



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0081224
(43) 공개일자 2009년07월28일

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0007194

(22) 출원일자 2008년01월23일

심사청구일자 2008년01월23일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

조명제

경남 진주시 강남동 7-24

전진수

경남 진주시 주악동 한주럭키아파트 12동 1504호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

권오식, 박창희, 김종관

전체 청구항 수 : 총 6 항

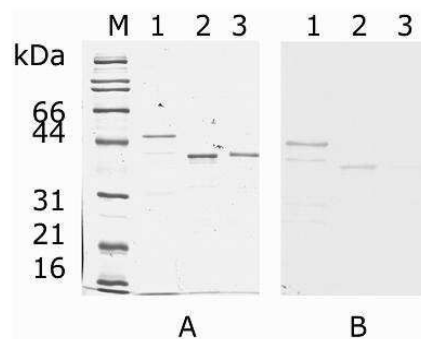
(54) 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백질의 사람 항혈청에반응하는 항원도메인제조합 단백질 및 그의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 헬리코박터 파이로리 감염의 혈청학적 진단을 목적으로 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)가 생성하는 Cag26 단백질 중 사람에게서 항원성을 보이는 항원도메인만 생성하는 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질을 제조방법에 관한 것이다.

이차원전기영동과 면역블롯 분석법으로 헬리코박터 파이로리 항원도메인을 맵핑(mapping)하여 CagA 단백질 중 환자의 혈청과 강하게 반응하는 수용성인 항원도메인제조합 단백질을 제조함으로써, 혈청학적 진단을 위한 항원 성분의 이용을 용이하게 하는 장점이 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

이우곤

경남 진주시 상봉동 상봉한주아파트 2동 307호

윤희상

경남 진주시 칠암동 505-33

서지현

경남 진주시 주악동 금호아파트석류마을 101동 1003호

이광호

경남 진주시 상평동 축석아파트 가동 101호

최상한

경남 사천시 정동면 고읍 523번지

송재영

경남 진주시 상봉서동 1062-2번지

백승철

경남 진주시 주악동 한보은빛마을아파트 102동 1104호

강형련

경남 진주시 가좌동 그린빌아파트 110동 1405호

권영철

경남 진주시 칠암동 100-1번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 RT104-03-07

부처명 산업자원부

연구사업명 지방기술혁신사업

연구과제명 Helicobacter pylori 항원결정기 제조합 단백질을 이용한진단소재 개발

주관기관 (재)경남테크로파크

연구기간 2005년 10월 01일 ~ 2008년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 40으로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)의 Cag26 단백질 항원도메인.

청구항 2

제 1항에 따른 항원도메인을 포함하는 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 항원도메인은 Cag26 단백질 유전자의 염기서열 1999번에서 2397번까지 포함하는 것을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리 수용성 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질.

청구항 4

제 2항에 있어서,

서열번호 41의 아미노산 서열로 구성되는 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질.

청구항 5

제 2항에 있어서,

헬리코박터 파이로리 감염환자 항혈청과 반응하는 것을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질.

청구항 6

- 1) 헬리코박터 파이로리 항원 유전자 절편을 증폭하는 단계;
- 2) 상기 증폭된 유전자 절편을 서브-클로닝 하여 클론을 얻은 후, 제한효소를 처리하여 절단하는 단계;
- 3) 상기 절단된 유전자 절편을 전기영동 하여 분리한 후, 정제하는 단계;
- 4) 상기 2) 단계에서 처리한 동일한 제한효소를 벡터에 처리하는 단계;
- 5) 상기 3) 단계의 정제된 유전자 절편과 상기 4) 단계의 벡터를 클로닝 하여 클론을 얻는 단계;
- 6) 상기 5) 단계의 클론을 단백질 발현시켜 항원성을 조사하고 항원도메인 서열을 맵핑하는 단계;
- 7) 상기 6) 단계의 맵핑된 항원도메인 서열을 증폭하고 융합대상 벡터와 클로닝 하여 클론을 얻는 단계; 및
- 8) 상기 7) 단계의 클론을 발현하여 제조합 융합단백질을 정제하는 단계;

를 포함하는 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 감염환자의 혈청과 반응하는 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질의 항원도메인제조합 단백질과 그의 제조방법에 관한 것으로서, 헬리코박터 파이로리 감염 여부 진단을 목적으로 헬리코박터 파이로리가 생성하는 Cag26 단백질 중 사람에게서 항원성을 보이고 수용성으로 대장균에서 발현되는 항원도메인만 생성하는 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 헬리코박터 파이로리 감염의 진단은 크게 침습적 방법과 비침습적 방법으로 나눈다. 침습적 방법은 위 내시경술을 통하여 얻은 생검체를 이용하여 배양법, 현미경적 관찰, 요소분해효소측정 등 헬리코박터 파이로리 세균의 존재를 확인하는 방법이다. 침습적 방법은 육안으로 병변을 관찰하면서 위점막을 채취하기 때문에 높은 특이도를 갖는다는 장점이 있으나, 헬리코박터 파이로리가 위점막에 끌고루 분포하는 것이 아니고 군데군데 서식하기 때문에 채취하는 위점막 위치에 따라 그 결과가 달리 나올 수가 있다. 또한 환자에게 신체적인 고통을 주기 때문에 반복 검사를 시행하기가 어려우므로 현실적으로 약물 투여 후 효과관정으로 사용하기가 불가능하다. 비침습적 방법은 ¹³C-요소호흡법과 혈청학적 방법이 있다. ¹³C-요소호흡법은 반복 시행할 수 있다는 장점이 있으나 검사하는데 고가의 장비가 필요하고 감염균수가 적을 경우 위 음성으로 진단된다. 또한 인지능력이 부족한 소아의 경우는 진단에 사용하기가 쉽지 않다. 혈청학적 방법은 모든 의료기관에서 널리 사용하고 있기 때문에 인적·물적 자원이 준비되어 있어 간편하게 진단할 수 있는 장점이 있다. 그러나 사용하는 항원에 따라서 교차반응이 일어날 수 있고 현증환자뿐만 아니라 과거에 감염된 경우에도 양성반응이 나올 수가 있다. 그러나 이러한 문제점은 진단에 사용하는 항원을 새로이 개발함으로써 극복할 수 있다.
- <3> 헬리코박터 파이로리가 감염된 환자의 혈청은 다양한 종류의 헬리코박터 파이로리 세포단백질과 반응하는데 특히 120 ~ 140 kDa 크기의 단백질과 특이하게 반응한다고 알려져 있다. 이 단백질은 세포독소생성과 관련이 있다고 하여 Cag26 단백질로 명명되었다. 서양에서는 혈청학적 조사에 의하면 십이지장궤양환자의 80 ~ 100%가 항 Cag26 항체 양성인데 비해 무증상 보균자의 경우 60%만이 항 Cag26 항체 양성자이다. 위암이 호발하는 한국뿐만 아니라 일본과 중국에서는 만성위염 환자에서 분리된 균주와 위·십이지장궤양 환자에서 분리되는 균주는 모두 Cag26 단백질 생산균주이고 모두 Cag26에 대한 항체를 보유한다. 상기 단백질은 사람에게서 항원성이 강하다.
- <4> 일반적으로 단백질항원의 경우 아미노산 15 ~ 22 잔기가 한 개의 항원결정기를 형성한다고 알려져 있다. 경우에 따라서는 이러한 항원결정기 여러 개가 항원분자의 일정 부분에 모여 항원도메인을 형성한다. 따라서 항원분자 모든 부분이 항원성을 나타내기보다 특정한 위치의 도메인이 항원성이 높은 구조를 나타낸다. 이러한 항체 반응성이 높은 항원도메인을 분석하고 이를 유전자 재조합기법으로 생산하고 정제하여 항원으로 사용함으로써 항원 단백질 전체를 항원으로 사용하는 경우보다 더욱 특이적인 진단이 가능할 것으로 사료된다.
- <5> 그러나 종래에는 Cag26 단백 전체를 유전자 재조합기법으로 대장균을 이용하여 발현을 성공하였다는 보고가 없으며, 특히 Cag26 단백질은 분자의 크기가 크고 또한 헬리코박터 파이로리 자체에서도 발현양이 적어 정제하기가 쉽지 않아, 정제된 Cag26 단백을 혈청학적 진단법에 사용하는 것이 매우 제한적이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <6> 본 발명은 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백질의 사람 항혈청에 반응하는 항원도메인재조합 단백질 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 헬리코박터 파이로리의 주된 항원성분인 Cag26 단백을 분석하여 환자혈청과 반응하는 항원도메인 부분을 결정하고 반응성과 용해성이 확인된 항원도메인재조합 단백질을 발현하고 정제하는 방법을 제공하여 혈청학적 진단법에 적용시키고자 한다. 보다 상세하게는 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백 유전자 절편을 중복되게 나누어 클로닝하고 발현시켜 환자혈청과의 반응성을 분석한다. 상기와 같이 항원도메인이 위치하는 곳을 매핑(mapping)함으로써 환자혈청과 반응하는 항원도메인 부분을 확인한다. 수용성인 항원도메인재조합 단백질을 발현시켜 정제함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- <7> 따라서 본 발명의 제 1목적은 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백 항원도메인을 제공하는 것이다.
- <8> 따라서 본 발명의 제 2목적은 상기 항원도메인을 포함하는 수용성인 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백 항원도메인재조합 단백질을 제공하는 것이다.
- <9> 또한, 본 발명의 제 3목적은 수용성인 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백 항원도메인재조합 단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <10> 상기와 같은 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 수용성인 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백 항원도메인재조합 단백질 및 그의 제조방법을 제공하고자 한다.
- <11> 본 발명은 하기의 서열번호 40으로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백 항원

도메인에 관한 것이다. 본 발명에서 확인한 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백질 중 사람에게서 항원도메인으로 작용하는 부위의 아미노산 서열은 다음과 같다.

<12> EASKEARAAAFDPNLKGIKIRSELSKLENINKNLKDFGKSFDELKNGKNKDFSKAEETLKALKDSVKDLGIN

<13> PEWISKIENLNAALNDFKNGKNKDFSKVTQAKSDLENSIKDVIINQKITDKVDNLNQAVSET

<14> (서열번호 40)

<15> 또한, 본 발명은 상기의 아미노산 서열을 갖는 항원도메인을 포함하는 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질에 관한 것이다. 상기 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질 항원도메인은 Cag26 단백질 유전자의 염기서열 1999번에서 2397번까지의 도메인에 위치한다.

<16> 또한, 본 발명은 서열번호 41의 아미노산 서열로 구성되는 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질에 관한 것이다. 상기 서열번호 41의 아미노산 서열은 다음과 같다.

<17> MAKEIKFSDSARNLLFEGVRLHDAVKVTMGPRGRNVL IQKSYGAPSI TKDGVSVAKEIELSCPVANMGAQ

<18> LVKEVASKTADAAGDGT TTATVLAISIFKEGLRNITAGANPIEVKRGMDKAAEAI INELKKASKKVGKKEE

<19> ITQVATISANS DHNIGKLIADAMEKVGKDGVI TVEEAKGIEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFVTNAEKMTAQ

<20> LDNAYILLTDKKISSMKDILPLEKT MKEGKPLL IIAEDIEGEAEASKEARAAAFDPNLKGIKIRSELSKLE

<21> NINKNLKDFGKSFDELKNGKNKDFSKAEETLKALKDSVKDLGINPEWISKIENLNAALNDFKNGKNKDFSK

<22> VTQAKSDLENSIKDVIINQKITDKVDNLNQAVSET (서열번호 41)

<23> 상기 단백질은 헬리코박터 파이로리 감염환자의 항혈청과 반응하는 수용성 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질이다.

<24> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

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

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

<27> 본 발명은,

<28> 1) 헬리코박터 파이로리 항원 유전자 절편을 증폭하는 단계;

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

<30> 3) 상기 절단된 유전자 절편을 분리한 후, 정제하는 단계;

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

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

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

<34> 7) 상기 6) 단계의 맵핑된 항원도메인 서열을 증폭하고 융합대상 벡터와 클로닝 하여 클론을 얻는 단계; 및

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

<36> 를 포함하는 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질 항원도메인제조합 단백질의 제조방법에 관한 것이다.

<37> 상기 1) 단계, 2) 단계, 또는 4) 단계에서 헬리코박터 파이로리 발현용 벡터 pEGexs에 융합단백질로 발현되도록 코돈을 맞추기 위해서는 5' 말단에는 *EcoRI*를 사용하며, 3' 말단은 *XhoI*를 사용한다.

<38> 본 발명에서는 상기의 헬리코박터 파이로리 Cag26 유전자 절편의 크기를 약 200 ~ 600 bp로 나누어 헬리코박터 파이로리 발현용 벡터 pEGexs에 클로닝 하여 제조합 단백질을 생산하고 이를 환자혈청과 반응시켜 항원도메인을 맵핑(mapping)하였다. 융합단백질의 반응성과 용해성을 조사하여 환자혈청과 반응성이 높으면서 용해성으로 발현되는 Cag26 단백질 항원도메인을 포함하는 제조합 융합단백질을 제조하고 정제함으로써 혈청학적 진단법에 광범위하게 사용될 수 있게 되었다.

효 과

<39> 이상과 같이, 본 발명은 환자혈청에 반응하는 수용성 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백 항원도메인제조합 단백질 및 그의 제조방법을 제공함으로써, 헬리코박터 파이로리 혈청학적 진단에 사용할 수 있는 새로운 항원 성분을 제공하여 헬리코박터 파이로리의 혈청학적 진단법 개발의 폭을 넓힘으로써 위십이지장 질환의 보건관리를 보다 향상시킬 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<40> 이하, 본 발명을 구체적인 실시 예에 의해 보다 더 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 사상과 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 분야에서 당업자에게 명백한 것이다.

<41> [실시예 1] 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백 유전자분석

<42> 국내에서 분리된 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백 유전자 염기서열 자료를 분석한 결과, 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백 유전자 서열은 하기 서열번호 1과 같이 전체크기는 3,534 bp이고 1,177개 아미노산으로 형성되어 있다. 또한 하기 도 1에 나타낸 바와 같이, 염기서열 분석 프로그램인 레이저진(Lasergene)으로 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백 유전자를 분석하여 염기서열 183, 1456, 2449 번째에는 제한효소 *HindIII* 자리, 548 번째에는 *PvuI* 자리, 1026 번째에는 *PstI* 자리, 1644 번째에는 *SmaI* 자리, 2022 번째에는 *NotI* 자리, 2235 번째에 *SphI* 자리가 위치하고 있는 확인할 수 있었다.

<43>	atgactaatgaaaccattgatcaacaacaacaccagatcaaacactaaaccaaacggat	60
<44>	tttgttccgcaacgatttatccataatcttcaagtagcttttatcaaagttgataacgct	120
<45>	gtcgcttcatttgatcctgatcaaaaaccaatcggtgataagaatgataggataaacagg	180
<46>	caagcttttgagaaaatctcgagctaagggaagaatacgccaataaagcgatcaaaaat	240
<47>	cctgcaaaaaagaatcagtatcttttcagactttatcaataagagcaatgatttgatcaac	300
<48>	aaagacaatctcattgctgtagattcttccgtagatagctttcggaatttggggatcag	360
<49>	cgttaccaaatttttacgagttgggtgtctcttcaaaaagatccgtctaaaatcaacacc	420
<50>	caacaaatccgaaattttatggaaaatatcatacaaccccctatctctgatgataaggaa	480
<51>	aaagcggagtttttgaggctcgcaacaacatcttttgaggaattatcatagggaaccaa	540
<52>	atccgatcgatgaaaaattcatgggcgtgtttgatgaatctttgaaagcaaggcaagaa	600
<53>	gcagaaaaaatgcagagcctgctgggtggggattggcttgatattttttatcatttgta	660
<54>	ttcaacaaaaacaatcttccgatctcaaagaaacgctcaatcaagagccaaggcctgat	720
<55>	tttgaacaaaatttgccactaccacaaccgacatacaaggcttaccgcctgaagctaga	780
<56>	gatttgcttgatgaaagggtaatttttctaattcactcttggtgatatggaaatgttg	840
<57>	gatgttgaggagtcgctgacaaggatcccaattacaagtttaatcaattattgatccac	900
<58>	aataacgcttttatcttctgtgctaatggggggtcatagtaacatagaacctgaaaaggtt	960
<59>	tcattattgtatggggataaatgggtggtcctgaagctaggcatgattggaacgccaccgtt	1020
<60>	gggtataaaaatcaacaaggcaacaatgtggccacactcattaatgcgcatcttaataac	1080
<61>	ggcgagcgggttaatcatagcgggtaatgaggatgggattaaaaatcctagcttctatctc	1140
<62>	tacaaagaagaccaactcacaggcttgaacaagcaatgagtcagaagagatccaaaac	1200
<63>	aaagtagatttcatggaatttcttgcgcaaaacaacgctaaattagataacttgagcgag	1260
<64>	aaagagaaagaaaaattccaaactgagattgaaaatttccaaaagaccgtaaggcttat	1320

<65> ttggacgctctaggaatgatcgcatgtgtttgtttctaaaaagacccaaaacattta 1380

<66> gcttttggttactgagtttggtaatggggaagtgagctataccctcaaggattatgggaaa 1440

<67> aaacaagataaagcttttagatggggagacaaaaaccactcttcaaggtaacctaaaatat 1500

<68> gatggcgtgatgtttgtcaattattccaatttcaaatacaccaacgcctccaagagtcct 1560

<69> gataagggtataggcactacgaatggcgtttcccat ttggaagcaaatttttagcaaagta 1620

<70> gctgtctttaatttgccataatttaaataatctcgctatcactaattatataaggcgagat 1680

<71> ttagaagagaaattgtgggctaaggattgtccctacaagaagctaataagctcatcaaa 1740

<72> gactttttgaacagcaacaaagaatgggttagaaaagt tcaaacttcaataaagctgta 1800

<73> gctgaagctaaaaacacaggcaattatgatggagtgaaaaaagctcagaaagatcttgaa 1860

<74> aaatctctaaggaacgagagcatttagagaaagaagtgcgaaaaaattggagagcaga 1920

<75> aacgacaacaaaaataaaatggaagcaaaagctcaagctaacagccaaaaagataagatt 1980

<76> ttgtgacttatcaataaagaggctagtaaggaagcaagagcggccgctttcgatccgaat 2040

<77> cttaaggcatcaggagcgaattgtctgataaacttgaaaaatcaacaagaatttgaaa 2100

<78> gactttggcaaatcttttgatgaactcaaaaatggcaaaaataaggatttcagcaaggca 2160

<79> gaagaaacgctaaaagcccttaagactcggtgaaagatttaggcatcaatccagaatgg 2220

<80> atttcaaaaattgaaaaccttaatgcagctttgaatgatttcaaaaatggcaaaaataag 2280

<81> gatttcagtaaggtaacacaagcaaaaagcgaccttgaaaaatccatttaaggatgtgatc 2340

<82> attaatcaaaagataacggataaagttgacaatctcaatcaggctgtatcagagactaaa 2400

<83> ttaacaggcgatttcagtaaggtagagcaagccctagccgaactcaaaagcttgatcttg 2460

<84> gatcttgaaaaaattctgatctacaaaaatccgttaaaaatggtgtaatggaacccta 2520

<85> gtcggtaatgggttatctaaaacagaagccacaacgctcaccaaaaatttttcggacatc 2580

<86> aggaagaattgaacgagaagttatttggaattccaataacaataataatggactcaaa 2640

<87> aacaacacagagcctatttacgctcaagtttaataaaaagaaaacaggacaagcagctagc 2700

<88> cctgaagagtcattttacgctcaagttgctaaaaaggtgagtgcaaaaattgaccaactc 2760

<89> aacgaatctgcatcagcaataaatagaaaaattgaccgattaacaaaaatgcatcagca 2820

<90> ggtaaaggagtgggcggtttcagtggagcagggcgatcagctagccctgaacccatttac 2880

<91> gctacaattgattttgatgaggcaaatcaagcaggcttcctttgaggagatcgcctcca 2940

<92> gttgatgatctcagtaaaagtagggctttcaagggaacaagaattgactcgtagaattggc 3000

<93> gatctcaatcaggcggatcagaagctaaaataggtcattttgataacctagaacaaaag 3060

<94> atagatgaactcaagattctacgaaaaagaatgctttgaagctatgggtgaaagcgcg 3120

<95> aaacaagtgcctactggtttgcaagcgaaattggacaattacgctactaacagccacaca 3180

<96> cgcattaatagcaatgtccaaactggagcgatcaatgaaaaagcgaccggcatgctaacg 3240

<97> caaaaaaccctgagtggctcaagctcgtgaatgataagatagttgcacataatgtggga 3300

<98> agtgctcattttgtcagagtatgataaaaattggattcaacaaaaagaatatgaaagattat 3360

<99> tctgattcgttcaagttttccaccaagttgaacaacgcgtaaaagacattaaagtctagc 3420

<100> tttgtgcaatttttaaccaatacattttctacaggatcttacagcttgatgaaagcaaat 3480

- <101> gcggaacatggagtcacaaataactaatacaaaaggtggtttccaaaaatcttaa 3534
- <102> (서열번호 1)
- <103> [제조예 1] 헬리코박터 파이로리 항원 제조 및 결손변이항원 제조
- <104> 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질은 전체 유전자가 클로닝 되어도 전체 단백질이 발현되지 않으므로, 상기 실시예 1의 자료를 근거로 하여 유전자 크기를 약 400 bp씩 중복으로 나누어 17개의 절편을 증폭하고 이를 헬리코박터 파이로리 발현용 벡터 pEGexs에 클로닝 하였다.
- <105> 우선, Cag26 단백을 발현하기 위하여 본 발명에서 사용한 프라이머 세트의 서열은 다음과 같다.
- <106> Cag26-1
- <107> 순방향 프라이머 : 5' -GCACCGGAATTCATGACTAATGAAACC-3' (서열번호 2)
- <108> 역방향 프라이머 : 5' -GCGTCGCTCGAGATCTTTTGAAGAGA-3' (서열번호 3)
- <109> Cag26-2
- <110> 순방향 프라이머 : 5' -GCACCGGAATTCCTTCACTCTTGGTGAT- 3' (서열번호 4)
- <111> 역방향 프라이머 : 5' -GCGTCGCTCGAGCATGAAATCTACTTT- 3' (서열번호 5)
- <112> Cag26-3
- <113> 순방향 프라이머 : 5' -GCACCGGAATTCGATTTCATGGAATTC- 3' (서열번호 6)
- <114> 역방향 프라이머 : 5' -GCATAGCTCGAGGCTACTTTGCTAAAA- 3' (서열번호 7)
- <115> Cag26-4
- <116> 순방향 프라이머 : 5' -GCACCGGAATTCAAAGATCCGTCTAAA - 3' (서열번호 8)
- <117> 역방향 프라이머 : 5' -GCATAACTCGAGATCACCAAGAGTGAA - 3' (서열번호 9)
- <118> Cag26-5
- <119> 순방향 프라이머 : 5' -GCACAGGAATTCACCTACGAATGGCGTT- 3' (서열번호 10)
- <120> 역방향 프라이머 : 5' -GCATAACTCGAGGTCGTTTCTGCTCT- 3' (서열번호 11)
- <121> Cag26-6
- <122> 순방향 프라이머 : 5' -GCAATGGAATTCGAGGCTAGTAAGGAA- 3' (서열번호 12)
- <123> 역방향 프라이머 : 5' -GCATAACTCGAGAGTCTCTGATACAG- 3' (서열번호 13)
- <124> Cag26-7
- <125> 순방향 프라이머 : 5' -GCCCCGAATTCAAATTAACAGGCGAT- 3' (서열번호 14)
- <126> 역방향 프라이머 : 5' -GCCACCTCGAGAATTTTGTTAATCCG - 3' (서열번호 15)
- <127> Cag26-8
- <128> 순방향 프라이머 : 5' -GCCACGAATTCGCATCAGCAGGTAAA- 3' (서열번호 16)
- <129> 역방향 프라이머 : 5' -GCCATCTCGAGTCCAGTTTGGACATT- 3' (서열번호 17)
- <130> Cag26-9
- <131> 순방향 프라이머 : 5' -GCCATGAATTCCAAACCTGGAGCGATC- 3' (서열번호 18)
- <132> 역방향 프라이머 : 5' -GCCATCTCGAGTTTTTGAAACCACC- 3' (서열번호 19)
- <133> Cag26-10
- <134> 순방향 프라이머 : 5' -GCACCGGAATTCAGGCAAGCTTTTGAG- 3' (서열번호 20)

- <135> 역방향 프라이머 : 5' -GCCATCCTCGAGCCTTGCTTTCAAAGA- 3' (서열번호 21)
- <136> Cag26-11
- <137> 순방향 프라이머 : 5' -GCCACGAATTCAGGCAAGAAGCAGAA- 3' (서열번호 22)
- <138> 역방향 프라이머 : 5' -GCCTACTCGAGAACCTTTTCAGGTTTC- 3' (서열번호 23)
- <139> Cag26-12
- <140> 순방향 프라이머 : 5' -GCCCCGAATTCTATGGGGATAATGGT- 3' (서열번호 24)
- <141> 역방향 프라이머 : 5' -GCCACCTCGAGAACCAAAGCTAAATG- 3' (서열번호 25)
- <142> Cag26-13
- <143> 순방향 프라이머 : 5' -GCCACGAATTCGAGTTTGGTAATGGG- 3' (서열번호 26)
- <144> 역방향 프라이머 : 5' -GCCCCCTCGAGTGAAACTTTTCTAAC- 3' (서열번호 27)
- <145> Cag26-14
- <146> 순방향 프라이머 : 5' -GCCCCGAATTCCAATAAAGCTGTAGC- 3' (서열번호 28)
- <147> 역방향 프라이머 : 5' -GCATACTCGAGCACCGAGTCTTTAAG- 3' (서열번호 29)
- <148> Cag26-15
- <149> 순방향 프라이머 : 5' -GCCCCGAATTCGTGAAAGATTTAGGC - 3' (서열번호 30)
- <150> 역방향 프라이머 : 5' -GCCCCCTCGAGCAATCTTTCTCTGAT- 3' (서열번호 31)
- <151> Cag26-16
- <152> 순방향 프라이머 : 5' -GCCCCGAATTCAAAGAATTGAACGAG- 3' (서열번호 32)
- <153> 역방향 프라이머 : 5' -GCATACTCGAGTTCTTGTTCCTTGA- 3' (서열번호 33)
- <154> Cag26-17
- <155> 순방향 프라이머 : 5' -GCCACGAATTCCTAGAAATTGGCGAT - 3' (서열번호 34)
- <156> 역방향 프라이머 : 5' -GCCACCTCGAGCGAATCAGAATAATC- 3' (서열번호 35)
- <157> 앞서 설명한 바와 같이, Cag26 단백 유전자를 400 bp씩 중복으로 나누어 17개 절편을 상기 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응으로 증폭한 후, 유전자재조합기법을 이용하여 대장균의 헬리코박터 파이로리 단백질 발현용 벡터인 pEGexs에 클로닝 하여 발현단백질을 생산하였다. 시발체에는 5' 말단에는 *EcoRI* 자리와 3' 말단에는 *XhoI* 자리를 삽입하였다. PCR 증폭 후에는 바로 pGEM-T 벡터에 클로닝 하여 클론을 얻었다. pGEM-T 벡터에 삽입된 유전자 DNA를 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단하여 1% 아가로스젤에 전기영동 하여 분리하고 절편 DNA를 아가로스 겔로부터 분리하여 정제한 후, 상기와 동일한 제한효소를 처리한 pEGexs 벡터를 상기 정제한 DNA와 클로닝 하였다.
- <158> 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백질 유전자 절편이 삽입된 pEGexs/Cag26-1, pEGexs/Cag26-2, pEGexs/Cag26-3, pEGexs/Cag26-4, pEGexs/Cag26-5, pEGexs/Cag26-6, pEGexs/Cag26-7, pEGexs/Cag26-8, pEGexs/Cag26-9, pEGexs/Cag26-10, pEGexs/Cag26-11, pEGexs/Cag26-12, pEGexs/Cag26-13, pEGexs/Cag26-14, pEGexs/Cag26-15, pEGexs/Cag26-16 및 pEGexs/Cag26-17을 제조하였으며, 하기 도 1과 같이 도식하였다.
- <159> **[실시예 2] 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질 유전자 절편 단백질 발현**
- <160> 상기 제조예 1과 같이 제조된 Cag26 단백질의 유전자 절편이 삽입된 클론 단백질의 발현여부를 확인하기 위하여 이를 발현 숙주에 형질전환 시키고 이소프로필티오갈락토사이드(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)를 첨가하여 발현을 유도한 결과 모두 효율적으로 발현하였다.
- <161> 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질의 유전자 절편이 삽입된 클론은 대장균 DH10B/r에 형질 전환시켜 클로닝된 플라스미드 클론을 얻고 이를 다시 발현 숙주인 대장균 BL21에 형질전환 시켜 이소프로필티오갈락토사이드를 처리하여 삽입된 유전자 절편을 발현시켰다. 단백질의 발현여부는 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide

gel electrophoresis)를 통하여 확인하였다.

[실시에 3] 헬리코박터 파이로리 Cag26 단백 유전자 절편의 발현단백질의 수용성 분석

헬리코박터 파이로리 Cag26 단백질의 유전자 절편 pEGexs/Cag26-1, pEGexs/Cag26-2, pEGexs/Cag26-3, pEGexs/Cag26-4, pEGexs/Cag26-5, pEGexs/Cag26-6, pEGexs/Cag26-7, pEGexs/Cag26-8, pEGexs/Cag26-9, pEGexs/Cag26-10, pEGexs/Cag26-11, pEGexs/Cag26-12, pEGexs/Cag26-13, pEGexs/Cag26-15, pEGexs/Cag26-16, pEGexs/Cag26-17를 발현한 후 균체를 파쇄하고 원침하여 상청액과 침전물을 대상으로 SDS-PAGE를 실시한 결과 하기 도 2A와 2B에 나타나 있듯이 pEGexs/Cag26-6, 15, 17의 발현단백질은 수용성으로 발현되었으나 나머지는 불용성으로 발현되었다. 수용성으로 발현되는 양을 하기 도 2B의 화살표 위치에서 비교하면, 수용성으로 발현되는 클론 중 pEGexs/Cag26-6만이 수용성으로 발현되는 양이 절대적으로 많았고 나머지 2개의 클론인 pEGexs/Cag26-15 및 pEGexs/Cag26-17은 불용성의 양이 상대적으로 많이 발현되었다.

[실시에 4] 면역블롯 분석법에 의한 Cag26 단백 유전자 절편 단백질의 항원성 분석

본 실시예에서는 Cag26 단백질의 유전자절편이 삽입된 클론의 발현 단백질을 환자혈청을 이용하여 면역블롯 분석법으로 항원성을 분석하였다. Cag26 단백질의 유전자절편이 삽입된 클론의 발현 단백질의 SDS-PAGE 결과를 하기 도 3A에 나타내었으며, 항원의 분석결과는 하기 도 3B와 같다. 그 결과를 요약하면 하기 도 5와 같이 pEGexs/Cag26-1, pEGexs/Cag26-6, pEGexs/Cag26-7, pEGexs/Cag26-10, pEGexs/Cag26-15, 그리고 pEGexs/Cag26-16은 매우 강하게 반응하였고, pEGexs/Cag26-2, pEGexs/Cag26-3, pEGexs/Cag26-8, pEGexs/Cag26-9, pEGexs/Cag26-12, pEGexs/Cag26-13, pEGexs/Cag26-17은 중등도로 반응하였고, pEGexs/Cag26-4, pEGexs/Cag26-5, pEGexs/Cag26-11 및 pEGexs/Cag26-14는 미약한 반응성을 나타내었다.

상기와 같은 결과를 통해 Cag26 단백질의 경우 전체적으로 두 군데에서 강한 반응성을 나타내는 도메인이 존재한다는 것을 확인하였다. 즉 N' 말단에 198 아미노산기 크기의 항원도메인이 있고 염기서열 199 ~ 298까지 327 아미노산기 크기의 항원도메인이 확인되었다.

[제조예 2] 헬리코박터 파이로리의 Cag26-6의 하위 클론제작

Cag26-6 항원도메인을 구성하는 항원결정기를 확인하기 위하여 Cag26-6에 해당되는 염기서열번호 199에서 2397 사이를 함유하는 이 Cag26-6 절편보다 짧은 클론 2개를 아래의 프라이머를 이용하여 제작하였다.

Cag26-18

순방향 프라이머 : 5' -GCCACGAATTCATCAGGAGCGAATTG- 3' (서열번호 36)

역방향 프라이머 : 5' -GCCACCTCGAGTGCATTAAGGTTTTTC- 3' (서열번호 37)

Cag26-19

순방향 프라이머 : 5' -GCCCCGAATTCGCTTTGAATGATTTC- 3' (서열번호 38)

역방향 프라이머 : 5' -GCATACTCGAGTTGCTCTACCTTACT- 3' (서열번호 39)

Cag26-18은 염기서열 2050에서 2247번까지이고 Cag26-19는 2248에서 2430까지이다. 제조예 1과 같은 방법으로 pEGexs/Cag26-18과 pEGexs/Cag26-19를 제작하였다.

[실시에 5] 헬리코박터 파이로리의 pEGexs/Cag26-18, -19 발현단백질 SDS-PAGE 분석과 면역블롯 분석

상기 제조예 2에서 제조한 pEGexs/Cag26-18과 19를 대장균에 형질전환하여 발현을 유도하였다. 세포파쇄액 상청액을 니켈킬럼으로 정제하여 SDS-PAGE하고 이를 환자혈청으로 면역블롯을 실시한 결과 하기 도 4와 같다. Cag26-6, Cag26-18 및 Cag26-19를 비교한 결과 Cag26-6의 항체반응성에 비하여 Cag26-18과 Cag26-19의 항원반응성이 급격히 저하되었다. 이러한 결과는 Cag26-6의 항체반응도는 특정 항원결정인자의 반응도에 의존한다기보다 여러개의 항원결정기 반응도의 합이라고 사료된다. 따라서 Cag26-6은 항원도메인 상태로 발현시키는 것이 혈청학적 진단에 유리할 것으로 판단된다.

[실시에 6] 헬리코박터 파이로리의 Cag26-6 항원도메인재조합 단백질 정제

상기 실시예 4와 5의 결과에 따라 수용성으로 발현된 pEGexs/Cag26-6을 선정하였다. pEGexs/Cag26-6의 대장균 클론을 이용하여 상기 실시예 2와 같이 발현시키고 세균체를 수집한 후, 파쇄 원침하여 세포파쇄추출액을 얻었다. 이를 니켈친화성 수지에 적용하여 정제를 시도하였다. 그 결과는 하기 도 6과 같이 이미다졸 200과 300 mM

에서 융합단백질이 정제되었다.

[실시예 7] 헬리코박터 파이로리의 Cag26-6 항원도메인 서열과 융합단백질 서열 분석

상기 실시예 4에 의해 수용성 Cag26-6 단백질의 항원도메인 융합단백질에는 강한 항원도메인 부분인 다음과 같은 서열이 융합되어 있는 것을 확인하였다.

EASKEARAAAFDPNLKGIRSELSKLENINKNLKDFGKSFDELKNGKNKDFSKEETLKALKDSVKDLGIN

PEWISKIENLNAALNDFKNGKNKDFSKVTQAKSDLENSIKDVIINQKITDKVDNLNQAVSET

(서열번호 40)

헬리코박터 파이로리 GroEL 부분인 발현유도단백이 포함된 클론이 발현하는 융합된 Cag26 항원도메인 재조합 단백질 GroELT1/Cag26-6의 아미노산 서열은 다음과 같다.

MAKEIKFSDSARNLLFEGVRQLHDAVKVTMGPRGRNVLIQSYGAPSITKDGVSVAKEIELSCPVANMGAQ

LVKEVASKTADAAGDGTATTATVLAISIFKEGLRNITAGANPIEVKRGMDKAAEAIINELKKASKKVGGKEE

ITQVATISANS DHNIGKLIADAMEKVGKDGVITVEEAKGIEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFVTNAEKMTAQ

LDNAYILLTDKKISSMKDILPLLEKTMKEGKPLLI AEDIEGEAEASKEARAAAFDPNLKGIRSELSKLE

NINKNLKDFGKSFDELKNGKNKDFSKEETLKALKDSVKDLGINPEWISKIENLNAALNDFKNGKNKDFSK

VTQAKSDLENSIKDVIINQKITDKVDNLNQAVSET (서열번호 41)

도면의 간단한 설명

도 1은 헬리코박터 파이로리의 Cag26 단백질 유전자 절편을 도식한 것이다.

도 2는 Cag26 단백질 유전자의 불용성 절편클론(A)과 수용성 절편클론인 Cag26-6(B)의 SDD-PAGE의 결과를 나타낸 것이다.

M; 표준 분자량 마커(Marker)

A 1; pEGexs/Cag26-5의 세포파쇄액 상청액

A 2; pEGexs/Cag26-5의 세포파쇄액 원침전물

A 3; pEGexs/Cag26-2의 세포파쇄액 상청액

A 4; pEGexs/Cag26-2의 세포파쇄액 원침전물

A 5; pEGexs/Cag26-4의 세포파쇄액 상청액

A 6; pEGexs/Cag26-4의 세포파쇄액 원침전물

A 7; pEGexs/Cag26-7의 세포파쇄액 상청액

A 8; pEGexs/Cag26-7의 세포파쇄액 원침전물

A 9; pEGexs/Cag26-8의 세포파쇄액 상청액

A 10; pEGexs/Cag26-8의 세포파쇄액 원침전물

A 11; pEGexs/Cag26-9의 세포파쇄액 상청액

A 12; pEGexs/Cag26-9의 세포파쇄액 원침전물

A 13; pEGexs/Cag26-13의 세포파쇄액 상청액

A 14; pEGexs/Cag26-13의 세포파쇄액 원침전물

A 15; pEGexs/Cag26-15의 세포파쇄액 상청액

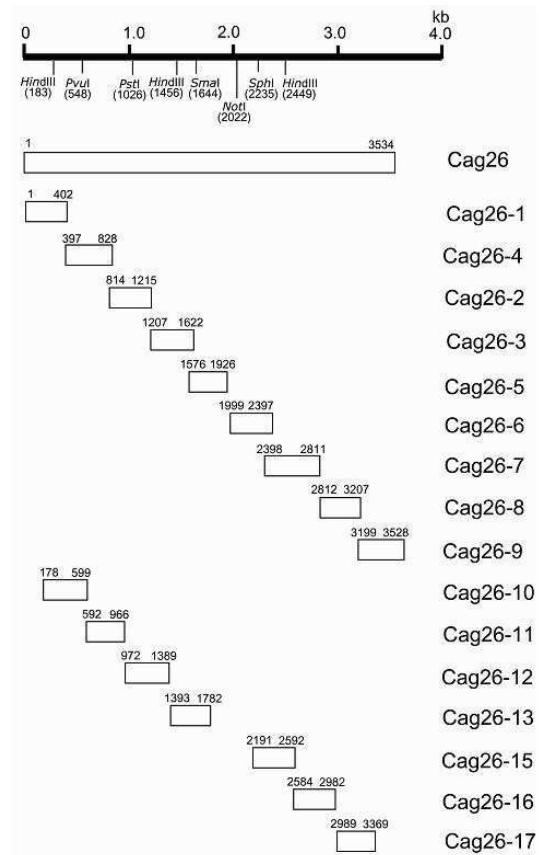
A 16; pEGexs/Cag26-15의 세포파쇄액 원침전물

- <211> A 17; pEGexs/Cag26-17의 세포파쇄액 상청액
- <212> A 18; pEGexs/Cag26-17의 세포파쇄액 원침전물
- <213> A 19; pEGexs/Cag26-16의 세포파쇄액 상청액 및
- <214> A 20; pEGexs/Cag26-16의 세포파쇄액 원침전물
- <215> B 1; pEGexs/Cag26-6의 세포파쇄액
- <216> B 2; pEGexs/Cag26-6의 세포파쇄액 상청액 및
- <217> B 3; pEGexs/Cag26-6의 세포파쇄액 원침전물
- <218> 도 3은 Cag26 단백질 유전자 절편클론의 발현단백질 SDS-PAGE분석(A), 환자혈청을 이용한 면역블롯분석 결과(B)를 나타낸 것이다.
- <219> M; 표준 분자량 마커(Marker)
- <220> 1; pEGexs/Cag26-1 세포파쇄액 원침전물
- <221> 2; pEGexs/Cag26-2 세포파쇄액 원침전물
- <222> 3; pEGexs/Cag26-3 세포파쇄액 원침전물
- <223> 4; pEGexs/Cag26-4 세포파쇄액 원침전물
- <224> 5; pEGexs/Cag26-5 세포파쇄액 원침전물
- <225> 6; pEGexs/Cag26-6 세포파쇄액 상청액
- <226> 7; pEGexs/Cag26-7 세포파쇄액 원침전물
- <227> 8; pEGexs/Cag26-8 세포파쇄액 원침전물
- <228> 9; pEGexs/Cag26-9 세포파쇄액 원침전물
- <229> 10; pEGexs/Cag26-10 세포파쇄액 원침전물
- <230> 11; pEGexs/Cag26-11 세포파쇄액 원침전물
- <231> 12; pEGexs/Cag26-12 세포파쇄액 원침전물
- <232> 13; pEGexs/Cag26-13 세포파쇄액 원침전물
- <233> 14; pEGexs/Cag26-15 세포파쇄액 원침전물
- <234> 15; pEGexs/Cag26-16 세포파쇄액 원침전물 및
- <235> 16; pEGexs/Cag26-17 세포파쇄액 원침전물
- <236> 도 4는 pEGexs/Cag26-6와 Cag26-6에 해당되는 DNA 절편 pEGexs/Cag26-18과 Cag26-19 발현단백질의 SDS-PAGE(A)와 면역블롯분석(B)을 나타낸 것이다.
- <237> M; 표준 분자량 마커(Marker)
- <238> 1; pEGexs/Cag26-6
- <239> 2; pEGexs/Cag26-18 및
- <240> 3; pEGexs/Cag26-19
- <241> 도 5는 Cag26 유전자 절편단백의 항원성을 도식한 것이다.
- <242> 1; pEGexs/Cag26-1 절편단백의 항원성
- <243> 2; pEGexs/Cag26-2 절편단백의 항원성
- <244> 3; pEGexs/Cag26-3 절편단백의 항원성

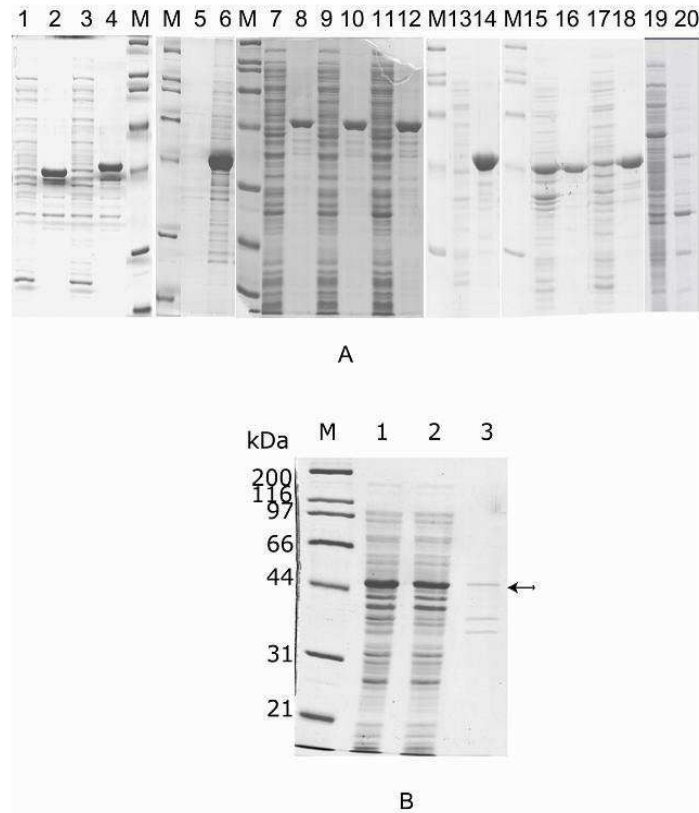
- <245> 4; pEGexs/Cag26-4 절편단백의 항원성
- <246> 5; pEGexs/Cag26-5 세절편단백의 항원성
- <247> 6; pEGexs/Cag26-6 절편단백의 항원성
- <248> 7; pEGexs/Cag26-7 절편단백의 항원성
- <249> 8; pEGexs/Cag26-8 절편단백의 항원성
- <250> 9; pEGexs/Cag26-9 절편단백의 항원성
- <251> 10; pEGexs/Cag26-10 절편단백의 항원성
- <252> 11; pEGexs/Cag26-11 절편단백의 항원성
- <253> 12; pEGexs/Cag26-12 절편단백의 항원성
- <254> 13; pEGexs/Cag26-13 절편단백의 항원성
- <255> 14; pEGexs/Cag26-15 절편단백의 항원성
- <256> 15; pEGexs/Cag26-16 절편단백의 항원성 및
- <257> 16; pEGexs/Cag26-17 세절편단백의 항원성
- <258> 도 6은 니켈(Nickel) 친화성수지를 이용한 Cag26-6 항원도메인제조합단백질을 정제한 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다.
- <259> M; 표준 분자량 마커(Marker)
- <260> 1; 세포파쇄액의 컬럼 통과액
- <261> 2; 40 mM 이미다졸용액으로 용출한 분획
- <262> 3; 50 mM 이미다졸으로 용출한 분획
- <263> 4; 80 mM 이미다졸으로 용출한 분획
- <264> 5; 100 mM 이미다졸으로 용출한 분획
- <265> 6; 150 mM 이미다졸으로 용출한 분획
- <266> 7; 200 mM 이미다졸으로 용출한 분획 및
- <267> 8; 300 mM 이미다졸으로 용출한 분획

도면

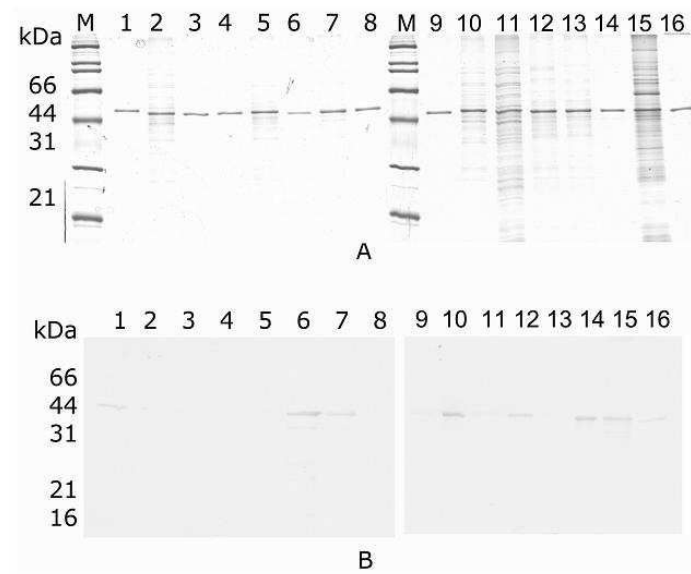
도면1



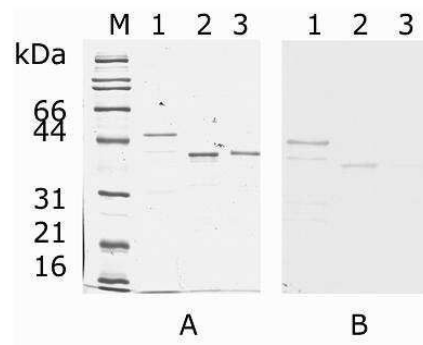
도면2



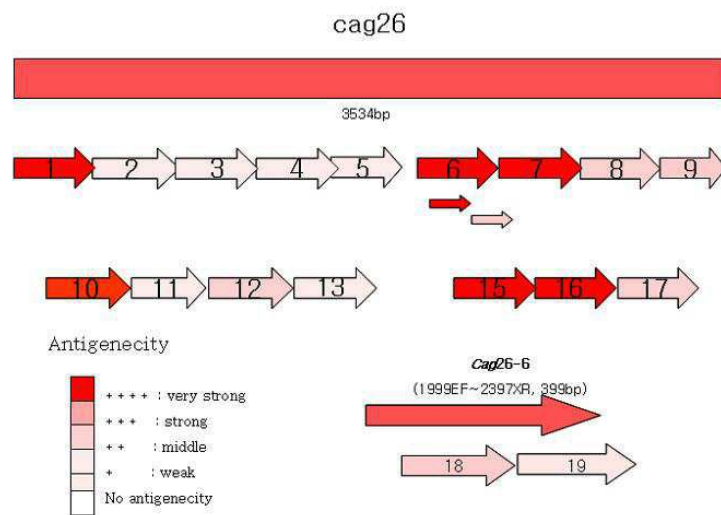
도면3



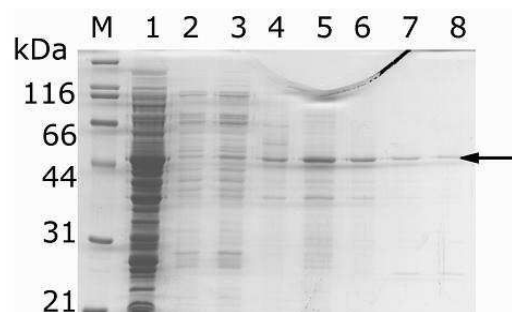
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
<120> Production of the antigenic domain recombinant protein of *Helicobacter pylori* Cag26 reactive to human antisera and its

method

<160> 41

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 3534
 <212> DNA
 <213> Helicobacter pylori

<400> 1
 atgactaatg aaaccattga tcaaaacaac acaccagatc aaacactaaa ccaaacggat 60
 ttgttccgc aacgatttat ccataatcct caagtagctt ttatcaaagt tgataacgct 120
 gtgccttcat ttgacctga tcaaaaacca atcggtgata agaatgatag ggataacagg 180
 caagcttttg agaaaatctc gcagctaagg gaagaatagc ccaataaagc gatcaaaaat 240
 cctgcaaaaa agaatacagta ttttccagac tttatcaata agagcaatga ttgatcaac 300
 aaagacaatc tcattgctgt agattcttcc gtagatagct ttcggaaatt tggggatcag 360
 cgttacaaaa tttttacgag ttgggtgtct cttcaaaaag atccgtctaa aatcaacacc 420
 caacaaatcc gaaattttat ggaaaatata atacaacccc ctatctctga tgataaggaa 480
 aaagcggagt ttttgaggtc tgccaaacaa tcttttgagc gaattatcat agggaaacaa 540
 atccgatcgg atgaaaaatt catgggcgtg ttgatgaat ctttgaaagc aaggcaagaa 600
 gcagaaaaaa atgcagagcc tgctggtggg gattggcttg atattttttt atcatttgta 660
 ttcaacaaaa aacaatcttc cgatctcaaa gaaacgtca atcaagagcc aaggcctgat 720
 ttgaacaaa atttagccac taccacaacc gacatacaag gcttaccgcc tgaagctaga 780
 gatttgcttg atgaaagggg taatttttct aaattcactc ttggtgatat ggaaatgttg 840

gatgttgagg gagtgcgtga caaggatccc aattacaagt ttaatcaatt attgatccac	900
aataacgctt taicttttgt gctaattgggg ggtcatagta acatagaacc tgaaaaggtt	960
tcattattgt atggggataa tggtaggtcct gaagctaggc atgattggaa cgccaccgtt	1020
ggttataaaa atcaacaagg caacaatgtg gccacactca ttaatgcgca tcttaataac	1080
ggcagcgggt taatcatagc gggtaatgag gatgggatta aaaatcctag cttctatctc	1140
tacaaagaag accaactcac aggccttgaag caagcaatga gtcaagaaga gatccaaaac	1200
aaagtagatt tcatggaatt tcttgcgcaa aacaacgcta aattagataa cttgagcgag	1260
aaagagaaag aaaaattcca aactgagatt gaaaatttcc aaaaagaccg taaggcttat	1320
ttggacgctc tagggaatga tcgcattgct ttgttttcta aaaaagacc aaacattta	1380
gcttttggtta ctgagtttgg taatggggaa gtgagctata cctcaagga ttatgggaaa	1440
aaacaagata aagcttttaga tggggagaca aaaaccactc ttcaaggtta cctaaaatat	1500
gatggcgtga tgtttgtcaa ttattccaat ttcaaataca ccaacgcctc caagatcct	1560
gataagggtta taggcactac gaatggcggt tccatttgg aagcaaattt tagcaaagta	1620
gctgtcttta atttgcctaa tttaataat ctgcctatca ctaattatat aaggcgagat	1680
ttagaagaga aattgtgggc taaaggattg tcctacaag aagctaataa gtcacatcaa	1740
gactttttga acagcaacaa agaaatggtt agaaaagttt caaacttcaa taaagctgta	1800
gctgaagcta aaaacacagg caattatgat ggagtgaata aagctcagaa agatcttgaa	1860
aaatctctaa ggaaacgaga gcatttagag aaagaagtag cgaaaaaatt ggagagcaga	1920
aacgacaaca aaaataaaat ggaagcaaaa gctcaagcta acagccaaaa agataagatt	1980
tttgcactta tcaataaaga ggctagtaag gaagcaagag cggccgcttt cgatccgaat	2040

cttaaaggca tcaggagcga attgtctgat aaacttgaaa atatcaacaa gaatttgaaa	2100
gactttggca aatcttttga tgaactcaaa aatggcaaaa ataaggattt cagcaaggca	2160
gaagaaacgc taaaagccct taaagactcg gtgaaagatt taggcatcaa tccagaatgg	2220
atttcaaaaa ttgaaaacct taatgcagct ttgaatgatt tcaaaaatgg caaaaataag	2280
gatttcagta aggtaacaca agcaaaaagc gaccttgaaa attccattaa ggatgtgatc	2340
attaatcaaa agataacgga taaagttgac aatctcaatc aggcgtatc agagactaaa	2400
ttaacaggcg atttcagtaa ggtagagcaa gccctagccg aactcaaaag ctgtgcattg	2460
gatcttggaa aaaattctga tctacaaaaa tccgttaaaa atggtgtaaa tggaaccta	2520
gtcggtaatg ggttatctaa aacagaagcc acaacgtca ccaaaaattt ttcggacatc	2580
aggaaagaat tgaacgagaa gttatttga aattccaata acaataataa tggactcaaa	2640
aacaacacag agcctattta cgctcaagtt aataaaaaa aaacaggaca agcagctagc	2700
cctgaagagt ccatttacgc tcaagttgct aaaaagggtga gtgcaaaaat tgaccaactc	2760
aacgaatctg catcagcaat aaatagaaaa attgaccgga ttaacaaaat tgcacagca	2820
ggtaaaggag tgggcggttt cagtggagca gggcgatcag ctagccctga acccatttac	2880
gctacaattg attttgatga ggcaaatcaa gcaggcttcc ctttgaggag atacgtcca	2940
gttgatgatc tcagtaaagt agggctttca aggaacaag aattgactcg tagaattggc	3000
gatctcaatc aggcggtatc agaagctaaa ataggtcatt ttgataacct agaacaaaag	3060
atagatgaac tcaagattc tacgaaaaa aatgctttga agctatgggt tgaaagcgcg	3120
aaacaagtgc ctactggttt gcaagcgaaa ttggacaatt acgtactaa cagccacaca	3180

cgcataata gcaatgtcca aactggagcg atcaatgaaa aagcgaccgg catgctaacg	3240
caaaaaaacc ctgagtggtc caagctcgtg aatgataaga tagttgcaca taatgtggga	3300
agtgtcatt tgcagagta tgataaaatt ggattcaacc aaaagaatat gaaagattat	3360
tctgattcgt tcaagttttc caccaagttg aacaacgccg taaaagacat taagtctagc	3420
tttgtgcaat tttaaccaa tacattttct acaggatctt acagcttgat gaaagcaaat	3480
gcggaacatg gagtcaaaaa tactaataca aaagtggtt tcaaaaaatc ttaa	3534

<210> 2
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-1 forward pfimer

<400> 2	
gcaccggaat tcatgactaa tgaaacc	27

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-1 reverse primer

<400> 3	
gcgtcgctcg agatcttttt gaagaga	27

<210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-2 forward primer

<400> 4
gcaccggaat tcttcactct tggatgat

27

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-2 reverse primer

<400> 5
gcgtcgctcg agcatgaaat ctacttt

27

<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-3 forward primer

<400> 6
gcaccggaat tcgatttcatt ggaatttc

28

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-3 reverse primer

<400> 7
gcatagctcg aggctacttt gctaaaa

27

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-4 forward primer

<400> 8
 gcaccggaat tcaaagatcc gtctaaa 27

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-4 reverse primer

<400> 9
 gcataactcg agatcaccaa gagtgaa 27

<210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-5 forward primer

<400> 10
 gcacaggaat tcactacgaa tggcggtt 27

<210> 11
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cag26-5 reverse primer

<400> 11
gcataactcg aggtcgtttc tgctct

26

<210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-6 forward primer

<400> 12
gcaatggaat tcgaggctag taaggaa

27

<210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-6 reverse primer

<400> 13
gcataactcg agagtctctg atacag

26

<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-7 forward primer

<400> 14
gccccgaatt caaattaaca ggcgat

26

<210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-7 reverse primer

<400> 15
 gccacctcga gaattttgtt aatccg 26

<210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-8 forward primer

<400> 16
 gccacgaatt cgcacagca ggtaaa 26

<210> 17
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-8 reverse primer

<400> 17
 gccatctcga gtccagtttg gacatt 26

<210> 18
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-9 forward primer

<400> 18
gccatgaatt ccaaactgga gcgatc 26

<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-9 reverse primer

<400> 19
gccatctcga gtttttgga accacc 26

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-10 forward primer

<400> 20
gcaccggaat tcaggcaagc ttttgag 27

<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 21
gccatcctcg agccttgctt tcaaaga 27

<210> 22

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-11 forward primer

<400> 22
 gccacgaatt caggcaagaa gcagaa 26

<210> 23
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-11 reverse primer

<400> 23
 gcctactcga gaaccttttc aggttc 26

<210> 24
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-12 forward primer

<400> 24
 gccccgaatt ctatgggat aatggt 26

<210> 25
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26-12 Cag26-12

<400> 25
gccacctcga gaaccaaagc taaatg 26

<210> 26
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-13 forward primer

<400> 26
gccacgaatt cgagtttggt aatggg 26

<210> 27
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-13 reverse primer

<400> 27
gccccctcga gtgaaacttt tctaac 26

<210> 28
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-14 forward primer

<400> 28
gccccgaatt ccaataaagc tgtagc 26

<210> 29
<211> 26

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-14 reverse primer

<400> 29
gcatactcga gcaccgagtc ttttaag 26

<210> 30
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-15 forward primer

<400> 30
gccccgaatt cgtgaaagat ttaggc 26

<210> 31
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-15 reverse primer

<400> 31
gccccctcga gcaattcttt cctgat 26

<210> 32
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-16 forward primer

<400> 32
gccccgaatt caaagaattg aacgag 26

<210> 33
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-16 reverse primer

<400> 33
gcatactcga gttcttggtc ccttga 26

<210> 34
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-17 forward primer

<400> 34
gccacgaatt ccgtagaatt ggcgat 26

<210> 35
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cag26-17 reverse primer

<400> 35
gccacctcga gcgaatcaga ataatc 26

<210> 36
<211> 26
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cag26-18 forward primer

<400> 36

gccacgaatt catcaggagc gaattg

26

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cag26-18 reverse primer

<400> 37

gccacctcga gtgcattaag gttttc

26

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cag26-19 forward primer

<400> 38

gccccgaatt cgctttgaat gatttc

26

<210> 39

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cag26-19 reverse primer

<400> 39

gcatactcga gttgctctac cttact

26

<210> 40
<211> 133
<212> PRT
<213> Helicobacter pylori

<400> 40
Glu Ala Ser Lys Glu Ala Arg Ala Ala Ala Phe Asp Pro Asn Leu Lys
1 5 10 15

Gly Ile Arg Ser Glu Leu Ser Asp Lys Leu Glu Asn Ile Asn Lys Asn
20 25 30

Leu Lys Asp Phe Gly Lys Ser Phe Asp Glu Leu Lys Asn Gly Lys Asn
35 40 45

Lys Asp Phe Ser Lys Ala Glu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Lys Asp Ser
50 55 60

Val Lys Asp Leu Gly Ile Asn Pro Glu Trp Ile Ser Lys Ile Glu Asn
65 70 75 80

Leu Asn Ala Ala Leu Asn Asp Phe Lys Asn Gly Lys Asn Lys Asp Phe
85 90 95

Ser Lys Val Thr Gln Ala Lys Ser Asp Leu Glu Asn Ser Ile Lys Asp
100 105 110

Val Ile Ile Asn Gln Lys Ile Thr Asp Lys Val Asp Asn Leu Asn Gln
115 120 125

Ala Val Ser Glu Thr
130

<210> 41
<211> 390
<212> PRT
<213> Helicobacter pylori

<400> 41
Met Ala Lys Glu Ile Lys Phe Ser Asp Ser Ala Arg Asn Leu Leu Phe

1	5	10	15
Glu Gly Val Arg Gln Leu His Asp Ala Val Lys Val Thr Met Gly Pro	20	25	30
Arg Gly Arg Asn Val Leu Ile Gln Lys Ser Tyr Gly Ala Pro Ser Ile	35	40	45
Thr Lys Asp Gly Val Ser Val Ala Lys Glu Ile Glu Leu Ser Cys Pro	50	55	60
Val Ala Asn Met Gly Ala Gln Leu Val Lys Glu Val Ala Ser Lys Thr	65	70	75
Ala Asp Ala Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Tyr	85	90	95
Ser Ile Phe Lys Glu Gly Leu Arg Asn Ile Thr Ala Gly Ala Asn Pro	100	105	110
Ile Glu Val Lys Arg Gly Met Asp Lys Ala Ala Glu Ala Ile Ile Asn	115	120	125
Glu Leu Lys Lys Ala Ser Lys Lys Val Gly Gly Lys Glu Glu Ile Thr	130	135	140
Gln Val Ala Thr Ile Ser Ala Asn Ser Asp His Asn Ile Gly Lys Leu	145	150	155
Ile Ala Asp Ala Met Glu Lys Val Gly Lys Asp Gly Val Ile Thr Val	165	170	175
Glu Glu Ala Lys Gly Ile Glu Asp Glu Leu Asp Val Val Glu Gly Met	180	185	190
Gln Phe Asp Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asn Ala Glu	195	200	205
Lys Met Thr Ala Gln Leu Asp Asn Ala Tyr Ile Leu Leu Thr Asp Lys	210	215	220
Lys Ile Ser Ser Met Lys Asp Ile Leu Pro Leu Leu Glu Lys Thr Met	225	230	235
			240

Lys Glu Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Ile Glu Gly Glu
245 250 255

Ala Glu Ala Ser Lys Glu Ala Arg Ala Ala Ala Phe Asp Pro Asn Leu
260 265 270

Lys Gly Ile Arg Ser Glu Leu Ser Asp Lys Leu Glu Asn Ile Asn Lys
275 280 285

Asn Leu Lys Asp Phe Gly Lys Ser Phe Asp Glu Leu Lys Asn Gly Lys
290 295 300

Asn Lys Asp Phe Ser Lys Ala Glu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Lys Asp
305 310 315 320

Ser Val Lys Asp Leu Gly Ile Asn Pro Glu Trp Ile Ser Lys Ile Glu
325 330 335

Asn Leu Asn Ala Ala Leu Asn Asp Phe Lys Asn Gly Lys Asn Lys Asp
340 345 350

Phe Ser Lys Val Thr Gln Ala Lys Ser Asp Leu Glu Asn Ser Ile Lys
355 360 365

Asp Val Ile Ile Asn Gln Lys Ile Thr Asp Lys Val Asp Asn Leu Asn
370 375 380

Gln Ala Val Ser Glu Thr
385 390