



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0081109
(43) 공개일자 2009년07월28일

(51) Int. Cl.

C12N 15/64 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0007007

(22) 출원일자 2008년01월23일

심사청구일자 2008년01월23일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

조명제

경남 진주시 강남동 7-24

박정원

경남 진주시 가좌 주공2차 201-705호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

권오식, 박창희, 김종관

전체 청구항 수 : 총 8 항

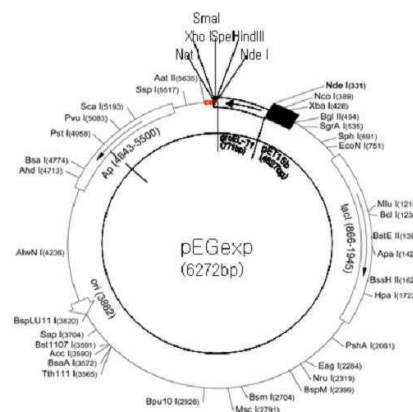
(54) 헬리코박터 파이로리의 단백질 항원결정기 분석을 위한융합단백질 발현용 벡터 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 헬리코박터 파이로리의 항원결정기와 유전자 절편의 발현을 위한 융합단백질용 벡터 pEGexp 개발에 관한 것으로서, 대장균 발현벡터를 이용하여 헬리코박터 파이로리 유전자중 발현양이 많은 GroEL 단백질 중 5' 말단 쪽을 삽입하여 발현 유도단백질로 사용하고 아래쪽에 트롬빈작용 도메인을 삽입한다. 그 다음 다양한 제한효소자리를 삽입하여 헬리코박터 파이로리 유전자 절편을 삽입할 수 있도록 제조하였다.

본 벡터는 유전자 전체, 일부, 그리고 단편을 융합단백질 형태로 발현하고 트롬빈을 이용하여 삽입된 유전자의 단백질을 분리할 수 있는 장점이 있으며, 헬리코박터 파이로리의 항원결정기와 각종 유전자 도메인을 유도단백과 융합된 상태로 발현이 되어 항원결정기의 기능과 도메인의 역할을 연구하는데 광범위하게 사용할 수 있다. 또한 본 발명을 통해 기능이 확인된 삽입유전자에 해당되는 단백을 쉽게 절단하여 그 특성을 조사할 수 있는 기반이 마련되었다.

대표도 - 도3



(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

이승규

경남 진주시 칠암동 한주APT 1906호

김경미

경남 진주시 칠암동 한주APT 1906호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 RT104-03-07

부처명 산업자원부

연구사업명 지방기술혁신사업

연구과제명 Helicobacter pylori 항원결정기 재조합 단백질을 이용한진단소재 개발

주관기관 (재)경남테크로파크

연구기간 2005년 10월 01일 ~ 2008년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

5' 말단에서 3' 말단 방향으로 T7 촉진자서열, 젓당 작동자서열, 리보솜 결합서열, 히스티딘 꼬리서열, 헬리코박터 파이로리 GroEL 염기서열, 트롬빈 도메인서열 및 클로닝 제한효소 인식부위서열을 포함하는 융합단백질 발현용 벡터.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 벡터는 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 융합단백질 발현용 벡터.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 헬리코박터 파이로리 GroEL의 염기서열은 1번에서 767번째까지 포함하는 GroEL-T1 염기서열인 것을 특징으로 하는 융합단백질 발현용 벡터.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 제한효소는 *NdeI*, *HindIII*, *SpeI*, *SmaI*, *XhoI* 및 *NotI*으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 융합단백질 발현용 벡터.

청구항 5

- 1) 헬리코박터 파이로리 GroEL의 유전자 절편을 증폭하고 서브-클로닝 하여 클론을 얻은 후 제한효소를 처리하고, 분리한 후 정제하는 단계;
 - 2) 상기 1) 단계에서 처리한 동일한 제한효소를 발현벡터에 처리하는 단계;
 - 3) 상기 1) 단계의 정제된 유전자 절편과 상기 2) 단계의 벡터를 클로닝 하여 클론을 얻는 단계;
 - 4) 상기 클론에 제한효소를 처리한 후 자가 클로닝 하여 재조합 플라스미드를 얻는 단계;
 - 5) 상기 재조합 플라스미드를 유도단백발현 정제 및 절단용 프라이머를 사용하여 증폭하고 DNA 절편을 얻는 단계;
 - 6) 상기 증폭된 DNA 절편에 제한효소를 처리하고 정제한 후, 동일한 제한효소를 상기 4) 단계에서 얻은 재조합 플라스미드에 처리하는 단계;
 - 7) 상기 5) 단계의 DNA 절편을 상기 6) 단계의 재조합 플라스미드에 클로닝 하여 최종 벡터를 얻는 단계; 및
 - 8) 상기 7) 단계에서 얻은 벡터를 대장균 숙주에 형질전환 시켜 플라스미드 DNA로 대량 제조하는 단계;
- 를 포함하는 헬리코박터 파이로리의 단백질 항원결정기 분석을 위한 융합단백질 발현용 벡터의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 4) 단계의 재조합 플라스미드는 헬리코박터 파이로리 GroEL의 염기서열 1번에서 767번째까지의 염기서열을 갖는 GroEL-T1이 포함된 pET15bsxn/GroEL-T1인 것을 특징으로 하는 융합단백질 발현용 벡터의 제조방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 5) 단계의 유도단백발현 정제 및 절단용 프라이머는 T7 촉진자서열, 젓당 작동자서열, 리보솜 결합서열,

히스티딘 꼬리서열, 헬리코박터 파이로리 GroEL 염기서열, 트롬빈 도메인서열 및 클로닝 제한효소 인식부위서열의 순서로 삽입하기 위한 프라이머인 것을 특징으로 하는 융합단백질 발현용 벡터의 제조방법.

청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 7) 단계의 최종 벡터는 pEGexp인 것을 특징으로 하는 융합단백질 발현용 벡터의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 헬리코박터 파이로리의 단백질 항원결정기 분석을 위한 융합단백질 발현용 벡터 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 헬리코박터 파이로리 유전자 중 대장균에서 안정적으로 발현양이 많은 GroEL 유전자 염기서열 1번에서 767번까지 삽입하여 발현 유도단백으로 사용하고 아래쪽에 트롬빈작용 도메인을 삽입한다. 그 다음 다양한 제한효소자리를 삽입하여 헬리코박터 파이로리 유전자 전체, 일부, 그리고 단편을 삽입할 수 있도록 설계하였다. 본 벡터는 헬리코박터 특정 유전자 전체, 일부, 그리고 단편을 융합단백질 형태로 발현하고 트롬빈을 이용하여 삽입된 유전자의 생산물을 쉽게 정제할 수 있다.

배경 기술

- <2> 일반적으로 헬리코박터 파이로리 유전자는 대장균에서 단백질로 발현시키는 것이 쉽지 않다. 이는 헬리코박터 파이로리가 독특한 DNA 제한수식 체계를 갖고 있기 때문으로 판단된다. 이와 더불어 헬리코박터 파이로리의 유전자는 대장균 체계에서 발현되는 비율이 지극히 낮은 것으로 알려져 있다. 현재 헬리코박터 파이로리 전체 유전자 염기서열이 공개되었고 또한 염기서열을 기초로 개별 유전자가 알려져 있음에도 불구하고 이들 유전자의 생물학적 성상에 대한 연구는 미진한 상태에 있다. 그 이유는 헬리코박터 파이로리 유전자가 대장균에서 발현되지 않아서 추가적인 연구를 수행하기가 쉽지 않기 때문으로 판단된다.
- <3> 특정 균종의 유전자가 대장균에 발현이 되지 않은 대표적인 이유로는 균종에 따라서 코돈구성이 다르다는 점을 들고 있다. 따라서 코돈의 구성성분을 교정한 대장균 숙주가 개발되어 시판됨으로써 이러한 문제점을 현실적으로 해결되었다고 판단된다. 다음으로는 발현된 단백질이 대장균에 독성작용을 나타내거나 대사를 방해할 수 있다. 이소프로필-베타-티오갈락토사이드(isopropyl-beta-thiogalactoside ; IPTG) 유도체계를 이용함으로써 숙주세포에 대한 독성 또는 대사방해 문제를 최대한 해결하고자 하나 아주 작은 양의 발현은 막을 방법이 없는 현실이다. 또한 발현된 단백질이 대장균 숙주 내에서 쉽게 분해되는 경우가 있다.
- <4> 대장균에서 다른 균종의 유전자 발현 효율을 높이기 위하여 대장균에서 발현이 잘되는 유래 단백 서열 다음에 삽입하여 유도단백과 융합된 상태로 발현시킴으로 독성과 분해의 문제를 최대한 극복하고 있다. 현재 사용하는 유도단백으로 글루타티온 S-전달효소(glutathion S-transferase), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 그리고 만노즈 수용체 등이 사용되고 있다. 이러한 유도단백은 대장균 유래 단백질이다. 대장균은 사람의 면역체계에 자주 노출됨으로써 대부분의 사람은 대장균 균체성분에 대한 항체를 형성하고 있다. 따라서 기존의 대장균 융합단백질 발현벡터를 사용할 경우 융합단백질에 반응하는 항체 때문에 목적하는 항원결정기의 검색과 반응성 분석이 불가능하다.
- <5> 따라서 헬리코박터 파이로리의 유전자 전체 또는 일부 절편을 클로닝 하여 사람의 항체를 이용하여 항원성을 분석하기 위해서는 새로운 융합단백질용 발현벡터의 개발이 필요하다. 본 발명자는 헬리코박터 파이로리 유전자 발현연구를 통하여 이 세균의 GroEL 유전자는 발현효율이 우수하고 이 유전자의 5'말단에서 767번까지 염기서열을 발현하였을 때 사람혈청에서 항체반응성이 없음을 관찰하였다. 이러한 특성을 이용한다면 헬리코박터 파이로리 단백질의 항원결정기를 비롯하여 도메인 또는 항원결정기의 생물학적 역할 분석에 사용할 수 있는 새로운 융합단백질 벡터의 제조가 가능할 것으로 판단하였다.
- <6> 특정 단백질의 생물학적 성상을 조사하기 위해서는 몇 개의 아미노산이 구성하는 항원결정기 수준에서의 역할이 규명되어야 한다. 헬리코박터 파이로리 단백질의 생물학적 기능을 도메인과 항원결정기 수준에서 분석할 수 있는 벡터의 개발은 이 세균감염의 병리학적 기전을 이해하거나 진단방안을 강구하는데 필수적이라고 판단된다.

<7>

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 본 발명은 헬리코박터 파이로리 GroEL 유전자 중 5' 말단에서 767번째 염기서열(257번째 아미노산 잔기)을 이용하여 기존에 사용하고 있는 T7 촉진자(promoter), 히스티딘 꼬리(His tag), 그리고 트롬빈 도메인을 삽입하여 헬리코박터 파이로리 유전자 전체, 일부, 그리고 단편을 발현하여 분석하고 또한 삽입된 유전자 발현단백을 분리 정제할 수 있는 융합단백 발현용 벡터 pGexp를 조립하고 실용성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- <9> 따라서 본 발명의 제 1목적은 5' 말단에서 3' 말단 방향으로 T7 촉진자서열, 젓당 작동자서열, 리보솜 결합서열, 히스티딘 꼬리서열, 헬리코박터 파이로리 GroEL-T1 염기서열, 트롬빈 도메인서열 및 클로닝 제한효소 인식부위서열을 포함하는 융합단백질 발현용 벡터를 제공하는 것이다.
- <10> 또한, 본 발명의 제 2목적은 융합단백질 발현용 벡터인 pEGexp의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <11> 상기와 같은 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 융합단백질 발현용 벡터 및 그의 제조방법을 제공하고자 한다.
- <12> 본 발명은 5' 말단에서 3' 말단 방향으로 T7 촉진자서열, 젓당 작동자서열, 리보솜 결합서열, 히스티딘 꼬리서열, 헬리코박터 파이로리 GroEL 염기서열, 트롬빈 도메인서열 및 클로닝 제한효소 인식부위서열을 포함하는 융합단백질 발현용 벡터에 관한 것이다. 상기 벡터는 하기 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)의 유전자 전체, 일부, 그리고 단편을 발현하기 위한 융합단백질 발현용 벡터이다.
- <13> AATCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATC
- <14> ATCATCACAGCAGCGGCCAGGAGCCGCGGCCATCCTTATGCAAAAAGAAATCAAATTTTCAGATAGTGCAA
- <15> GAAACCTTTTATTGAAGGCGTGAGACAACATCCATGACGCTGTCAAAGTAACCATGGGACCAAGAGGCAGG
- <16> AATGTGTTGATTCAAAAAAGCTATGGCGCTCCAAGCATCACAAAGACGGCGTGAGCGTGCGTAAAGAGAT
- <17> TGAATTAAGTTGCCCGTGGCCAACATGGGCGCTCAACTCGTTAAAGAAGTAGCGAGCAAAACCGCTGATG
- <18> CTGCCGCGATGGCAGCACCACAGCGACCGTGCTTGCTTATAGCATCTTTAAAGAAGGCTTGAGGAATATC
- <19> ACGGCTGGGGCTAACCCTATTGAAGTGAAACGAGGCATGGATAAAGCCGCTGAAGCGATTATTAATGAGCT
- <20> TAAAAAGCGAGCAAAAAAGTAGGCGGTAAAGAAGAAATCACCCAAGTAGCGACCATTTCTGCAAACTCCG
- <21> ATCACAATATCGGAAAACATCGCTGACGCTATGGAAAAAGTGGGTAAAGACGGCGTGATCACCGTTGAA
- <22> GAAGCTAAGGCATTGAAGATGAATTAGATGTCGTAGAGGGCATGCAATTTGATAGAGGCTACCTCTCCCC
- <23> TTACTTTGTAACAAACGCTGAGAAAATGACCGCTCAATTGGATAACGCTTACATCCTTTTAACGGATAAAA
- <24> AAATCTCTAGCATGAAAGACATTCTCCCTCTACTAGAAAAAACCATGAAAGAGGGTAAACCGCTTTAATC
- <25> ATCGCTGAAGACATTGAGGGCGAAGCTGGGATCCCGGAATTCTTTGTGCGACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCG
- <26> CGGCAGCCATATGAAGAAAAGCTTTGTGTCAGCATGCCCGGTTTCGCCTCGAGCGGCCCATCGTGA
- <27> (서열번호 6)
- <28> 상기 헬리코박터 파이로리 GroEL의 염기서열은 1번에서 767번째까지 포함하는 염기서열로써, GroEL-T1으로 명명한다. 또한, 상기 제한효소는 *NdeI*, *HindIII*, *SpeI*, *SmaI*, *XhoI* 및 *NotI*으로 구성되어 있다.
- <29> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <30> 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.
- <31> 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.

<32>

<33> 본 발명은 상기의 염기서열을 기존에 알려진 대장균 플라스미드에 삽입하여 헬리코박터 파이로리 유전자 전체, 일부 및 단편을 융합단백질형태로 발현하고 삽입된 부분을 쉽게 정제할 수 있는 융합단백질 발현용 벡터 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

<34> 본 발명은,

<35> 1) 헬리코박터 파이로리 GroEL의 유전자 절편을 증폭하고 서브-클로닝 하여 클론을 얻은 후 제한효소를 처리하고, 분리한 후 정제하는 단계;

<36> 2) 상기 1) 단계에서 처리한 동일한 제한효소를 발현벡터에 처리하는 단계;

<37> 3) 상기 1) 단계의 정제된 유전자 절편과 상기 2) 단계의 벡터를 클로닝 하여 클론을 얻는 단계;

<38> 4) 상기 클론에 제한효소를 처리한 후 자가 클로닝 하여 재조합 플라스미드를 얻는 단계;

<39> 5) 상기 재조합 플라스미드를 유도단백발현 정제 및 절단용 프라이머를 사용하여 증폭하고 DNA 절편을 얻는 단계;

<40> 6) 상기 증폭된 DNA 절편에 제한효소를 처리하고 정제한 후, 동일한 제한효소를 상기 4) 단계에서 얻은 재조합 플라스미드에 처리하는 단계;

<41> 7) 상기 5) 단계의 DNA 절편을 상기 6) 단계의 재조합 플라스미드에 클로닝 하여 최종 벡터를 얻는 단계; 및

<42> 8) 상기 7) 단계에서 얻은 벡터를 대장균 숙주에 형질전환 시켜 플라스미드 DNA로 대량 제조하는 단계;

<43> 를 포함하는 헬리코박터 파이로리의 단백질 항원결정기 분석을 위한 융합단백질 발현용 벡터의 제조방법에 관한 것이다.

<44> 상기 1) 단계와 2) 단계에서 pET15bsxn에 헬리코박터 파이로리 GroEL이 유도단백질로 발현되도록 코돈을 맞추기 위해서는 5' 말단에는 NdeI을 사용하며, 3' 말단은 XhoI를 사용한다.

<45> 상기 2) 단계의 발현벡터인 pET15bsxn은, pET15b 벡터의 제한효소자리 ClaI과 EcoRI을 SalI, XhoI, NotI으로 변형시킨 대장균 발현벡터이다.

<46> 상기 4) 단계의 재조합 플라스미드는 헬리코박터 파이로리 GroEL의 염기서열 1번에서 767번째까지의 염기서열을 갖는 GroEL-T1이 포함된 pET15bsxn/GroEL-T1인 융합단백질 발현용 벡터를 제조하기 위하여 상기 3) 단계에서 얻은 재조합 클론 pET15b/GroEL을 HindIII로 처리하여 GroEL의 767번 이후 서열을 제거시킨다.

<47> 상기 5) 단계의 유도단백발현 정제 및 절단용 프라이머는 T7 촉진자서열, 젓당 작동자서열, 리보솜 결합서열, 히스티딘 꼬리서열, 헬리코박터 파이로리 GroEL-T1 염기서열, 트롬빈 도메인서열 및 클로닝 제한효소 인식부위 서열의 순서로 삽입하기 위한 프라이머이다.

<48> 상기 6) 단계에서 유도단백발현정제절단을 위한 염기서열이 바르게 삽입되기 위해서 5' 말단에는 XbaI을 사용하며, 3' 말단은 NotI을 사용한다.

<49> 상기와 같은 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 상기 7) 단계의 최종 벡터인pEGexp를 완성함으로써, 헬리코박터 파이로리 단백질의 항원결정기와 도메인의 생물학적 역할을 연구할 수 있는 기반을 마련하였다.

효 과

<50> 이상과 같이, 본 발명은 헬리코박터 파이로리 유전자중 대장균에서 안정적으로 발현양이 많은 GroEL 유전자 염기서열 1번에서 767번까지 삽입하여 발현 유도단백으로 사용하고 아래쪽에 트롬빈작동 도메인을 삽입하고 그 다음 다양한 제한효소자리를 삽입한 헬리코박터 파이로리의 유전자 전체, 일부, 그리고 단편을 삽입할 수 있는 벡터를 개발함으로써 유전자 전체, 일부, 그리고 단편을 융합단백질 형태로 발현하고 트롬빈을 이용하여 삽입된 유전자의 단백질을 분리할 수 있는 장점이 있으며, 헬리코박터 파이로리의 항원결정기와 각종 유전자 도메인을 유도단백과 융합된 상태로 발현이 되어 항원결정기의 기능과 도메인의 역할을 연구하는데 광범위하게 사용할 수 있다. 또한 본 발명을 통해 기능이 확인된 삽입유전자에 해당되는 단백을 쉽게 절단하여 그 특성을 조사할 수 있는 기반이 마련되었다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<51> 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.

<52> **[실시예 1] 헬리코박터 파이로리 GroEL 유전자의 분석**

<53> 국내에서 분리된 헬리코박터 파이로리 GroEL 단백질 유전자 염기서열자료를 분석하면 하기 서열번호 1과 같다. 전체크기는 1,641 bp이고 546개 아미노산으로 형성되어 있다. 염기서열 분석 프로그램인 레이저진(Lasergene)으로 분석하면 하기 도 1과 같이 염기서열 767번째에 *Hind*III 자리가 위치하고 있다.

<54> atggcaaaagaaatcaaattttcagatagtgaagaacacctttttattgaaggcgtgaga 60
 <55> caactccatgacgctgtcaaagtaacatgggaccaagaggcaggaatgtgttgattcaa 120
 <56> aaaagctatggcgctccaagcatcaccaaagacggcgtagcgctggctaaagagattgaa 180
 <57> ttaagttgccgggtggccaacatggcgctcaactcgttaaagaagtagcgagcaaaacc 240
 <58> gctgatgctgccggcgatggcagcaccacagcgaccgtgcttgcttatagcatctttaa 300
 <59> gaaggcttgaggaatatcacggctggggctaaccctattgaagtgaacgaggcatggat 360
 <60> aaagccgctgaagcgattattaatgagcttaaaaaagcgagcaaaaaagtagcggtaaa 420
 <61> gaagaaatcacccaagtagcgaccatttctgcaaacctccgatcacaatcggaaaaactc 480
 <62> atcgctgacgctatggaaaaagtggttaagacggcgatgacccgttgaagaagctaa 540
 <63> ggcatgaagatgaattagatgtcgtagaggcgatgcaatttgatagaggctacctctcc 600
 <64> ccttactttgttaacaaacgctgagaaaaatgaccgctcaattggataacgcttacatcctt 660
 <65> ttaacggataaaaaaatctctagcatgaaagacattctccctctactagaaaaaacatg 720
 <66> aaagagggtaaaccgcttttaatcatcgctgaagacattgaggcggaagctttaacgact 780
 <67> ctagtggatgaataaattaaaggcgctgttaatatcgacgggttaagctccaggcttt 840
 <68> ggggacagaagaaaagaaatgctcaaagacatcgccattttaaccggcggtcaagtcac 900
 <69> agcgaagaattaggcttgactttagaaaacgctgaagtgagtttttaggcaaaagccgga 960
 <70> aggatgtgatgacaaagacaaccacgatcgtagatggcaaggccatagccatgat 1020
 <71> gtcaaagacagagtcgcaaatcaaaacccaaattgcaagcacgacaagcgattatgac 1080
 <72> aaagaaaaattgcaagaaagattggctaaactctctggcggtgtggctgtgattaaagt 1140
 <73> ggcgctgcgagtgaagtggaatgaaagagaaaaagaccgggttgatgacgcttgagc 1200
 <74> gcgactaaagcggtgttgaagaaggcattgttatgggtggcggtgcggtctcatcg 1260
 <75> gcggctcaaaaagtgcatttgaatttacacgatgatgaaaaagtggtgatgaaatcatc 1320
 <76> atgctgccattaaagcccattagctcaaatcgctatcaatgccggttatgatggcggt 1380
 <77> gtggtcgatgaatgaagtcaaaaacacgaaggcattttggttttaacgctagcaatggc 1440
 <78> aagtatgtggatatgtttaaagaaggcattattgacccttaaaagtagaaaggatcgct 1500
 <79> ttacaaaatgcggtttcggtttcaagcctgcttttaactacagaagccaccgtgcatgaa 1560
 <80> atcaaagaagaaaaagcaactccagcaatgcctgatatgggtggcatggcggtatggga 1620
 <81> ggcatggcgcgcatgatgtaa 1641

- <82> (서열번호 1)
- <83> [제조예 1] 헬리코박터 파이로리 GroEL 유전자 전체와 767번까지 절편의 클로닝과 발현
- <84> 헬리코박터 파이로리 GroEL 유전자 전체를 아래의 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)으로 합성하였다.
- <85> GroEL 순방향프라이머 : 5' -GCTGCGCATATGGCAAAAGAAATCAAA- 3' (서열번호 2)
- <86> GroEL 역방향프라이머 : 5' -GGATCCTTACATCATGCCGCCCAT- 3' (서열번호 3)
- <87> 전체 오픈리딩프레임(open reading frame)이 함유 되도록 GroEL 유전자의 염기서열을 이용하여 프라이머를 만들고 PCR 방법으로 유전자 절편을 증폭시켰다. 순방향 프라이머에는 5' 말단에 *NdeI* 자리와 역방향 프라이머는 *BamHI* 자리를 삽입하였다. PCR 증폭 후에는 바로 pGEM-T 벡터에 클로닝 하여 클론을 얻었다. pGEM-T 벡터에 삽입된 유전자 DNA를 *NdeI*와 *BamHI*으로 절단하여 1% 아가로스 젤 전기영동 하여 분리하고 절편 DNA를 아가로스 겔로부터 분리하여 정제한 후, 상기와 동일한 제한효소를 처리한 pET15bsxn 벡터를 상기 정제한 DNA와 라이게이션 하여 pET15bsxn/GroEL을 클로닝 하였다.
- <88> 또한, GroEL-T1 클론 생산은 앞에서 GroEL 전체 유전자가 삽입된 클론을 이용하여 제한효소 *HindIII*로 절단하여 875 bp크기의 절편을 제거하고 나머지 DNA 절편을 자가 라이게이션 반응을 일으켜 GroEL-T1만 삽입된 클론 pET15bsxn/GroEL-T1을 얻었다.
- <89> [실시예 2] 헬리코박터 파이로리 GroEL 유전자 전체와 GroEL-T1 절편의 발현
- <90> 상기 제조예 1과 같이 제조된 클론 pET15bsxn/GroEL과 pET15bsxn/GroEL-T1이 함유하고 있는 삽입된 유전자 단백질의 발현여부를 확인하기 위하여 이들 클론 플라스미드를 발현대장균 숙주에 형질전환 시키고 이소프로필티오갈락토사이드(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)를 첨가하여 발현을 유도한 결과 모두 효율적으로 발현하였다.
- <91> 헬리코박터 파이로리 GroEL 유전자와 GroEL-T1 절편이 삽입된 pET15bsxn/GroEL과 pET15bsxn/GroEL-T1 재조합 플라스미드를 대장균 DH10B/r에 형질 전환시켜 클로닝된 플라스미드 클론을 얻고 이를 다시 발현 숙주인 대장균 균주 로제타(Rosetta) 2에 형질전환 시켜 이소프로필티오갈락토사이드를 처리하여 삽입된 유전자를 발현시켰다. 단백질의 발현여부는 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 통하여 확인하였다.
- <92> [실시예 3] SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
- <93> 단백질 발현여부는 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 세균체를 초음파 파쇄기로 파쇄 시켰다. 파쇄된 세균체액과 2배 농도의 SDS-PAGE 시료완충액과 동량 혼합한 다음 100℃에서 5분간 끓였다. 이를 미리 제조한 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 적용하여 변성조건으로 전기영동 하였다. 10 mA에서 브로모페놀 마커(bromophenol marker)가 바닥에 닿을 때까지 전기영동 하였다. 그 결과 하기 도 2A와 같이 GroEL 전체 유전자가 삽입된 클론은 60 kDa의 단백질이 다량 발현되는 것과 GroEL-T1 절편은 30 kDa의 단백질이 다량 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 겔을 2장 만들어 한 개는 코마시블루 염색을 실시하여 발현된 단백질을 확인하고 다른 겔은 면역블롯 분석에 사용하였다.
- <94>
- <95> [실시예 4] 면역블롯 분석법에 의한 GroEL 단백질과 GroEL-T1 절편단백의 항원성 분석
- <96> 환자의 혈청을 이용하여 GroEL 단백질과 GroEL-T1 결손 단백질의 항원성을 분석하였다. 상기 실시예 3에서 발현시킨 대장균 균체를 SDS-PAGE를 실시한 겔을 10% 아세톤과 10% 메타놀 용액을 사용하여 고정시켰다. 이를 니트로셀룰로즈 여과지에 올려놓고 겔 쪽에 음극선, 여과지에 양극선을 연결하여 전기적으로 단백질을 여과지로 옮겼다. 120 mA로 60 분간 4℃의 전달 완충액(20 mM Tris, 0.01% SDS, 144 mM 글리신 pH 8.3, 25% 메타놀)에서 전기 전달시켰다. 이 니트로셀룰로즈 여과지를 1% 우혈청 용액으로 니트로셀룰로즈 여과지의 나머지 단백질 결합 부위를 차단시킨 후, 여과지를 1:10으로 희석시킨 환자혈청과 37℃에서 한 시간 반응시켰다. 반응 후 완충액으로 세척하고 알칼리성 포스파타제가 결합된 가토 항-인체 항체를 1:500으로 희석하여 첨가하고 37℃에서 30분간 반응시켰다. 완충액으로 5회 세척한 다음 기질용액을 넣어 실온에서 15분간 효소반응을 진행시켰다. 기질용액은 알칼리성 포스파타제 완충액(100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgSO₄ pH 9.5)에 0.03% 니트로블루테트라졸리움(nitroblue tetrazolium) 기질과 0.015% 브로모클로로인도릴포스페이트(5-bromo-4-chloro-3-indolyl

phosphate) (BCIP) 기질을 첨가하여 제조하였다. 효소반응은 반응 중지용 완충액(20 mM tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0)으로 중지시켰다.

<97> 그 결과 하기 도 2B와 같이 GroEL 전체 유전자가 삽입된 클론은 60 kDa의 단백질획에 강한 반응성을 보였으나 GroEL-T1 절편 유전자는 30 kDa의 단백질획에는 반응성이 없었다. 이러한 결과를 통해 헬리코박터 파이로리 GroEL 유전자의 발현단백은 염기서열 1번에서 767번까지는 환자혈청과 반응하는 항원결정기가 존재하지 않는다는 것을 확인하였다.

<98> [제조예 2] GroEL-T1을 유도단백으로 이용한 유도단백 정제절단 염기서열을 삽입한 pEGexp 제조

<99> 상기 실시예 3과 실시예 4의 결과에 따라 헬리코박터 파이로리의 항원결정기를 비롯한 기타 항원결정기를 융합 단백질로 발현하는 유도단백으로 적합하다는 결론을 내렸다. 따라서 GroEL-T1을 유도단백으로 이용하여 헬리코박터 파이로리 유전자절편을 삽입하고 발현한 다음 정제하고 절단할 수 있는 도메인을 삽입하기 위하여 아래와 같은 프라이머를 설계하였다.

<100> GroEL-T1 순방향 프라이머:

<101> 5'-

AATTCCTCTAGAAATAATTTTGTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCAGGAGCCGCGCGCATCCTTATGCAAAAGA- 3' (서열번호 4)

<102> GroEL-T1 역방향 프라이머:

<103> 5'-

TCAGTCACGATGCGGCCGCTCGAGGCGAACCCGGGCATGCTGACAAAGCTTTTCTTCATATGGCTGCCGCGCGCACCAGGCCGCTGCTGTCGACAAAGAATTCGGGATCCAGCTTCGCCCTC- 3' (서열번호 5)

<104> pET15bsxn/GroEL-T1 플라스미드 DNA를 주형으로 사용하여 상기의 프라이머로 증합효소연쇄반응을 유도하여 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA의 서열은 하기 서열번호 6과 같다.

<105> AATTCCTCTAGAAATAATTTTGTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATC

<106> ATCATCACAGCAGCGGCCAGGAGCCGCGGCCATCCTTATGCAAAAGAAATCAAATTTTCAGATAGTGCAA

<107> GAAACCTTTTATTTGAAGCGTGAGACAACCTCATGACGCTGTCAAAGTAACCATGGGACCAAGAGGCAGG

<108> AATGTGTGATTCAAAAAAGCTATGGCGCTCCAAGCATCACAAAGACGGCGTGAGCGTGCTAAAGAGAT

<109> TGAATTAAGTTGCCCGTGGCCAACATGGGCGCTCAACTCGTTAAAGAAGTAGCGAGCAAAACCGCTGATG

<110> CTGCCGGCGATGGCAGCACACAGCGACCGTGCTTGCTTATAGCATCTTTAAAGAAGGCTTGAGGAATATC

<111> ACGGCTGGGGCTAACCTTATTGAAGTGAAACGAGGCATGGATAAAGCCGCTGAAGCGATTATTAATGAGCT

<112> TAAAAAAGCGAGCAAAAAAGTAGGCGGTAAAGAAGAAATCACCAAGTAGCGACCATTTCTGCAAACTCCG

<113> ATCACAATATCGAAAACTCATCGCTGACGCTATGGAAAAAGTGGGTAAAGACGGCGTGATCACCGTTGAA

<114> GAAGCTAAGGCATTGAAGATGAATTAGATGTCGTAGAGGCATGCAATTTGATAGAGGCTACCTCTCCCC

<115> TTAAGTTGTAACAAACGCTGAGAAAAATGACCGCTCAATTGGATAACGCTTACATCCTTTTAAACGGATAAAA

<116> AAATCTCTAGCATGAAAGACATTCTCCCTCTACTAGAAAAAACCATGAAAGAGGGTAAACCGCTTTTAATC

<117> ATCGCTGAAGACATTGAGGGCGAAGCTGGGATCCCGGAATCTTTGTCGACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCG

<118> CGGCAGCCATATGAAGAAAAGCTTTGTCAGCATGCCCGGGTTCGCCTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGA

<119> (서열번호 6)

<120> 상기 증폭된 DNA 절편을 제한효소 *Xba*I과 *Not*I으로 절단하고, 상기 동일한 제한효소로 절단한 pET15bsxn 플라스미드 DNA와 라이게이션 하였다. 대장균 숙주에 형질전환 하여 최종 목적 벡터인 pEGexp를 대량 제조하였다.

<121> TTCTTGAAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAGGTTTCTTAGACGTCAG 80

<122> GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATG 160

<123>	AGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTAT	240
<124>	TCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGGCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT	320
<125>	TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTT	400
<126>	CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCG	480
<127>	CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA	560
<128>	GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAG	640
<129>	GAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT	720
<130>	ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTA	800
<131>	CTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG	880
<132>	GCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG	960
<133>	TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGA	1040
<134>	TAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCAT	1120
<135>	TTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA	1200
<136>	CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA	1280
<137>	CAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTC	1360
<138>	AGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC	1440
<139>	TACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAA	1520
<140>	GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACC	1600
<141>	TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC	1680
<142>	GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCG	1760
<143>	GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC	1840
<144>	GCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA	1920
<145>	TAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGTCGCCGACGCCAAGCGAGCGAGTCACTGAGCGAGG	2000
<146>	AAGCGGAAGAGCGCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATATGGTGCCTCTCA	2080
<147>	GTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCC	2160
<148>	GACACCCGCCAACACCGCTGACGCGCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTC	2240
<149>	TCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAGGCTCATCAGCGTG	2320
<150>	GTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGC	2400
<151>	TTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGATTCTGTTC	2480
<152>	ATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGA	2560
<153>	ACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATGGATGCGGCGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCG	2640
<154>	TTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCT	2720
<155>	GACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAACCGAAGACCATTATGTTGTTGCTCAGGTGCGAGACGTTTTGCA	2800
<156>	GCAGCAGTCGCTTACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTATTCTGCTAACAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGG	2880
<157>	TCCTCAACGACAGGAGCAGCATCATGCGACCCGTGGCCAGGACCAACGCTGCCCGAGATGCGCCGCTGCGGCTGCTG	2960
<158>	GAGATGGCGGACGCGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGGCGATTACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCTCC	3040

<159>	AATTCCTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCCGCGCTTCCATTCAAGGTCGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCG	3120
<160>	ACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGGTATAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGTGCTCGCCGAGGCGG	3200
<161>	CATAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAGTGATCGAAGTTAGGCTGGTAAGAGCCGCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCC	3280
<162>	TGATGGTCGTCATCTACCTGCCTGGACAGCATGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCCGCGGAAGCGAGAAGAATCAT	3360
<163>	AATGGGGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCCAGCGCTCGGCCGCCATGCCGCGATAA	3440
<164>	TGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACC	3520
<165>	GCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGCGACCTG	3600
<166>	TCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGA	3680
<167>	CTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGC	3760
<168>	TCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTT	3840
<169>	GCGTATTTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCTGGCCCTGA	3920
<170>	GAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGGCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTATGGTGGTTAACGGCGGGATATA	4000
<171>	ACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGC	4080
<172>	GCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCATGGTT	4160
<173>	TGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATG	4240
<174>	CCAGCCAGCCAGACGACGAGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCCTAACAGCGGATTTGCTGGTGACCCAATGCGA	4320
<175>	CCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCA	4400
<176>	AGAAATAACGCCGAACATTAGTGACGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAG	4480
<177>	CCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCTTCGTTCTACCATCGACACCA	4560
<178>	CCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGGTGCAGGGCCAGACTGGAG	4640
<179>	GTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCAT	4720
<180>	CGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCTGGTTCCACACGCGGAAACGGTCTGATAAGAGA	4800
<181>	CACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTAT	4880
<182>	CATGCCATACCGGAAAGGTTTTGCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTA	4960
<183>	GGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGCCGTTGAGCACCGCCGCCGAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAAC	5040
<184>	AGTCCCCCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTC	5120
<185>	CCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGCGCACGATGCGTCCGGCGT	5200
<186>	AGAGGATCGAGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAG	5280
<187>	AATTCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCGAGCCATCATCATCATCACA	5360
<188>	GCAGCGGCCAGGAGCCGCGGCCATCCTTATGCAAAAGAAATCAAATTTTCAGATAGTGCAAGAAACCTTTTATTTGAAG	5440
<189>	GCGTGAGACAACTCCATGACGCTGTCAAAGTAACCATGGGACCAAGAGGCAGGAATGTGTTGATTCAAAAAAGCTATGGC	5520
<190>	GCTCCAAGCATCACAAAGACGGCGTGAGCGTGGCTAAAGAGATTGAATTAAGTTGCCCGGTGGCCAACATGGGCGCTCA	5600
<191>	ACTCGTTAAAGAAGTAGCGAGCAAAACCGCTGATGCTGCCGGCGATGGCACGACCACAGCGACCGTGCTTGCTTATAGCA	5680
<192>	TCTTTAAAGAAGGCTTGAGGAATATCACGGCTGGGGCTAACCTATTGAAGTAAACGAGGCATGGATAAAGCCGCTGAA	5760
<193>	GCGATTATTAATGAGCTTAAAAAGCGAGCAAAAAAGTAGGCGGTAAAGAAGAAATCACCCAAGTAGCGACCATTTCTGC	5840
<194>	AAACTCCGATCACAATATCGGAAACTCATCGCTGACGCTATGAAAAAGTGGGTAAAGACGGCGTGATCACCGTTGAAG	5920

<195> AAGCTAAGGGCATTGAAGATGAATTAGATGTCGTAGAGGGCATGCAATTTGATAGAGGCTACCTCTCCCCTTACTTTGTA 6000
 <196> ACAAACGCTGAGAAAATGACCGCTCAATTGGATAACGCTTACATCCTTTTAACGGATAAAAAATCTCTAGCATGAAAGA 6080
 <197> CATTCTCCCTCTACTAGAAAAAACCATGAAAGAGGGTAACCGCTTTTAATCATCGCTGAAGACATTGAGGGCGAAGCTG 6160
 <198> GGATCCCGGAATTCTTTGTCGACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAAGAAAAGCTTTGTCAGCATGCCC 6240
 <199> GGGTTCGCCTCGAGCGGCCGCATCGTGA 6272

<200> (서열번호 7)

<201> **[실시예 5] pEGexp 벡터를 이용한 헬리코박터 파이로리의 유전자절편 클로닝**

<202> 상기에서와 같이, 삽입된 유전자절편이 유도단백과 융합단백으로 발현되고 정제와 절단이 가능한지를 확인하기 위해서 pEGexp에 헬리코박터 파이로리 유전자 절편을 클로닝 하였다. 헬리코박터 파이로리 Cag26 유전자중 일부인 유전자 염기서열 1999번에서 2397번까지의 절편을 클로닝하기 위하여 하기의 프라이머를 이용하였다.

<203> Cag26 순방향 프라이머 : 5' -GCAATGGAATTCGAGGCTAGTAAGGAA- 3' (서열번호 8)

<204> Cag26 역방향 프라이머 : 5' -CCCGGGCATAACTCGAGAGTCTCTGATACAG- 3' (서열번호 9)

<205> pEGexp의 클로닝 자리에 유전자 코돈을 맞추기 위하여 순방향 프라이머에는 5'말단에 *NdeI* 자리와 역방향 프라이머는 *SmaI* 자리를 삽입하였다. PCR 증폭 후에는 바로 pGEM-T 벡터에 클로닝 하여 클론을 얻었다. pGEM-T 벡터에 삽입된 유전자 DNA를 *NdeI* 과 *SmaI* 으로 절단하여 1% 아가로스겔에 전기영동 하여 분리하고 절편 DNA를 아가로스겔로부터 분리하여 정제한 후, 상기와 동일한 제한효소를 처리한 pEGexp 벡터를 상기 정제한 DNA와 라이게이션하여 pEGexp/Cag26-6을 얻었다.

<206> **[실시예 6] pEGexp/Cag26-6 융합단백질 발현정제와 삽입절편 발현물 정제분리**

<207> 상기 실시예 5에서 얻은 클론 pEGexp/Cag26-6을 대장균 발현숙주에 형질전환시켜 배양하고 배양농도가 600 nm에서 흡광도가 0.5에 도달하였을 때 이소프로필티오갈락토시드 (isopropyl- β -thiogalactoside)를 첨가하여 유도단백과 삽입절편이 융합단백으로 발현되도록 유도하였다. 균체를 수집하여 파쇄하고 상청액을 니켈친화성 컬럼으로 정제하였다. 하기 도 4A와 같이 이미다졸의 농도 80과 160 mM에서 융합단백이 용출되는 것을 관찰하였다. 용출된 단백질을 트롬빈으로 처리한 다음 다시 니켈친화성 컬럼을 통과시킨 결과 하기 도 4B와 같이 유도단백에 해당되는 GroEL-T1은 이미다졸 농도 80 mM에서 용출이 되나 삽입된 절편에 해당되는 단백질은 컬럼에 붙지 않고 이미다졸 용액 처리 전에 순수하게 분리되었다.

도면의 간단한 설명

<208> 도 1은 헬리코박터 파이로리 GroEL 유전자 절편의 도식도이다.

<209> 도 2는 pET15bsxn/GroEL과 pET15bsxn/GroEL-T1의 유전자 발현의 SDS-PAGE 분석(A)과 면역블롯 분석결과(B)를 나타낸 것이다.

<210> M은 표준 마커(Marker);

<211> 1은 대장균숙주의 발현유도 전 세포파쇄액;

<212> 2는 대장균숙주의 발현유도 후 세포파쇄액;

<213> 3과 pET15bsxn/GroEL 형질전환 대장균의 발현후 세포파쇄액; 및

<214> 4는 pET15bsxn/GroEL-T1 형질전환 대장균의 발현후 세포파쇄액: 의 결과이다.

<215> 도 3은 pEGexp 벡터 플라스미드의 도식도이다.

<216> 도 4는 pEGexp/Cag26-6 클론의 발현, 정제, 그리고 삽입절편단백의 분리정제한 것이다.

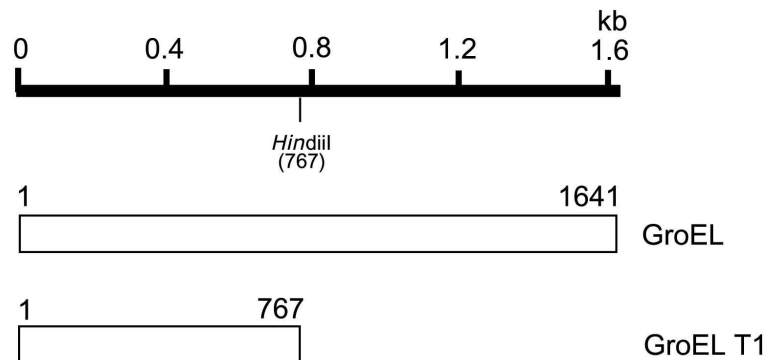
<217> 4A는 pEGexp/Cag26-6 클론을 이용하여 융합단백질의 발현과 니켈친화컬럼을 이용하여 융합단백질의 정제 결과로써,

<218> M은 표준 마커(Marker);

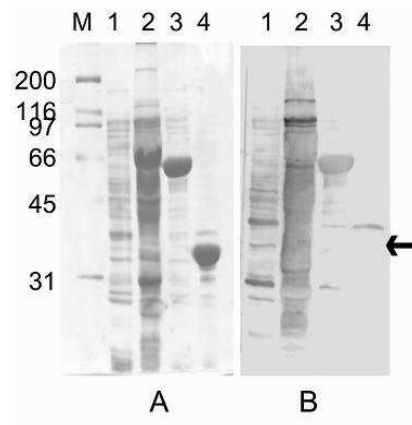
- <219> A 1은 pEGexp/Cag26-6 형질전환 대장균의 발현 후 세포파쇄추출액;
- <220> A 2는 pEGexp/Cag26-6 형질전환 대장균의 발현 후 세포파쇄추출액을 니켈친화성 컬럼에 적용했을 때 컬럼 통과액 분획;
- <221> A 3과 A 4는 세척 용액;
- <222> A 5는 이미다졸 20 mM 농도로 용출한 분획;
- <223> A 6는 이미다졸 40 mM 농도로 용출한 분획;
- <224> A 7는 이미다졸 80 mM 농도로 용출한 분획;
- <225> A 8는 이미다졸 160 mM 농도로 용출한 분획;
- <226> A 9는 이미다졸 320 mM 농도로 용출한 분획: 의 결과이다.
- <227> 4B는 니켈친화컬럼을 이용하여 정제한 pEGexp/Cag26-6의 발현 융합단백질에서 삽입단백질인 Cag26-6 절편단백질의 절단과 정제로써,
- <228> B 1은 니켈친화성컬럼으로 정제후 트롬빈 처리한 용액;
- <229> B 2는 트롬빈 처리후 다시 니켈친화성 컬럼을 통과한 분획;
- <230> B 3은 이미다졸 40 mM 농도로 용출한 분획;
- <231> B 4는 이미다졸 80 mM 농도로 용출한 분획; 및
- <232> B 5는 이미다졸 160 mM 농도로 용출한 분획: 의 결과이다.

도면

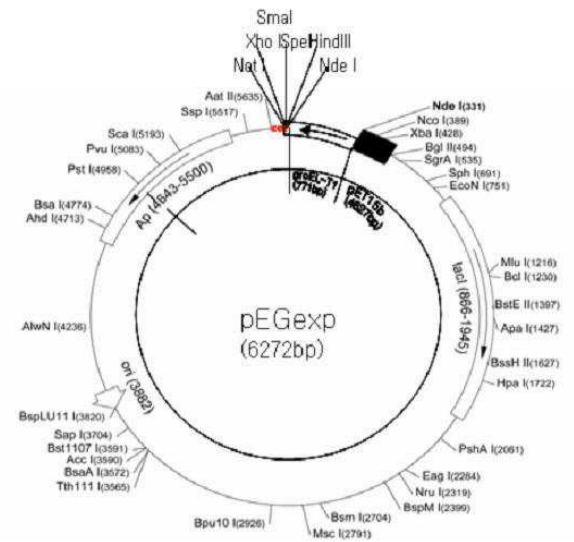
도면1



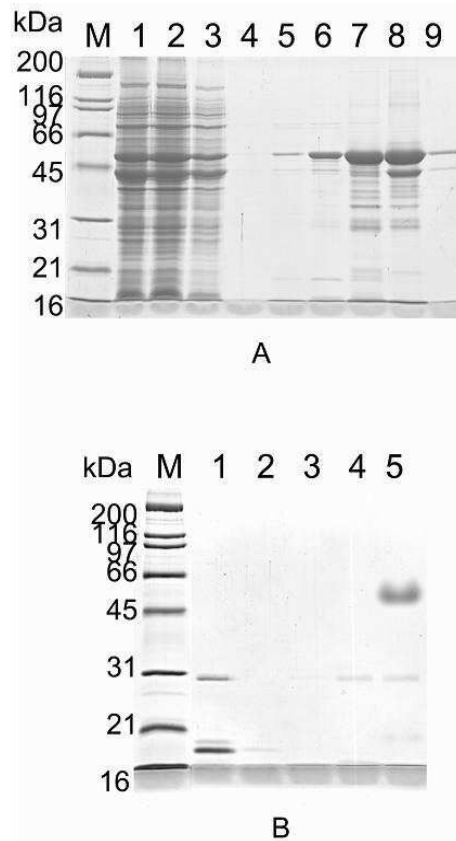
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<160> 9

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 1641
 <212> DNA
 <213> Helicobacter pylori

<400> 1
 atggcaaaag aaatcaaatt ttcagatagt gcaagaaacc ttttatttga aggcgtgaga 60

caactccatg acgctgtcaa agtaaccatg ggaccaagag gcaggaatgt gttgattcaa 120

aaaagctatg gcgctccaag catcaccaaa gacggcgtga gcgtggctaa agagattgaa	180
ttaagttgcc cggtaggcaa catgggcgtt caactcgtta aagaagtagc gagcaaaacc	240
gctgatgctg ccggcgatgg cacgaccaca gcgaccgtgc ttgcttatag catctttaa	300
gaaggcttga ggaatatcac ggctggggct aacctattg aagtgaacg aggcatggat	360
aaagccgctg aagcgattat taatgagctt aaaaaagcga gcaaaaaagt aggcggtaaa	420
gaagaaatca cccaagtagc gaccatttct gcaaaactcg atcacaatat cggaaaactc	480
atcgctgacg ctatggaaaa agtgggtaaa gacggcgtga tcaccgttga agaagctaag	540
ggcattgaag atgaattaga tgtcgtagag ggcatgcaat ttgatagagg ctacctctcc	600
ccttactttg taacaaacgc tgagaaaatg accgctcaat tggataacgc ttacatcctt	660
ttaacggata aaaaaatctc tagcatgaaa gacattctcc ctctactaga aaaaaccatg	720
aaagagggtg aaccgctttt aatcatcgct gaagacattg agggcgaagc tttaacgact	780
ctagtggtag ataaattaag aggcgtgtta aatcatcgag cggttaaagc tccaggcttt	840
ggggacagaa gaaaagaaat gctcaaagac atcgccattt taaccggcgg tcaagtcac	900
agcgaagaat taggcttgac tttagaaaac gctgaagtgg agtttttagg caaagccgga	960
aggattgtga ttgacaaaga caacaccacg atcgtagatg gcaaaggcca tagccatgat	1020
gtcaaagaca gattcgcgca aatcaaaacc caaattgcaa gcacgacaag cgattatgac	1080
aaagaaaaat tgcaagaaag attggctaaa ctctctggcg gtgtggctgt gattaaagt	1140
ggcgctgcga gtgaagtga aatgaaagag aaaaaagacc gggttgatga cgcgttgagc	1200
gcgactaaag cgctgttga agaaggcatt gtatttggtg gcggtgcggc tctattcgc	1260
gcggctcaaa aagtgcattt gaatttacac gatgatgaaa aagtgggcta tgaaatcatc	1320

atgcgtgccca ttaaagcccc attagctcaa atcgctatca atgccggtta tgatggcgg	1380
gtggtcgtga atgaagtga aaaacacgaa gggcattttg gttttaacgc tagcaatggc	1440
aagtatgtgg atatgtttaa agaaggcatt attgaccct taaaagtaga aaggatcgct	1500
ttacaaaatg cggtttcggg ttcaagcctg cttttaacta cagaagccac cgtgcatgaa	1560
atcaaagaag aaaaagcaac tccagcaatg cctgatatgg gtggcatggg cggatggga	1620
ggcatgggcg gcatgatgta a	1641

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

<220>
 <223> GroEL forward primer

<400> 2	
gctgcgcata tggcaaaaga aatcaaa	27

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> GroEL reverse primer

<400> 3	
ggatccttac atcatgccgc ccat	24

<210> 4
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> GroEL-T1 forward primer

<400> 4

aattccctc tagaaataat ttgtttaac tttaagaagg agatatacca tgggcagcag 60

ccatcatcat catcatcaca gcagcgcca ggagccgc gccatcctta tgcaaaaga 119

<210> 5

<211> 125

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GroEL-T1 reverse primer

<400> 5

tcagtcacga tgcggccgct cgagcggaac ccgggcatgc tgacaaagct tttcttcata 60

tggctgccgc gcggcaccag gccgctgctg tcgacaaaga attccgggat ccagcttcg 120

ccctc 125

<210> 6

<211> 992

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 6

aattccctc tagaaataat ttgtttaac tttaagaagg agatatacca tgggcagcag 60

ccatcatcat catcatcaca gcagcgcca ggagccgc gccatcctta tgcaaaaga 120

atcaaattt cagatagtc aagaacctt ttatttgaag gcgtgagaca actccatgac 180

gctgtcaaag taacatggg accaagaggc aggaatgtgt tgattcaaaa aagctatggc 240

gctccaagca tcaccaaaga cggcgtgagc gtggctaaag agattgaatt aagttgcccg 300
 gtggccaaca tgggcgctca actcgttaaa gaagtagcga gcaaaaccgc tgatgctgcc 360
 ggcgatggca cgaccacagc gaccgtgctt gcttatagca tctttaaaga aggcttgagg 420
 aatatcacgg ctggggctaa ccctattgaa gtgaaacgag gcatggataa agccgctgaa 480
 gcgattatta atgagcttaa aaaagcgagc aaaaagtag gcggtaaaga agaaatcacc 540
 caagtagcga ccatttctgc aaactccgat cacaatatcg gaaaactcat cgctgacgct 600
 atggaaaaag tgggtaaaga cggcgtgatc accgttgaag aagctaaggc cattgaagat 660
 gaattagatg tcgtagaggc catgcaattt gatagaggct acctctccc ttactttgta 720
 acaaacgctg agaaaatgac cgctcaattg gataacgctt acatcctttt aacggataaa 780
 aaaatctcta gcatgaaaga cattctccct ctactagaaa aaacatgaa agagggtaaa 840
 ccgcttttaa tcatcgctga agacattgag ggccaagctg ggatcccga attctttgtc 900
 gacagcagcg gcctgggtcc gcgcggcagc catatgaaga aaagctttgt cagcatgccc 960
 gggttcgcct cgagcggccg catcgtgact ga 992

<210> 7
 <211> 6272
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 7
 ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat 60
 aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 120
 tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 180
 gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttcctgt tcgcccttat 240

tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt	300
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag	360
cggtaagatc ctigagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa	420
agttctgcta tgtggcgcggt tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg	480
ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct	540
tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataaac	600
tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca	660
caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat	720
accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact	780
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc	840
ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttcg gctggctggt ttattgctga	900
taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggatatcatt gcagcactgg ggccagatgg	960
taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg	1020
aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca	1080
agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta	1140
ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca	1200
ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg	1260
cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgtacca gcggtggttt gtttgccgga	1320
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agatacaaaa	1380

tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc	1440
tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg	1500
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac	1560
ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct	1620
acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc	1680
ggtaagcggc agggctggaa caggagagcg cagcaggagg cttccagggg gaaacgcctg	1740
gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg	1800
ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt	1860
ggccttttgc tggccttttg ctacatgtt ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga	1920
taaccgtatt accgccttgg agtgagctga taccgtctgc cgcagccgaa cgaccgagcg	1980
cagcagtgca gtgagcagg aagcggaga gcgcctgatg cggtatattc tccttacgca	2040
tctgtcgggt atttcacacc gcatatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc	2100
gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc	2160
gacacccgcc aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt	2220
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	2280
cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga	2340
tgtctgcctg ttcattccgg tccagctcgt tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc	2400
ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg ttttttctg tttggtcact gatgcctccg	2460
tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca	2520
cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaaac	2580

tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggccaatgc cagcgcttcg	2640
ttaatacaga tgiagggtgtt ccacagggtia gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga	2700
acataatggt gcagggcgct gacttcgcg tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga	2760
agaccattca tgttgttgct caggtcgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc	2820
gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg	2880
tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggacccaacg ctgcccgaga	2940
tgcgccgctg gcggctgctg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg	3000
tttgcgcatt cacagtcttc cgcaagaatt gattggctcc aattcttgga gtggtgaatc	3060
cgtttagcgag gtgccgccgg cttccattca ggtcaggtg gcccggtcc atgcaccgcg	3120
acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggcggcgccct acaatccatg ccaaccggtt	3180
ccatgtgctc gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgac agcggtccag tgatcgaagt	3240
taggctggta agagccgcga gcgatccttg aagctgtccc tgatggtcgt catctacctg	3300
cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat	3360
aatggggaag gccatccagc ctgcgctgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc	3420
ggccgccatg ccggcgataa tggcctgctt ctgcgcgaaa cgtttggtgg cgggaccagt	3480
gacgaaggct tgagcgaggg cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat	3540
cgtcgcgtc cagcgaaagc ggtcctcgcc gaaaatgacc cagagcgtg ccggcacctg	3600
tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg	3660
cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggtcttcaag ggcatcggtc gagatcccg	3720

tgctaata ga gtgagcta ac ttacatta at tgcgttgcgc tcaactgccg ctttccagtc	3780
gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt	3840
gcgtattggg cgccagggtg gtttttcttt tcaccagtga gacgggcaac agctgattgc	3900
ccttcaccgc ctggccctga gagagttaga gcaagcggtc cacgctgggt tgcgccagca	3960
ggcgaaaatc ctgtttgatg gtggtaaacg gcgggatata acatgagctg tcttcggtat	4020
cgctgatcc cactaccgag atatccgcac caacgcgcag cccggactcg gtaatggcgc	4080
gcattgcgcc cagcgccatc tgatcgttgg caaccagcat cgcagtggga acgatgcctt	4140
cattcagcat ttgcatggtt tgttgaaaac cggacatggc actccagtcg ctttcccgtt	4200
ccgctatcgg ctgaatttga ttgcgagtga gatatttatg ccagccagcc agacgcagac	4260
gcgccgagac agaacttaat gggcccgtta acagcgcat ttgctggtga cccaatgcga	4320
ccagatgctc cagccccagt cgcgtaccgt cttcatggga gaaaataata ctgttgatgg	4380
gtgtctggtc agagacatca agaaataacg ccggaacatt agtgcaggca gcttccacag	4440
caatggcatc ctggtcatcc agcggatagt taatgatcag cccactgacg cgttgcgcga	4500
gaagattgtg caccgccgct ttacaggctt cgacgccgct tcgttctacc atcgacacca	4560
ccacgtggc acccagttaga tcggcgcgag atttaatcgc cgcgacaatt tgcgacggcg	4620
cgtgcagggc cagactggag gtggcaacgc caatcagcaa cgactgtttg cccgccagtt	4680
gttgtgccac gcggttggga atgtaattca gtcgcccat cgccgcttcc actttttccc	4740
gcgttttcgc agaaacgtgg ctggcctggt tcaccacgcg ggaaacggtc tgataagaga	4800
caccgcata ctctgcgaca tcgtataacg ttactggttt cacattcacc accctgaatt	4860
gactctcttc cgggcgtat catgccatac cgcgaaaggt tttgcgcat tcgatggtgt	4920

ccgggatctc gacgctctcc cttatgcgac tctgcattt ggaagcagcc cagtagtagg	4980
ttgaggccgt tgagcacgcg cgccgcaagg aatggtgcat gcaaggagat ggcgcccaac	5040
agtcccccg ccacggggcc tgccaccata ccacgcca aacaagcgct catgagcccg	5100
aagtggcgag ccgatcttc cccatcggtg atgtcgcgga tataggcgcc agcaaccgca	5160
cctgtggcgc cggatgatcc ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcga gatctcgatc	5220
ccgcgaaatt aatacgactc actatagggg aattgtgagc ggataacaat tccccctag	5280
aattccctc tagaaataat ttgttttaac tttaagaagg agatatacca tgggcagcag	5340
ccatcatcat catcatcaca gcagcggcca ggagccgcgc gccatcctta tgcaaaagaa	5400
atcaaat ttt cagatagtc aagaaacctt ttatttgaag gcgtgagaca actccatgac	5460
gctgtcaaag taacatggg accaagagc aggaatgtgt tgattcaaaa aagctatggc	5520
gtccaagca tcaccaaaga cggcgtgagc gtggctaaag agattgaatt aagttgcccc	5580
gtggccaaca tgggcgctca actcgtttaa gaagtagcga gcaaaaccgc tgatgctgcc	5640
ggcgtggca cgaccacgc gaccgtgctt gcttatagca tctttaaga aggcttgagg	5700
aatatcacgg ctggggctaa ccctattgaa gtgaaacgag gcatggataa agccgctgaa	5760
gcgattatta atgagcttaa aaaagcgagc aaaaagtag gcggtaaaga agaaatcacc	5820
caagtagcga ccatttctgc aaactccgat cacaatatcg gaaaactcat cgctgacgct	5880
atggaaaaag tgggtaaaga cggcgtgatc accgttgaag aagctaaggc cattgaagat	5940
gaattagatg tcgtagaggg catgcaattt gatagaggct acctctcccc ttactttgta	6000
acaaacgctg agaaaatgac cgctcaattg gataacgctt acatcctttt aacggataaa	6060

aaaatctcta gcatgaaaga cattctccct ctactagaaa aaacatgaa agagggtaaa	6120
ccgcttttaa tcatcgctga agacattgag ggccaagctg ggatcccga attctttgtc	6180
gacagcagcg gcctgggtgcc gcgcggcagc catatgaaga aaagctttgt cagcatgccc	6240
gggttcgcct cgagcggccg catcgtgact ga	6272

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

<220>
 <223> Cag26 forward primer

<400> 8	
gcaatggaat tcgaggctag taaggaa	27

<210> 9
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cag26 reverse primer

<400> 9	
cccgggcata actcgagagt ctctgataca g	31