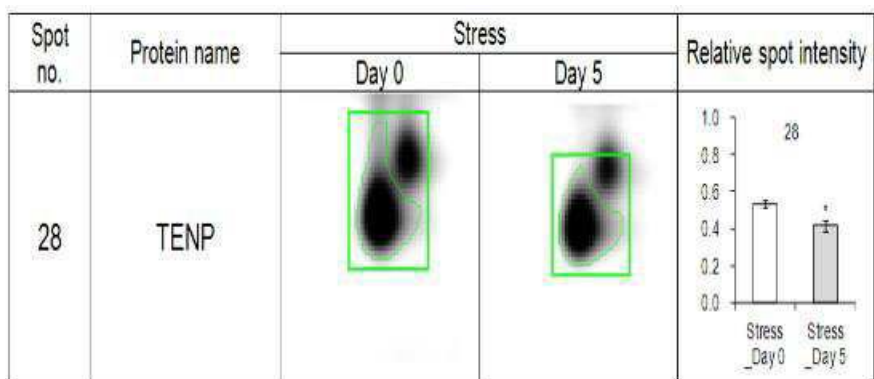
도면13



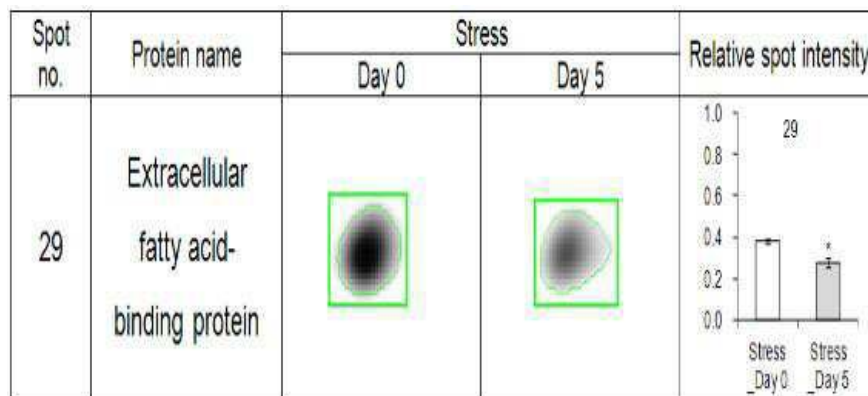
도면14



도면15



도면16



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Biomarker protein specific for environmental stress of poultry

<130> P12-0044

<160> 6

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 472

<212> PRT

<213> Ovoinhibitor

<400> 1

Met Arg Thr Ala Arg Gln Phe Val Gln Val Ala Leu Ala Leu Cys Cys

1 5 10 15

Phe Ala Asp Ile Ala Phe Gly Ile Glu Val Asn Cys Ser Leu Tyr Ala

20 25 30

Ser Gly Ile Gly Lys Asp Gly Thr Ser Trp Val Ala Cys Pro Arg Asn

35 40 45

Leu Lys Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Glu Cys

50 55 60

Gly Ile Cys Leu Tyr Asn Arg Glu His Gly Ala Asn Val Glu Lys Glu

65 70 75 80

Tyr Asp Gly Glu Cys Arg Pro Lys His Val Met Ile Asp Cys Ser Pro

85 90 95

Tyr Leu Gln Val Val Arg Asp Gly Asn Thr Met Val Ala Cys Pro Arg

100 105 110

Ile Leu Lys Pro Val Cys Gly Ser Asp Ser Phe Thr Tyr Asp Asn Glu

115 120 125

Cys Gly Ile Cys Ala Tyr Asn Ala Glu His His Thr Asn Ile Ser Lys

130 135 140

Leu His Asp Gly Glu Cys Lys Leu Glu Ile Gly Ser Val Asp Cys Ser

145 150 155 160

Lys Tyr Pro Ser Thr Val Ser Lys Asp Gly Arg Thr Leu Val Ala Cys

165 170 175

Pro Arg Ile Leu Ser Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Phe Thr Tyr Asp

180 185 190

Asn Glu Cys Gly Ile Cys Ala His Asn Ala Glu Gln Arg Thr His Val

195 200 205

Ser Lys Lys His Asp Gly Lys Cys Arg Gln Glu Ile Pro Glu Ile Asp

210 215 220

Cys Asp Gln Tyr Pro Thr Arg Lys Thr Thr Gly Gly Lys Leu Leu Val

225 230 235 240

Arg Cys Pro Arg Ile Leu Leu Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Phe Thr

245 250 255

Tyr Asp Asn Glu Cys Gly Ile Cys Ala His Asn Ala Gln His Gly Thr

260 265 270

Glu Val Lys Lys Ser His Asp Gly Arg Cys Lys Glu Arg Ser Thr Pro

275 280 285

Leu Asp Cys Thr Gln Tyr Leu Ser Asn Thr Gln Asn Gly Glu Ala Ile

290 295 300

Thr Ala Cys Pro Phe Ile Leu Gln Glu Val Cys Gly Thr Asp Gly Val

305 310 315 320

Thr Tyr Ser Asn Asp Cys Ser Leu Cys Ala His Asn Ile Glu Leu Gly

325 330 335

Thr Ser Val Ala Lys Lys His Asp Gly Arg Cys Arg Glu Glu Val Pro

340 345 350
 Glu Leu Asp Cys Ser Lys Tyr Lys Thr Ser Thr Leu Lys Asp Gly Arg
 355 360 365
 Gln Val Val Ala Cys Thr Met Ile Tyr Asp Pro Val Cys Ala Thr Asn
 370 375 380
 Gly Val Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Thr Leu Cys Ala His Asn Leu Glu

 385 390 395 400
 Gln Arg Thr Asn Leu Gly Lys Arg Lys Asn Gly Arg Cys Glu Glu Asp
 405 410 415
 Ile Thr Lys Glu His Cys Arg Glu Phe Gln Lys Val Ser Pro Ile Cys
 420 425 430
 Thr Met Glu Tyr Val Pro His Cys Gly Ser Asp Gly Val Thr Tyr Ser
 435 440 445
 Asn Arg Cys Phe Phe Cys Asn Ala Tyr Val Gln Ser Asn Arg Thr Leu
 450 455 460

 Asn Leu Val Ser Met Ala Ala Cys
 465 470
 <210> 2
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Ovalbumin-related protein X
 <400> 2
 Gln Ile Lys Asp Leu Leu Val Ser Ser Ser Thr Asp Leu Asp Thr Thr
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Met Trp Lys Thr Ala
 20 25 30
 Phe Asn Ala Glu Asp Thr Arg Glu Met Pro Phe His Val Thr Lys Gln
 35 40 45

 Glu Ser Lys Pro Val Gln Met Met Cys Met Asn Asn Ser Phe Asn Val
 50 55 60
 Ala Thr Leu Pro Ala Glu Lys Met Lys Ile Leu Glu Leu Pro Phe Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Asp Leu Ser Met Leu Val Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Asp
85 90 95
Leu Glu Arg Ile Glu Lys Thr Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp
100 105 110
Thr Asn Pro Asn Thr Met Glu Lys Arg Arg Val Lys Val Tyr Leu Pro
115 120 125
Gln Met Lys Ile Glu Glu Lys Tyr Asn Leu Thr Ser Val Leu Met Ala
130 135 140
Leu Gly Met Thr Asp Leu Phe Ile Pro Ser Ala Asn Leu Thr Gly Ile
145 150 155 160
Ser Ser Ala Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Gly Ala Phe
165 170 175
Met Glu Leu Ser Glu Asp Gly Ile Glu Met Ala Gly Ser Thr Gly Val
180 185 190
Ile Glu Asp Ile Lys His Ser Pro Glu Ser Glu Gln Phe Arg Ala Asp
195 200 205
His Pro Phe Leu Phe Leu Ile Lys His Asn Pro Thr Asn Thr Ile Val
210 215 220
Tyr Phe Gly Arg Tyr Trp Ser Pro
225 230
<210> 3
<211> 440
<212> PRT
<213> TENP
<400> 3
Met Gly Ala Leu Leu Ala Leu Leu Asp Pro Val Gln Pro Thr Arg Ala
1 5 10 15
Pro Asp Cys Gly Gly Ile Leu Thr Pro Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Ala
20 25 30
Glu Val Ser Lys Pro His Ala Glu Val Val Leu Arg Gln Asp Leu Met
35 40 45
Pro Lys Glu Pro Gln Thr Cys Ser Leu Ala Pro Trp Ser Pro Ala Gly

50 55 60
 Thr Glu Leu Pro Ala Val Lys Val Ala Asp Leu Trp Leu Ser Val Ile
 65 70 75 80
 Pro Glu Ala Gly Leu Arg Leu Gly Ile Glu Val Glu Leu Arg Ile Ala
 85 90 95

 Pro Leu His Thr Val Pro Met Pro Val Arg Ile Ser Ile Arg Ala Asp
 100 105 110
 Leu His Val Asp Met Gly Pro Asp Gly Asn Leu Gln Leu Leu Thr Ser
 115 120 125
 Ala Cys Arg Pro Thr Val Gln Ala Gln Ser Thr Arg Glu Ala Glu Ser
 130 135 140
 Lys Ser Ser Arg Ser Ile Leu Asp Lys Val Val Asp Val Asp Lys Leu
 145 150 155 160
 Cys Leu Asp Val Ser Lys Leu Leu Leu Phe Pro Asn Glu Gln Leu Met

 165 170 175
 Ser Leu Thr Ala Leu Phe Pro Val Thr Pro Asn Cys Gln Leu Gln Tyr
 180 185 190
 Leu Ala Leu Ala Ala Pro Val Phe Ser Lys Gln Gly Ile Ala Leu Ser
 195 200 205
 Leu Gln Thr Thr Phe Gln Val Ala Gly Ala Val Val Pro Val Pro Val
 210 215 220
 Ser Pro Val Pro Phe Ser Met Pro Glu Leu Ala Ser Thr Ser Thr Ser
 225 230 235 240

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

Arg Val Val Leu Glu Glu Gly Arg Ala Ala Leu Lys Leu Phe Leu Thr

305 310 315 320

Val His Ile Gly Ala Gly Ser Pro Asp Phe Gln Ser Phe Leu Ser Val

325 330 335

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

340 345 350

Arg Met Met Ile Ser Thr Ala Val Ile Glu Asp Ala Glu Leu Ser Leu

355 360 365

Ala Ala Ser Asn Val Gly Leu Val Arg Ala Ala Leu Leu Glu Glu Leu

370 375 380

Phe Leu Ala Pro Val Cys Gln Gln Val Pro Ala Trp Met Asp Asp Val

385 390 395 400

Leu Arg Glu Gly Val His Leu Pro His Met Ser His Phe Thr Tyr Thr

405 410 415

Asp Val Asn Val Val Val His Lys Asp Tyr Val Leu Val Pro Cys Lys

420 425 430

Leu Lys Leu Arg Ser Thr Met Ala

435 440

<210> 4

<211> 383

<212> PRT

<213> Hemopexin

<400> 4

Met Leu Phe Phe Arg Gly Gly Asp Val Trp Glu Ile Ser Gly Glu Gly

1 5 10 15

Pro Gln Pro His Ser Arg Pro Leu Ala Glu Ser Trp Pro Glu Leu Glu

20 25 30

Gly Pro Val Asp Ala Ala Leu Arg Ile His Arg Gln Asp His Pro Glu

35 40 45

Glu His Gln Ser Leu Tyr Leu Phe Gln Asp Glu Lys Val Trp Ser Tyr

50 55 60

Ala Gly Gly Gln Leu Arg Pro Gly Phe Pro Arg Leu Ile Gly Asp Glu

65 70 75 80
Phe Pro Gly Val Pro Gly Gly Leu Asp Ala Ala Val Glu Cys His Pro
85 90 95
Glu Glu Cys Gly Gly Glu Thr Val Leu Phe Phe Lys Gly Asp Lys Val
100 105 110
Phe Ser Phe Asp Leu Glu Leu Arg Val Thr Lys Glu Arg Pro Trp Leu
115 120 125
Asp Ala Gly Pro Cys Asp Ala Ala Leu Arg Trp Leu Glu Arg Tyr Tyr
130 135 140

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

210 215 220
Trp Arg Asp Gly Trp His Ala Trp Pro Gln Ala His Ser Trp Pro Gly
225 230 235 240
Leu Gln Gly Asp Val Asp Ala Ala Phe Ser Trp Asp Lys Arg Met Tyr
245 250 255
Leu Ile Gln Gly Ser Gln Val Ser Ile Tyr Val Ser Gly Arg Gly Gly
260 265 270
His Gln Leu Val Glu Gly Tyr Pro Arg Ala Leu Gln Glu Glu Leu Gly
275 280 285

Val Pro Lys Ala Asp Ala Ala Phe Thr Cys Pro Gly Ser Ala Glu Leu
290 295 300
Tyr Val Ile Thr Gly Asp Arg Met Gln Arg Val Asp Leu Thr Lys Ser

305 310 315 320
 Pro Arg His Ala Asp Glu Pro Gln Pro Leu Pro Tyr Asp Gly Val Asp
 325 330 335
 Gly Ala Met Cys Thr Ala Asp Gly Ile Tyr Leu Leu Arg Gly Asp Arg
 340 345 350
 Tyr His Arg His Arg Asp Val Ala Glu Leu Leu Ala Ala His Pro Pro

 355 360 365
 Ala Asp Pro Pro Ser Ile Ala Val Asp Leu Phe His Cys Ala Gln
 370 375 380
 <210> 5
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> IGY-FCU3-4
 <400> 5
 Asp Ile Ser Pro Asp Gly Ala Gln Ser Cys Ser Pro Ile Gln Leu Tyr
 1 5 10 15
 Ala Ile Pro Pro Ser Pro Gly Glu Leu Tyr Ile Ser Leu Asp Ala Lys
 20 25 30
 Leu Arg Cys Leu Val Val Asn Leu Pro Ser Asp Ser Ser Leu Ser Val

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

 Thr Gly Pro Thr Thr Pro Pro Leu Ile Tyr Pro Phe Ala Pro His Pro
 115 120 125
 Glu Glu Leu Ser Leu Ser Arg Val Thr Leu Ser Cys Leu Val Arg Gly
 130 135 140

Phe Arg Pro Arg Asp Ile Glu Ile Arg Trp Leu Arg Asp His Arg Ala
 145 150 155 160
 Val Pro Ala Thr Glu Phe Val Thr Thr Ala Val Leu Pro Glu Glu Arg
 165 170 175
 Thr Ala Asn Gly Ala Gly Gly Asp Gly Asp Thr Phe Phe Val Tyr Ser
 180 185 190
 Lys Met Ser Val Glu Thr Ala Lys Trp Asn Gly Gly Thr Val Phe Ala
 195 200 205
 Cys Met Ala Val His Glu Ala Leu Pro Met Arg Phe Ser Gln Arg Thr
 210 215 220
 Leu Gln Lys Gln Ala Gly Lys
 225 230
 <210> 6
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Extracellular fatty acid-binding protein
 <400> 6
 Met Arg Thr Leu Ala Leu Ser Leu Ala Leu Ala Leu Leu Cys Leu Leu

 1 5 10 15
 His Thr Glu Ala Ala Ala Thr Val Pro Asp Arg Ser Glu Val Ala Gly
 20 25 30
 Lys Trp Tyr Ile Val Ala Leu Ala Ser Asn Thr Asp Phe Phe Leu Arg
 35 40 45
 Glu Lys Gly Lys Met Lys Met Val Met Ala Arg Ile Ser Phe Leu Gly
 50 55 60
 Glu Asp Glu Leu Glu Val Ser Tyr Ala Ala Pro Ser Pro Lys Gly Cys
 65 70 75 80

 Arg Lys Trp Glu Thr Thr Phe Lys Lys Thr Ser Asp Asp Gly Glu Leu
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Glu Glu Ala Glu Lys Thr Val Glu Val Leu Asp Thr Asp
 100 105 110
 Tyr Lys Ser Tyr Ala Val Ile Phe Ala Thr Arg Val Lys Asp Gly Arg

115	120	125	
Thr Leu His Met Met Arg Leu Tyr Ser Arg Ser Arg Glu Val Ser Pro			
130	135	140	
Thr Ala Met Ala Ile Phe Arg Lys Leu Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Thr			
145	150	155	160
Asp Glu Met Val Ala Val Leu Pro Ser Gln Glu Glu Cys Ser Val Asp			
	165	170	175
Glu Val			