



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0131586
(43) 공개일자 2016년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A23L 1/00 (2006.01)
A61K 8/11 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/4728 (2013.01)
A23P 10/30 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0064348
(22) 출원일자 2015년05월08일
심사청구일자 2016년05월12일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최유성
대전광역시 대덕구 대전로1020번길 86, 1동 1108
호 (오정동, 영진로알아파트)
손채연
대전광역시 중구 계백로1583번길 46-2, 401호 (유
천동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

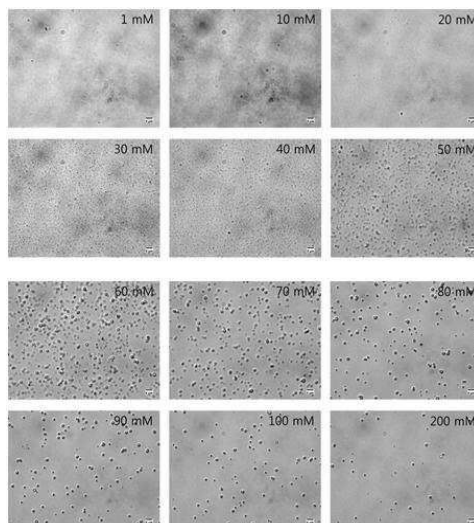
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 칼슘결합 단백질 및 이에 의해 형성된 코아세르베이트

(57) 요약

본 발명은 칼슘 결합 단백질 및 이에 의해 형성된 코아세르베이트에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 재조합 칼슘 결합 단백질은 칼슘 이온과 결합할 수 있으며, 코아세르베이트 형성능이 우수하므로, 칼슘 결합 단백질 및 이를 이용한 코아세르베이트를 대량으로 생산하여 산업적으로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 8/11 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

(72) 발명자

차형준

경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 1001호 (지곡동, 교수아파트)

반소영

대구광역시 수성구 범안로 40, 202동 1405호 (범물동, 범물청아타운)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드로 구성된, 칼슘 결합용 단백질.

청구항 2

서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 코아세르베이트 형성용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 양이온성 고분자를 더 포함하는 코아세르베이트 형성용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 코아세르베이트는 복합 코아세르베이트인, 코아세르베이트 형성용 조성물.

청구항 5

서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 코아세르베이트.

청구항 6

서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환 미생물을 제조하는 단계;를 포함하는 칼슘 결합 단백질의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 칼슘 결합 단백질 및 이에 의해 형성된 코아세르베이트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코아세르베이트는 이온성 고분자 전해질 그 자체, 또는 양이온성 고분자 전해질과 음이온성 고분자 전해질에 의해 특정 조건에서 형성되는 콜로이드 물질의 일종으로, 코아세르베이트가 형성되었을 때 용액의 흡광도는 증가하게 되고, 용액 상에서 동그란 구 형태로 외부 용액과 분리되어 존재한다. 코아세르베이트는 용해된 단백질이 전해질 염 이온 또는 알코올 등과 상호작용하여 자체적으로 형성되기도 하고, 특정 단백질과 반대 성질을 띄는 고분자 전해질과의 혼합을 통해서도 일어날 수 있다. 코아세르베이트는 식품, 화장품의 제형화를 위해 사용되기도 하고, 낮은 표면장력에 기인해 약물, 효소, 세포, 식품첨가물 등의 기능성 물질을 미세캡슐 안에 고정화하는데 쓰이기도 한다.

[0003] 칼슘 결합 단백질은, 자연계에 존재하는 생명체 지지체로서 뼈, 치아, 껍질 등 다양한 형태의 바이오미네랄의 구성 성분들 중 하나이다. 이는 무기질 재료 단독으로는 나타낼 수 없는 바이오미네랄의 물리적, 기계적, 생물학적 물성을 생명체가 원하는 목적에 맞도록 조절하는 데 활용된다. 칼슘 결합 단백질은 칼슘 이온과 결합하여

복합체를 잘 형성하는 것으로 알려져 있고, 이를 위해 대체적으로 음전하를 띄는 아미노산이 단백질의 주 구성 성분을 이룬다. 따라서 칼슘 결합 단백질은 음이온성 고분자 전해질의 특성을 갖고 있을 가능성이 높다. 또한 이는 인산칼슘, 탄산칼슘 등으로 구성된 뼈, 치아 등의 골조직 재생용 생체재료와 함께 활용되어, 손상되거나 결손된 골 부위에 인산칼슘, 탄산칼슘 기반 생체재료의 이식 및 충진을 효율적으로 수행하는 데 도움을 줄 수 있다.

[0004] 그러나 지금까지 칼슘 결합 단백질은 생명체에서 추출에 의해 소량으로 주로 얻어지고 있어, 생화학적 연구는 어느 정도 이루어지고 있으나 산업적으로 활용되기 위해 대량 생산된 사례는 상대적으로 미미하다. 또한, 칼슘 결합 단백질을 이용하여 코아세르베이트를 형성한 결과는 거의 보고된 바 없다. 따라서 칼슘 결합 단백질 및 이를 이용한 코아세르베이트를 대량으로 생산할 수 있는 새로운 방법에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 칼슘 결합 단백질 및 이를 이용한 코아세르베이트의 대량 생산 방법을 연구하던 중, 새로운 제조 합 칼슘 결합 단백질을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드로 구성된 칼슘 결합용 단백질 및 이를 포함하는 코 아세르베이트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드로 구성된, 칼슘 결합용 단백질을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 코아세르베이트 형성용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 코아세르베이트를 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환 미생물을 제조하는 단계;를 포함하는 칼슘 결합 단백질의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 신규한 제조합 칼슘 결합 단백질은 칼슘 이온과 결합할 수 있으며, 코아세르베이트 형성능이 우수하므로, 칼슘 결합 단백질 및 이를 이용한 코아세르베이트를 대량으로 생산하여 산업적으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 제조합 칼슘 결합 단백질 발현 벡터 pGG의 모식도를 나타낸 도이다.

도 2는 정제된 제조합 칼슘 결합 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 도이다 (M, 단백질 마커; BL & IS, BL21 (DE3) 세포의 음성 대조군; S, GG1234의 수용성 분획; FT, 친화성 결합 이후 통과액; W, 세척분획; E, 정제된 GG1234).

도 3은 GG1234의 칼슘 결합능을 SDS-PAGE 이미지와 Stains-all 염색법으로 확인한 결과를 나타낸 도이다 (GG: GG1234).

도 4는 GG1234 농도에 따른 GG1234의 칼슘 결합능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 pH 변화에 따른 GG1234의 코아세르베이트 형성능을 흡광도 변화를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 GG1234의 코아세르베이트 형성을 육안으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 GG1234와 fp-151의 혼합에 의한 복합 코아세르베이트 형성을 흡광도 변화를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다(GG-151 코아세르베이트: GG1234 및 fp151의 복합 코아세르베이트).

도 8은 복합 코아세르베이트 형태를 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드로 구성된, 칼슘 결합용 단백질을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 칼슘과 결합할 수 있는 칼슘 결합능을 가지는 재조합 단백질로, 코아세르베이트를 효과적으로 형성할 수 있으며 수용성 형태로 대량 생산이 가능하여 산업적으로 다양한 분야에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0015] 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 갠스 갠스(Gallus gallus) 유래의 유전자에 의해 암호화되는 Genbank XP_001234449로 등록된 서열이며, 칼슘 결합 능력을 유지하는 범위 내에서 이의 변이체 역시 포함할 수 있다. 변이체는 카르복실 말단 또는 아미노말단에 추가 아미노산 서열의 부가 또는 일부 아미노산의 치환이 된 것을 의미한다.
- [0016] 이 경우 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드의 변이체는 이와 기능적 동등성이 있는 폴리펩티드를 제한없이 포함할 수 있으며, 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드와 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 95%, 더 바람직하게는 97%, 더 바람직하게는 98%, 더더욱 바람직하게는 99%의 서열 동일성을 갖는 것을 말한다.
- [0017] 상기 폴리펩티드는 mRNA 서열의 일부를 코돈 최적화한 DNA 서열을 이용하여 대장균에서 대량 생산될 수 있으며, 대량 생산된 재조합 폴리펩티드는 수용성으로 과량 발현되는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 용어 코돈 최적화란, 숙주 세포에서 이중 재조합 단백질을 보다 효과적으로 제조하기 위하여 드물게 존재하는 코돈을 숙주세포에서 이중 재조합 단백질을 암호화하는 핵산 중 자주 존재하는 코돈으로 변형시키고, 상기 숙주 세포를 재조합 단백질을 암호화하는 핵산으로 형질전환시킨 후 재조합 뉴클레오타이드를 발현시키는 것을 말한다. 이중발현 시스템에서 이와 같은 최적화는 외래 단백질을 생성시킬 수 있는 숙주의 능력을 개선시킬 수 있다.
- [0019] 본 발명에서의 상기 칼슘 결합용 단백질은 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 외부 유전자를 발현할 수 있는 용도로 제작된 통상의 벡터에 발현 가능하도록 삽입하여, 유전공학적인 방법으로 대량 생산할 수 있다. 상기 벡터는 단백질을 생산하기 위한 숙주세포의 종류 및 특성에 따라 적절히 선택하거나, 신규로 제작할 수 있다. 상기 벡터를 숙주세포에 형질전환하는 방법 및 형질전환체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법은 통상의 방법으로 용이하게 실시할 수 있다. 상기한 벡터의 선택, 제작, 형질전환 및 재조합 단백질의 발현 등의 방법은, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시할 수 있으며, 통상의 방법에서 일부의 변형도 본 발명에 포함된다.
- [0020] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 칼슘 이온과 결합했을 때 다량의 복합체를 형성하며 침전물을 형성할 수 있다. 따라서 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 칼슘 결합 단백질로 활용하기 위한 칼슘 결합용 단백질을 구성한다.
- [0021] 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드로 구성된 칼슘 결합용 단백질 및 이의 기능을 유지하는 변이체는 음이온성 아미노산을 다량 함유하고 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 코아세르베이트 형성용 조성물을 제공한다.
- [0023] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 코아세르베이트를 제공한다.
- [0024] 용어 코아세르베이트는 음이온성 고분자 전해질과 양이온성 고분자 전해질이 특정 조건에서 혼합되었을 때 형성되는 콜로이드 물질의 일종으로, 용액상에서 동그란 구 형태로 외부 용액과 분리되어 존재하는 물질을 말한다.
- [0025] 본 발명의 코아세르베이트는 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드로 구성된 칼슘 결합 단백질 자체, 또는 상기 재조합 칼슘 결합 단백질과 양이온성 고분자가 결합하여 형성된 콜로이드의 일종일 수 있으며, 바람직하게는 수용성 용매, 보다 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 아세톤, 아세트산 수용액에서 제조될 수 있으며, 더 바람직하게는 아세트산 나트륨 수용액에서 형성될 수 있다.

- [0026] 상기 용매에서 코아세르베이트를 제조하는 경우 칼슘 결합 단백질 및 양이온성 고분자의 첨가량은 이에 한정되지 않으나 바람직하게는 각각 용매 전체의 부피 대비 0.001 내지 100%(w/v) 일 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 0.01 내지 30%(w/v)일 수 있다.
- [0027] 상기 코아세르베이트 형성용 조성물은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드와 혼합되어 코아세르베이트를 형성할 수 있는 다양한 pH, 농도의 전해질 또는 고분자를 추가적으로 포함할 수 있으며, 적정 pH 는 바람직하게는 pH 2.0 내지 pH 10.0, 보다 바람직하게는 pH 2.0 내지 pH 6.0, 더 바람직하게는 pH 2.5 내지 pH 5.5일 수 있다.
- [0028] 즉 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 칼슘 결합 단백질은 산성의 pH 영역에서 전해질 염 또는 양이온성 고분자와 결합하여 코아세르베이트를 형성할 수 있다. 칼슘 결합 단백질이 전해질 염과 결합하여 형성되는 코아세르베이트를 단순 코아세르베이트(simple coacervate)라고 하며, 양이온성 고분자와 결합하여 형성되는 것을 복합 코아세르베이트(complex coacervate)라고 정의한다.
- [0029] 본 발명의 코아세르베이트 형성용 조성물은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드에 더하여 하나 이상의 양이온성 고분자를 더 포함할 수 있고, 이는 복합 코아세르베이트를 형성할 수 있다.
- [0030] 상기 양이온성 고분자는 음이온성 단백질인 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드로 구성된 칼슘 결합 단백질과 결합하여 코아세르베이트를 형성할 수 있는 고분자 물질을 제한없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드 또는 이의 변이체로 구성되는 칼슘 결합 단백질의 pI (Isoelectric point)보다 높은 고분자, 더 바람직하게는 pI 수치가 6 내지 12인 고분자, 더 바람직하게는 8 내지 11인 고분자일 수 있다. 상기 pI 수치를 초과하거나 미만인 경우 코아세르베이트가 형성되기 어려우므로 상기 pI 범위내의 양이온성 고분자를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0031] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환 미생물을 제조하는 단계;를 포함하는 칼슘 결합 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0032] 상기 제조방법에 의하면 칼슘 결합 단백질을 수용성 형태로 대량 생산할 수 있다.
- [0033] 보다 구체적으로 상기 제조방법은,
- [0034] 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드의 mRNA 서열을 코돈 최적화하고, 최적화된 칼슘 결합 단백질의 DNA 양 끝에 제한효소사이트를 첨가하여 발현벡터에 클로닝하는 단계;
- [0035] 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- [0036] 형질전환체를 배양하여 제조된 재조합 칼슘 결합 단백질을 정제하는 단계;로 이루어질 수 있다.
- [0037] 용어 벡터는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 발현 벡터는 목적한 코딩서열과 특정 숙주생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 이와 같은 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비 형질전환 세포와 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 카나마이신, 블레오마이신, 클로로앰피니콜, 앰피실린과 같은 항생제 유전자가 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 또한 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0039] 용어 형질전환체는 숙주세포에 새로운 목적 폴리뉴클레오티드가 도입된 것을 말하며, 상기 숙주세포는 대장균, 효모, 동물, 식물 세포 또는 곤충세포 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0041] **실시예 1. 재조합 칼슘 결합 단백질의 제조**
- [0042] Genbank XP_001234449 로 등록된 서열번호 1의 서열을 이용하여 재조합 칼슘 결합 단백질을 제조하였다. 보다

구체적으로 서열번호 1의 서열을 대장균에서 대량 발현시키기 위하여, mRNA 서열의 일부를 코돈 최적화한 DNA 서열을 화학 합성하였다. 최적화된 DNA의 양 말단에는 NdeI, XhoI의 제한효소 사이트를 첨가하고 발현용 프로모터 T7을 포함하는 발현벡터 pET23b(+)에 클로닝하여 재조합 단백질 발현 벡터를 제조하였다. 발현 벡터에는 재조합 단백질의 정제를 위하여 C-말단에 6개의 히스티딘 서열로 이루어진 히스티딘 태그(histidine tag, HHHHHH)가 포함되도록 하였으며, 유전자 도입을 확인하기 위하여 앰피실린 저항성 유전자가 포함되도록 하였다. 제조된 단백질 발현 벡터 pGG의 모식도를 도 1에 나타내었으며, 이를 통해 제조되는 재조합 단백질을 GG1234로 명명하였다.

[0043] GG1234의 대량 생산을 위하여 재조합 단백질 발현 벡터 pGG를 대장균 BL21(DE3)에 42℃에서 1분 30초간 열충격을 가하여 도입하였다. pGG는 앰피실린 항생제에서 저항 내성을 지니는 벡터이므로, 앰피실린이 첨가되어 있는 LB-한천 배지에서 배양하여 벡터가 도입된 형질전환 대장균을 선별하였다. 선별된 형질전환체를 50μg/mL 앰피실린이 첨가된 통상의 37℃, LB 배지에서 진탕 배양하여 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)가 0.8~0.9 정도에 도달했을 때 유도물질인 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, 1mM)를 첨가하여 GG1234의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 추가로 20시간 동안 20℃에서 배양한 후, 배양된 세포를 4000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 세포 파쇄를 위한 용액(50 mM 인산나트륨 완충액(sodium phosphate buffer), pH 7, 10 mM 이미다졸(imidazole))에 부유시킨 다음 초음파 분쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 수용성 분액과 불용성 분액으로 나누어 각각을 통상의 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 또한, 상기 단백질의 수용성 분액을 니켈 레진이 충전된 컬럼에 적용하여 단백질과 컬럼이 결합하도록 하고, 세척 버퍼(50 mM 인산 나트륨 완충액, 20 mM 이미다졸, pH 7.0)로 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 씻어냈다. 컬럼으로부터 단백질의 용출은 용출 버퍼(50 mM 인산나트륨 완충액, 300 mM 이미다졸, pH 7.0)를 이용하여 진행하였고, 물을 이용한 투석을 통해 단백질 수용액에 남아 있는 물과 단백질 성분 이외의 성분을 제거하고 최종적으로 정제된 단백질을 생산하였다. 재조합 칼슘 결합 단백질이 발현된 대장균의 수용성 분액과 니켈 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제된 재조합 칼슘 결합 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0044] 도 2에 나타난 바와 같이, 재조합 단백질은 수용성으로 과량 발현되어 검출되었으며, 이를 통해 재조합 단백질 GG1234가 수용성 형태로 대량 생산될 수 있고, 쉽게 분리 정제 할 수 있음을 확인하였다.

[0045] 실시예 2. 재조합 칼슘 결합 단백질 GG1234의 칼슘 결합 능력 확인

[0046] 상기 실시예 1에서 분리, 정제된 단백질이 칼슘과 결합하는 칼슘 결합 단백질로서의 특성을 나타내는지 여부를 확인하였다.

[0047] 2.1 Stains-all 염색법에 의한 분석

[0048] 칼슘 결합 단백질은 음이온성 아미노산을 많이 포함하고 있으므로, Stains-all 염색법에 의해 칼슘 결합 능력을 간접적으로 확인할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이는 양이온성 카보시아닌(carbocyanine) 염색 시약이 단백질의 칼슘 결합 부위에 결합하여 염색약-단백질 복합체를 형성하며, 이러한 복합체는 600~615 nm의 파장영역에서 특이적인 흡광도를 보여, 염색시약을 적용하였을 때 푸른색으로 염색되는 반면, 칼슘 결합 능력이 없는 대부분의 단백질들은 복합체를 형성하지 않아 붉은색으로 단백질이 염색되는 원리를 이용한다. 실시예 1의 GG1234 단백질의 칼슘 결합 여부를 SDS-PAGE 이미지와 Stains-all 염색법으로 확인한 결과를 도 3에 나타내었다. 음성 대조군으로는 BSA 단백질을 사용하였다.

[0049] 도 3에 나타난 바와 같이, GG1234 단백질은 음성 대조군인 BSA와 달리 푸른색으로 염색이 되는 것을 확인하였으며, 이와 같은 결과를 통해 GG1234 단백질이 칼슘과 결합할 수 있는 가능성이 높은 단백질을 확인하였다.

[0050] 2.2 GG1234 및 칼슘 이온의 침전물 형성 확인

[0051] GG1234 단백질이 칼슘과 결합할 수 있는 능력이 있는 것으로 예상되었으므로, 이를 직접 확인하기 위하여, GG1234 단백질과 칼슘 이온의 직접적인 혼합을 수행하고 600nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 칼슘 이온은 10mM로 고정하였으며, GG1234 단백질의 농도를 변화시키며 흡광도를 측정한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0052] 도 4에 나타난 바와 같이 GG1234 단백질은 칼슘 이온과 반응하여 다수의 복합체를 형성하고 이에 의해 많은 침

전물을 형성하였으며 이와 같은 결과를 통해 GG1234는 칼슘 결합능을 가진 칼슘 결합 단백질을 확인하였다.

[0053] 실시예 3. GG1234 단백질의 코아세르베이트 형성

[0054] 실시예 1의 재조합 단백질 GG1234가 칼슘 결합능이 있는 단백질을 확인하였으므로, 이를 다양한 농도의 아세트산 나트륨 완충액 및 pH에 넣었을 때 코아세르베이트가 형성되는지 여부를 흡광도 변화 및 현미경 관찰을 통해 확인하였다. 아세트산 나트륨 완충액을 200mM까지 농도 변화시켜 첨가하고, pH를 약 3 내지 5까지 변화시키며 600nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0055] 도 5에 나타낸 바와 같이, pH 3.75에서 가장 높은 흡광도가 나타났으며, 현미경을 통해 약 2~3 μ m 정도 크기의 원형체가 형성된 것을 확인하였다. 또한 도 6에 나타낸 바와 같이 가장 높은 흡광도를 나타내는 pH 3.75에서 1 내지 200mM의 아세트산 나트륨 완충액을 첨가한 결과, 구형의 코아세르베이트가 효과적으로 형성되는 것을 육안으로 확인하였다.

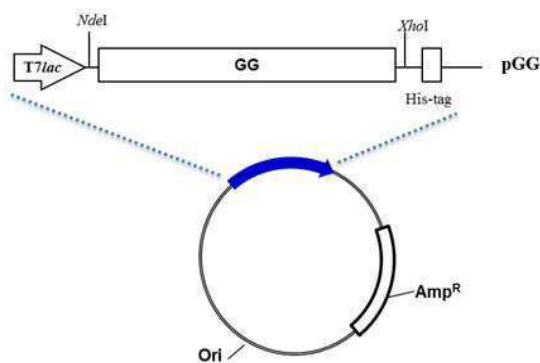
[0056] 실시예 4. 재조합 칼슘 결합 단백질 GG1234와 양이온성 고분자 단백질 fp-151을 이용한 복합 코아세르베이트 (complex coacervate) 형성

[0057] 재조합 칼슘 결합 단백질 GG1234와 대표적인 양이온성 단백질 고분자인 fp-151(서열번호 2)을 1:1 (w/w) 비율로 혼합하고, 이와 같은 혼합에 의하여 pH 3 내지 6의 pH 용액에서 코아세르베이트가 형성되는지를 탁도 변화를 통해 확인하였다. 탁도 변화의 측정은 600nm에서의 흡광도 측정을 통해 수행하였으며, 결과를 도 7에 나타내었다.

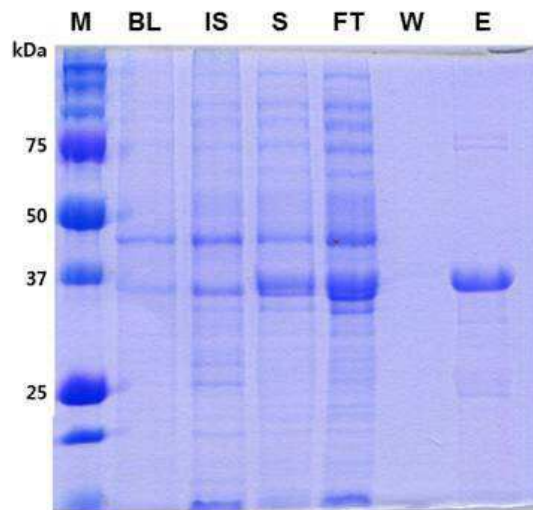
[0058] 도 7에 나타낸 바와 같이, GG1234와 fp-151의 혼합에 의하여 탁도의 변화가 관찰되었으며, 이는 복합 코아세르베이트(complex coacervate) 형성에 의한 것이다. 형성된 복합 코아세르베이트는 GG-151로 명명하였다. 이 중 가장 높은 흡광도를 나타내는 pH 4와 낮은 흡광도를 나타내는 pH 5 및 pH 6에서의 코아세르베이트 형태를 현미경으로 관찰하였으며, 이를 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타낸 바와 같이, 가장 높은 흡광도를 나타내는 pH 4에서 가장 많은 복합 코아세르베이트 GG-151이 형성되었음을 확인하였다.

도면

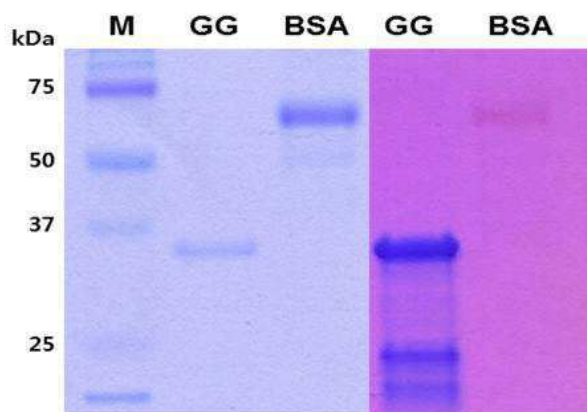
도면1



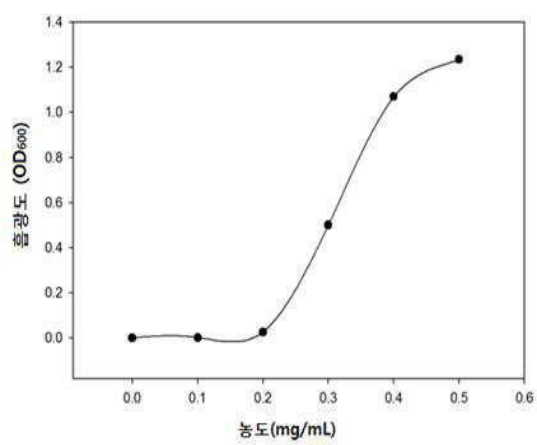
도면2



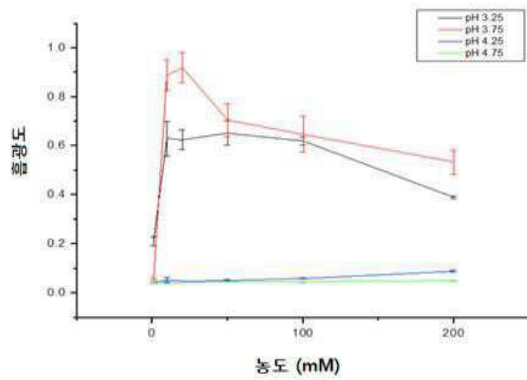
도면3



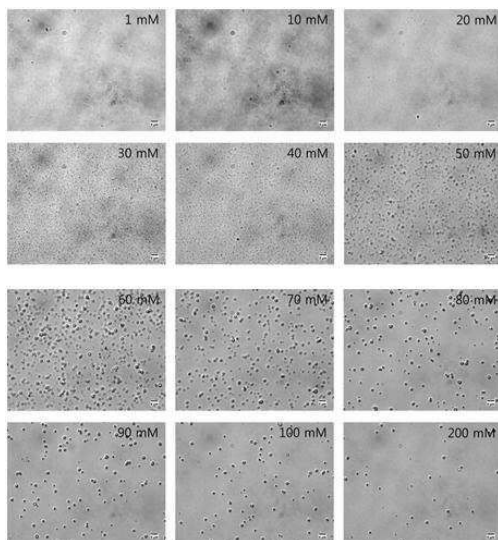
도면4



도면5



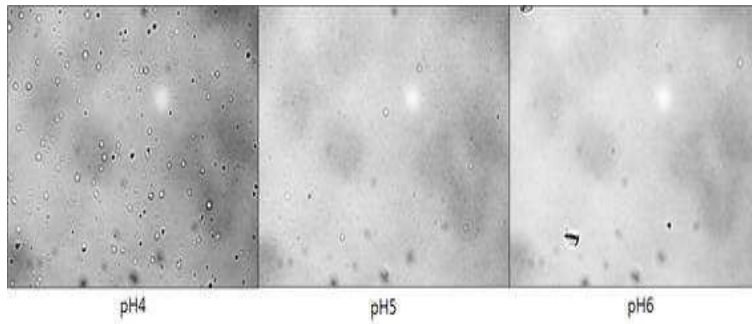
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Calcium binding proteins and coacervate formed from calcium
binding proteins

<130> 1-26p

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 284

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 1

Met Gln Glu Leu Val Ala Thr Glu Arg Arg Glu Val Ala Thr Met Gln

1 5 10 15

Glu Leu Val Ala Thr Trp Lys Asp Glu Val Ala Met Met Arg Gly Glu

20 25 30

Val Ala Thr Trp Lys Asp Glu Val Ala Met Met Arg Gly Glu Val Ala

35 40 45

Thr Trp Lys Asp Glu Val Ala Thr Val Arg Gly Glu Val Ala Thr Trp

50 55 60

Lys Glu Leu Gly Ala Gln Lys Ala Ala Val Gln Leu Glu Lys Met Glu

65 70 75 80

Asp Asn Gly Asp Asn Gly Asp Ser Gly Asp Asn Gly Asp Leu Gly Asp

85 90 95

Asn Gly Asp Leu Gly Asp Asn Gly Asp Ser Glu Asp Ser Gly Asp Cys

100 105 110
 Gly Asp Val Gly Asp Asn Gly Asp Ser Gly Asp Cys Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Asp Asn Gly Ala Asn Gly Asp Asn Gly Asp Arg Gly Asp Asn Gly Asp
 130 135 140
 Ser Gly Asp Ser Gly Asp Cys Gly Asn Gly Arg Asp Ser Gly Ala Asn
 145 150 155 160
 Gly Asp Leu Gly Asp Tyr Gly Asp Ser Gly Gly Ser Gly Asp Asn Gly

165 170 175
 Asp Arg Asp Ser Gly Asp Ser Gly Asp Asn Gly Ala Asn Gly Asp Cys
 180 185 190
 Glu Asp Asn Gly Asp Ile Arg Asp Ile Gly Asp Ile Gly Asp Ser Gly
 195 200 205
 Asp Thr Gly Asp Asn Arg Asp Ser Gly Val Asn Gly Asp Ser Gly Asp
 210 215 220
 Ser Gly Ala Asn Gly Asp Leu Gly Asp Asn Gly Asp Ile Gly Asp Ile
 225 230 235 240

Gly Asp Ser Gly Asp Thr Gly Asp Asn Arg Asp Ser Gly Val Asn Gly
 245 250 255
 Asp Ser Gly Asp Asn Gly Ala Asn Gly Asp Ser Gly Asp Asn Gly Asp
 260 265 270
 Ile Gly Asp Ser Glu Asp Asn Gly Asp Val Gly Thr
 275 280

<210> 2

<211> 196

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fp-151

<400> 2

Met Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr

1 5 10 15
 Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala

20 25 30
 Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro
 35 40 45
 Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ser Ser Glu
 50 55 60
 Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr Tyr His Tyr His Ser
 65 70 75 80

 Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr Lys Gly Lys
 85 90 95
 Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asn Ser Gly
 100 105 110
 Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly Tyr
 115 120 125
 Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr
 130 135 140
 Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser

 145 150 155 160
 Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys
 165 170 175
 Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro
 180 185 190
 Pro Thr Tyr Lys
 195