(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월10일
(11) 등록번호 10-1253471
(24) 등록일자 2013년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/56 (2006.01) *C12P 19/00* (2006.01)
C12P 33/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0015494(분할)
(22) 출원일자 2013년02월13일
심사청구일자 2013년02월13일
(62) 원출원 특허 10-2011-0120880
원출원일자 2011년11월18일
심사청구일자 2011년11월18일
(56) 선행기술조사문헌
KR100249427 B1
KR100992800 B1

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
양덕춘
경기도 용인시 기흥구 보라동 현대모닝사이드 111동 301호
전림호
경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교 국제캠퍼스 송관B동 한방바이오실험실
김연주
경기도 화성시 영통구 반월동 868번지 신영통 현대2차 아파트 212동 505호
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 최준호

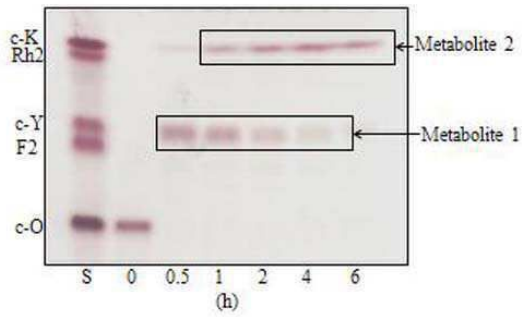
(54) 발명의 명칭 **β-글라이코시다제의 제조방법 및 진세노사이드 전환방법**

(57) 요 약

본 발명은 PPD 타입 진세노사이드를 체내 흡수가 용이한 형태의 마이너 진세노사이드인 희귀 활성 진세노사이드로 효율적으로 생전환 할 수 있는 신규한 β-글라이코시다제 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 β-글라이코시다제 단백질을 이용하면 PPD 타입 진세노사이드를 체내 흡수가 용이한 희귀 활성 진세노사이드로 효율적으로 생전환 시킬 수 있다. 따라서 천연에서는 미량만 생산되어 이용에 제한이 따르던 희귀 활성 진세노사이드를 대량생산 함으로써 산업적으로 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008204
부처명	농림수산식품부
연구사업명	기능성 식품 및 의약
연구과제명	미생물 메타지놈 시스템생물학 기반 신규 대사경로 핵심유전자 발굴과 대사재설계 원천기술 개발 및 이용
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β-글라이코시다제 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 배양하는 단계;

(b) 상기 배양된 형질전환체로부터 β-글라이코시다제를 생산하는 단계; 및

(c) 상기 생산된 β-글라이코시다제를 회수하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β-글라이코시다제의 제조방법.

청구항 2

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β-글라이코시다제 단백질, 제1항의 단계 (a)의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 진세노사이드 화합물 O(compound O), 화합물 Y 또는 진세노사이드 F2와 접촉시키는 단계를 포함하는 진세노사이드 전환 방법으로,

상기 진세노사이드의 전환은 화합물 O(compound O)의 화합물 Y(compound Y)로의 전환, 화합물 Y의 화합물 K(compound K)로의 전환, 화합물 O의 화합물 K로의 전환, 진세노사이드 F2의 화합물 K로의 전환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 방법은 화합물 O(compound O), 화합물 Y 또는 진세노사이드 F2의 3번 또는 20번 탄소의 가수분해에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 전환은 pH 4.0 내지 8.0에서 수행되는 것인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 전환은 20 내지 50℃에서 수행되는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PPD 타입 진세노사이드를 체내 흡수가 용이한 형태의 마이너 진세노사이드인 희귀 활성 진세노사이드로 효율적으로 생전환 할 수 있는 신규한 β-글라이코시다제 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사포닌은 식물계에 널리 존재하는 배당체에서 당이 아닌 부분이 여러 고리 화합물로 이루어진 물질을 의미하며, 인삼 또는 홍삼에 주요 생리활성 성분으로 포함된 사포닌 성분인, 트리테르펜사포닌(triterpene saponin)은 타 식물에서 발견되는 사포닌과는 화학 구조가 상이하므로 이러한 인삼사포닌을 타 식물계 사포닌과 구별하기 위해서 인삼(Ginseng) 배당체(Glycoside)란 의미로 진세노사이드(Ginsenoside)라고 부른다.

[0003] 진세노사이드는 triterpenoid인 oleanane계 진세노사이드와 dammarane계 진세노사이드로 분류되며, dammarane계 진세노사이드는 구조적인 특징에 근거하여 다시 프로토파낙사다이올(protopanaxadiol) 계 진세노사이드(PPD)와 프로토파낙사트라이올(protopanaxatriol) 계 진세노사이드(PPT)로 분류된다. 프로토파낙사다이올계 진세노사이드(PPD)에는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Rg3, F2, Rh2, 화합물 K (compound K), 화합물 O (compound O), 화합물 Mc (compound Mc), 화합물 Mc1 (compound Mc1), 화합물 Y (compound Y), protopanaxadiol 등이 포함된다(도 1).

[0004] 진세노사이드의 90% 이상을 차지하는 것은 메이저(major) 진세노사이드이나 이는 큰 사이즈로 인하여 생체 내에서의 흡수율이 매우 낮다. 따라서 진세노사이드의 약효를 증대시키기 위해서 메이저 진세노사이드를 상대적으로 흡수도 잘 되며 약효도 더 뛰어난 마이너(minor) 진세노사이드로 전환시키는 과정이 필요하다. 즉, 메이저 진세노사이드는 in vivo에서 효과적으로 생리적 활성을 나타내기 위하여 글루코스를 제거(deglycosylated)하는 전환 과정이 요구된다.

[0005] 메이저 진세노사이드에는 Rg1, Re, Rb1, Rb2, Rc 등이 포함되며, 마이너 진세노사이드에는 F2, Rg3, Rh1, Rh2, 화합물 K, 화합물 Mc, 화합물 Mc1 등이 포함된다.

[0006] 미량의 진세노사이드인 마이너 진세노사이드를 생산하기 위한 방법으로 화학적 분해 방법 (De Mayo 등, Canad. J. Chem., 43, 2033, 1965), 효소적 방법 (Kitagawa 등, Terahedron Letters, 30, 2283, 1974) 등이 제시되어 왔으나, 상기와 같은 방법들은 1) 제조 공정상 여러 단계를 거쳐야 하거나, 2) 제조과정에서 목적하는 성분이 소실되며, 3) 식용에 부적합한 촉매를 사용하거나, 4) 낮은 수율을 나타내어 여전히 대량생산에 한계가 있었다.

[0007] 효소적 방법에 사용될 수 있는 효소의 종류로는 β-글루코시다제 (β-glucosidase), α-L-아라비노피라노시다제 (α-L-arabinopyranosidase), α-L-아라비노퓨라노시다제 (α-L-arabinofuranosidase), α-L-람노시다제 (α-L-rhamnosidase) 등이 알려져 있으며, 이와 같은 효소를 이용한 메이저 진세노사이드의 생전환(biotransformation)에 대해 많은 연구가 있었다. 그러나 이들 역시 대량 생산 방법으로서는 효과적이지 못하고, 많은 비용이 발생하는 문제가 있다. 뿐만 아니라, β-글루코시다제, α-L-아라비노피라노시다제, α-L-아라비노퓨라노시다제, α-L-람노시다제에 속한다고 해도 모두 메이저 진세노사이드를 마이너 진세노사이드로 전환시킬 수 있는 활성을 가지는 것은 아니며, 전환활성을 갖는다 하여도 그 활성이 미미한 경우도 많다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) J. J. DUGAN AND P. DE MAYO. TERPENOIDS: X. PRE-SENEGENIN, A QUITE NORMAL TRITERPENOID. Canadian Journal of Chemistry, 1965, 43:(7) 2033-2046

(비특허문헌 0002) KITAGAWA et al. SOIL BACTERIAL HYDROLYSIS LEADING TO GENUINE AGLYCONE .9. STEROIDAL PROSAPOGENOL OF NEW TYPE FROM EPIGEOUS PART OF METANARTHECIUM-LUTEO-VIRIDE MAXIM. AND CHARACTERIZATION OF 3-EPI-METAGENIN. TETRAHEDRON, 1974, 30 (15): 2283-2291

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 PPD 타입 진세노사이드를 체내 흡수가 용이한 형태의 마이너 진세노사이드인 희귀 활성 진세노사이드로 효율적으로 생전환 할 수 있는 신규한 β-글라이코시다제 단백질을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 마이크로박테리움 에스터라로마티컴 유래의 신규한 β-글라이코시다제 단백질을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 서열번호 3 및 서열번호 4의 핵산서열을 갖는 프라이머로 이루어진 제1항의 β-글라이코시다제 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 상기 배양된 형질전환체로부터 β-글라이코시다제를 생산하는 단계; 및 상기 생산된 β-글라이코시다제를 회수하는 단계를 포함하는 β-글라이코시다제의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 상기 β-글라이코시다제 단백질, 상기 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 PPD 타입 진세노사이드와 접촉시키는 단계를 포함하는, PPD 타입 진세노사이드의 희귀 활성 진세노사이드로의 전환방법 및 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 β-글라이코시다제 단백질을 이용하면 PPD 타입 진세노사이드를 체내 흡수가 용이한 희귀 활성 진세노사이드로 효율적으로 생전환 시킬 수 있다. 따라서 천연에서는 미량만 생산되어 이용에 제한이 따르던 희귀 활성 진세노사이드를 대량생산 함으로써 산업적으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1 은 PPD(protopanaxadiol) 타입 진세노사이드의 종류를 나타낸 것이다.

도 2 는 본 발명의 β-글라이코시다제 단백질을 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3 은 본 발명의 β-글라이코시다제 단백질과 화합물 O의 시간에 따른 반응에 대한 TLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4 는 본 발명의 β-글라이코시다제 단백질과 화합물 O의 시간에 따른 반응에 대한 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5 는 본 발명의 β-글라이코시다제 단백질에 의해 화합물 O→화합물 Y→화합물 K로 전환되는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 6 은 본 발명의 β-글라이코시다제 단백질과 진세노사이드 F2의 반응에 대한 TLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7 은 pH (A), 온도 (B) 변화에 따른 본 발명의 β-글라이코시다제 단백질의 활성 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8 은 서열번호 2의 β-글라이코시다제 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pMAL-*bgp3*의 개열지도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β-글라이코시다제 단백질을 제공한다.

[0018] β-글라이코시다제는 이당류 이상의 사슬형 다당류의 당을 가수분해하는 효소로서, 본 발명의 β-글라이코시다제는 메이저 진세노사이드를 마이너 진세노사이드로 전환하는 활성을 갖는다.

[0019] 본 발명에 따른 β-글라이코시다제 단백질은 마이크로박테리움 에스터라로마티컴 (*Microbacterium esteraromaticum*) GS514 (KCTC 12040BP) 유래의 단백질로서, 본 발명자들에 의해 bgp3로 명명되었으며 약

79kDa의 분자량을 갖는다.

[0020] *또한 본 발명에 따른 β-글라이코시다제 단백질은 PPD 타입 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 대한 가수분해능을 갖는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 상기 서열번호 1의 β-글라이코시다제 단백질은 연속 또는 비연속적으로 PPD 타입 진세노사이드의 3번 탄소에 위치한 글루코스(glucose) 또는 20번 탄소에 위치한 아라비노피라노사이드(arabinopyranoside)를 순차적으로 가수분해 하는 것을 특징으로 한다. 이를 통해 PPD 타입 진세노사이드를 흡수가 용이한 마이너 진세노사이드로 전환시킬 수 있다.

[0021] 하기 실시예를 통해서 알 수 있는 바와 같이, 상기 서열번호 1의 β-글라이코시다제 단백질은 PPD 타입의 메이저 진세노사이드인 화합물 O (compound O)의 3번 탄소에 위치한 글루코스를 가수분해하여 마이너 진세노사이드인 화합물 Y(compound Y)로 전환시켰고, 시간이 지남에 따라 화합물 Y의 20번 탄소에 위치한 아라비노피라노사이드를 가수분해 함으로써 마이너 진세노사이드인 화합물 K(compound K)로 전환시켰다. 또한 상기 서열번호 1의 β-글라이코시다제 단백질은 PPD 타입의 마이너 진세노사이드 F2의 3번 탄소에 위치한 글루코스를 가수분해 하여 마이너 진세노사이드인 화합물 K로 전환시키는 활성도 가짐을 확인하였다.

[0022] 본 발명의 한 구체예에서, PPD 타입의 메이저 진세노사이드는 화합물 O일 수 있으며, 마이너 진세노사이드는 진세노사이드 F2, 화합물 Y 또는 화합물 K일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에 따른 β-글리코시다제 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상의 유사성을 가지는 아미노산 서열, 80% 이상의 유사성, 90% 이상의 유사성, 95% 이상의 유사성, 98% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 β-글리코시다제의 활성을 갖는 서열을 포함한다. 또한 이러한 유사성을 갖는 서열로서 실질적으로 β-글리코시다제와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0024] 또한 본 발명은 상기 서열번호 1의 β-글라이코시다제 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0025] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 유전자는 마이크로박테리움 에스터라로마티컴 GS514 (KCTC 12040BP) 유래일 수 있으며, 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 유전자일 수 있다. 그러나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 서열과 70% 이상의 유사성을 가지는 서열, 80% 이상의 유사성, 90% 이상의 유사성, 95% 이상의 유사성, 98% 이상의 유사성을 나타내는 서열로서 실질적으로 β-글라이코시다제의 활성을 갖는 서열을 포함한다. 또한 이러한 유사성을 갖는 서열로서 실질적으로 β-글라이코시다제와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 핵산서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 핵산서열을 갖는 유전자도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0026] 또한 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0027] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 재조합 벡터는 도 8에 기재된 개열지도를 갖는 pMAL-*bgp3* 벡터일 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어 "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 본 발명의 일 실시예에서는 포스미드 라이브러리(fosmid library)를 통하여 스크리닝하는 한편, β-글라이코시다제를 코딩할 수 있는 ORF를 동정하여 이를 pMAL-c5X 발현 벡터에 삽입함으로써 재조합 벡터를 제조하였다(도 8).

[0029] 본 발명의 재조합 벡터는 본 발명의 유전자를 적당한 벡터에 연결 (삽입)하여 획득할 수 있다. 본 발명의 유전자가 삽입될 벡터는 그것이 숙주 안에서 복제될 수 있는 한 특별히 제한되지는 않는다. 예를 들어, 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 사용될 수 있다. 플라스미드 DNA의 구체적인 예로는 pCDNA3.1+ (Invitrogen) 같은 상업적인 플라스미드를 포함한다. 본 발명에 사용된 플라스미드의 다른 예로는 대장균 유래 플라스미드 (pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드 (pUB110 및 pTP5) 및 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50)가 있다. 파아지 DNA의 구체적인 예로는 -파아지 (Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, gt10, gt11 및 ZAP)가 있다. 또한, 레트로바이러스 (retrovirus), 아데노바이러스 (adenovirus) 또는 백시니아 바이러스 (vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스, 배큘로바이러스 (baculovirus)와 같은 곤충 바이러스가 또한 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 유전자를 벡터로 삽입하기 위해, 정제된 DNA를 적당한 제한효소로 절단하여 적당한 벡터 DNA의 제한효소 이식부위 또는 클로닝 부위에 삽입하는 방법이 사용될 수 있다. 본 발명의 유전자는 벡터에 작동 가능하게 연결되어 있어야 한다. 이를 위해서, 본 발명의 벡터는 프로모터 및 본 발명의 유전자 이외에 인핸서(enhancer)와 같은 시스 요소 (cis element), 스플라이싱 시그널 (splicing signal), 폴리 A 추가 시그널 (poly A addition signal), 선택 마커 (selection marker), 라이보좀 결합 서열 (ribosome binding sequence, SD sequence) 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택 마커의 예로, 클로람페니콜 저항 유전자, 암피실린 저항 유전자, 디하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase), 네오마이신 저항 유전자 등이 사용될 수 있으나, 상기 예들에 의해 작동 가능하도록 연결되는 추가적 구성요소가 제한되는 것은 아니다.

[0031] 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0032] 본 발명에서 용어 "형질전환 (transformation)"이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다. 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다. 그러나 상기 예들에 국한되는 것은 아니며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명에서 숙주는 본 발명의 유전자를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지는 않으며, 예를 들어 대장균(*E.coli*) 같은 에스케리키아 (*Escherichia*) 세균; 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 같은 바실러스 (*Bacillus*) 세균; 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*) 같은 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 세균; 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 스키조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*) 같은 효모; 동물세포 및 곤충 세포가 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 대장균(*E.coli*) BL21에 상기 재조합 벡터를 형질전환 함으로써 β-글라이코시다제의 발현을 유도하였다.

[0034] 또한 본 발명은 서열번호 3 및 서열번호 4의 핵산서열을 갖는 프라이머로 이루어진 서열번호 1의 β-글라이코시다제 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0035] 마이크로박테리움 에스터라로마티컴 GS514 (KCTC 12040BP) 균주의 게놈 DNA(genomic DNA)를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행함으로써, 서열번호 1의 β-글라이코시다제 단백질을 제조할 수 있다.

[0036] 또한 본 발명은 (a) β-글라이코시다제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 배양하는 단계; (b) 상기 배양된 형질전환체로부터 β-글라이코시다제를 생산하는 단계; 및 (c) 상기 생산된 β-글라이코시다제를 회수하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 β-글라이코시다제의 제조방법을 제공한다.

[0037] 상기 단계 (a)에 있어서, 형질전환체의 배양은 다양한 배지에서 수행할 수 있으며, 예를 들어 페드-배치(fed-batch) 배양 또는 연속 배양 등을 수행할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 형질전환체의 생장을 위하여 배지 중에 포함될 수 있는 탄소원은 제조된 형질전환체의 종류에 따라 당업자의 판단에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 배양 시기 및 양을 조절하기 위해 적당한 배양 조건을 채택할 수 있다.

[0038] 상기 단계 (b)에 있어서, 적절한 숙주세포를 선택하여 배지 조건을 조성하면 형질전환체는 β-글라이코시다제를 생산하게 되며, 벡터의 구성 및 숙주세포의 특징에 따라 숙주세포의 세포질 내, 페리플라즈믹 스페이스(periplasmic space) 또는 세포 외로 분비될 수 있다.

[0039] 상기 단계 (c)에 있어서, 숙주 세포 내 또는 외에서 발현된 β-글라이코시다제는 통상의 방식으로 회수될 수 있다. 예를 들어 염석(예를 들어 황산암모늄 침전, 인산 나트륨 침전 등), 용매 침전(예를 들어, 아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전 등), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 컬럼 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용하여 회수할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 당업

계의 통상적인 방법에 의해 회수할 수 있다(Sambrook, J et al. Molecular Cloning 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001).

[0040] 또한 본 발명은 전술한 서열번호 1의 β-글라이코시다제 단백질, 서열번호 2의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 PPD 타입 진세노사이드와 접촉시키는 단계를 포함하는 PPD 타입 진세노사이드의 희귀 활성 진세노사이드로의 전환방법을 제공한다.

[0041] 본 발명에서 PPD 타입 진세노사이드란, 배경기술에서 언급한 바와 같이 프로토파낙사다이올(protopanaxadiol)계의 진세노사이드를 의미한다. 출발물질로 이용되는 PPD 타입 진세노사이드로는, 분리 및 정제된 형태의 진세노사이드를 이용할 수도 있고, 또는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물에 포함되어 있는 진세노사이드를 이용할 수도 있다. 즉, 진세노사이드를 포함하는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물을 직접 출발물질로 이용하여 본 발명의 방법을 실시할 수도 있다. 본 발명에서 이용되는 인삼으로는, 공지된 다양한 인삼을 사용할 수 있으며, 고려삼(Panax ginseng), 회기삼(P. quiquefolius), 전칠삼(P. notoginseng), 죽절삼(P. japonicus), 삼엽삼(P. trifolium), 히말라야삼(P. pseudoginseng) 및 베트남삼(P. vietnamensis)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0042] 본 발명에서 "희귀 활성 진세노사이드"는 메이저 진세노사이드에 비해 생체 흡수율이 향상된 마이너 진세노사이드를 의미하는 것으로, 진세노사이드 F2, Rg3, Rh1, Rh2, 화합물 Y, 화합물 K, 화합물 Mc, 화합물 Mc1 등을 포함한다.

[0043] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 희귀 활성 진세노사이드로의 전환방법은 PPD 타입 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 대한 가수분해능을 갖는 β-글라이코시다제 단백질에 의해 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0044] 구체적으로 상기 희귀 활성 진세노사이드로의 전환은 화합물 O의 화합물 Y로의 전환, 화합물 Y의 화합물 K로의 전환, 화합물 O의 화합물 K로의 전환, 진세노사이드 F2의 화합물 K로의 전환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0045] 더욱 구체적으로 상기 희귀 활성 진세노사이드로의 전환은 PPD 타입의 메이저 진세노사이드인 화합물 O의 3번 탄소에 위치한 글루코스가 가수분해 되어 마이너 진세노사이드인 화합물 Y로 전환되고, 시간이 지남에 따라 다시 화합물 Y의 20번 탄소에 위치한 아라비노피라노사이드가 가수분해 됨으로써 마이너 진세노사이드인 화합물 K로 전환되는 것일 수 있다. 또한 상기 희귀 활성 진세노사이드로의 전환은 PPD 타입의 마이너 진세노사이드 F2의 3번 탄소에 위치한 글루코스가 가수분해 되어 마이너 진세노사이드인 화합물 K로 전환되는 것일 수 있다. 이때 상기 3번 탄소에 위치한 글루코스의 가수분해가 먼저 일어난 후 20번 탄소에 위치한 아라비노피라노사이드의 가수분해가 순차적으로 일어나는 것일 수 있다.

[0046] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상기 전환방법은 pH 4.0 내지 8.0, pH 5.0 내지 8.0, pH 4.0 내지 7.0 또는 pH 5.0 내지 7.0의 조건에서 수행되는 것일 수 있으며, 온도 조건의 경우 20 내지 50℃, 20 내지 45℃, 20 내지 40℃ 또는 25 내지 40℃에서 수행되는 것일 수 있다.

[0047] 또한 본 발명은 전술한 서열번호 1의 β-글라이코시다제 단백질, 서열번호 2의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 포함하는 PPD 타입 진세노사이드의 희귀 활성 진세노사이드로의 전환용 조성물을 제공한다.

[0048] 상기 조성물의 희귀 활성 진세노사이드로의 전환 활성은 전술한 바와 같다.

[0049] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0050] **실시예 1: 활성균주 분리 및 선발**

[0051] **인삼밭 토양으로부터 β-글라이코시다제 활성균주 분리**

[0052] 인삼밭 토양은 멸균수를 이용하여 10^{-3}~10^{-7}으로 희석한 후 esculin 한천 평판배지에 spreading 하여 28℃에서 배양하였다(Atlas, 1993). 검게 발색되는 단일 콜로니들은 R2A 한천 평판배지에서 같은 조건에서 순수배양 될 때까지 계대 배양하여 β-글라이코시다제 활성균주를 분리하였다. Esculin 한천 평판배지는 casein의 pancreatic digest (casamino acids) 13 g, NaCl 5 g, yeast extract 5 g, heart muscle 2 g, esculin 1 g, ferric citrate 0.5 g 및 agar 15 g을 1 L 증류수에 용해하여 만들었다.

[0053] **β-글라이코시다제 활성균주로부터 진세노사이드 전환 균주 선발 및 계통분**류

[0054] β-글라이코시다제 활성을 나타낸 토양미생물들을 nutrient broth 배지에서 현탁 배양 후 배양액 200 ㎕와 0.2 ㎛ 필터로 멸균한 1 mM 진세노사이드 Rb_1 수용액 200 ㎕를 혼합하여 진탕배양기에서 30℃로 48시간 반응시켰다. 대부분의 균주들은 진세노사이드 Rb_1을 전환시키지 못하였고 약 20%의 균주들만 Rb_1을 각각 Rd, F_2, 화합물 K, 진세노사이드 XVII로 전환시켰다. 반응혼합물을 200 ㎕ 수포화 부탄올로 추출하고 40℃에서 감압농축 한 후 HPLC 용 MeOH에 용해시켜 TLC와 HPLC 분석을 통하여 Rg_3 생산 균주를 선발하였다.

[0055] 선발된 진세노사이드 Rg_3 생산 균주를 페트리 디쉬에 도말한 후 자란 단일 콜로니를 소량 채취하여 PCR 튜브에 옮기고, 여기에 농도가 10 pmol/㎕인 9F (5'-GAGT TTGATCCTGGCTCAG-3') 프라이머와 1512R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT T-3') 프라이머를 각각 2 ㎕, 10 mM dNTP 0.4 ㎕, 10×*Taq* 버퍼 2 ㎕, 5 U *Taq* DNA 중합효소 0.2 ㎕ 및 DW 13.4 ㎕를 첨가하여 총 20 ㎕로 맞추었다. 혼합물은 94℃에서 5분 pre-denaturation한 후, denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 60℃에서 1분, extension은 72℃에서 1.5분 조건으로 33 사이클을 반응시키고 72℃에서 final extension을 7분 수행하여 4℃에서 보관하였다.

[0056] PCR 산물의 확인은 1% 아가로스 겔 (0.2 g 아가로스 + 20 ml TAE 버퍼) 에서 PCR 마커와 함께 100 V로 35분 전기영동 하여 transilluminator (SE-20E DNA Image Visualizer™, SeoLin Scientific Corp. Korea)를 이용하여 밴드를 확인하였고 증폭된 16S rRNA는 ABI 3700을 이용하여 서열 분석을 수행하였다. 진세노사이드 Rg_3 생산 균주의 16S rRNA 서열은 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)에서 BLAST를 이용하여 등록된 균주들과의 상동성 검색을 실시하였다. 균주들의 16S rRNA 염기서열은 ClustalX program (Thompson *et al*. 1997)을 이용하여 일정하게 정렬한 다음 BioEdit program을 이용하여 gap을 삭제하고 편집하였다. 균주들의 유연관계 분석은 Kimura two-parameter model (Kimura, 1983)과, MEGA 3.1 Program (Kumar *et al*. 2004)의 neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) 로 실시하였다.

[0057] 그 결과 진세노사이드 Rg_3 생산 균주는 마이크로박테리움 에스터라로마티컴 (*Microbacterium esteraromaticum*)과 가장 높은 상동성을 나타내었으며, 한국생명공학연구원 미생물자원센터(KCTC)에 2011년 8월 18일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 12040BP번을 부여받았다. 액티노박테리아 피름 (*Actinobacteria phylum*) 속에 속하는 GS514 균주는 진세노사이드 전환활성을 나타낸 균주들 중의 하나로 진세노사이드 Rb_1을 주로 진세노사이드 Rd로 전환시키는 동시에 스탠다드 진세노사이드 Rg_3와 같은 R_f 값을 가지는 위치에서 약한 사포닌 밴드를 관찰할 수 있었다.

[0058] **실시예 2. 고효율 β-글라이코시다제를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 형질**전환 미생물의 제작

[0059] **포스미드 라이브러리 (Fosmid library)**

[0060] 분리 균주 마이크로박테리움 에스터라로마티컴 GS514의 게놈 DNA로부터 β-글라이코시다제 유전자를 찾기 위해 게놈 DNA를 200ul 파이펫으로 무작위로 자른 다음 pCC1FOS 벡터에 클로닝 하여 *E. coli* EPI300-T1R에 형질전환시켰다. 포스미드 라이브러리를 포함한 형질전환체를 12.5 mg/ml 클로람페니콜(chloramphenicol) 및 27 mg/ml X-Glu LB 아가 플레이트에 picking한 후 16 시간 배양하였다. 파란색을 띠는 콜로니를 선별하여 진세노사이드 Rb1과 반응시켜 TLC로 분석하였다.

[0061] **재조합 단백질 *bgp3*의 클로닝, 발현 및 분리**

[0062] 진세노사이드 Rb1을 전환시키는 포스미드 라이브러리로 찾은 β-글라이코시다제 유전자에 Nde1 제한효소 인식부

위를 가진 프라이머 *bgp3*F (서열번호 3: 5'-CCA TAT GGA GCC CCA GAT GAC CAA -3')와 EcoRV 제한효소 인식부위를 가진 프라이머 *bgp3*R (서열번호 4: 5'-CCG ATA TCT CAG GCG AAG ACG-3')를 이용하여 PCR 산물을 얻었다. 이를 Nde1과 EcoRV로 자른 후 pMAL-c5X 벡터에 클로닝하여 pMAL-*bgp3*을 얻은 후 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환시켰다. pMAL-*bgp3*이 형질전환된 *E. coli* BL21을 2011년 10월 31일자로 한국생명공학연구원 미생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 기탁번호 KCTC 12044BP를 부여받았다.

[0063] pMAL-*bgp2*를 포함하고 있는 BL21 (DE3)을 500ml 앰피실린 LB 배지에 2시간 배양 후 0.5 mM IPTG를 첨가하여 9시간 배양하였다. 배양액을 4℃에서 5,000 × g로 30분 원심분리 하여 상층액을 제거한 후 세포를 초음파처리(sonication) 하여 25,000 × g로 30분 원심분리 후 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 아밀로스 컬럼(amylose column)을 이용하여 pMAL-*bgp3* 효소를 정제한 후 프로테아제 인자(protease factor) Xa로 자른 후 다시 아밀로스 컬럼을 이용하여 bgp3 효소를 정제하여 사포닌 전환실험에 사용하였다.

[0064] 아밀로스 컬럼을 이용하여 최종적으로 정제된 bgp3 효소(β-글라이코시다제)를 SDS-PAGE 분석하였다. Bgp3 효소는 SDS-PAGE 상에서 단일 밴드를 보여주었고 분자량은 약 79kDa 이며 글리코시다제 패밀리 (glycosidase family) 1에 속하는 효소였다(도 2).

[0065] **실시예 3. β-글라이코시다제(bgp3)의 활성 분석**

[0066] 정제된 bgp3 효소를 각각 화합물 O (compound O), 화합물 Y (compound Y) 및 진세노사이드 F2와 반응시켰다. 반응과정 중 시간 별로 반응 혼합물을 취하여 동량의 수포화 부탄올로 추출하여 TLC, HPLC로 분석하였다.

[0067] **TLC분석**

[0068] 반응산물은 TLC 플레이트에 0.6 cm 간격으로 점적하고 $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (65:35:10, v/v, 하층) 혼합용매로 5.5 cm 전개한 후 10% H_2SO_4를 분무하여 110℃에서 가열하는 방법으로 발색시켰다.

[0069] **HPLC분석**

[0070] HPLC 분석 컬럼은 C18 (250×4.6 mm, ID 5 ㎛)을 사용하였고, 이동상은 아세토니트릴 (용매 A)과 증류수(용매 B)를 사용하였으며, 시료 주입양은 20 ㎕, 유속은 1.6 ml/min, UV 검출기(UV detector)로 203 nm에서 측정하였다.

[0071] **진세노사이드의 전환**

[0072] Bgp3를 화합물 O와 시간 별로 반응시킨 후 TLC로 확인하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 진세노사이드 화합물 O는 반응 0.5 시간에 대부분 화합물 Y(compound Y)로 전환되었고, 반응 6 시간에는 화합물 O와 중간산물인 화합물 Y가 대부분 화합물 K(compound K)로 전환되었다. HPLC 분석 결과도 TLC와 유사한 경향을 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 반응 0.5 시간에 화합물 O 피크가 완전히 사라졌고 화합물 Y와 화합물 K 피크가 생성되었으며, 6 시간 이후에는 오직 화합물 K 피크만 관찰할 수 있었다. 즉, bgp3는 진세노사이드 화합물 O를 화합물 O→화합물 Y→화합물 K 순으로 전환시킴을 알 수 있다(도 5).

[0073] Bgp3에 의한 PPD 타입 진세노사이드의 기질 특이성을 관찰하기 위하여 bgp3를 진세노사이드 F2 및 화합물 Y와 반응시켜 보았다. 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, bgp3는 진세노사이드 F2의 C-3 에 위치한 하나의 글루코스만을 가수분해 하여 화합물 K로 전환시켰고, 화합물 Y의 C-20에 위치한 아라비노피라노사이드(arabinopyranoside)를 가수분해하여 화합물 K로 전환시킨 것을 확인할 수 있었다.

[0074] 결과적으로 bgp3는 선택적으로 PPD 타입 진세노사이드의 C-3에 위치한 하나의 글루코스를 먼저 가수분해하고, 다음에 C-20에 위치한 아라비노피라노사이드를 가수분해한다는 것을 확인할 수 있다.

[0075] **실시예 4. pH 및 온도에 따른 β-글라이코시다제(bgp3)의 활성 분석**

[0076] Bgp3 효소의 활성 최적 pH 조건을 찾기 위하여 bgp3를 37℃에서 pH (2.0-12.0)별로 pNPG와 반응시켰다. Bgp3는 pH 4.0-8.0 사이에서 높은 활성을 나타내었다(도 7A).

[0077] Bgp3 효소의 활성 최적 온도 조건을 찾기 위하여 bgp3를 pH 6.0으로 조절한 후 각각 20℃-80℃사이에서 pNPG와

반응시켰다. 그 결과, bgp3는 20℃-50℃ 사이에서 높은 활성을 나타내었다(도 7B).

수탁번호

[0078]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12040BP

수탁일자 : 20111031

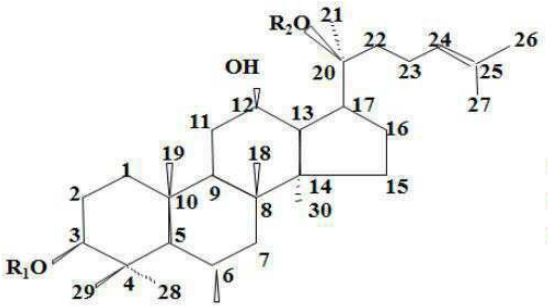
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12044BP

수탁일자 : 20111031

도면

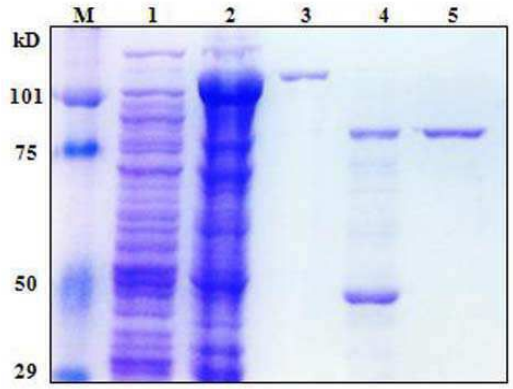
도면1



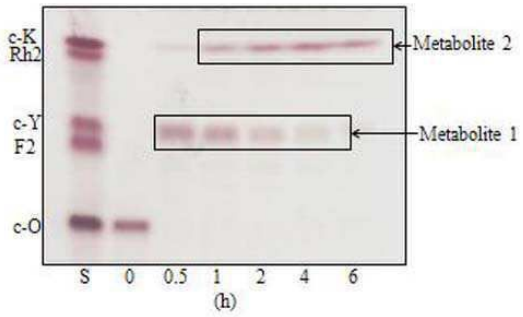
- D-glucose
- L-arabinopyranoside
- L-arabinofuranoside

Ginsenoside (PPD)	R_1(C-3)	R_2 (C-20)
Rb1	Glc(2→1)Glc	Glc(6→1)Glc
Rb2	Glc(2→1)Glc	Glc(6→1)arap
Rc	Glc(2→1)Glc	Glc(6→1)araf
Rd	Glc(2→1)Glc	Glc
c-O	Glc	Glc(6→1)arap
c-Y	H	Glc(6→1)arap
c-Mc1	Glc	Glc(6→1)araf
c-Mc	H	Glc(6→1)araf
F2	Glc	Glc
Rg3	Glc(2→1)Glc	H
Rh2	Glc	H
c-K	H	Glc
PPD	H	H

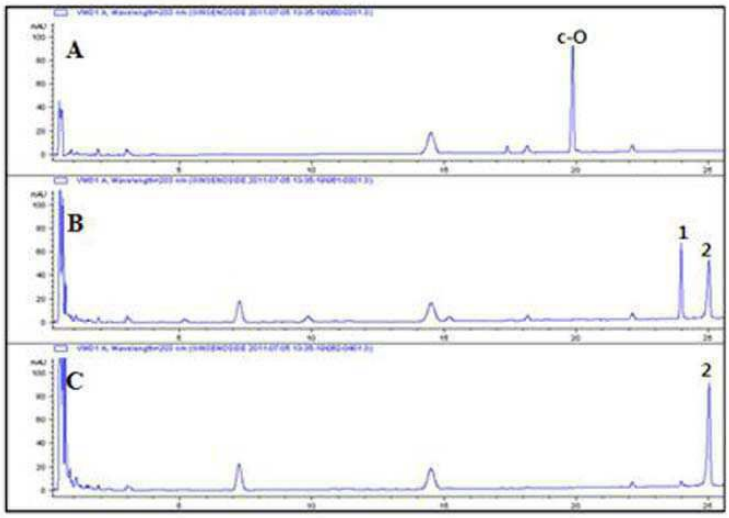
도면2


M
1
2
3
4
5
kD
101
75
50
29

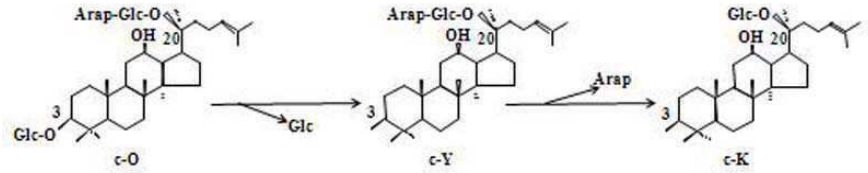
도면3


c-K
Rh2
c-Y
F2
c-O
Metabolite 2
Metabolite 1
S
0
0.5
1
2
4
6
(h)

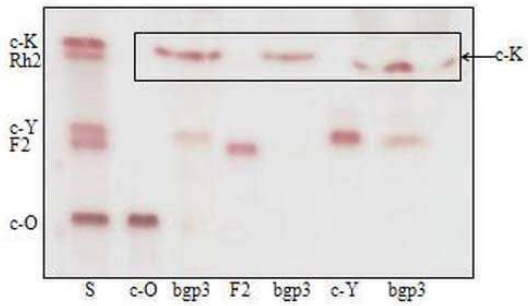
도면4


A
c-O
B
1
2
C
2

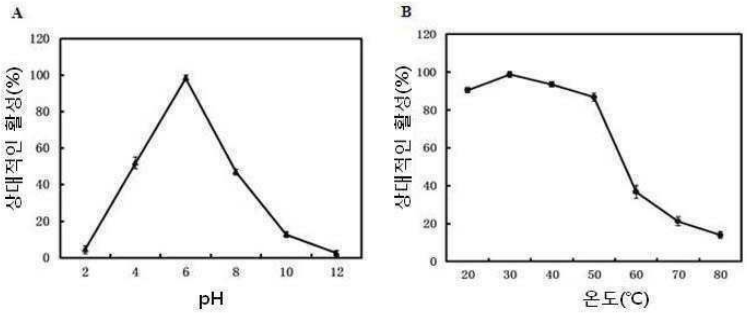
도면5



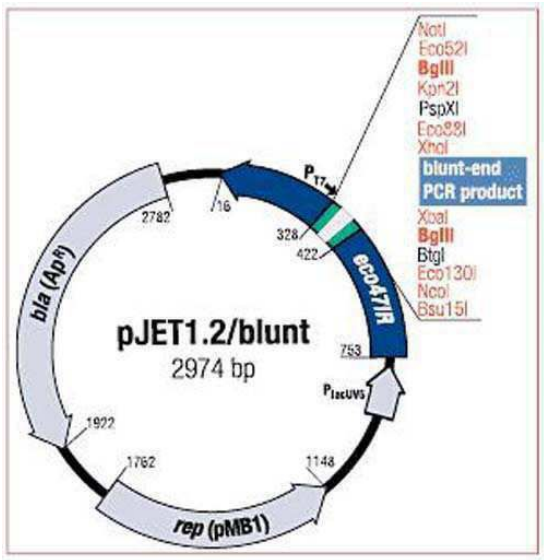
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

<120> Method for preparing beta-Glycosidase Protein and converting ginsenoside

<130> P130139

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 756

<212> PRT

<213> Microbacterium esteraromaticum

<400> 1

Met Glu Pro Gln Met Thr Asn Pro Ile Glu Gly Ala Leu Asp Ala Ala
1 5 10 15

Ile Glu Arg Leu Asn Leu Thr Gln Leu Ala Ala Leu Gly Gly Gly Ala
20 25 30

Ser Phe Trp Glu Ser Lys Thr Ala Pro Gly Val Pro Ser Phe Ser Met
35 40 45

Ser Asp Gly Pro His Gly Leu Arg Lys Gln Glu Gly Asp Ala Ala Asp
50 55 60

His Leu Gly Leu Gly Ala Ser Val Pro Ala Thr Cys Phe Pro Pro Ala
65 70 75 80

Val Ser Met Gly Gln Ser Trp Asp Pro Ala Leu Ala Arg Arg Val Ala
85 90 95

Ala Ala Leu Ala Glu Glu Ala His Ala Gln Gly Val Asn Val Leu Leu
100 105 110

Gly Pro Gly Ile Asn Ile Lys Arg Asp Pro Arg Cys Gly Arg Asn Phe
115 120 125

Glu Tyr Leu Ser Glu Asp Pro Phe Leu Thr Gly Leu Leu Ala Thr Ser
130 135 140

Trp Val Asn Gly Leu Gln Ser Gly Gly Val Gly Ala Ser Leu Lys His
145 150 155 160

Phe Ala Ala Asn Asn Ala Glu Phe Asp Arg Met Arg Leu Ser Ser Asp

165 170 175

Val Asp Glu Arg Pro Leu His Glu Ile Tyr Leu Arg Ala Phe Glu Thr

180 185 190

Val Ile Arg Asp Ala Gln Pro Trp Thr Val Met Cys Ser Tyr Asn Arg

195 200 205

Ile Asn Gly Val Leu Ala Ser Gln Ser Arg Trp Leu Leu Thr Asp Val

210 215 220

Leu Arg Asp Gln Trp Gly Phe Ala Gly Ala Val Val Ser Asp Trp Gly

225 230 235 240

Ala Val Ala Asp Arg Val Ala Ala Val Asp Ala Gly Leu Asp Leu Gln

245 250 255

Met Pro Gly Asp Thr Ser Ala Phe Asp Ala Ala Val Val Ala Ala Val

260 265 270

Glu Ala Gly Thr Leu Pro Arg Ala Ala Val Thr Arg Ala Ala Arg Ala

275 280 285

Val Ala Arg Thr Ala Leu Leu Ala Gln Arg Ser Arg Arg Glu Val Thr

290 295 300

Val Asp Tyr Asp Ala His His Ala Leu Ala Arg Glu Thr Ala Gly Arg

305 310 315 320

Ser Ile Val Leu Leu Lys Asn Glu Ser Ala Leu Leu Pro Leu Asp Pro

325 330 335

Thr Ala Arg Ile Ala Val Ile Gly Ser Phe Ala Thr Glu Pro Arg Tyr

340 345 350

Gln Gly Gly Gly Ser Ser His Val Arg Pro Thr Arg Leu Asp Ile Pro

355 360 365

Leu Asp Gln Ile Arg Ala Ala Ala Pro Asn Ala His Val Thr His Ala

370 375 380

Ala Gly Phe Thr Val Asn Gly Thr Gly Asn Gln Asp Ala Leu His Ala

385 390 395 400

Asp Ala Val Glu Ile Ala Asp Ala Ala Asp Val Ala Val Leu Phe Leu

405 410 415

Gly Leu Ala Glu His Gln Glu Ser Glu Gly Phe Asp Arg Glu Asp Ile

420 425 430

Glu Leu Pro Ala Glu Gln Leu Ala Leu Leu Glu Ala Ile Ala Ala Val

435 440 445

Gln Pro His Thr Val Val Val Leu Ala Ser Gly Gly Val Leu Arg Leu

450 455 460

Ala Pro Val Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ile Leu Asn Gly Gly Leu Leu

465 470 475 480

Gly Gln Ala Ser Gly Ser Ala Ile Ala Asp Val Leu Phe Gly Lys Val

485 490 495

Asn Pro Ser Gly Arg Leu Ala Glu Thr Val Pro Leu Arg Leu Gln Asp

500 505 510

Ala Pro Ser Tyr Leu His Phe Pro Gly Glu His Ser Arg Val Arg Tyr

515 520 525

Gly Glu Gly Val Phe Val Gly Tyr Arg Gly Tyr Asp Ala Arg Asp Gln

530 535 540

Asp Val Leu Tyr Pro Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr Thr Phe Ser

545 550 555 560

Tyr Glu His Leu Asp Leu His Thr Thr Glu Asp Gly Leu Leu Ala Asp

565 570 575

Val Gln Ile Arg Asn Thr Gly Ser Val Ala Gly Arg Glu Ile Val Gln

580 585 590

Leu Tyr Ala Ala Lys Pro Asp Ser Ser Val Ser Arg Ala Pro Gln Glu

595 600 605

Leu Val Gly Val Gly Ser Ile Asp Leu Lys Pro Gly Glu Thr Gly Thr

610 615 620

Val Ser Ile Ala Ile Ala Arg Arg Asp Leu Ala Tyr Trp Asp Asp Gln

625 630 635 640

Leu Gly Arg Trp Val Val Glu Asp Gly Ser Tyr Trp Ile Thr Ala Ala

645 650 655

Lys Ser Ser Arg Asn Ala Gln Leu Ser Gln Glu Thr Thr Val Ala Gly

660 665 670

Asp Asp Val Arg Ser Pro Phe Thr Ala Glu Ser Thr Ile Gly Glu Val
675 680 685
Met Ala His Pro Ala Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Ala Phe Gly Pro
690 695 700
Leu Met Pro Gln Glu Gly Ala Gly Ala Glu Leu Gly Met Asp Val Met
705 710 715 720
Lys Met Met Ala Ser Met Pro Leu Gly Arg Val Ile Gly Gly Val Asp
725 730 735
Glu Gln Ser Ala His His Leu Gln Ala Leu Leu Gly Gly Leu Asn Ala

740 745 750
Ala Val Phe Ala
755

<210> 2
<211> 2271
<212> DNA
<213> Microbacterium esteraromaticum
<400> 2

atggagcccc agatgaccaa cccgatcgaa ggcgccctcg acgccgcgat cgaacggctg 60
aacctgacac agctcgccgc actaggcggc ggcgcgtcct tctgggaatc gaaaaccgcc 120
cccggcgtgc cgagcttttc gatgtcggac ggcccccacg gcctgcgcaa gcaggagggc 180
gatgcagccg accacctcgg cctcggcgcc agcgttcccg ccacatgctt ccccccggcg 240
gtgagcatgg gacaaagctg ggatcccgca ctagcgcgcc gcgtcgctgc agccctcgcc 300

gaggaggcgc acgctcaggg cgtgaacgtg ctgctcgggc cgggcatcaa catcaaacgc 360
gatccccgct gcggaaggaa cttcgaatac ctcagcgaag acccccttcct caccgggctg 420
ctcgcgacgt cctgggtgaa cggcctgcag tccgggggag tgggcgcatc cctgaaacac 480
ttcgctgcca acaacgccga attcgatcgg atgcgattga gctctgacgt tgacgagcgg 540
ccgctgcacg agatctatct ccgcgcattc gagacggtca tccgcgacgc gcaaccgtgg 600
acggtgatgt gctcctacaa ccgcatcaac ggggtactcg cgtcgcagag ccgatggctg 660
ttgaccgacg tcctccgcga ccagtgggga ttcgcgggcg ccgtggtcag cgactgggga 720

gcggtggcag accgagtcgc agcggtcgac gccggccttg acctgcagat gcccggggac 780

accagcgcct tcgacgcggc ggtcgtcgca gcagtggaag cgggcaccct cccgcgagcg 840

gccgtcacgc gtgcagcacg tgccgtcgca cgaacagccc tgctcgctca gcggtctcgc 900

cgcgaggtga ccgtggacta cgacgcacac cacgcgttgg cgagagagac tgcggggcgc 960

agcatcgttc tcctcaagaa cgaatctgcg ctgctccccc ttgaccccac tgcacgcatt 1020

gcggtgatcg ggtcattcgc tacggagcct cgctatcagg gcggcggcag ctcccacgtc 1080

cgacccaccc gcctggacat ccccctcgac cagatccgcg ctgctgcccc gaacgcgcac 1140

gtgacccatg ccgccggatt caccgtcaac gggaccggca accaggatgc gctgcacgca 1200

gacgccgtcg agattgctga cgcggcggat gttgccgtcc tcttcctcgg cctggcggag 1260

catcaagaat cggaaggctt tgaccgagaa gacatcgagc ttccggcaga gcagctcgcg 1320

ctcctcgagg cgatcgctgc cgtacagcct cacaccgtcg tcgttctcgc ctccggcggt 1380

gtgctgcgcc tggcacctgt cgccgccacc gcgacagcca tcctgaacgg cgggctgctc 1440

ggacaagcca gcggttccgc gatcgcggat gtcctgttcg gcaaggtcaa cccgtccggg 1500

cgactcgccg aaaccgtgcc gctccggctg caggacgccc ccagctacct acatttcccg 1560

ggcgagcact cacgcgtgcg ctacggagaa ggcgtgttcg tcggataccg cggatacgac 1620

gcccgcgatc aagacgtact ttacccgttc gggcacgggc tctcctacac gaccttctcc 1680

tacgagcacc tcgacctgca caccacagag gacgggttgc tggccgatgt gcagatccgc 1740

aacacgggat cggtcgcggg ccgggaaatc gttcagttgt atgcagcgaa gccggattca 1800

tctgttagcc gggcacccca ggaactggtt ggggtcggct ccatcgacct gaagcctggt 1860

gagacaggga ccgtctctat cgccatcgcg cgccgggacc ttgcctactg ggacgaccag 1920

ctcggccggt gggtcgtcga agacggcagc tactggatca ccgcagccaa atccagtcga 1980

aacgcgcagc tcagccagga gacgactgtc gcaggcgatg acgtgcggtc gccattcacc 2040

gccgagtcca ccatcggtga agtcatggcg caccccgccg cggcagccgt ggcggtggcg 2100

gcgttcggac cgctgatgcc gcaagaagga gccggcgccg aactgggtat ggacgtcatg 2160

aagatgatgg cctccatgcc gctggggcgc gtcatcggcg gtgtagacga gcaatcagcc 2220

catcacctgc aggcgcttct cggcggcctc aacgccgccg tcttcgcctg a 2271

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bgp3F primer

<400> 3

ccatatggag ccccagatga ccaa 24

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bgp3R primer

<400> 4

ccgatatctc aggcgaagac g 21