



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0045175
(43) 공개일자 2015년04월28일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 14/435</i> (2006.01) <i>C07K 16/18</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/12</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-0124532</p> <p>(22) 출원일자 2013년10월18일
 심사청구일자 2013년10월18일</p> | <p>(71) 출원인
 경상대학교산학협력단
 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)</p> <p>(72) 발명자
 나병국
 경남 진주시 진주대로815번길 11, 114동 1402호
 (주약동, 주약현대아파트)</p> <p>(74) 대리인
 이원희</p> |
|---|---|

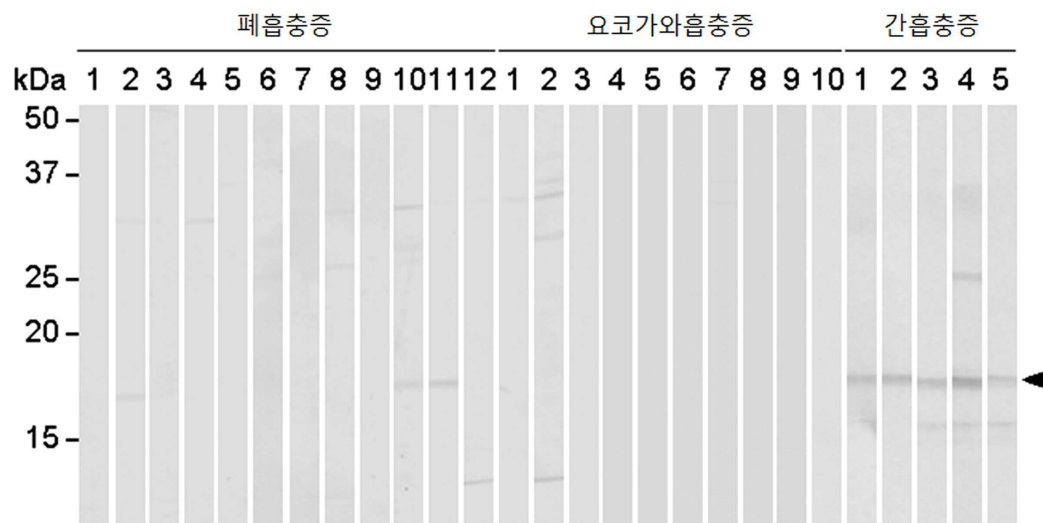
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **간흡충 파라마이오신 항원결정기 및 이를 이용한 간흡충증 혈청학적 진단 방법**

(57) 요약

본 발명은 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 파라마이오신(paramyosin)의 항원결정기(epitope) 재조합 단백질을 포함하는 간흡충증 진단용 키트 및 혈청 진단 방법에 관한 것으로, 구체적으로 간흡충 파라마이오신 유전자 단편의 재조합 단백질을 제작하여 항원성 및 비특이적 결합 분석을 수행한 결과, 상기 간흡충 파라마이오신의 중간 부위 중 375번에서 525번 아미노산을 포함한 부위(CsPmyC-2)가 인간 면역글로블린에 대한 비특이적 결합을 하지 않으면서 간흡충 환자의 혈청에 대해 항원성을 나타내는 주요한 항원결정기(epitope)임을 확인함으로써, 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질을 간흡충증의 혈청학적 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도7



명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 파라마이오신(paramyosin) 항원결정기(epitope).

청구항 2

제 1항의 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 재조합 단백질은

- 1) 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 숙주세포에 형질전환하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 재조합 단백질은 인간의 면역글로블린(Immunoglobulin G, IgG) 항체와 비특이적으로 결합하지 않는 것을 특징으로 하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 재조합 단백질은 간흡충증 환자 혈청에 대하여 특이적 항원성을 갖는 것을 특징으로 하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질.

청구항 6

제 2항의 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질을 포함하는 간흡충증 진단용 키트.

청구항 7

서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 대해 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 또는 다클론 항체인 것을 특징으로 하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 대해 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 항체는 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 대해 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 10

제 7항의 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 간흡충증 진단 키트.

청구항 11

- 1) 피검체로부터 분리된 시료를 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질과 접촉시키는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 시료 중 상기 재조합 단백질과 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 간흡충증 혈청 진단 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 단계 1)의 시료는 혈청인 것을 특징으로 하는 간흡충증 혈청 진단 방법.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 단계 1)의 항원결정기는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 간흡충증 혈청 진단 방법.

청구항 14

제 11항에 있어서, 상기 단계 2)의 검출은 면역블롯(immunoblot) 또는 ELISA를 이용하는 것을 특징으로 하는 간흡충증 진단 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 파라마이오신(paramyosin) 항원결정기(eptiope) 재조합 단백질을 포함하는 간흡충증 진단용 키트 및 혈청 진단 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 특이적으로 결합하는 항체 및 이를 포함하는 진단용 키트 및 혈청 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

간흡충(Chinese liver fluke, *Clonorchis sinensis*)은 인체감염 시 담관에 기생하여 간흡충증(clonorchiasis)을 일으키며, 간흡충증은 우리나라를 비롯하여 중국, 베트남, 태국 등에 유행하는 만성 기생충질환이다. 주로 간흡충의 피낭유충이 감염된 민물고기를 날로 먹거나 덜 익혀 먹었을 경우 사람에게 감염되며, 우리나라 전 국민의 약 2-3%(약 100만 명)가 간흡충에 감염되어 있고, 특히, 5대강 유역에 거주하는 주민들에서 감염률이 높은 것으로 알려져 우리나라에서 매우 중요한 기생충이다. 간흡충은 사람의 간의 담관 그리고 담낭 속에 살면서 담관이나 담낭을 자극하여 염증을 일으켜 담관염이나 담낭염을 유발한다. 또한 많은 수의 간흡충이 간 내 담관에

감염될 경우에는 담도를 막아 담도폐쇄를 일으키기도 한다. 간흡충이 이렇게 담도를 막으면 담즙이 정체되고, 이 상태에서 죽은 충체나 충란이 핵이 되어 담석이 잘 생긴다고도 한다. 가장 중요한 것은 이러한 담도폐쇄, 만성적인 염증이 계속되면서 담관암이 생길 수 있다는 것이다.

[0003]

간흡충 감염은 그 자체의 치료는 큰 문제가 되지 않으나, 감염상태가 오래 방치되었을 경우 그에 따른 합병증이 유발된다. 담관암, 담관내 결석, 화농성 담관염 등의 다양한 합병증은 간흡충 감염 자체에 비하여 대단히 심각한 질환이므로 이러한 중증 질환으로 발전하기 전에 초기에 감염 여부를 진단하고 치료의 시기를 앞당기는 것이 매우 중요하다.

[0004]

간흡충 감염은 대변검사법으로 현미경으로 충란을 직접 확인하여 진단한다. 대변검사법은 감염여부를 가장 정확하게 판별할 수 있을 뿐 아니라, 대변 내 충란 수를 측정하여 감염 강도를 추정할 수 있는 장점이 있지만, 대단위 기생충 감염을 조사하는 경우에는 대변수거의 어려움이 있고, 충체 부하가 낮은 간흡충 감염자의 경우에는 충란 검출율이 낮아져서 현미경대변검사를 반복해야 하기 때문에 확진까지 소요되는 시간이 길다. 보완적인 진단법으로 초음파검사와 역행성 내시경담도조영술 등의 영상진단법과 면역혈청학적 검사로 피부반응검사가 간흡충 감염의 진단에 활용되고 있다. 대단위 간흡충증관리사업에 양성감염자 선별검사로 피내반응 검사가 사용되고 있다. 간흡충 피내반응 검사는 민감도는 높지만 특이도가 낮고, 현증과 과거 감염을 구분하지 못해 실효성이 떨어진다. 영상학적 진단방법인 초음파검사, 전산화 단층 촬영(CT), 자기공명영상(MRI), 내시경적 역행성 담관조영술은 간 내 담관이 불규칙적으로 확장된 소견을 확인하여 간흡충증을 의심해 볼 수 있고, 또 이차적인 합병증 즉 담낭, 담관, 간의 염증, 담관결석, 담관암 등을 알아볼 수 있지만, 이들 방법으로는 확진이 어렵고 고가의 진단장비와 전문가가 필요하여 진단법으로 활용하기에 제한적인 면이 있다.

[0005]

1950년대 이후 기생충 특이항체를 검출하는 혈청학적 검사법으로 보체결합반응법, 면역형광법, 면역전기영동법, 면역천천확산법, 효소면역검사법(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) 등이 개발되었다. 혈청학적 검사법은 충체가 어려서 아직 충란을 산란하지 않거나, 충체가 노쇠하여 충란을 생성하지 않은 경우에도 혈청에서 항체를 검출하여 간흡충 감염을 진단할 수 있는 진단법이다. 이 가운데 감염자의 혈액에서 간흡충 항원단백질과 반응하는 항체를 검사하는 효소면역검사법 같은 면역혈청학적 검사법이 간흡충증 진단에 유용하게 이용되고 있다. 면역혈청학적 검사 키트를 개발하기 위해서는 민감도와 특이도가 높은 간흡충 특이항원을 확보하는 것이 중요하다. 간흡충은 담관에서 기생하면서 비침습적인 생활환(life cycle)을 갖고 있기 때문에 혈액 내에 특이 항체생성 효율이 낮은 편이다. 따라서 항원성이 매우 강력한 간흡충 항원 단백질 개발이 지속적으로 요구되어 왔다.

[0006]

파라마이오신(paramyosin)은 수많은 무척추동물에서 발견되는 α -나선(α -helical), 로드형(rod-shaped) 필라멘트성(filamentous) 단백질이다. 이 단백질은 주로 연체동물(mollusca)에서 큰 필라멘트(filament) 형성의 중요한 구성요소로서 작용하고 수축 활성화에 중요한 역할을 하는 근육에 위치한다. 또한, 파라마이오신은 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*), 일본주혈흡충(*Schistosoma japonicum*), 간질(*Fasciola hepatica*), 폐흡충(*Paragonimus westermani*), 유구조충(*Taenia solium*), 단방조충(*Echinococcus granulosus*) 및 회선사상충(*Onchocerca volvulus*)을 포함한 다양한 연충(helminth) 기생충에서 확인된다. 연충 기생충에서 유래한 파라마이오신은 근육층의 생리학적 수축을 조절하는 구조적 단백질로서의 역할을 할 뿐만 아니라, 보체(complement) C1 기능을 저해하여 보체 캐스케이드(cascade)의 경로를 억제함으로써 숙주의 면역 시스템을 조절하는 면역조절 분자로서의 역할을 한다고 보고되고 있다. 또한, 파라마이오신은 Fc 수용체(receptor)로서 작용함으로써 기생충의 면역 방어 기작 및 인간의 알러지(allergy) 반응에도 관여한다고 보고되고 있으나, 아직까지 특이 진단항원으로서 파라마이오신에 대해 많이 연구되어 있지 않다.

[0007]

이에 본 발명자들은 간흡충의 신속하고 편리한 혈청학적 진단을 위한 특이 항원을 찾기 위하여 간흡충 파라마이오신 유전자 단편의 재조합 단백질을 제작하고 항원성 및 비특이적 결합 분석을 수행한 결과, 상기 간흡충 파라마이오신의 중간 부위 중 375번에서 525번 아미노산을 포함한 부위가 인간 면역글로블린에 대한 비특이적 결합을 하지 않으면서 간흡충 환자의 혈청에 대해 항원성을 나타내는 주요한 항원결정기(epitope)임을 확인하였다. 따라서, 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질이 간흡충증의 혈청학적 진단에 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 파라마이오신(paramyosin) 항원결정기(epitope)를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질을 제공하는 것이다.
- [0010] 아울러, 본 발명의 목적은 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 파라마이오신(paramyosin) 항원결정기(epitope)를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 본 발명의 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질을 포함하는 간흡충증 진단용 키트를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 본 발명의 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 유효 성분으로 함유하는 간흡충증 진단용 키트를 제공한다.
- [0016] 아울러, 본 발명은
- [0017] 1) 피검체로부터 분리된 시료를 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질과 접촉시키는 단계;
- [0018] 2) 상기 단계 1)의 시료 중 상기 재조합 단백질과 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 간흡충증 혈청 진단 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 파라마이오신(paramyosin)의 항원결정기(epitope) 재조합 단백질을 포함하는 간흡충증 진단용 키트 및 혈청 진단 방법에 관한 것으로, 간흡충 파라마이오신 유전자 단편의 재조합 단백질을 제작하여 항원성 및 비특이적 결합 분석을 수행한 결과, 상기 간흡충 파라마이오신의 중간 부위 중 375 번에서 525번 아미노산을 포함한 부위가 인간 면역글로블린에 대한 비특이적 결합을 하지 않으면서 간흡충증 환자의 혈청에 대해 항원성을 나타내는 주요한 항원결정기(epitope)임을 확인함으로써, 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질은 간흡충증의 혈청학적 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 파라마이오신(paramyosin) 전장(full-length) 유전자(CsPmy), CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편을 나타낸 도이다.
- 도 2는 간흡충 파라마이오신 전장 유전자(CsPmy), CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편의 재조합 단백질 발현을 나타낸 도이다.

도 3a는 간흡충 파라마이오신 전장 유전자(CsPmy), CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편 재조합 단백질의 항원성을 나타낸 도이다.

도 3b는 간흡충 파라마이오신 전장 유전자(CsPmy), CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편 재조합 단백질의 인간 IgG에 대한 비특이적 반응을 나타낸 도이다.

도 4는 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 CsPmyC를 세분화한 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편을 나타낸 도이다.

도 5는 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 CsPmyC를 세분화한 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편의 재조합 단백질 발현을 나타낸 도이다.

도 6a는 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 CsPmyC를 세분화한 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편 재조합 단백질의 항원성을 나타낸 도이다.

도 6b는 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 CsPmyC를 세분화한 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편 재조합 단백질의 인간 IgG에 대한 비특이적 반응을 나타낸 도이다.

도 7은 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 CsPmyC를 세분화한 CsPmyC-2 유전자 단편 재조합 단백질과 폐흡충증(paragonimiasis), 요코가와흡충증(metagonimiasis) 및 간흡충증(clonorchiasis) 환자 혈청의 교차반응을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 파라마이오신(paramyosin) 항원결정기(epitope)를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질을 제공한다.

상기 재조합 단백질은

1) 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 숙주세포에 형질전환하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 간흡충 파라마이오신 항원결정기 재조합 단백질을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 단계 1)의 발현벡터의 제작 시에는, 상기 재조합 단백질을 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(inhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.

본 발명의 발현벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 발현벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에세리키아속(*Escherichia sp.*)균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus sp.*)균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MF 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

상기 단계 2)의 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격 유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO₄) 침전, 염화 칼슘(CaCl₂) 침전, 실리콘 카바이

드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0032] 상기 형질전환체는 상기 발현 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 발현 벡터 pQE-30을 대장균 균주 M15[pREP4]에 도입하여 형질전환체를 제조하였다.

[0033] 상기 재조합 단백질은 인간의 면역글로블린(Immunoglobulin G, IgG) 항체와 비특이적으로 결합하지 않는 것이 바람직하다.

[0034] 상기 재조합 단백질은 간흡충증이 걸린 개체의 혈청에 대하여 특이적 항원성을 갖는 것이 바람직하다.

[0035] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 간흡충증 진단을 위한 특이항원을 암호화하는 간흡충 파라마이오신 유전자 단편을 찾기 위하여, 간흡충 파라마이오신 유전자(CsPmy, 서열번호 7)를 임의로 5개의 단편, CsPmyA(aa 1-300, 서열번호 3), CsPmyB(aa 181-460, 서열번호 4), CsPmyC(aa 301-600, 서열번호 1), CsPmyD(aa 461-740, 서열번호 5) 및 CsPmyE(aa 601-864, 서열번호 6)에 대한 컨스트럭트(construct)를 제작하고, T&A 클로닝 벡터 내로 클로닝한 후, 상기 클로닝된 각각의 유전자 단편을 대장균 균주(*Escherichia coli*, *E.coli*) DH5 α 로 형질전환하였다. 그 다음, 상기 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편을 함유한 플라스미드(plasmid)를 형질전환체 *E.coli*로부터 각각 정제한 후, 발현벡터인 pQE-30 내로 서브클로닝하고 *E.coli* M15[pREP4]로 형질전환하여 각각의 상기 유전자 단편이 포함된 형질전환체를 제작하였다(도 1 참조).

[0036] 또한, 본 발명자들은 간흡충 파라마이오신 유전자 단편의 재조합 단백질을 생산하기 위하여, 상기 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편이 포함된 각각의 형질전환체로부터 재조합 단백질을 발현시켜 SDS-PAGE를 수행하여 발현을 확인하고, Ni-NTA 친화성 컬럼을 이용하여 각각의 유전자 단편 재조합 단백질을 정제하였다(도 2 참조).

[0037] 또한, 본 발명자들은 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 재조합 단백질의 항원성 및 비특이적 반응을 확인하기 위하여, 상기 정제한 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편 재조합 단백질과 간흡충증 환자 혈청 또는 인간 면역글로블린(immunoglobulin G, IgG)을 반응시키고 면역블롯(immunoblot)을 수행한 결과, 상기 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 재조합 단백질 모두 간흡충증 환자 혈청에 대하여 항원성을 나타내고, 특히, CsPmyC를 제외한 나머지 재조합 단백질을 모두 인간 IgG와 반응하는 것을 확인함으로써, 상기 CsPmyC가 인간 IgG와 비특이적인 결합을 하지 않는 주요 항원결정기 부위를 포함함을 확인하였다(도 3a 및 3b 참조).

[0038] 또한, 본 발명자들은 간흡충 파라마이오신의 항원결정기 부위를 세부적으로 분석하기 위하여, CsPmyC를 3개의 단편, CsPmyC-1(aa 301-450, 서열번호 18), CsPmyC-2(aa 375-525, 서열번호 2) 및 CsPmyC-3(aa 451-600, 서열번호 19)으로 세분화하여 컨스트럭트를 제작하고, T&A 클로닝 벡터 내로 클로닝한 후, 상기 클로닝된 각각의 유전자 단편을 *E.coli* DH5 α 로 형질전환하였다. 그 다음, 상기 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편을 함유한 플라스미드를 형질전환체 *E.coli*로부터 각각 정제한 후, 발현벡터인 pQE-30 내로 서브클로닝하고 *E.coli* M15[pREP4]로 형질전환하여 각각의 상기 유전자 단편이 포함된 형질전환체를 제작하였다(도 4 참조).

[0039] 또한, 본 발명자들은 간흡충 파라마이오신 항원결정기 후보 유전자 단편의 재조합 단백질을 생산하기 위하여, 상기 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편이 포함된 각각의 형질전환체로부터 재조합 단백질을 발현시켜 SDS-PAGE를 수행하여 발현을 확인하고, Ni-NTA 친화성 컬럼을 이용하여 각각의 유전자 단편 재조합 단백질을 정제하였다(도 5 참조).

[0040] 또한, 본 발명자들은 간흡충 파라마이오신 항원결정기 후보 유전자 단편 재조합 단백질의 항원성 및 비특이적 반응을 확인하기 위하여, 상기 정제한 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편 재조합 단백질과 간흡충증 환자 혈청 또는 인간 IgG를 반응시키고 면역블롯(immunoblot)을 수행한 결과, CsPmyC-2는 모든 실험한 간흡충증 환자 혈청에 대하여 양성 반응을 나타내고, 인간 IgG와 비특이적인 결합을 하지 않는 것을 확인함으로써, 상기 CsPmyC-2가 간흡충 파라마이오신의 주요 항원결정기임을 확인하였다(도 6a 및 6b 참조).

[0041] 아울러, 본 발명자들은 간흡충증 진단 특이 항원으로서 CsPmyC-2의 특이성을 확인하기 위하여, CsPmyC-2 재조합 단백질을 간흡충증(clonorchiasis) 환자, 폐흡충증(paragonimiasis) 환자 또는 요코가와흡충(metagonimiasis) 환자의 혈청과 면역블롯을 수행하여 교차반응을 분석한 결과, CsPmyC-2 재조합 단백질이 폐흡충증 및 요코가와흡충증 환자의 혈청에 대해 낮은 양성 반응을 나타내는 것을 확인함으로써, 상기 CsPmyC-2가 간흡충증의 특이

항원임을 확인하였다(도 7 참조).

- [0042] 따라서, 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 및 이를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 제조합 단백질은 인간 면역글로블린에 대한 비특이적 결합을 하지 않으면서 간흡충증 환자의 혈청에 대해 항원성을 나타내므로, 간흡충증의 혈청학적 진단에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 제조합 단백질을 포함하는 간흡충증 진단용 키트를 제공한다.
- [0044] 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 및 이를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 제조합 단백질은 인간 면역글로블린에 대한 비특이적 결합을 하지 않으면서 간흡충증 환자의 혈청에 대해 항원성을 나타내므로, 간흡충증 진단용 키트로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다.
- [0046] 상기 항체는 단일클론 또는 다클론 항체인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 상기 단일클론 항체는 당업자에게 알려진 공지의 방법으로 제작하여도 무방하며, 당업자에게 알려진 종래 방법에 따라 본 발명의 제조합 단백질을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여할 수 있다. 외부 숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 형성된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하여 항체를 분리할 수 있다.
- [0048] 상기 단일클론 항체는 본 발명의 항원 결합기를 특이적으로 인식하는 결합의 특성을 갖는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 상기 항체는 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 방법으로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 및 이를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 제조합 단백질은 인간 면역글로블린에 대한 비특이적 결합을 하지 않으면서 간흡충증 환자의 혈청에 대해 항원성을 나타내므로, 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 대해 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 함유하는 간흡충증 진단 키트를 제공한다.
- [0052] 또한, 본 발명은
- [0053] 1) 피검체로부터 분리된 시료를 간흡충 파라마이오신 항원결정기를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 제조합 단백질과 접촉시키는 단계;
- [0054] 2) 상기 단계 1)의 시료 중 상기 제조합 단백질과 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 간흡충증 혈청 진단 방법을 제공한다.
- [0055] 상기 단계 1)의 시료는 혈청인 것이 바람직이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 상기 단계 1)의 항원결정기는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하다.
- [0057] 상기 단계 2)의 검출은 면역블롯(immunoblot) 또는 ELISA를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0058] 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 및 이를 포함하는 간흡충 파라마이오신 항원결정기 제조합 단백질은 인간 면역글로블린에 대한 비특이적 결합을 하지 않으면서 간흡충증 환자의 혈청에 대해 항원성을 나타내므로, 상기 간흡충 파라마이오신 항원결정기에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 간흡충증 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

[0059] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0060] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0061] <실시예 1> 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 파라마이오신(paramyosin) 유전자 단편의 제조

[0062] <1-1> 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 증폭 및 형질전환체의 제작

[0063] 파라마이오신은 간흡충의 표피 구성 단백질 중 하나이다. 따라서, 간흡충증 진단을 위한 특이항원을 암호화하는 간흡충 파라마이오신 유전자 단편을 찾기 위하여, 하기 [표 1]과 같이 간흡충 파라마이오신 유전자(CsPmy)를 임의로 5개의 단편, CsPmyA(aa 1-300, 서열번호 3), CsPmyB(aa 181-460, 서열번호 4), CsPmyC(aa 301-600, 서열번호 1), CsPmyD(aa 461-740, 서열번호 5) 및 CsPmyE(aa 601-864, 서열번호 6)에 대한 컨스트럭트를 제작하였다.

[0064] 구체적으로, 전장 간흡충 파라마이오신 유전자(Park et al., 2009; Genbank Accession No; EF071860, CsPmy, aa 1-864; 서열번호 7)를 T&A 클로닝 벡터(T&A cloning vector)(Real Biotech Corporation) 내로 클로닝(cloning)하였다. 상기 벡터 내로 클로닝한 전장 간흡충 파라마이오신 유전자, Ex Taq(Takara) 및 하기 [표 2]의 올리고뉴클레오티드 프라이머(oligonucleotide primers)를 사용하여 하기 [표 3]의 조건으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 수행하여, 도 1의 모식도에서 나타낸 바와 같이 간흡충 파라마이오신 유전자의 아미노산 1에서 300을 암호화하는 CsPmyA, 아미노산 181에서 460을 암호화하는 CsPmyB, 아미노산 301에서 600을 암호화하는 CsPmyC, 아미노산 461에서 740을 암호화하는 CsPmyD 및 아미노산 601에서 864를 암호화하는 CsPmyE 유전자 단편을 증폭하였다. 상기 증폭된 각각의 유전자 단편은 아가로스 겔에서 전기영동하여 PCR 산물을 확인한 후, T&A 클로닝 벡터 내로 클로닝하였다. 추후 실험에 사용하기 위하여 상기 클로닝 된 각각의 유전자 단편을 *Escherichia coli*(*E.coli*) DH5 α (Real Biotech Corporation)로 제조사의 절차에 따라 형질전환하였다.

표 1

단편	서열
CsPmyA	MSHESESHVKISRTIYRGVSPSTSRLESRVRELEDMLDLERDARVRAERHAADMSFQVDALSERLDEAGGNSSQTHELLKRREMEIAKLRLDLENANASLEMAETSMRRRHQTALNELSAEVENLQKQKGAEKDKNSLIMEVDNVLGQLDGALKAKQSAESKLEGLDAQNLRLKGLTDDLQRQLNDLNAAKARLTSENFELHANQEYEAQVLNLKARSSLESADVDDLKRSLDDEAKSRFNLQAQLTSLQMDYDNLQAKYEESEEEASNLRNQVSKFNADLAAMKSKFERELMSKTEE(서열번호 3)
CsPmyB	LQRQLNDLNAAKARLTSENFELHANQEYEAQVLNLKARSSLESADVDDLKRSLDDEAKSRFNLQAQLTSLQMDYDNLQAKYEESEEEASNLRNQVSKFNADLAAMKSKFERELMSKTEEYELKRKLTLRITELEDTAERERARASNLEKIKAKLTIEIKDLQNEVDGLSAENALARRAKAAESLANDLQRRLEDEMTIEINNLSQNSQLEAENMRLKSQVNDLVDKNAALDRENRLSDQVKELKSTLRDANRRRLTDLEALRSQLEAERDNLASALH(서열번호 4)
CsPmyC	YEELKRKLTLRITELEDTAERERARASNLEKIKAKLTIEIKDLQNEVDGLSAENALARRAKAAESLANDLQRRLEDEMTIEINNLSQNSQLEAENMRLKSQVNDLVDKNAALDRENRLSDQVKELKSTLRDANRRRLTDLEALRSQLEAERDNLASALH(서열번호 1)
CsPmyD	DAEEALREVDQKYQNAQAALNHLKSEMEQRLREKDEELETLRKTTTTRTIEELTVTITEMEYKYSLSRLKKRYESNIAEELQLDTANKANANLNMKENKTLAQRVKDLEAFLEERRLREAAESNLQASERKRILQSSEVEELRGALEAADRARKHAENEMNEAQTRVSELTMQVNTLTNDKRRLEGDISVMQADMDEAINAKAGAEDRATRLNSEVLRRLADELRQEENYKHAEALRKQLEVEIREITVKLEEAEAFSAREGRRMVQKLQTRVRELEA(서열번호 5)
CsPmyE	VEELRGALEAADRARKHAENEMNEAQTRVSELTMQVNTLTNDKRRLEGDISVMQADMDEAINAKAGAEDRATRLNSEVLRRLADELRQEENYKHAEALRKQLEVEIREITVKLEEAEAFSAREGRRMVQKLQTRVRELEAEFDEASRRCKEALAAARKFERQYRELQTQAEDDRMVLQLDLDKQTMKMKAYKRQLEAEVVSQITMNKYRKAQQQIEEAHRADMAERTVTIKRIGPGRAGSVVRELSVTNNRGRATSM(서열번호 6)

표 2

유전자 단편	프라이머	서열
CsPmyA	정방향	5'- <u>GTCGAC</u> ATGAGTCACGAGTCGGAATCA-3'(서열번호 8)
	역방향	5'-AAGCTTTTATTCCTCAGTTTTTGACAT-3'(서열번호 9)
CsPmyB	정방향	5'- <u>GTCGAC</u> TGCAGCGCAACTGAATGAC-3'(서열번호 10)
	역방향	5'-AAGCTTTTAAATGCAAAGCGGATGCCAA-3'(서열번호 11)
CsPmyC	정방향	5'- <u>GTCGAC</u> TACGAAGAACAAGAGGAAG-3'(서열번호 12)
	역방향	5'-AAGCTTTTACTCGCTCGATAGCTGAAT-3'(서열번호 13)
CsPmyD	정방향	5'- <u>GTCGAC</u> GATGCAGAAGAAGCCCTGCGG-3'(서열번호 14)
	역방향	5'-AAGCTTTTAGGCTTCGAGCTCGCAAC-3'(서열번호 15)
CsPmyE	정방향	5'- <u>GTCGAC</u> TTGAAGAGTTACGTGGTGCC-3'(서열번호 16)
	역방향	5'-AAGCTTTTACATCATGCTCGTCGCGG-3'(서열번호 17)

표 3

PCR 조건			
변성(denaturation)	95℃	5분	1회
변성(denaturation)	95℃	1분	25회
결합(annealing)	50℃	1분	
신장(extension)	72℃	1분	
최종 신장(final extension)	72℃	10분	1회

<1-2> 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 발현벡터 및 형질전환체의 제작

간흡충 파라마이오신 유전자 단편의 발현을 위하여 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 클로닝 된 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편을 함유한 플라스미드(plasmid)를 형질전환체인 *E. coli*로부터 각각 정제하였다. 상기 정제된 각각의 유전자 단편을 함유한 플라스미드 및 발현벡터인 pQE-30(Qiagen)을 Sali(Takara) 및 HindIII(Takara)로 각각 절단한 다음, 발현벡터 0.1 μ g과 유전자 30 ng을 혼합하고 10배 농도의 접합 농축액(10mM DTT 및 100 mM MgCl₂, 10 mM ATP를 함유한 600 mM Tris-HCl, pH7.5) 1 μ l 및 T4 DNA 연결 효소 10 단위(Unit)을 가하여 전체부피를 10 μ l로 조정하고 16℃에서 18 시간 반응시켜 발현벡터 pQE-30로 상기 각각의 유전자 단편을 서브클로닝(subcloning) 한 후, *E. coli* M15[pREP4](Qiagen)로 제조사의 절차에 따라 형질전환하였다. 상기 형질전환체인 *E. coli*는 엠페실린(ampicillin) 100 μ g/ml 및 카나마이신(kanamycin) 50 μ g/ml이 첨가된 LB 고체배지에 도말하고 37℃ 항온기에서 24 시간 배양하여 형질전환체를 선별하였다. 상기 선별된 형질전환체가 함유하고 있는 발현벡터를 자동염기서열분석법으로 분석하고, DNASTAR(Lageregene) 분석 프로그램을 이용하여 각각의 발현벡터 내에서 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편의 염기서열을 확인하였다.

<실시예 2> 간흡충 파라마이오신 유전자 단편의 재조합 단백질 생산 및 정제

상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 제작한 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편으로 형질전환하여 선별된 형질전환체 *E. coli*에서 각각의 유전자 단편에 대한 재조합 단백질을 발현 및 정제하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에 기재된 방법으로 선별된 각각의 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편 형질전환 *E. coli*를 100 μ g/ml의 엠페실린 및 50 μ g/ml 카나마이신이 함유된 LB 고체배지에 접종하고 37℃ 항온기에서 24 시간 배양하고, 배양된 균체를 LB 액체배지 5 ml에 현탁하여 균탁도가 600 nm에서 흡광도가 0.6이 되도록 조절한 다음, 이 배양액 5 ml를 100 μ g/ml의 엠페실린 및 50 μ g/ml 카나마이신이 함유된 LB 액체배지 500 ml에 접종하여 600 nm의 흡광도에서 0.7 내지 1.0이 되도록 37℃에서 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 이어 IPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactoside)(Duchefa)를 최종 농도가 1 mM이 되도록 넣고, 37℃에서 200 rpm으로 3시간 진탕배양하여 발현을 유도하였다. 배양된 세포는 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균을 모으고 용해 완충용액(lysis buffer)(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸(imidazole), pH 8.0)에 현탁시킨 후, 극초음파 분쇄기(ultra sonicator)로 파쇄하였다. 그 다음 12,000 rpm에서 20분간 4℃에서 원심분리

하여 상층액을 획득하였다. 상기 획득한 상층액은 15% SDS-PAGE를 수행하여 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 재조합 단백질의 발현 여부를 관찰하였다.

[0073]

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 선별된 형질 전환체 *E.coli*에서 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 재조합 단백질이 발현됨을 확인하였다(도 2). 따라서, 상기 발현된 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 재조합 단백질을 Ni-NTA 친화성 컬럼(affinity column)(Qiagen)을 이용하여 제조사의 절차에 따라 정제하였다.

[0074]

<실시예 3> 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 재조합 단백질의 항원성 및 비특이적 반응 확인

[0075]

<3-1> 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 재조합 단백질의 항원성 확인

[0076]

상기 <실시예 2>에 기재된 방법으로 정제한 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 재조합 단백질의 항원성을 분석하기 위하여, 면역블롯(immunoblot)을 수행하였다.

[0077]

구체적으로, 상기 <실시예 2>에 기재된 방법으로 획득한 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 재조합 단백질을 12% SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 분리하고 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)(Bio-Rad)에 이동시키고, 여러 개의 스트립(strip)으로 자른 다음 3% 스킴밀크(skim milk)를 포함한 PBST(0.05% Tween 20/PBS, pH 7.4)로 차단하였다. 이후, 상기 각각의 스트립에 3% 스킴 밀크가 첨가된 PBST로 1:100의 비율로 희석한 12 개의 간흡충증 환자 혈청 또는 5 개의 정상인 혈청을 첨가하여 실온에서 3 시간 동안 반응시키고, PBST로 3회 세척한 후, 3% 스킴밀크가 첨가된 PBST로 1:1,000의 비율로 희석한 호스라디시-퍼옥시데이즈(horseradish-peroxidase, HRP)-접합된 항-인간 IgG(Sigma)를 첨가하여 실온에서 3 시간 동안 추가 반응시켰다. 그 다음, 각각의 스트립을 PBST로 3회 세척하고, 기질 용액(0.05% 4-클로로-1-나프톨(4-chloro-1-naphthol), 0.05% 과산화수소(hydrogen peroxide)/100 mM PBS, pH 7.0)에 첨가하여 암실에서 10분간 발색시킨 다음 증류수로 수차례 세척하여 반응을 종결시켰다.

[0078]

그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 정상인 혈청 샘플과 달리 간흡충증 환자 샘플들에 대해서 각각의 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 재조합 단백질이 전체 유전자의 재조합 단백질(CsPmy)과 유사하게 반응하는 것을 확인함으로써, 상기 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 재조합 단백질 모두 간흡충증 환자 혈청에 대하여 유사한 양상의 항원성을 나타냄을 확인하였다(도 3a).

[0079]

<3-2> 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 재조합 단백질의 비특이적 반응 확인

[0080]

상기 <실시예 2>에 기재된 방법으로 정제한 간흡충 파라마이오신 유전자 단편 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 재조합 단백질과 인간 IgG의 비특이적 결합을 분석하기 위하여, 면역블롯을 수행하였다.

[0081]

구체적으로, 상기 <실시예 2>에 기재된 방법으로 획득한 CsPmyA, CsPmyB, CsPmyC, CsPmyD 및 CsPmyE 재조합 단백질을 상기 실시예 <3-1>과 같이 12% SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 분리하고 니트로셀룰로오스 막에 이동시키고, 여러 개의 스트립으로 자른 다음 3% 스킴밀크를 포함한 PBST로 차단하였다. 이후, 상기 각각의 스트립을 3% 스킴밀크를 포함한 PBST에 0, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석한 인간 IgG(sigma)에 첨가하여 실온에서 3 시간 동안 반응시켰다. 이후, 상기 스트립을 PBST로 3회 세척하고 3% 스킴밀크가 첨가된 PBST로 1:1,000의 비율로 희석한 HRP-접합된 항-인간 IgG에 첨가하여 실온에서 3 시간 동안 추가 반응시켰다. 그 다음, 각각의 스트립을 PBST로 3회 세척하고 기질 용액에 첨가하여 암실에서 10분간 발색시킨 다음 증류수로 수차례 세척하여 반응을 종결시켰다(도 3b).

[0082]

그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, CsPmyC를 제외한 전장 간흡충 파라마이오신 재조합 단백질, CsPmyA, CsPmyB, CsPmyD 및 CsPmyE 유전자 단편 재조합 단백질의 경우, 인간 IgG와 반응하는 것을 확인함으로써, CsPmyC를 제외한 재조합 단백질을 모두 인간 IgG와 비특이적으로 결합함을 확인하였다(도 3b). 따라서, 상기 <실시예 3>의 결과를 통해 CsPmyC 이외의 단편에서 나타나는 항원성은 혈청 내 IgG와 비특이적 반응에 기인한 결과이며, CsPmyC는 인간 IgG와 비특이적인 결합을 하지 않는 주요 항원결정기(epitope)를 포함하고 있음을 확인하였다.

[0083]

<실시예 4> 간흡충 파라마이오신의 항원결정기 후보 유전자 단편 제작

[0084] <4-1> 간흡충 파라마이오신의 항원결정기 후보 유전자 단편 증폭 및 형질전환체 제작

[0085] 상기 <실시예 3>의 결과를 통해 CsPmyC가 항원결정기 부위를 포함함을 확인하였다. 따라서, 간흡충 파라마이오신의 항원결정기 부위를 세부적으로 분석하기 위하여, 하기 [표 4]와 같이 CsPmyC를 3개의 단편 CsPmyC-1(aa 301-450, 서열번호 18), CsPmyC-2(aa 375-525, 서열번호 2) 및 CsPmyC-3(aa 451-600, 서열번호 19)으로 세분화하여 컨스트럭트를 제작하였다.

[0086] 구체적으로, 상기 실시예<1-1>에 기재된 방법으로 획득한 T&A 클로닝 벡터 내로 클로닝한 CsPmyC 유전자, Ex Taq 및 하기 [표 5]의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 하기 [표 6]의 조건으로 PCR을 수행하여, 도 4의 모식도에서 나타난 바와 같이 간흡충 파라마이오신 유전자 아미노산 301에서 450를 암호화하는 CsPmyC-1, 아미노산 375에서 525를 암호화하는 CsPmyC-2 및 아미노산 451에서 600을 암호화하는 CsPmyC-3 유전자 단편을 증폭하였다. 상기 증폭된 각각의 유전자 단편은 상기 실시예 <1-1>과 같이 T&A 클로닝 벡터 내로 클로닝하고 *E. coli* DH5 α 로 제조사의 절차에 따라 형질전환하였다.

표 4

단편	서열
CsPmyC-1	YEELKRKLTLRITELEDTAERERARASNLEKIKAKLTIEIKDLQNEVDGLSAENAEARRAKAAESLANDLQRRLDEMTIEINNLHSQNSQLEAENMRKLSQVNDLVKNAALDRENRLSDQVKELKSTLRDANRRRLTDLEALRSQLEA(서열번호 18)
CsPmyC-2	LDEMTIEINNLHSQNSQLEAENMRKLSQVNDLVKNAALDRENRLSDQVKELKSTLRDANRRRLTDLEALRSQLEAERDNLASALHDAEEALREVDQKYQNAQAALNHLKSEMEQRLREKDEELETLRKTTTTRTIEELTVTITEMEVKYKS(서열번호 2)
CsPmyC-3	ERDNLASALHDAEEALREVDQKYQNAQAALNHLKSEMEQRLREKDEELETLRKTTTTRTIEELTVTITEMEVKYKSELSRLKKRYESNIAELELQDLTANKANANLMKENKTLAQRVKDLEAFLEEEERRLEAAESNLQASERKRRIQLSSE(서열번호 19)

표 5

단편	프라이머	서열
CsPmyC-1	정방향	5'-GGATCCTACGAAGAACTCAAGAGG-3'(서열번호 20)
	역방향	5'-AAGCTTTTACGCCTCAAGTTGAGACCG-3'(서열번호 21)
CsPmyC-2	정방향	5'-GGATCCGATGAGATGACCATTTGAA-3'(서열번호 22)
	역방향	5'-AAGCTTTTATGACTTGTATTTACCTC-3'(서열번호 23)
CsPmyC-3	정방향	5'-GGATCCGAACGGGATAATTTGGCA-3'(서열번호 24)
	역방향	5'-AAGCTTTTACTCGTCGATAGCTGAAT-3'(서열번호 25)

표 6

PCR 조건			
변성	95℃	5분	1회
변성	95℃	1분	25회
결합	50℃	1분	
신장	72℃	45초	
최종 신장	72℃	10분	1회

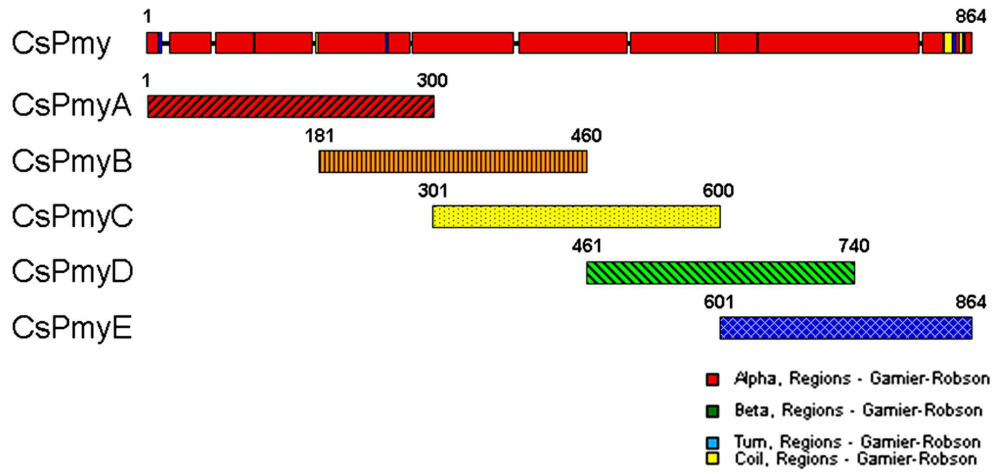
[0090] <4-2> 간흡충 파라마이오신 항원결정기 후보 유전자 단편 발현벡터 및 형질전환체의 제작

[0091] 간흡충 파라마이오신 항원결정기 후보 유전자 단편의 발현을 위하여, 실시예 <4-1> 기재된 방법으로 획득한 클로닝 된 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편을 함유한 플라스미드를 형질전환체인 *E. coli*로부터 정제하였다. 상기 정제된 각각의 유전자 단편을 함유한 플라스미드 및 발현벡터인 pQE-30을 BamHI(Takara) 및 HindIII(Takara)로 각각 절단하였다. 그 다음, 상기 실시예 <1-2>와 같이 반응시켜 발현벡터 pQE-30로 상기 각각의 유전자 단편을 서브클로닝 한 후, *E. coli* M15[pREP4](Qiagen)로 제조사의 절차에 따라 형질전환하고, 앰피실린 및 카나마이신으로 형질전환체를 선별한 후, 자동염기서열분석법 및 DNASTAR 분석 프로그램을 이용하여 각각의 발현벡터 내에서 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편의 염기서열을 확인하였다.

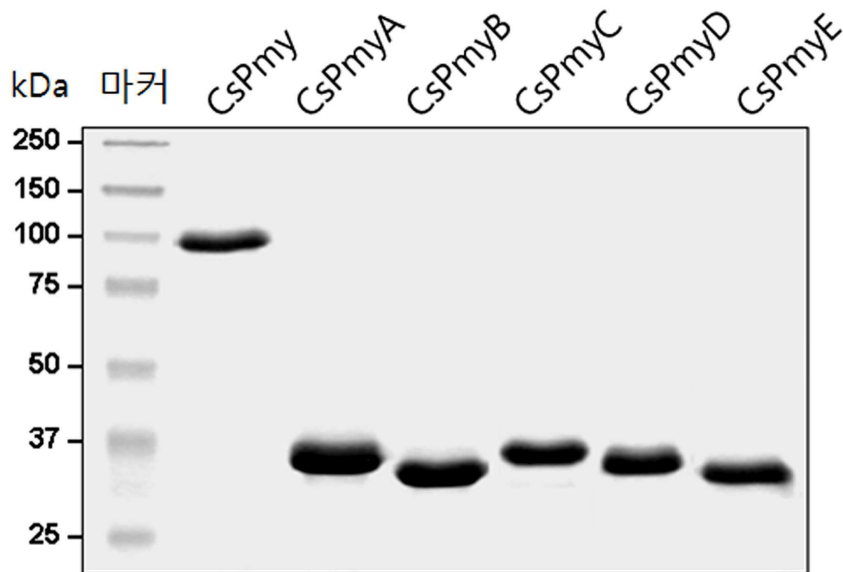
- [0092] <실시예 5> 간흡충 파라마이오신 항원결정기 후보 유전자 단편의 재조합 단백질 생산 및 정제
- [0093] 상기 <실시예 4>에 기재된 방법으로 제작한 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편으로 형질전환하여 선별된 형질전환 *E.coli*에서 각각의 유전자 단편에 대한 재조합 단백질을 발현 및 정제하였다.
- [0094] 구체적으로, 상기 실시예 <4-2>에 기재된 방법으로 선별된 각각의 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 유전자 단편 형질전환 *E.coli*로부터 상기 <실시예 2>와 같이 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 재조합 단백질을 발현하고, 발현 여부를 관찰하였다.
- [0095] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 선별된 형질 전환 *E.coli*에서 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 재조합 단백질 발현됨을 확인하였다. 따라서, 상기 발현된 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 재조합 단백질을 Ni-NTA 친화성 컬럼을 이용하여 제조사의 절차에 따라 정제하였다.
- [0096] <실시예 6> 간흡충 파라마이오신 항원결정기 후보 유전자 단편 재조합 단백질의 항원성 및 비특이적 반응 확인
- [0097] 상기 <실시예 5>에 기재된 방법으로 정제한 간흡충 파라마이오신 항원결정기 후보 유전자 단편 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 재조합 단백질의 항원성 분석 및 비특이적 반응을 확인하기 위하여, 면역블롯(immunoblot)을 수행하였다.
- [0098] 구체적으로, 상기 <실시예 5>에 기재된 방법으로 획득한 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 재조합 단백질을 상기 실시예 <3-1>과 같이 항원성을 분석하고(도 6a), 실시예 <3-2>와 같이 비특이적 결합을 분석하였다(도 6b).
- [0099] 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타낸 바와 같이, CsPmyC-1과 CsPmyC-3의 경우 83.3%의 환자 혈청에 대해 양성 반응을 나타내었으나, CsPmyC-2는 사용한 모든 환자의 혈청에 대해 양성 반응을 나타냄을 확인하였다(도 6a). 또한 CsPmyC-1, CsPmyC-2 및 CsPmyC-3 모두 인간 IgG와 비특이적인 결합을 하지 않는 것을 확인함으로써, (도 6b). 상기 CsPmyC-2가 간흡충 파라마이오신의 주요 항원 결정기임을 확인하였다(도 6a 및 6b).
- [0100] <실시예 7> 간흡충 파라마이오신 항원결정기 CsPmyC-2 재조합 단백질의 교차반응 확인
- [0101] 간흡충증 진단 특이 항원으로서 CsPmyC-2 재조합 단백질의 특이성을 분석하기 위하여, 다른 기생충 감염환자 혈청을 이용해 교차반응 분석을 수행하였다.
- [0102] 구체적으로, 상기 <실시예 5>에 기재된 방법으로 획득한 CsPmyC-2 재조합 단백질을 15% SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 분리하고 니트로셀룰로오스 막에 이동시킨 후, 여러 개의 스트립으로 자른 다음 3% 스킵밀크를 포함한 PBST(0.05% Tween 20/PBS, pH 7.4)로 차단하였다. 이후, 상기 각각의 스트립에 3% 스킵 밀크가 첨가된 PBST로 1:100의 비율로 간흡충증 환자(clonorchiasis; n=5), 폐흡충증 환자(paragonimiasis; n=12) 및 요코가와흡충증 환자(metagonimiasis; n=10)의 혈청을 첨가하여 상기 실시예 <3-1>과 같이 면역블롯을 수행하였다.
- [0103] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, CsPmyC-2 재조합 단백질이 간흡충증 환자의 혈청에는 특이적으로 반응하였으나, 폐흡충증 환자 혈청에 대해서는 16.7%, 요코가와흡충증 환자 혈청에 대해서는 0%의 양성반응을 나타내는 것을 확인함으로써, 상기 CsPmyC-2가 간흡충증의 특이 감별 진단에 유용한 특이 항원임을 확인하였다.

도면

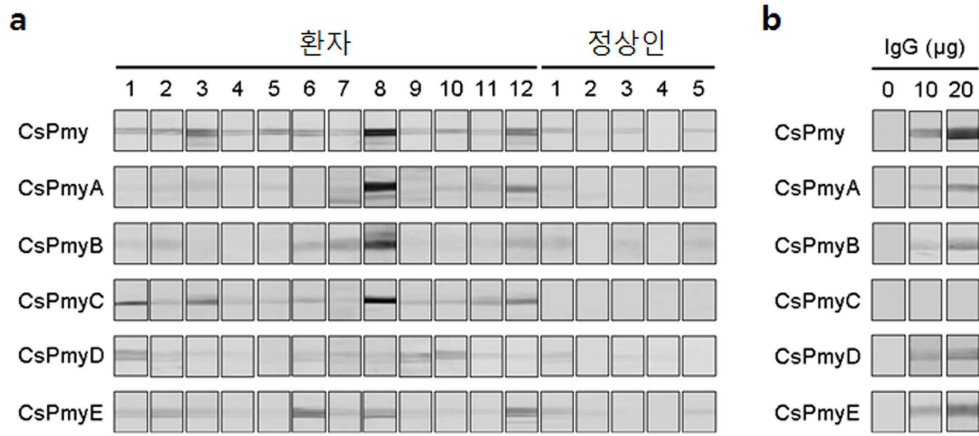
도면1



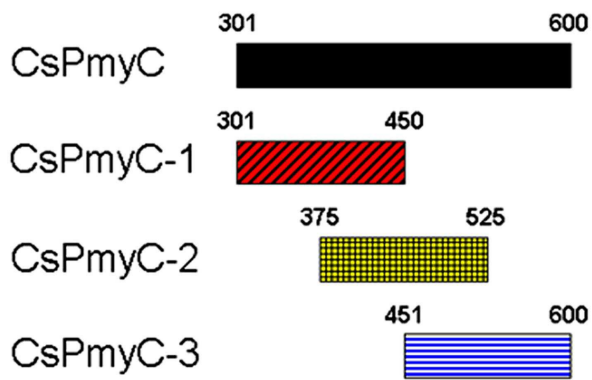
도면2



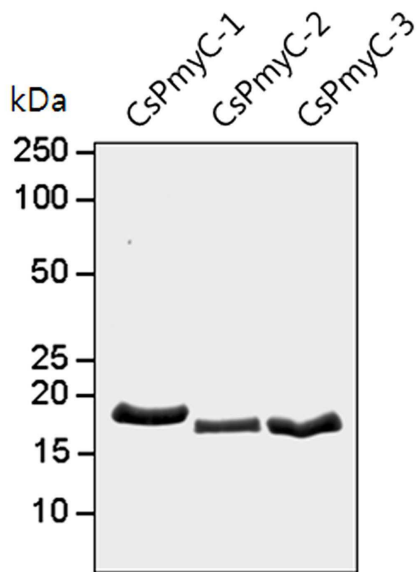
도면3



도면4



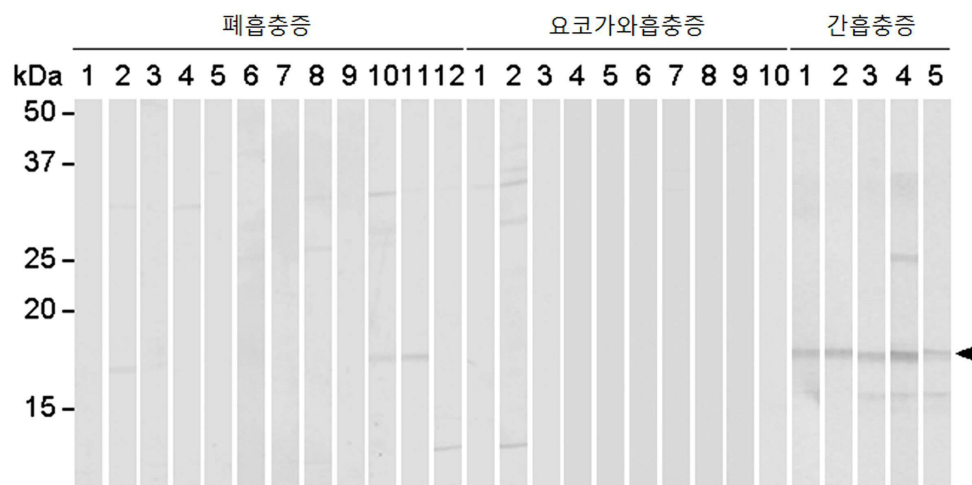
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation Gyeongsang National University

<120> Antigenic epitope of Clonorchis sinensis paramyosin and
serodiagnostic method of clonorchiasis using the antigen

<130> 13p-08-34

<160> 25

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 300

<212> PRT

<213> Clonorchis sinensis

<400> 1

Tyr Glu Glu Leu Lys Arg Lys Leu Thr Leu Arg Ile Thr Glu Leu Glu

1 5 10 15

Asp Thr Ala Glu Arg Glu Arg Ala Arg Ala Ser Asn Leu Glu Lys Ile

20 25 30

Lys Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ile Lys Asp Leu Gln Asn Glu Val Asp

35 40 45

Gly Leu Ser Ala Glu Asn Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ala Lys Ala Ala

50 55 60

Glu Ser Leu Ala Asn Asp Leu Gln Arg Arg Leu Asp Glu Met Thr Ile

65 70 75 80

Glu Ile Asn Asn Leu His Ser Gln Asn Ser Gln Leu Glu Ala Glu Asn

85 90 95

Met Arg Leu Lys Ser Gln Val Asn Asp Leu Val Asp Lys Asn Ala Ala

100 105 110

Leu Asp Arg Glu Asn Arg Gln Leu Ser Asp Gln Val Lys Glu Leu Lys

115 120 125

Ser Thr Leu Arg Asp Ala Asn Arg Arg Leu Thr Asp Leu Glu Ala Leu

130 135 140

Arg Ser Gln Leu Glu Ala Glu Arg Asp Asn Leu Ala Ser Ala Leu His

145 150 155 160

Asp Ala Glu Glu Ala Leu Arg Glu Val Asp Gln Lys Tyr Gln Asn Ala

	165	170	175
Gln Ala Ala Leu Asn His Leu Lys Ser Glu Met Glu Gln Arg Leu Arg			
180	185	190	
Glu Lys Asp Glu Glu Leu Glu Thr Leu Arg Lys Thr Thr Thr Arg Thr			
195	200	205	
Ile Glu Glu Leu Thr Val Thr Ile Thr Glu Met Glu Val Lys Tyr Lys			
210	215	220	
Ser Glu Leu Ser Arg Leu Lys Lys Arg Tyr Glu Ser Asn Ile Ala Glu			
225	230	235	240

Leu Glu Leu Gln Leu Asp Thr Ala Asn Lys Ala Asn Ala Asn Leu Met			
245	250	255	
Lys Glu Asn Lys Thr Leu Ala Gln Arg Val Lys Asp Leu Glu Ala Phe			
260	265	270	
Leu Glu Glu Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala Ala Glu Ser Asn Leu Gln			
275	280	285	
Ala Ser Glu Arg Lys Arg Ile Gln Leu Ser Ser Glu			
290	295	300	

<210> 2
 <211> 151
 <212> PRT

<213> Clonorchis sinensis

<400> 2

Leu Asp Glu Met Thr Ile Glu Ile Asn Asn Leu His Ser Gln Asn Ser			
1	5	10	15
Gln Leu Glu Ala Glu Asn Met Arg Leu Lys Ser Gln Val Asn Asp Leu			
20	25	30	
Val Asp Lys Asn Ala Ala Leu Asp Arg Glu Asn Arg Gln Leu Ser Asp			
35	40	45	
Gln Val Lys Glu Leu Lys Ser Thr Leu Arg Asp Ala Asn Arg Arg Leu			
50	55	60	

Thr Asp Leu Glu Ala Leu Arg Ser Gln Leu Glu Ala Glu Arg Asp Asn
 65 70 75 80
 Leu Ala Ser Ala Leu His Asp Ala Glu Glu Ala Leu Arg Glu Val Asp
 85 90 95
 Gln Lys Tyr Gln Asn Ala Gln Ala Ala Leu Asn His Leu Lys Ser Glu
 100 105 110
 Met Glu Gln Arg Leu Arg Glu Lys Asp Glu Glu Leu Glu Thr Leu Arg
 115 120 125
 Lys Thr Thr Thr Arg Thr Ile Glu Glu Leu Thr Val Thr Ile Thr Glu
 130 135 140
 Met Glu Val Lys Tyr Lys Ser
 145 150
 <210> 3
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Clonorchis sinensis
 <400> 3
 Met Ser His Glu Ser Glu Ser His Val Lys Ile Ser Arg Thr Ile Tyr
 1 5 10 15
 Arg Gly Val Ser Pro Ser Thr Ser Arg Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu
 20 25 30
 Leu Glu Asp Met Leu Asp Leu Glu Arg Asp Ala Arg Val Arg Ala Glu
 35 40 45
 Arg His Ala Ala Asp Met Ser Phe Gln Val Asp Ala Leu Ser Glu Arg
 50 55 60
 Leu Asp Glu Ala Gly Gly Asn Ser Ser Gln Thr His Glu Leu Leu Lys
 65 70 75 80
 Arg Arg Glu Met Glu Ile Ala Lys Leu Arg Lys Asp Leu Glu Asn Ala
 85 90 95
 Asn Ala Ser Leu Glu Met Ala Glu Thr Ser Met Arg Arg Arg His Gln
 100 105 110
 Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Ala Glu Val Glu Asn Leu Gln Lys Gln

115 120 125
 Lys Gly Lys Ala Glu Lys Asp Lys Asn Ser Leu Ile Met Glu Val Asp
 130 135 140
 Asn Val Leu Gly Gln Leu Asp Gly Ala Leu Lys Ala Lys Gln Ser Ala
 145 150 155 160
 Glu Ser Lys Leu Glu Gly Leu Asp Ala Gln Leu Asn Arg Leu Lys Gly
 165 170 175
 Leu Thr Asp Asp Leu Gln Arg Gln Leu Asn Asp Leu Asn Ala Ala Lys

180 185 190
 Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asn Phe Glu Leu Leu His Ala Asn Gln Glu
 195 200 205
 Tyr Glu Ala Gln Val Leu Asn Leu Ser Lys Ala Arg Ser Ser Leu Glu
 210 215 220
 Ser Ala Val Asp Asp Leu Lys Arg Ser Leu Asp Asp Glu Ala Lys Ser
 225 230 235 240
 Arg Phe Asn Leu Gln Ala Gln Leu Thr Ser Leu Gln Met Asp Tyr Asp
 245 250 255

Asn Leu Gln Ala Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Glu Glu Ala Ser Asn Leu
 260 265 270
 Arg Asn Gln Val Ser Lys Phe Asn Ala Asp Leu Ala Ala Met Lys Ser
 275 280 285
 Lys Phe Glu Arg Glu Leu Met Ser Lys Thr Glu Glu
 290 295 300

<210> 4

<211> 280

<212> PRT

<213> Clonorchis sinensis

<400> 4

Leu Gln Arg Gln Leu Asn Asp Leu Asn Ala Ala Lys Ala Arg Leu Thr
 1 5 10 15

Ser Glu Asn Phe Glu Leu Leu His Ala Asn Gln Glu Tyr Glu Ala Gln
 20 25 30

Val Leu Asn Leu Ser Lys Ala Arg Ser Ser Leu Glu Ser Ala Val Asp
35 40 45

Asp Leu Lys Arg Ser Leu Asp Asp Glu Ala Lys Ser Arg Phe Asn Leu
50 55 60

Gln Ala Gln Leu Thr Ser Leu Gln Met Asp Tyr Asp Asn Leu Gln Ala
65 70 75 80

Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Glu Glu Ala Ser Asn Leu Arg Asn Gln Val
85 90 95

Ser Lys Phe Asn Ala Asp Leu Ala Ala Met Lys Ser Lys Phe Glu Arg
100 105 110

Glu Leu Met Ser Lys Thr Glu Glu Tyr Glu Glu Leu Lys Arg Lys Leu
115 120 125

Thr Leu Arg Ile Thr Glu Leu Glu Asp Thr Ala Glu Arg Glu Arg Ala
130 135 140

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Lys Ile Lys Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ile
145 150 155 160

Lys Asp Leu Gln Asn Glu Val Asp Gly Leu Ser Ala Glu Asn Ala Glu
165 170 175

Leu Ala Arg Arg Ala Lys Ala Ala Glu Ser Leu Ala Asn Asp Leu Gln
180 185 190

Arg Arg Leu Asp Glu Met Thr Ile Glu Ile Asn Asn Leu His Ser Gln
195 200 205

Asn Ser Gln Leu Glu Ala Glu Asn Met Arg Leu Lys Ser Gln Val Asn
210 215 220

Asp Leu Val Asp Lys Asn Ala Ala Leu Asp Arg Glu Asn Arg Gln Leu
225 230 235 240

Ser Asp Gln Val Lys Glu Leu Lys Ser Thr Leu Arg Asp Ala Asn Arg
245 250 255

Arg Leu Thr Asp Leu Glu Ala Leu Arg Ser Gln Leu Glu Ala Glu Arg
260 265 270

Asp Asn Leu Ala Ser Ala Leu His
275 280

<210> 5
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Clonorchis sinensis
 <400> 5
 Asp Ala Glu Glu Ala Leu Arg Glu Val Asp Gln Lys Tyr Gln Asn Ala

 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Leu Asn His Leu Lys Ser Glu Met Glu Gln Arg Leu Arg
 20 25 30
 Glu Lys Asp Glu Glu Leu Glu Thr Leu Arg Lys Thr Thr Thr Arg Thr
 35 40 45
 Ile Glu Glu Leu Thr Val Thr Ile Thr Glu Met Glu Val Lys Tyr Lys
 50 55 60
 Ser Glu Leu Ser Arg Leu Lys Lys Arg Tyr Glu Ser Asn Ile Ala Glu
 65 70 75 80

 Leu Glu Leu Gln Leu Asp Thr Ala Asn Lys Ala Asn Ala Asn Leu Met
 85 90 95
 Lys Glu Asn Lys Thr Leu Ala Gln Arg Val Lys Asp Leu Glu Ala Phe
 100 105 110
 Leu Glu Glu Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala Ala Glu Ser Asn Leu Gln
 115 120 125
 Ala Ser Glu Arg Lys Arg Ile Gln Leu Ser Ser Glu Val Glu Glu Leu
 130 135 140
 Arg Gly Ala Leu Glu Ala Ala Asp Arg Ala Arg Lys His Ala Glu Asn

 145 150 155 160
 Glu Met Asn Glu Ala Gln Thr Arg Val Ser Glu Leu Thr Met Gln Val
 165 170 175
 Asn Thr Leu Thr Asn Asp Lys Arg Arg Leu Glu Gly Asp Ile Ser Val
 180 185 190
 Met Gln Ala Asp Met Asp Glu Ala Ile Asn Ala Lys Ala Gly Ala Glu
 195 200 205
 Asp Arg Ala Thr Arg Leu Asn Ser Glu Val Leu Arg Leu Ala Asp Glu

210 215 220
 Leu Arg Gln Glu Gln Glu Asn Tyr Lys His Ala Glu Ala Leu Arg Lys
 225 230 235 240
 Gln Leu Glu Val Glu Ile Arg Glu Ile Thr Val Lys Leu Glu Glu Ala
 245 250 255
 Glu Ala Phe Ser Ala Arg Glu Gly Arg Arg Met Val Gln Lys Leu Gln
 260 265 270
 Thr Arg Val Arg Glu Leu Glu Ala
 275 280
 <210> 6
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Clonorchis sinensis

 <400> 6
 Val Glu Glu Leu Arg Gly Ala Leu Glu Ala Ala Asp Arg Ala Arg Lys
 1 5 10 15
 His Ala Glu Asn Glu Met Asn Glu Ala Gln Thr Arg Val Ser Glu Leu
 20 25 30
 Thr Met Gln Val Asn Thr Leu Thr Asn Asp Lys Arg Arg Leu Glu Gly
 35 40 45
 Asp Ile Ser Val Met Gln Ala Asp Met Asp Glu Ala Ile Asn Ala Lys
 50 55 60
 Ala Gly Ala Glu Asp Arg Ala Thr Arg Leu Asn Ser Glu Val Leu Arg

 65 70 75 80
 Leu Ala Asp Glu Leu Arg Gln Glu Gln Glu Asn Tyr Lys His Ala Glu
 85 90 95
 Ala Leu Arg Lys Gln Leu Glu Val Glu Ile Arg Glu Ile Thr Val Lys
 100 105 110
 Leu Glu Glu Ala Glu Ala Phe Ser Ala Arg Glu Gly Arg Arg Met Val
 115 120 125
 Gln Lys Leu Gln Thr Arg Val Arg Glu Leu Glu Ala Glu Phe Asp Ala

130 135 140
 Glu Ser Arg Arg Cys Lys Glu Ala Leu Ala Ala Arg Lys Phe Glu
 145 150 155 160
 Arg Gln Tyr Arg Glu Leu Gln Thr Gln Ala Glu Asp Asp Arg Arg Met
 165 170 175
 Val Leu Glu Leu Gln Asp Leu Leu Asp Lys Thr Gln Met Lys Met Lys
 180 185 190
 Ala Tyr Lys Arg Gln Leu Glu Glu Ala Glu Glu Val Ser Gln Ile Thr
 195 200 205
 Met Asn Lys Tyr Arg Lys Ala Gln Gln Gln Ile Glu Glu Ala Glu His

 210 215 220
 Arg Ala Asp Met Ala Glu Arg Thr Val Thr Ile Lys Arg Ile Gly Pro
 225 230 235 240
 Gly Arg Ala Gly Ser Val Val Arg Glu Leu Ser Val Thr Thr Asn Arg
 245 250 255
 Gly Thr Arg Ala Thr Ser Met Met
 260
 <210> 7
 <211> 864
 <212> PRT
 <213> Clonorchis sinensis
 <400> 7
 Met Ser His Glu Ser Glu Ser His Val Lys Ile Ser Arg Thr Ile Tyr

 1 5 10 15
 Arg Gly Val Ser Pro Ser Thr Ser Arg Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu
 20 25 30
 Leu Glu Asp Met Leu Asp Leu Glu Arg Asp Ala Arg Val Arg Ala Glu
 35 40 45
 Arg His Ala Ala Asp Met Ser Phe Gln Val Asp Ala Leu Ser Glu Arg
 50 55 60
 Leu Asp Glu Ala Gly Gly Asn Ser Ser Gln Thr His Glu Leu Leu Lys

65	70	75	80
Arg Arg Glu Met Glu Ile Ala Lys Leu Arg Lys Asp Leu Glu Asn Ala			
	85	90	95
Asn Ala Ser Leu Glu Met Ala Glu Thr Ser Met Arg Arg Arg His Gln			
	100	105	110
Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Ala Glu Val Glu Asn Leu Gln Lys Gln			
	115	120	125
Lys Gly Lys Ala Glu Lys Asp Lys Asn Ser Leu Ile Met Glu Val Asp			
	130	135	140
Asn Val Leu Gly Gln Leu Asp Gly Ala Leu Lys Ala Lys Gln Ser Ala			
145	150	155	160
Glu Ser Lys Leu Glu Gly Leu Asp Ala Gln Leu Asn Arg Leu Lys Gly			
	165	170	175
Leu Thr Asp Asp Leu Gln Arg Gln Leu Asn Asp Leu Asn Ala Ala Lys			
	180	185	190
Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asn Phe Glu Leu Leu His Ala Asn Gln Glu			
	195	200	205
Tyr Glu Ala Gln Val Leu Asn Leu Ser Lys Ala Arg Ser Ser Leu Glu			
	210	215	220
Ser Ala Val Asp Asp Leu Lys Arg Ser Leu Asp Asp Glu Ala Lys Ser			
225	230	235	240
Arg Phe Asn Leu Gln Ala Gln Leu Thr Ser Leu Gln Met Asp Tyr Asp			
	245	250	255
Asn Leu Gln Ala Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Glu Glu Ala Ser Asn Leu			
	260	265	270
Arg Asn Gln Val Ser Lys Phe Asn Ala Asp Leu Ala Ala Met Lys Ser			
	275	280	285
Lys Phe Glu Arg Glu Leu Met Ser Lys Thr Glu Glu Tyr Glu Glu Leu			
290	295	300	
Lys Arg Lys Leu Thr Leu Arg Ile Thr Glu Leu Glu Asp Thr Ala Glu			
305	310	315	320

Arg Glu Arg Ala Arg Ala Ser Asn Leu Glu Lys Ile Lys Ala Lys Leu
 325 330 335
 Thr Ile Glu Ile Lys Asp Leu Gln Asn Glu Val Asp Gly Leu Ser Ala
 340 345 350
 Glu Asn Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ala Lys Ala Ala Glu Ser Leu Ala
 355 360 365

 Asn Asp Leu Gln Arg Arg Leu Asp Glu Met Thr Ile Glu Ile Asn Asn
 370 375 380
 Leu His Ser Gln Asn Ser Gln Leu Glu Ala Glu Asn Met Arg Leu Lys
 385 390 395 400
 Ser Gln Val Asn Asp Leu Val Asp Lys Asn Ala Ala Leu Asp Arg Glu
 405 410 415
 Asn Arg Gln Leu Ser Asp Gln Val Lys Glu Leu Lys Ser Thr Leu Arg
 420 425 430
 Asp Ala Asn Arg Arg Leu Thr Asp Leu Glu Ala Leu Arg Ser Gln Leu

 435 440 445
 Glu Ala Glu Arg Asp Asn Leu Ala Ser Ala Leu His Asp Ala Glu Glu
 450 455 460
 Ala Leu Arg Glu Val Asp Gln Lys Tyr Gln Asn Ala Gln Ala Ala Leu
 465 470 475 480
 Asn His Leu Lys Ser Glu Met Glu Gln Arg Leu Arg Glu Lys Asp Glu
 485 490 495
 Glu Leu Glu Thr Leu Arg Lys Thr Thr Thr Arg Thr Ile Glu Glu Leu
 500 505 510

 Thr Val Thr Ile Thr Glu Met Glu Val Lys Tyr Lys Ser Glu Leu Ser
 515 520 525
 Arg Leu Lys Lys Arg Tyr Glu Ser Asn Ile Ala Glu Leu Glu Leu Gln
 530 535 540
 Leu Asp Thr Ala Asn Lys Ala Asn Ala Asn Leu Met Lys Glu Asn Lys
 545 550 555 560
 Thr Leu Ala Gln Arg Val Lys Asp Leu Glu Ala Phe Leu Glu Glu Glu
 565 570 575

Arg Arg Leu Arg Glu Ala Ala Glu Ser Asn Leu Gln Ala Ser Glu Arg

580	585	590	
Lys Arg Ile Gln Leu Ser Ser Glu Val Glu Glu Leu Arg Gly Ala Leu			
595	600	605	
Glu Ala Ala Asp Arg Ala Arg Lys His Ala Glu Asn Glu Met Asn Glu			
610	615	620	
Ala Gln Thr Arg Val Ser Glu Leu Thr Met Gln Val Asn Thr Leu Thr			
625	630	635	640
Asn Asp Lys Arg Arg Leu Glu Gly Asp Ile Ser Val Met Gln Ala Asp			
645	650	655	

Met Asp Glu Ala Ile Asn Ala Lys Ala Gly Ala Glu Asp Arg Ala Thr			
660	665	670	
Arg Leu Asn Ser Glu Val Leu Arg Leu Ala Asp Glu Leu Arg Gln Glu			
675	680	685	
Gln Glu Asn Tyr Lys His Ala Glu Ala Leu Arg Lys Gln Leu Glu Val			
690	695	700	
Glu Ile Arg Glu Ile Thr Val Lys Leu Glu Glu Ala Glu Ala Phe Ser			
705	710	715	720
Ala Arg Glu Gly Arg Arg Met Val Gln Lys Leu Gln Thr Arg Val Arg			

725	730	735	
Glu Leu Glu Ala Glu Phe Asp Ala Glu Ser Arg Arg Cys Lys Glu Ala			
740	745	750	
Leu Ala Ala Ala Arg Lys Phe Glu Arg Gln Tyr Arg Glu Leu Gln Thr			
755	760	765	
Gln Ala Glu Asp Asp Arg Arg Met Val Leu Glu Leu Gln Asp Leu Leu			
770	775	780	
Asp Lys Thr Gln Met Lys Met Lys Ala Tyr Lys Arg Gln Leu Glu Glu			
785	790	795	800

Ala Glu Glu Val Ser Gln Ile Thr Met Asn Lys Tyr Arg Lys Ala Gln		
805	810	815
Gln Gln Ile Glu Glu Ala Glu His Arg Ala Asp Met Ala Glu Arg Thr		

820 825 830
Val Thr Ile Lys Arg Ile Gly Pro Gly Arg Ala Gly Ser Val Val Arg

835 840 845
Glu Leu Ser Val Thr Thr Asn Arg Gly Thr Arg Ala Thr Ser Met Met

850 855 860

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsPmyA forward primer

<400> 8

gtcgacatga gtcacgagtc ggaatca

27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsPmyA reverse primer

<400> 9

aagcttttat tctcagttt ttgacat

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsPmyB forward primer

<400> 10

gtcgacttgc agcggcaact gaatgac

27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsPmyB reverse primer

<400> 11

aagcttttaa tgcaaagcgg atgcaa

27

<210>	12	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CsPmyC forward primer	
<400>	12	
	gtcgactacg aagaactcaa gaggaag	27
<210>	13	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CsPmyC reverse primer	
<400>	13	
	aagcttttac tcgctcgata gctgaat	27
<210>	14	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CsPmyD forward primer	
<400>	14	
	gtcgacgatg cagaagaagc cctgcgg	27
<210>	15	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CsPmyD reverse primer	
<400>	15	
	aagcttttag gcttcgagct cgcgaaac	27
<210>	16	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CsPmyE forward primer	

<400> 16

gtcgacgttg aagagttacg tgggtgcc

27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsPmyE reverse primer

<400> 17

aagcttttac atcatgctcg tcgcgcg

27

<210> 18

<211> 150

<212> PRT

<213> Clonorchis sinensis

<400> 18

Tyr Glu Glu Leu Lys Arg Lys Leu Thr Leu Arg Ile Thr Glu Leu Glu

1	5	10	15
Asp Thr Ala Glu Arg Glu Arg Ala Arg Ala Ser Asn Leu Glu Lys Ile			
20	25	30	
Lys Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ile Lys Asp Leu Gln Asn Glu Val Asp			
35	40	45	
Gly Leu Ser Ala Glu Asn Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ala Lys Ala Ala			
50	55	60	
Glu Ser Leu Ala Asn Asp Leu Gln Arg Arg Leu Asp Glu Met Thr Ile			
65	70	75	80
Glu Ile Asn Asn Leu His Ser Gln Asn Ser Gln Leu Glu Ala Glu Asn			
85	90	95	
Met Arg Leu Lys Ser Gln Val Asn Asp Leu Val Asp Lys Asn Ala Ala			
100	105	110	
Leu Asp Arg Glu Asn Arg Gln Leu Ser Asp Gln Val Lys Glu Leu Lys			
115	120	125	
Ser Thr Leu Arg Asp Ala Asn Arg Arg Leu Thr Asp Leu Glu Ala Leu			
130	135	140	

Arg Ser Gln Leu Glu Ala

145 150

<210> 19

<211> 150

<212> PRT

<213> Clonorchis sinensis

<400> 19

Glu Arg Asp Asn Leu Ala Ser Ala Leu His Asp Ala Glu Glu Ala Leu

1 5 10 15

Arg Glu Val Asp Gln Lys Tyr Gln Asn Ala Gln Ala Ala Leu Asn His

20 25 30

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

35 40 45

Glu Thr Leu Arg Lys Thr Thr Thr Arg Thr Ile Glu Glu Leu Thr Val

50 55 60

Thr Ile Thr Glu Met Glu Val Lys Tyr Lys Ser Glu Leu Ser Arg Leu

65 70 75 80

Lys Lys Arg Tyr Glu Ser Asn Ile Ala Glu Leu Glu Leu Gln Leu Asp

85 90 95

Thr Ala Asn Lys Ala Asn Ala Asn Leu Met Lys Glu Asn Lys Thr Leu

100 105 110

Ala Gln Arg Val Lys Asp Leu Glu Ala Phe Leu Glu Glu Glu Arg Arg

115 120 125

Leu Arg Glu Ala Ala Glu Ser Asn Leu Gln Ala Ser Glu Arg Lys Arg

130 135 140

Ile Gln Leu Ser Ser Glu

145 150

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsPmyC-1 forward primer

<400>	20	
ggatcctacg aagaactcaa gagg		24
<210>	21	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CsPmyC-1 reverse primer	
<400>	21	
aagcttttac gcctcaagtt gagaccg		27
<210>	22	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CsPmyC-2 forward primer	
<400>	22	
ggatccgatg agatgacat tgaa		24
<210>	23	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CsPmyC-2 reverse primer	
<400>	23	
aagcttttat gacttgtatt tcacctc		27
<210>	24	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CsPmyC-3 forward primer	
<400>	24	
ggatccgaac gggataattt ggca		24
<210>	25	
<211>	27	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsPmyC-3 reverse primer

<400> 25

aagcttttac tcgctcgata gctgaat

27