



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0142638

(43) 공개일자 2015년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 1/02 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 1/02 (2013.01)

C12N 9/88 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0083116

(22) 출원일자 2015년06월12일

심사청구일자 2015년06월12일

(30) 우선권주장

1020140071736 2014년06월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김동명

대전광역시 서구 둔산로 223 청솔아파트 7동 303호

강택진

서울특별시 강북구 숭례로 174 SK아파트 123동 1304호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

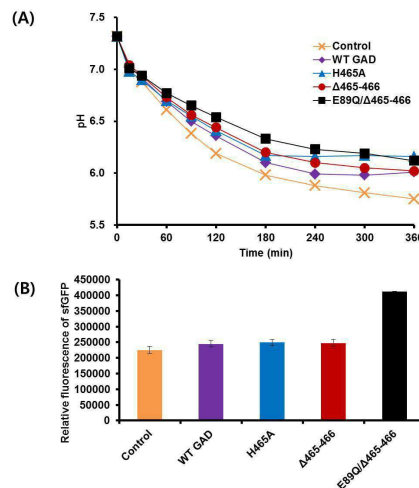
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 효소를 이용하여 pH를 조절하는 무세포 단백질 합성 방법

(57) 요약

본 발명은 효소를 이용하여 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 아미노산 탈카복실화 효소를 이용하여 ATP의 재생 시 생성되는 수소이온을 제거함으로써, pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법에 관한 것이다. 본 발명의 무세포 단백질 합성 방법은 단백질의 발현량을 향상시킬 뿐만 아니라 발현된 단백질의 분리정제 없이 바로 활성분석에 활용할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12P 21/02 (2013.01)
C12Y 401/01015 (2013.01)
C12Y 401/01019 (2013.01)
G01N 33/50 (2013.01)

이기백

경기도 성남시 분당구 미금로 68, 306동 1101호(구 미동, 무지개마을아파트)

(72) 발명자

김호철

경기도 수원시 영통구 영통로 498 황골마을1단지아파트 114동 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0031946
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업 (글로벌 프론티어 사업)
연구과제명	바이오부품/소자/회로의 고속개발을 위한 무세포 합성 생물학 플랫폼
기 여 율	2/10
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2011.09.29 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2014-M3C1A3051473
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업 (미래융합파이오니어 사업)
연구과제명	DNA라이브러리 발현 및 세포내 활성 동시 분석기술
기 여 율	8/10
주관기관	아주대학교
연구기간	2014.09.15 ~ 2015.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

무세포 단백질 합성 방법에 있어서, 무세포 단백질 합성 반응액에 효소를 첨가하여 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 효소는 아미노산 탈카르복실화 효소(amino acid decarboxylase)인 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 아미노산 탈카르복실화 효소는 글루탐산 탈카르복실화 효소, 아르기닌 탈카르복실화 효소 및 리신 탈카르복실화 효소 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 글루탐산 탈카르복실화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열의 89번째 글루탐산이 글루타민으로 치환되고, 465번째와 466번의 아미노산이 결실된 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 pH는 6.5 내지 8.0로 조절되는 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 아미노산 탈카르복실화 효소는 탄소원으로부터 ATP를 재생할 때 생성되는 수소이온을 제거하여 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 탄소원은 단당류, 이당류, 다당류, 다가 알코올 및 유기산 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 단당류는 포도당인 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 무세포 단백질 합성 방법으로 합성된 단백질의 라이브러리.

청구항 10

제9항의 단백질 라이브러리를 대상으로 활성형 단백질을 스크리닝하는 것을 특징으로 하는 활성형 단백질의 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 단백질 라이브러리는 분리정제하지 않은 것을 특징으로 하는 활성형 단백질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소를 이용하여 pH를 조절하는 무세포 단백질 합성 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 아미노산 탈카르복실화 효소(amino acid decarboxylases)를 이용하여 pH 저하를 조절함으로써, 무세포 단백질 합성량을 증가시킬 뿐만 아니라 합성된 단백질을 분리정제하지 않고 활성형 스크리닝에 활용할 수 있는 무세포 단백질 합성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 무세포 단백질 합성(cell-free protein synthesis)은 세포에서 단백질 생산에 관련되는 세포 내 단백질 합성기구와 이의 인자들만을 추출하여 세포 외부에서 세포의 생리적 조절 기작이 배제된 상태로 단백질의 합성 과정만을 인위적으로 반복시켜 단기간에 목적 단백질을 대량 생산하는 기술로서, 요구되는 단백질 생합성 기구 즉, 리보솜, 개시인자, 신장인자, 종결인자, 아미노아실티알렌에이(aminoacyl tRNA) 합성효소 등은 세포의 파쇄액에 포함된 것을 이용하거나 별개로 추가하여 사용할 수 있다(Yoshihiro Shimizu et. al, 2001, Nature Biotechnology, 19(8):751-755; Tae-Wan Kim et. al, 2006, Journal of Biotechnology, 126(4):554-561).

[0003] 단백질 합성 기구들에 의한 DNA의 전사 및 번역 반응은 지속적인 ATP의 공급이 요구되므로 무세포 단백질 합성 용액에는 ATP의 재생을 위한 메커니즘이 필요하다. 전통적으로 ATP의 재생을 위해 사용되는 아세틸포스페이트(acetyl phosphate), 크레아틴인산(creatine phosphate) 또는 포스포에놀피루베이트(phosphoenolpyruvate; PEP) 등의 물질들은 ATP의 재생 효율이 낮을 뿐만 아니라 무기 인산(inorganic phosphate)을 축적하여 단백질 합성 효율이 저하되는 문제점이 있다는 것이 제기되어 왔다.

[0004] 최근에 이와 같은 문제점을 해소하기 위하여 Swartz 등은 무세포 단백질 합성 반응에 요구되는 ATP의 재생 물질로 포도당을 사용함으로써 장시간 동안 ATP의 공급을 원활하게 하여 높은 생산성의 무세포 단백질 합성이 가능함을 보였으며, 포도당과 같은 저가의 에너지원을 ATP의 재생에 이용함으로써 무세포 단백질 합성 반응의 생산성과 경제성을 크게 향상시킬 수 있음을 입증하였다(Kara A. Calhoun et. al, 2005, Biotechnology Progress, 21(4):1146-1153). 포도당은 세포 추출액 내에 존재하는 효소들에 의하여 이화작용과 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)의 과정을 거치면서 여러 개의 ATP를 재생시킬 수 있기 때문에 무세포 단백질 합성 시스템 내에서 효율적인 에너지원으로서 사용될 수 있다.

[0005] 하지만, 무세포 단백질 합성 반응에서 포도당 및 포도당 이하 해당작용의 중간체들이 사용될 경우, 이들로부터 생성되는 유기산의 축적에 의하여 반응액의 pH가 감소하게 된다. 이 같은 pH의 저하는 단백질 합성 기구들의 활성을 저해하여 무세포 단백질 합성의 생산성을 제한하는 요인으로 작용하게 된다(Ho-Cheol Kim et. al, 2011, Process Biochemistry, 46(6):1366-1369). 따라서 세포 추출액 내의 단백질 합성 도구들이 영향을 받지 않는 범위 내에서 pH를 제어하는 것이 필수적이다.

[0006] 이와 같이 pH 제어를 위해, Tris 또는 HEPES 등의 화학적인 pH 완충제를 사용하는 것이 일반적이나, 현재 통상적으로 사용되는 pH 완충제의 농도는 포도당 등의 사용으로 인한 반응액의 pH 저하를 충분히 억제하지 못할 뿐만 아니라, 고농도의 완충제의 사용은 이에 비례하는 염 농도의 증가를 동반하게 되므로 단백질 합성을 저해하는 요인으로 작용하는 문제점이 있다.

[0007] 또한, pH 제어를 위해 사용된 완충용액은 무세포 단백질 합성 후에 제거할 수 있는 것이 아니므로, 무세포 합성 반응으로 합성한 효소의 활성을 pH 기반으로 분석하고자 할 때, 합성액에 포함된 완충용액이 활성 분석용액에 포함되므로 효소활성에 의한 pH 변화를 억제하게 되어 정확한 효소활성의 분석이 어렵다는 문제점도 있다.

[0008] 한편, 한국등록특허 제0749053호에 무세포 단백질 합성방법이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0733712호에 무세포 단백질 합성용 세포 추출액 제조 및 이를 이용한 단백질 합성법이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제1229849호에 소포체의 첨가에 의한 무세포 단백질 합성 시스템의 단백질 발현 수율 개선 방법이 개시되어 있으나, 상기의 문제점을 해소할 수 있는 기술은 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 무세포 단백질 합성과정에서 변이 아미노산 탈카르복실화 효소를 이용하여 pH를 조절하여 효율적으로 무세포 단백질 합성을 할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 무세포 단백질 합성 반응액에 효소를 첨가하여 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 무세포 단백질 합성 방법으로 합성된 단백질의 라이브러리를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 무세포 단백질 합성 방법으로 합성된 단백질 라이브러리를 이용한 활성형 단백질의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 효소를 이용하여 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법에 관한 것으로, 글루탐산 탈카르복실화 효소(GAD)와 글루탐산을 이용하여 무세포 단백질을 합성하게 되면, 무세포 단백질 반응이 진행됨에 따라, 글루탐산이 소모되어 고갈되므로, 효소 합성 반응 후의 무세포 합성 반응액은 pH 완충기작이 없는(Buffer-Free) 상태가 된다. 따라서 무세포 단백질 합성 반응액의 일부를 취하여 무세포 단백질 합성 반응액에 포함된 효소의 활성을 분석하면, pH 변화를 억제하는 요소가 없으므로, 고감도의 효소활성 분석이 가능하게 된다.
- [0014] 또한, 화학적인 완충용액을 사용하는 경우, pH 저하를 충분히 억제하지 못할 뿐만 아니라, 고농도의 완충제의 사용은 이에 비례하는 염 농도의 증가를 동반하게 되므로 단백질 합성을 저해하는 요인으로 작용하여 단백질 합성량이 낮은 수준이지만, 본 발명의 GAD 시스템을 이용하게 되면, pH 저하를 억제하는 효과가 탁월하므로, 단백질의 합성량이 증진된 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 무세포 단백질 합성에서 화학 완충용액(HEPES buffer)의 농도(-◆- 57mM, -■- 118mM, -▲- 179mM 및 -●- 240mM)에 따른 sfGFP 합성 농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)(A) 및 pH 감소 정도(B)를 확인한 그래프이다.
- 도 2는 240mM의 완충용액(HEPES buffer)의 조건으로 무세포 단백질 합성하여 획득한 시알산 전이 효소(ST)의 평균발현량을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 57mM의 완충용액(HEPES buffer)의 조건으로 무세포 단백질 합성 시, 글루탐산 탈카르복실화 효소에 의해 pH 변화 조절 효과(A) 및 각 조건에서의 sfGFP 단백질의 발현량을 확인한 그래프이다. -×- Control은 대조구로서, 글루탐산 탈카르복실화 효소가 첨가되지 않은 것이고; -◆- WT GAD는 야생형 글루탐산 탈카르복실화 효소가 첨가된 것이고; -▲- H465A는 465번째 히스티딘(Histidine)이 알라닌(Alanine)으로 치환된 변이 야생형 글루탐산 탈카르복실화 효소가 첨가된 것이고; -●- $\Delta 465-466$ 는 465번째 히스티딘(Histidine)과 466번째 트레오닌(Threonine)이 결실된 변이 글루탐산 탈카르복실화 효소가 첨가된 것이고; -■- Glu89Gln/ $\Delta 465-466$ 는 89번째 글루탐산(Glutamic acid)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 465번째 히스티딘(Histidine)과 466번째 트레오닌(Threonine)이 결실된 변이 글루탐산 탈카르복실화 효소가 첨가된 것이다.
- 도 4는 89번째 글루탐산(Glutamic acid)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 465번째 히스티딘(Histidine)과 466번째 트레오닌(Threonine)이 결실된 변이 글루탐산 탈카르복실화 효소의 농도에 따른 sfGFP 단백질의 발현량을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 1.6mg/ml의 GAD(Glu89Gln/ $\Delta 465-466$) 및 240mM의 완충용액(HEPES-KOH)을 사용한 무세포 단백질 합성에서의 pH 변화와 단백질 발현량을 시간에 따라 비교한 그래프이다.
- 도 6은 글루탐산의 초기 농도별 무세포 단백질 합성에 의한 글루탐산 소진시간을 확인한 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 라이브러리 제작, 아미노산 탈카르복실화 효소를 이용하여 무세포 단백질 합성 및 합성된 효소의 활성을 분석하는 어세이 과정을 나타낸 도면이다.
- 도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 글루탐산 탈카르복실화 효소 및 글루탐산을 이용한 무세포 단백질 합성과정을 나타낸 도면이다.
- 도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 무작위 선별된 시알산 전이 효소 변이체의 무세포 단백질 합성량을 나타낸 그래프이다. WT는 야생형 시알산 전이 효소이고, No DNA는 DNA를 제외하고 무세포 단백질 합성을 실시한 대조구이다.

도 10은 시알산 전이 효소의 유전자 라이브러리를 제작하기 위한 PCR 조건을 도식화한 것이다.

도 11은 무세포 단백질 합성 시스템을 활용한 활성형 시알산 전이 효소의 스크리닝 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 무세포 단백질 합성 방법에 있어서, 무세포 단백질 합성 반응액에 효소를 첨가하여 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법을 제공한다.
- [0017] 상기 무세포 단백질 합성 반응액에는 세포 추출액, 유전자, 에너지원, 완충용액, 아미노산 등이 포함될 수 있으며, 여기에 글루탐산, 아르기닌, 리신 등의 아미노산이 추가로 포함되어 효소의 기질로 이용될 수 있다.
- [0018] 상기 효소는 아미노산 탈카르복실화 효소(amino acid decarboxylase)이며, 상기 아미노산 탈카르복실화 효소는 각종의 아미노산에 작용하여 C-C 결합을 탈리하여 이산화탄소와 각 아미노산에 해당하는 아민(amine)을 생성하는 분해효소이다.
- [0019] 바람직한 아미노산 탈카르복실화 효소로는 글루탐산 탈카르복실화 효소(glutamate decarboxylase, EC 4.1.1.15), 아르기닌 탈카르복실화 효소(arginine decarboxylase, EC 4.1.1.19), 리신 탈카르복실화 효소(lysine decarboxylase, EC 4.1.1.18), 아스파르트산 4-탈카르복실화 효소(aspartate 4-decarboxylase, EC 4.1.1.12), 발린 탈카르복실화 효소(valine decarboxylase, EC 4.1.1.14), 히스티딘 탈카르복실화 효소(histidine decarboxylase, EC 4.1.1.22), 티로신 탈카르복실화 효소(tyrosine decarboxylase, EC 4.1.1.25), 페닐알라닌, 트립토판, 티로신 등에 작용하는 방향족 L-아미노산 탈카르복실화 효소(aromatic-L-amino acid decarboxylase, EC 4.1.1.28), 페닐알라닌 탈카르복실화 효소(EC 4.1.1.53), 메티오닌 탈카르복실화 효소(EC 4.1.1.57) 중에서 선택된 하나 이상인 것이며, 더욱 바람직하게는 글루탐산 탈카르복실화 효소(glutamate decarboxylase, EC 4.1.1.15), 아르기닌 탈카르복실화 효소(arginine decarboxylase, EC 4.1.1.19) 및 리신 탈카르복실화 효소(lysine decarboxylase, EC 4.1.1.18) 중에서 선택된 하나 이상인 것이고, 더더욱 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열의 89번째 글루탐산이 글루타민으로 치환되고, 465번째와 466번의 아미노산이 결실된 것을 특징으로 하는 글루탐산 탈카르복실화 효소인 것이지만 이에 제한하는 것은 아니며, 상기 아미노산 탈카르복실화 효소의 일부 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입될 수 있으며, 인산화 또는 메틸화 등의 변형된 형태의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 pH는 6.5 이하로 저하되지 않는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 6.5 내지 8.0로 조절되는 것이다.
- [0021] 상기 아미노산 탈카르복실화 효소는 탄소원으로부터 ATP를 재생할 때 생성되는 수소이온을 제거하여 pH를 조절하는 것이고, 상기 탄소원은 단당류, 이당류, 다당류, 다가 알코올 및 유기산 중에서 선택된 하나 이상인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 포도당이지만 이에 제한하지 않는다.
- [0022] 또한, 본 발명은 본 발명의 무세포 단백질 합성법으로 합성된 단백질 라이브러리를 제공한다. 상기 단백질 라이브러리는 시알산전이 효소 단백질 라이브러리인 것이 바람직하지만 이에 제한하지 않는다. 상기 시알산 전이 효소는 당단백질의 당쇄구조 말단에 시알산을 붙여주는 역할을 하는 효소로서, 상기 효소로부터 유도된 시알릭락토오스 및 시알릴 올리고당은 몸조직, 피부 및 두피 등에 시알산을 공급할 수 있는 주요한 공급원으로서도 역할을 수행하는 것이 특징이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 본 발명의 무세포 단백질 합성 방법으로 합성된 단백질 라이브러리를 대상으로 활성형 단백질을 스크리닝하는 것을 특징으로 하는 활성형 단백질의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 단백질 라이브러리는 분리정제하지 않고 스크리닝할 수 있는 것이 특징이다.
- [0024] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[재료 및 실험방법]

1. 세포 추출액(S12 extract)의 제조

[0027] 대장균 유래의 BL21(DE3)를 5ml의 LB 배지에 접종하여 37℃에서 12시간 동안 배양하였다. 이후 37℃에서 밤새

40mℓ의 2xYTPG 배지에 계대 배양을 하고, 4ℓ의 2xYTPG 배지가 들어있는 발효조에 접종을 하여 같은 온도에서 배양을 하였다. 흡광도(OD₆₀₀)가 0.6이 되었을 때, 최종적으로 1mM의 이소프로필티오-β-D-갈락토시드(IPTG)를 발효조에 넣어주어 T7 RNA 중합효소를 발현시키고, 흡광도(OD₆₀₀)가 4.5가 되었을 때, 세포 배양을 중단하고, 원심분리(4,500rpm, 15분, 4℃)를 통하여 배지로부터 대장균만(cell pellet)을 수집하였다.

[0028] 상기 회수된 대장균은 1g당 20mM의 완충용액 A[10mM Tris-acetate buffer (pH 8.2), 14mM magnesium acetate, 60mM potassium glutamate, 1mM dithiothreitol (DTT), 0.05%(v/v) 2-mercaptoethanol(2-ME)]를 넣어 잘 씻어 주는 과정을 3회 반복하였다.

[0029] 상기 세척된 대장균 10g 당 12.7mℓ의 완충용액 B(완충용액 A에서 2-ME를 제거한 완충용액)를 넣고 상기 대장균을 균일하게 잘 풀어준 후, 압착기(French Pressure Cell Press, Thermo Scientific)를 이용하여 일정한 압력(12,000 psi)으로 세포를 파쇄하였다. 상기 세포 파쇄액은 원심분리(30,000rcf, 30분, 4℃)를 통해 상등액을 수득하였고, 이를 37℃에서 30분간 인큐베이션 한 다음 소량씩 분주하여 사용할 때까지 초저온 냉동고(-80℃)에 보관하였다.

[0030] 2. 무세포 단백질 합성 및 확인

[0031] 무세포 단백질 합성 반응은 1.75mℓ의 소형 시험관에 넣고 30℃의 항온수조에서 반응하였다.

[0032] 57mM의 완충용액(HEPES-KOH, pH 8.2), 1.4mM의 ATP, 1.0mM의 CTP, GTP 및 UTP, 1.8mM의 DTT, 90mM의 포타슘 글루타메이트(potassium glutamate), 80mM의 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 8mM의 마그네슘 아세테이트(magnesium acetate), 20mM의 포타슘 포스페이트(potassium phosphate), 34μg/ℓ의 L-5-포르밀-5,6,7,8-테트라히드로폴릭산(L-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid; folinic acid), 3.2mM의 20종의 아미노산, 2%(w/v)의 PEG (8000), 80mM의 D-포도당, 13.3μg/ℓ의 플라스미드, 및 27%(v/v)의 S12 extract를 무세포 단백질 합성 반응액으로 사용하였다.

[0033] 상기 완충용액(HEPES-KOH, pH 8.2), 아미노산, 포도당(glucose) 및 L-글루탐산(L-glutamate)의 농도는 필요에 따라 조정하였다. 생산된 단백질의 총량은 TCA-침전 후 방사성 동위원소의 방사선량에 따라 결정하였다.

[0034] 활성형 sfGFP의 정량은 VICTOR X3 multilabel plate reader(Perkin-Elmer, Waltham, MA)를 이용하여 형광을 측정하여 결정하였다. 생산된 sfGFP는 Coomassie blue-stained Tricine-SDS-PAGE gels를 통하여 크기를 확인하였다.

[0035] pH의 변화는 90μℓ의 반응액에 마이크로 pH-전극(micro-combination pH-electrode; InLab 423, Mettler-Toledo GmbH, Switzerland)으로 매 시간마다 측정하여 기록하였다.

[0036] 3. 글루탐산 탈카르복실화 효소(GAD)를 이용한 무세포 단백질 합성 및 정제

[0037] 야생형 GAD 효소와 변이 GAD(Glu89Gln/Δ465-466)의 유전자 서열은 각각 pET28b 벡터에 클로닝하여 대장균 BL21(DE3)에 형질전환 하였다. 이들 각 세포는 50μg/ℓ의 카나마이신(kanamycin)이 포함되어 있는 500mℓ의 LB 배지에서 37℃의 온도 조건 하에 배양하였고, GAD를 발현시키기 위해 OD₆₀₀ 값이 2.5가 되었을 때 1mM의 IPTG를 넣어주었다. 이후 같은 조건에서 두 시간을 더 배양한 후, 세포를 수거해서 완충용액 A로 세척을 하였다. 이후, 상기 세포 덩어리를 완충용액 B로 풀어준 뒤, 압착기(French Pressure Cell Press)를 이용하여 12,000psi의 압력으로 파쇄하였고, 30,000rcf로 4℃에서 30분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다.

[0038] 회수된 상등액은 Ni-NTA agarose beads(Qiagen)를 이용하여 분리 정제하였고, VIVA-spin 20(MWCO 10 kDa, Sartorius)으로 완충용액 B를 이용하여 농축하였다. 이후, 브레드포드(Bradford) 방법으로 단백질의 농도를 측정한 뒤 사용할 때까지 -80℃에 보관하였다.

[0039] 실시예 1. 무세포 단백질 합성에서의 완충용액의 농도에 따른 단백질 합성량 및 pH 변화량 확인

[0040] 무세포 단백질 합성에서 완충용액의 농도에 따른 pH 변화를 확인하기 위하여 57mM, 118mM, 179mM 및 240mM의 완충용액을 이용하여 제조하여 sfGFP 단백질의 무세포 단백질 합성을 실시하였다.

- [0041] 도 1에 개시된 바와 같이 화학 완충용액(HEPES buffer)의 농도를 늘려감에 따라 pH의 감소 폭이 줄어들고 단백질의 합성량이 증가하는 것을 확인하였다. 이때 과량의 포도당(80mM)을 사용한 반응에서 최소한의 pH 유지 조건인 6.5 수준을 유지하기 위해 완충용액(HEPES buffer)의 농도를 240mM 이하로 최적화하였다. 240mM의 완충용액 조건에서 무세포 단백질 합성을 수행한 결과, 약 2mg/ml의 sfGFP 단백질이 획득됨을 확인하였다.
- [0042] 이후, 시알산 전이 효소의 활성을 스크리닝하기 위하여 96개의 시알산 전이 효소 유전자라이브러리들을 이용하여 상기 최적화된 240mM의 완충용액의 조건으로 무세포 단백질 합성을 실시하였다.
- [0043] 도 2에 개시한 바와 같이, 96종의 시알산 전이 효소 라이브러리들 96웰 플레이트에서 무세포 단백질 합성을 수행하여 $630 \pm 101 \mu\text{g/ml}$ 의 시알산 전이 효소가 발현됨을 확인되었으나, pH 지시약과 기질을 이용한 활성 측정 반응에서는 아무런 색의 변화도 관찰할 수 없었다. 이 과정에서 pH 지시약의 색 변화가 나타나지 않은 것은 고농도의 완충용액(HEPES buffer, 240mM)이 활성 측정용액 내에서도 수소이온 농도의 변화에 대한 완충작용을 하여 색의 변화가 나타나지 않은 것으로 판단되었다.
- [0044] 따라서, 시알산 전이 효소를 분리정제하여 활성분석의 가능 여부를 확인하였고, 분리정제된 경우는 상기 단백질의 활성에 따라 색의 변화를 관찰할 수 있었다.
- [0045] 본 실시예 1을 통하여 무세포 단백질 합성 반응에서 pH 변화를 조절하면서 활성분석에서 간섭을 하지 않는 완충 메커니즘이 필요하다는 것을 확인하였다.
- [0046] **실시예 2. 무세포 단백질 합성에서의 글루탐산 탈카르복실화 효소에 의한 pH 변화 조절 효과 및 sfGFP 단백질의 발현량 확인**
- [0047] 무세포 단백질 합성 반응에서 pH 변화를 조절하면서 활성분석에서 간섭을 하지 않는 완충 메커니즘으로 아미노산 탈카르복실화효소를 이용하고자 하였다.
- [0048] 수많은 미생물은 산성 조건에서도 살아남을 수 있는 내재된 완충시스템이 있는데, 예를 들어 대장균의 경우, 몇 종류의 아미노산 탈카르복실화 효소(아르기닌, 글루탐산, 리신 탈카르복실화 효소)는 산성 조건에서 유도 발현된다. 상기 효소들은 각 아미노산에서 카르복실기를 이탈시키면서 수소이온을 함께 제거하고, 산성 조건에서도 대장균 세포 내부의 pH를 유지시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 특징을 이용하여 상기 미생물의 항산성 메커니즘을 무세포 단백질 합성 시스템의 pH 변화를 조절하는데 적용하고자 하였다.
- [0049] 본 실시예 2에서는 세포 추출액의 해당과정으로 인해 생성되는 수소이온을 제거하기 위해 글루탐산 탈카르복실화 효소(GAD)를 이용하였다. 글루탐산 한 분자는 상기 효소를 통해 한 분자의 유도 아미노산(γ -aminobutyric acid)으로 변하면서 같은 몰 수의 수소이온을 제거하는 역할을 수행한다. 따라서 GAD 및 글루탐산을 무세포 단백질 합성 용액에 첨가하게 되면 ATP의 재생과정에서 생성되는 수소이온을 제거하게 되므로 pH를 안정하게 유지할 수 있는 것이다.
- [0050] 하지만, GAD를 이용하여 pH를 조절하는 시스템은 글루탐산이 소진됨과 동시에 완충효과가 사라지고, pH에 의존적인 대장균의 야생형 GAD의 활성이 pH가 3.8 내지 4.6에서 활성 및 단백질의 협동성(cooperativity)을 보이고 있기 때문에 GAD의 활성은 무세포 단백질 합성 시스템에 적합한 pH인 6.5 내지 8.0에서는 나타나지 않는 것이다.
- [0051] 그러나 다행히도 최근 연구에서 대장균 유래 GAD의 pH 의존도는 일부의 특정 아미노산 잔기의 역할에 의하여 결정된다는 것이 알려졌다. 즉, 상기 GAD 효소의 엔지니어링을 통해 효소의 pH 의존도를 변화시킬 수 있다는 것이다. 그 예로, Ho 등의 연구에서는 대장균 GAD의 89번째 아미노산인 글루탐산을 글루타민으로 치환하여 중성 범위의 pH에서도 활성을 가질 수 있다는 것이 밝혀졌다. 또한, 465번째와 466번째 아미노산인 히스티딘과 트레오닌을 제거함으로써 인해 pH에 의존하는 협동성을 없애면서 활성을 가지는 pH의 범위를 늘릴 수 있었다. 이러한 변이에 의한 효과가 함께 적용되면서 중성에 가까운 pH, 그리고 넓은 범위의 pH에서도 활성을 가지는 변이된 GAD(Glu89Gln/ Δ 465-466)를 만들게 되었다.
- [0052] 본 발명자들은 효소에 의한 pH 조절을 위해 상기한 바와 같은 변이된 GAD(Glu89Gln/ Δ 465-466)를 이용하기로 결정하였고, 포도당을 이용한 무세포 단백질 합성 반응에서 pH 감소가 줄어들 것으로 예상하였다.
- [0053] 따라서 본 실시예 2에서 무세포 단백질 합성에서의 글루탐산 탈카르복실화 효소(GAD)에 의한 pH 변화 조절 효과 및 sfGFP 단백질의 발현량 확인을 하였다.

- [0054] 결과는 pH가 중성으로 유지되는 시간이 증가하면서 무세포 단백질 합성 반응을 통해 얻어진 단백질의 양이 현저히 증가함을 알 수 있었다. 대조구로 실시한 57mM의 HEPES-KOH의 완충용액을 사용한 경우, 반응액의 pH가 80분 이내에서 6.5 이하로 떨어진 반면, 동일한 반응액에 0.4mg/ml의 변이된 GAD를 추가한 경우에는 pH가 6.5에 도달하기까지의 시간이 약 130분까지 증가한 것을 확인하였다 (도 3A).
- [0055] 이와 같이 pH의 떨어지는 속도가 늦춰진 반응에서는 합성된 단백질의 양도 함께 늘어 약 두 배에 가까운 생산성을 나타내었다. 한편, 야생형 GAD를 추가해준 경우에는 pH를 제어하는 효과가 거의 나타나지 않았으며, 단백질의 생산성도 기존의 반응과 비슷한 수준을 나타내었다(도 3B). 이와 같은 결과는 야생형 GAD 효소보다 변이된 GAD(Glu89Gln/Δ465-466)가 반응액의 pH의 감소에 대하여 효과적이라는 것을 의미하였다.
- [0056] 또한, 무세포 단백질 합성 반응액에 GAD(Glu89Gln/Δ465-466)의 농도를 1.6mg/ml 이상의 농도까지 높이면 경우에 항산화 작용이 더욱 커지게 되어 무세포 단백질 합성 반응액 내에서 단백질의 생산성이 늘어나는 효과를 볼 수 있었다(도 4).
- [0057] 또한, 1.6mg/ml의 GAD(Glu89Gln/Δ465-466)와 240mM의 HEPES-KOH를 무세포 단백질 합성 용액에 각각 사용하였을 때의 pH 변화와 합성된 단백질의 양을 각 시간에 따라 비교하였다. 도 5에 개시한 바와 같이 일정 농도 이상의 GAD가 있을 때 반응액 내에서 완충용액인 HEPES-KOH를 완전히 제거하더라도 pH가 완벽하게 유지된다는 것을 확인하였다.
- [0058] 또한, 반응액 내에 포함된 166mM 글루탐산의 초기 농도는 6시간의 반응 동안 모두 소진이 됨으로써 완충제가 없는 조건이 형성되게 된다 (도 6). 따라서 초기농도로 166mM의 글루탐산을 사용하는 경우 무세포 단백질 합성시간이 6시간까지 수행하는 것이 바람직함을 알 수 있었다. 6시간 이후에, 글루탐산을 추가로 첨가하여 진행하는 것을 배제하지 않으며, 글루탐산의 농도를 적절히 조절함에 따라 무세포 단백질 합성 반응 시간을 연장할 수 있을 것이다.

[0059] **실시예 3. 시알산 전이 효소 라이브러리 제작, 발현 및 활성 분석**

- [0060] 본 실시예 3에서는 도 7에 개시한 바와 같은 과정으로, 시알산 전이 효소의 라이브러리 제작, 아미노산 탈카르복실화 효소를 이용하여 무세포 단백질 합성 및 합성된 효소의 활성을 분석하는 어세이를 실시하였다.
- [0061] 본 실시예 3에서는 글루탐산 탈카르복실화 효소(GAD) 및 글루탐산을 이용하여 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 무세포 단백질 합성 방법으로 10,000여 개의 다양한 유전자 라이브러리를 발현하고 발현된 단백질의 활성을 스크리닝하고자 하였다(도 8).
- [0062] 도 9에 개시한 바와 같이, 글루탐산 탈카르복실화 효소(GAD) 및 글루탐산을 이용하여 pH를 조절하는 GAD 시스템을 이용한 무세포 단백질 합성한 시알산 전이 효소 변이체들의 합성량이 거의 일정하게 합성됨을 확인함으로써, 반응액을 일정량 취하여 활성 분석의 결과가 발현량에 의한 차이가 아니라는 것을 알 수 있었다.
- [0063] 또한, GAD를 이용한 무세포 단백질 합성을 통해 생산된 시알산 전이 효소를 별도의 정제과정 없이 활성측정 용액에 적용한 결과가 정제된 시알산 전이 효소의 활성 분석 결과와 같은 동일한 양상으로 나타나는 것을 확인하였다.
- [0064] 따라서 본 발명에 따른 아미노산 탈카르복실화 효소를 이용한 pH를 조절하는 무세포 단백질 합성 방법으로 합성된 단백질 라이브러리를 이용한 pH 기반의 효소 스크리닝이 가능할 것으로 예상하였다.
- [0065] 시알산 전이 효소의 유전자 라이브러리를 제작하기 위해 PCR 기법으로 서열번호 2의 아미노산 서열의 265번째 트레오닌(Threonine; Thr), 313번째 아르기닌(Arginine; Arg) 및 357번째 트레오닌(Threonine; Thr) 코돈을 무작위 변이시켰고, 사용된 프라이머는 표 1에 나타내었다. 상기 시알산 전이 효소의 활성부위로 예측되는 부위 중에서 세 곳의 아미노산 위치를 선택하여 무작위로 변이된 유전자 라이브러리를 제작하고 이를 발현하여 효소 활성이 야생형보다 증대된 변이 유전체를 선별하고자 하였다.

표 1

[0066] 시알산 전이 효소의 유전자 라이브러리 제작을 위한 프라이머

서열 번호	프라이머 명칭	시작점	염기서열(5'→ 3')
3	T7 promoter	Forward	TCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG

4	1 st fragment	Backward	AAAGATAAATTTAGCTTGTGCACTTC
5	2 nd fragment	Forward	GAAGTGCAACAAGCTAAATTTATCTTTNNSGGCACG
6	2 nd fragment	Backward	AGGATGCCCTTTAAAGTAGATTTT
7	3 rd fragment	Forward	AAAATCTACTTTAAAGGGCATCCTNNSGGTGGTGAAATTAATGACTACATTCTGA
8	3 rd fragment	Backward	TGAACTTGCAACACCAACCCAC
9	4 th fragment	Forward	GTGGGTGGTGTGCAAGTTCANNSTATTTTC
10	T7 terminator	Backward	CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTA

[0067] PCR을 수행한 온도 및 시간 등의 조건은 도 10에 나타내었다. PCR을 통하여 제작된 유전자는 pIVEX2.3d 벡터에 클로닝하여 상기 265번째 트레오닌(Threonine; Thr), 313번째 아르기닌(Arginine; Arg) 및 357번째 트레오닌(Threonine; Thr) 위치에 각각 다른 유전자 서열로 치환된 콜로니(colony)를 획득하여 라이브러리를 제작하였다. 콜로니 채집기(K3, K biosystems)를 이용하여 상기 라이브러리 중에서 10,000개의 콜로니를 취하여 200 μ l의 LB 배지가 들어있는 96웰 플레이트에 접종하였다. 상기 획득한 10⁴개의 96웰 플레이트를 37℃에서 15시간 동안 교반시켜 배양하였다.

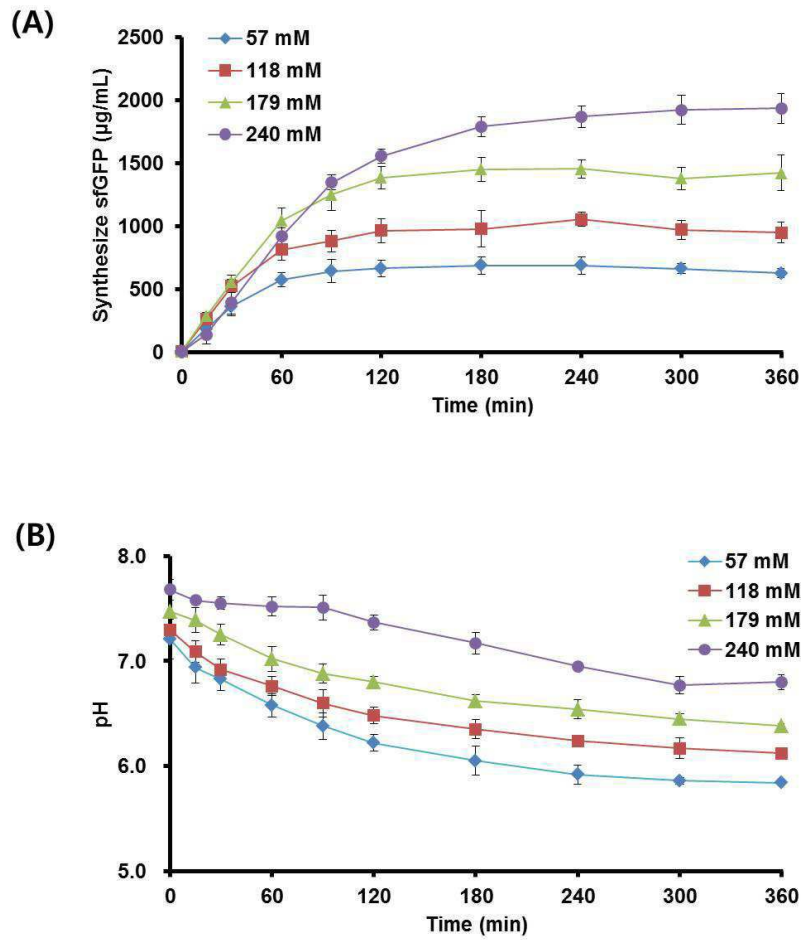
[0068] 상기 배양된 세포들은 23.5 μ l의 PCR 반응 용액이 담겨있는 26개의 384웰 플레이트에 1.5 μ l씩 옮겨 담았고, 이후, PCR을 통하여 증폭된 각각의 유전자는 19.5 μ l의 무세포 단백질 합성 반응액이 담겨있는 새로운 384웰 플레이트에 각각 3.0 μ l씩 옮겨졌다. 상기 플레이트는 습도가 높은 30℃의 교반기에 3시간 동안 무세포 단백질 합성 반응을 실시하였다.

[0069] 무세포 단백질 합성 반응이 끝난 직후, 본 실시예 3에서 제작한 시알산 전이 효소 라이브러리에 담긴 반응액을 5mM의 Tris-Cl(pH 8.5) 용액으로 3배 희석한 후, 1.8 μ l의 희석액을 58.5 μ l의 활성 스크리닝 용액(5mM의 Tris-Cl pH 8.5, 4mM의 CMP-NeuAc, 0.4mM의 cresol-red, 4mM의 lactose)이 담긴 384웰 플레이트에 옮겨서 15분간 상온에 방치하였다. 상기 라이브러리의 OD₆₀₀ 값은 플레이트 리더(Victor 3, PerkinElmer)로 측정하여 가장 높은 흡광도를 가진 표본을 선별하였다. 상기 모든 과정에서의 용액을 옮기는 공정은 자동화된 리퀴드 핸들링 시스템(JANUS Automated Workstation, PerkinElmer)을 활용하였다.

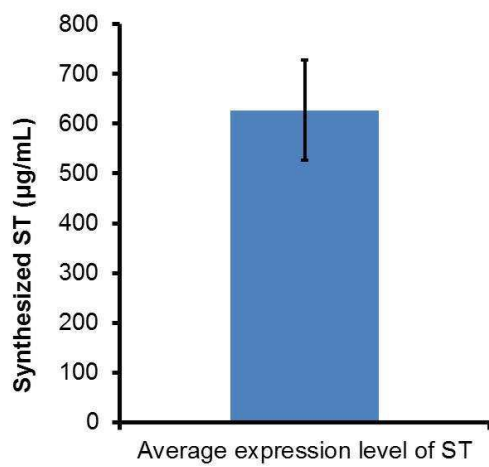
[0070] 결과는 도 11에 개시한 바와 같이, 10,000 여개의 유전자로부터 시알산 전이 효소의 발현 및 활성형 단백질의 스크리닝을 통해 현저하게 증가된 활성을 보이는 시알산 전이 효소를 식별해낼 수 있었다.

도면

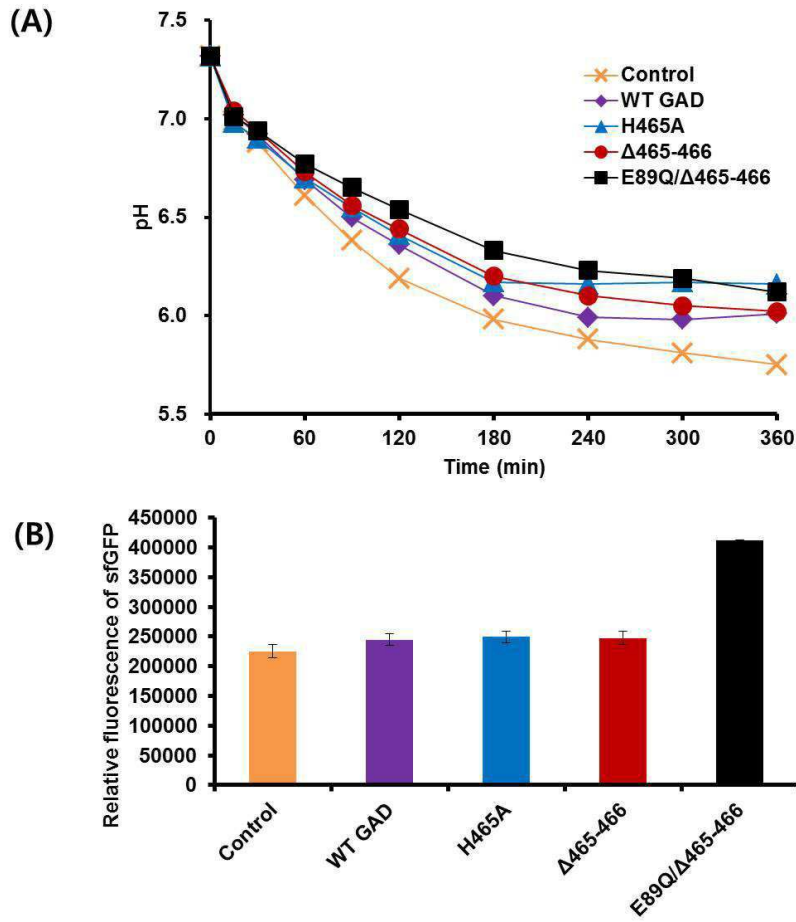
도면1



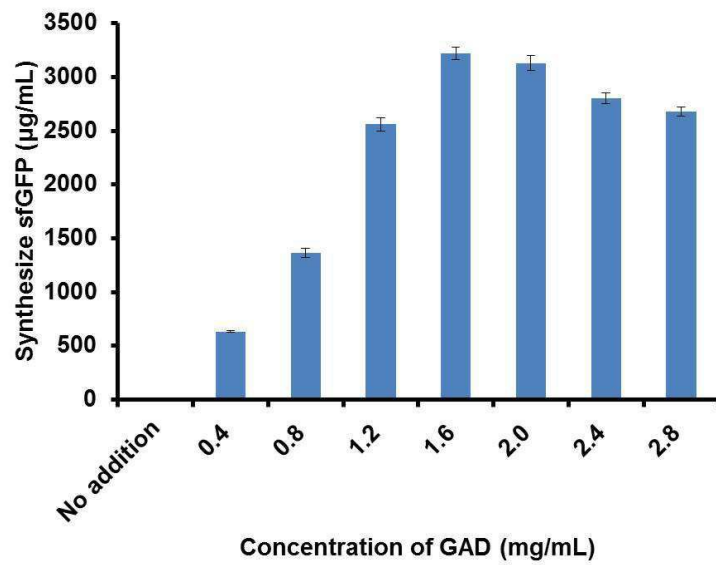
도면2



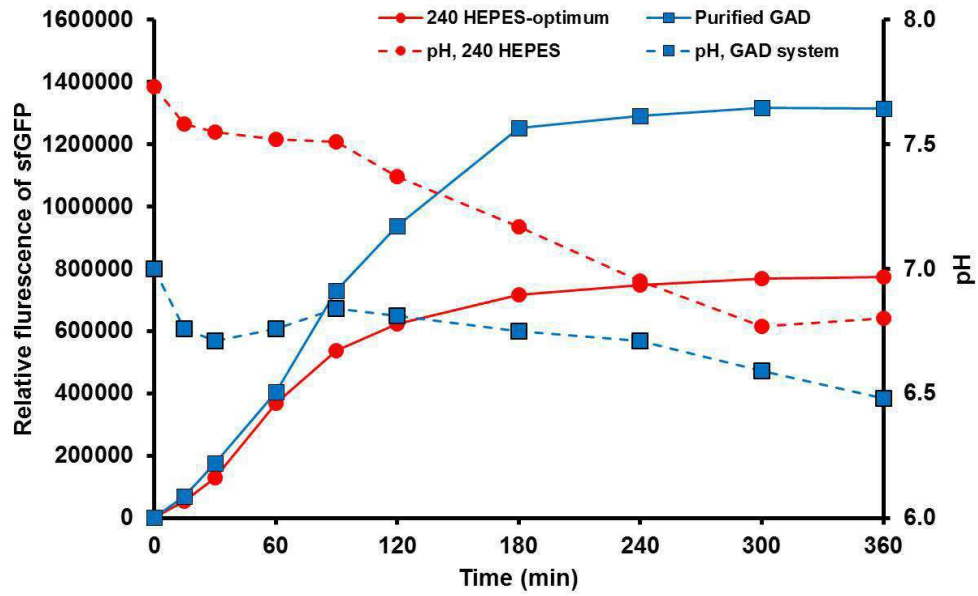
도면3



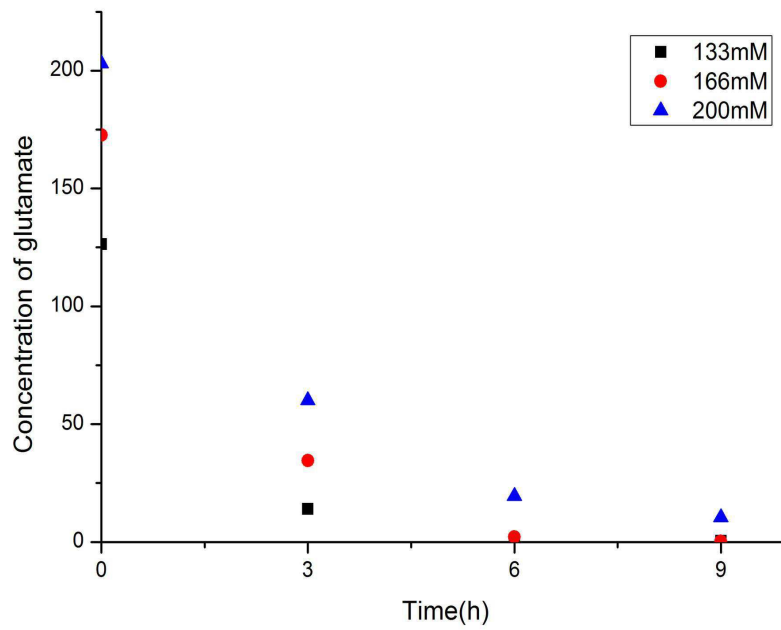
도면4



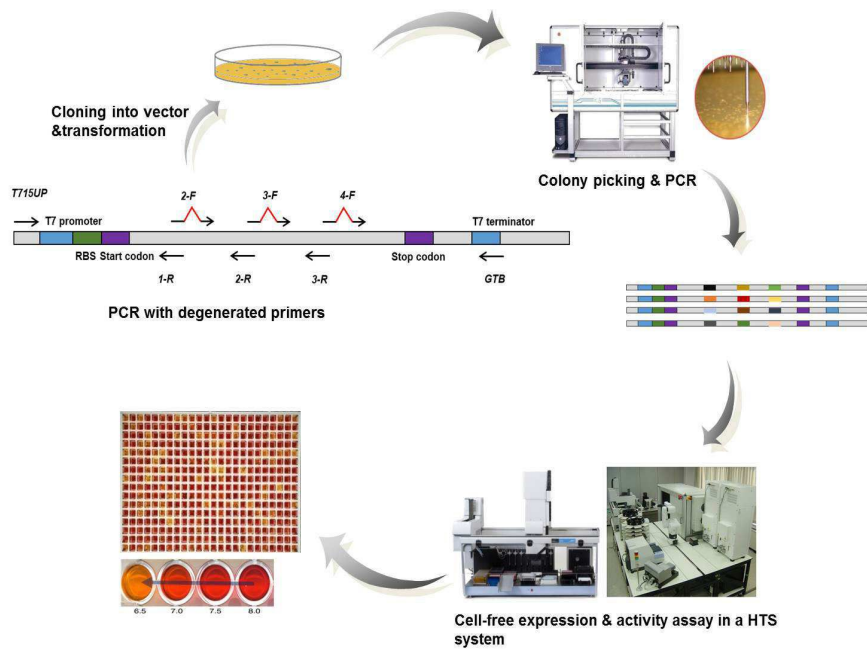
도면5



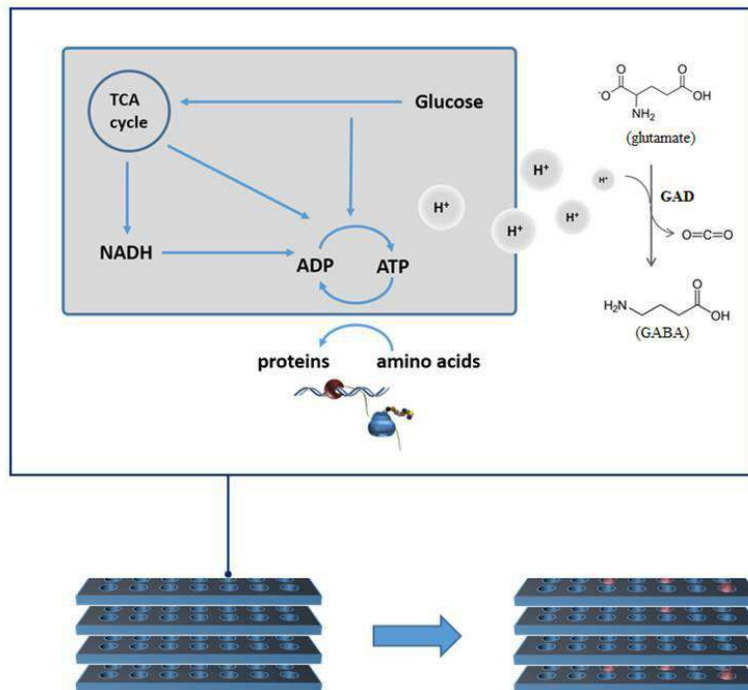
도면6



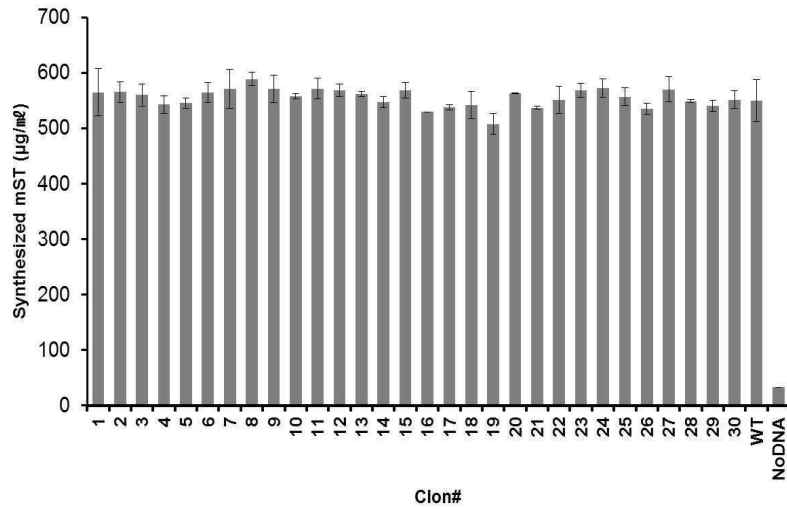
도면7



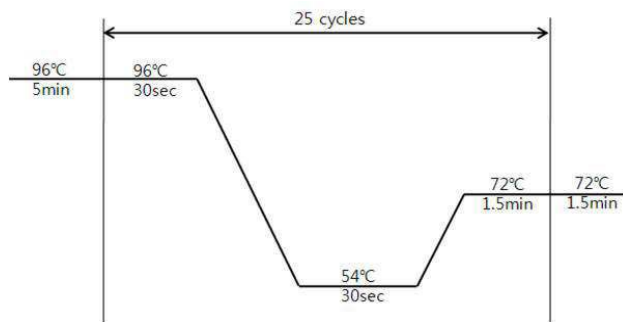
도면8



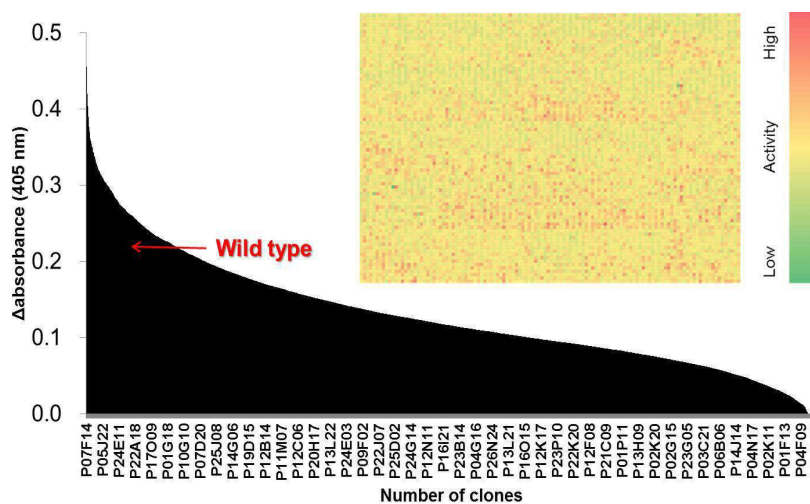
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Method of cell-free protein synthesis regulating pH with enzymes

<130> PN15165

<160> 10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 466

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Asp Lys Lys Gln Val Thr Asp Leu Arg Ser Glu Leu Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Phe Gly Ala Lys Ser Ile Ser Thr Ile Ala Glu Ser Lys Arg Phe

20 25 30

Pro Leu His Glu Met Arg Asp Asp Val Ala Phe Gln Ile Ile Asn Asp

35 40 45

Glu Leu Tyr Leu Asp Gly Asn Ala Arg Gln Asn Leu Ala Thr Phe Cys

50 55 60

Gln Thr Trp Asp Asp Glu Asn Val His Lys Leu Met Asp Leu Ser Ile

65 70 75 80

Asn Lys Asn Trp Ile Asp Lys Glu Glu Tyr Pro Gln Ser Ala Ala Ile

85 90 95

Asp Leu Arg Cys Val Asn Met Val Ala Asp Leu Trp His Ala Pro Ala

100 105 110

Pro Lys Asn Gly Gln Ala Val Gly Thr Asn Thr Ile Gly Ser Ser Glu

115 120 125

Ala Cys Met Leu Gly Gly Met Ala Met Lys Trp Arg Trp Arg Lys Arg

130 135 140

Met Glu Ala Ala Gly Lys Pro Thr Asp Lys Pro Asn Leu Val Cys Gly

145 150 155 160

Pro Val Gln Ile Cys Trp His Lys Phe Ala Arg Tyr Trp Asp Val Glu

165 170 175

Leu Arg Glu Ile Pro Met Arg Pro Gly Gln Leu Phe Met Asp Pro Lys

180 185 190

Arg Met Ile Glu Ala Cys Asp Glu Asn Thr Ile Gly Val Val Pro Thr
 195 200 205
 Phe Gly Val Thr Tyr Thr Gly Asn Tyr Glu Phe Pro Gln Pro Leu His
 210 215 220
 Asp Ala Leu Asp Lys Phe Gln Ala Asp Thr Gly Ile Asp Ile Asp Met
 225 230 235 240
 His Ile Asp Ala Ala Ser Gly Gly Phe Leu Ala Pro Phe Val Ala Pro
 245 250 255
 Asp Ile Val Trp Asp Phe Arg Leu Pro Arg Val Lys Ser Ile Ser Ala
 260 265 270
 Ser Gly His Lys Phe Gly Leu Ala Pro Leu Gly Cys Gly Trp Val Ile
 275 280 285
 Trp Arg Asp Glu Glu Ala Leu Pro Gln Glu Leu Val Phe Asn Val Asp
 290 295 300
 Tyr Leu Gly Gly Gln Ile Gly Thr Phe Ala Ile Asn Phe Ser Arg Pro
 305 310 315 320
 Ala Gly Gln Val Ile Ala Gln Tyr Tyr Glu Phe Leu Arg Leu Gly Arg
 325 330 335
 Glu Gly Tyr Thr Lys Val Gln Asn Ala Ser Tyr Gln Val Ala Ala Tyr
 340 345 350
 Leu Ala Asp Glu Ile Ala Lys Leu Gly Pro Tyr Glu Phe Ile Cys Thr
 355 360 365
 Gly Arg Pro Asp Glu Gly Ile Pro Ala Val Cys Phe Lys Leu Lys Asp
 370 375 380
 Gly Glu Asp Pro Gly Tyr Thr Leu Tyr Asp Leu Ser Glu Arg Leu Arg
 385 390 395 400
 Leu Arg Gly Trp Gln Val Pro Ala Phe Thr Leu Gly Gly Glu Ala Thr
 405 410 415
 Asp Ile Val Val Met Arg Ile Met Cys Arg Arg Gly Phe Glu Met Asp
 420 425 430
 Phe Ala Glu Leu Leu Leu Glu Asp Tyr Lys Ala Ser Leu Lys Tyr Leu
 435 440 445

Ser Asp His Pro Lys Leu Gln Gly Ile Ala Gln Gln Asn Ser Phe Lys
 450 455 460

His Thr

465

<210> 2

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Asp Pro Ala Ser Leu Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Asn Gln Leu Met Asp Phe Thr Gln Asn Asn Glu Asp Lys Thr His Pro
 20 25 30

Arg Ile Phe Gly Leu Ser Arg Phe Lys Ile Pro Asp Asn Ile Ile Thr
 35 40 45

Gln Tyr Gln Asn Ile His Phe Val Glu Leu Lys Asp Asn Arg Pro Thr

50 55 60

Glu Ala Leu Phe Thr Ile Leu Asp Gln Tyr Pro Gly Asn Ile Glu Leu
 65 70 75 80

Asn Ile His Leu Asn Ile Ala His Ser Val Gln Leu Ile Arg Pro Ile
 85 90 95

Leu Ala Tyr Arg Phe Lys His Leu Asp Arg Val Ser Ile Gln Gln Leu
 100 105 110

Asn Leu Tyr Asp Asp Gly Ser Met Glu Tyr Val Asp Leu Glu Lys Glu
 115 120 125

Glu Asn Lys Asp Ile Ser Ala Glu Ile Lys Gln Ala Glu Lys Gln Leu
 130 135 140

Ser His Tyr Leu Leu Thr Gly Lys Ile Lys Phe Asp Asn Pro Thr Ile
 145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Trp Gln Ser Ala Phe Pro Val Lys Tyr His Phe Leu
 165 170 175

Ser Thr Asp Tyr Phe Glu Lys Ala Glu Phe Leu Gln Pro Leu Lys Glu

180 185 190
Tyr Leu Ala Glu Asn Tyr Gln Lys Met Asp Trp Thr Ala Tyr Gln Gln

195 200 205
Leu Thr Pro Glu Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Thr Leu Val Gly Phe Asn

210 215 220
Asp Glu Val Lys Gln Ser Leu Glu Val Gln Gln Ala Lys Phe Ile Phe

225 230 235 240
Thr Gly Thr Thr Thr Trp Glu Gly Asn Thr Asp Val Arg Glu Tyr Tyr

245 250 255
Ala Gln Gln Gln Leu Asn Leu Leu Asn His Phe Thr Gln Ala Glu Gly

260 265 270

Asp Leu Phe Ile Gly Asp His Tyr Lys Ile Tyr Phe Lys Gly His Pro

275 280 285

Arg Gly Gly Glu Ile Asn Asp Tyr Ile Leu Asn Asn Ala Lys Asn Ile

290 295 300

Thr Asn Ile Pro Ala Asn Ile Ser Phe Glu Val Leu Met Met Thr Gly

305 310 315 320

Leu Leu Pro Asp Lys Val Gly Gly Val Ala Ser Ser Leu Tyr Phe Ser

325 330 335

Leu Pro Lys Glu Lys Ile Ser His Ile Ile Phe Thr Ser Asn Lys Gln

340 345 350

Val Lys Ser Lys Glu Asp Ala Leu Asn Asn Pro Tyr Val Lys Val Met

355 360 365

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

370 375 380

Leu Lys Gln Leu Gly Gly Gly Leu Glu

385 390

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400>	3	
tcgatccgc gaaattaata cgactcacta tagg		34
<210>	4	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
aaagataaat ttagcttggt gcacttc		27
<210>	5	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
gaagtgaac aagctaaatt tatctttnns ggcacg		36
<210>	6	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	
aggatgccct ttaaagtaga tttt		24
<210>	7	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	7	
aaaatctact ttaaaggcca tcctnnsggt ggtgaaatta atgactacat tctga		55
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

tgaacttgca acaccacca c

21

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gtgggtggtg ttgcaagtc annstatttc

30

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

caaaaaaccc ctcaagaccc gtta

25