



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월27일
(11) 등록번호 10-2014901
(24) 등록일자 2019년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0043521
(22) 출원일자 2018년04월13일
심사청구일자 2018년04월13일
(56) 선행기술조사문헌
Molecular Biotechnology (2012) 52:129-139
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조병훈
경상남도 진주시 영천강로 172, 1002호(충무공동)
위수환
경상남도 진주시 진주대로568번길 9, 1202호(가좌동)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 8 항

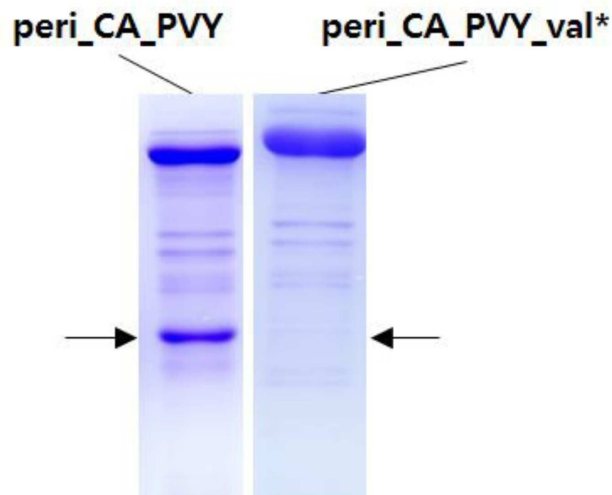
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 단백질에 대한 나노운반체로서의 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 세포간극 표적용 시그널 펩타이드 코딩 유전자; 목적 단백질을 코딩하는 유전자; 및 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질의 돌연변이 유전자;가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터를 이용한 효소에 대한 나노운반체로서의 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 바이러스 유사 입자는 단백질에 대한 나노운반체로서 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 9/88 (2013.01)
C12Y 402/01001 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C12N 2770/34023 (2013.01)
C12N 2770/34051 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

한국생물공학회, 생물공학의 동향 (2017.10)
 p.244
 위수한, "Engineering of Plant Viral Coat Protein in Escherichia coli for Self-assembly of Catalytic Nanofilament", 경상대학교 대학원, 석사학위논문 (2019)
 Nano Letters (2016) 16:3379-3384
 Applied and Environmental Microbiology (2013) 79(21):6697-6705

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525006930
 부처명 해양수산부
 연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원
 연구사업명 해양수산생명공학기술개발
 연구과제명 말미 실크단백질 및 홍합 접착단백질 기반 기능성 복합지혈제 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 포항공과대학교 산학협력단
 연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711067052
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(미래부)
 연구과제명 탄산무수화 효소의 편향된 촉매작용에 관한 새로운 기작 연구
 기 여 율 1/2
 주관기관 경상대학교
 연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

대장균의 세포간극(periplasmic space) 표적용 시그널 펩타이드 코딩 유전자; 목적 단백질을 코딩하는 유전자; 및 감자 바이러스 Y 껍막 단백질의 야생형 유전자인 서열번호 3의 염기서열에서 105번째 및 111번째의 구아닌(guanine)이 각각 티민(thymine)과 시토신(cytosine)으로 치환된 돌연변이 유전자;가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대장균의 세포간극 표적용 시그널 펩타이드 코딩 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 감자 바이러스 Y 유래 껍막 단백질의 돌연변이 유전자 사이에 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 GS 링커를 코딩하는 염기 서열이 삽입된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 목적 단백질은 효소, 항원, 항체, 세포수용체, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질을 이루는 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 효소 단백질은 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 7

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 대장균.

청구항 8

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 대장균을 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 대장균을 배양하여 재조합 바이러스 유사 입자(virus like particle)의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자의 제조방법.

청구항 9

제8항의 방법에 의해 제조된 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자(virus like particle).

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질에 대한 나노운반체로서의 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 바이러스 유사 입자(virus like particle)는 바이러스의 구조 단백질을 유전자 재조합 기술을 이용하여 동물세포, 곤충세포, 식물세포, 박테리아 또는 효모에서 생산하여 바이러스 형태와 유사하게 제조한 단백질 구조체다. 바이러스 유사 입자의 조립은 구조 단백질을 암호화하는 재조합 DNA 분자를 이용하여 적당한 숙주세포를 형질전환시켜 배양하고, 세포 안에서 발현된 구조단백질이 세포 내부 또는 세포 외부에서 조립되는 과정을 거친다.
- [0003] 바이러스 유사 입자는 본래의 바이러스와 유사한 구조를 갖고 있으나, 유전물질을 갖고 있지 않아 증식이 불가능하므로 의약 분야, 생물학적 분야, 나노 기술 분야 등을 포함한 다양한 분야에서 약물 전달체, 진단 물질 등으로 활용될 수 있다.
- [0004] 유전자 재조합 기술이 발달되면서 동물세포, 효모와 같은 진핵생물(eukaryote) 및 대장균과 같은 원핵생물(prokaryote) 등을 이용하여 유용한 목적 단백질이 많이 생산되고 있으며, 이들 단백질이 의약품 등의 생물공학 산업에 널리 이용되고 있다. 특히 대장균은 세포의 성장 속도가 빠르고 그의 유전자에 대한 규명이 다른 생물체에 비해 잘 연구되어 있으므로, 유전자 재조합 기술에서 목적 단백질을 생산하기 위한 숙주세포로 많이 이용되고 있다.
- [0005] 그러나 생산하고자 하는 목적 단백질이 대장균에서 필요 이상으로 과발현(overexpression)되었을 때, 상당수의 단백질들은 완전한 접힘(folding)을 이루지 못하고 다양한 기작에 의해 활성을 잃은 상태의 불용성 봉입체(inclusion body)를 형성하게 된다. 이 봉입체는 대부분 단백질로서의 활성을 가지지 못하므로 이로부터 생물학적 활성을 가진 가용성(soluble) 단백질을 얻기 위해서는 복잡하고 비용이 많이 드는 변성(denaturation) 및 재접힘(refolding) 과정이 필요하다. 따라서 목적 단백질을 세포 내에서 가용성 형태로 대량 생산하는 방법에 대한 관심이 높아지고 있다.
- [0006] 대장균내에서 합성된 재조합 단백질을 세포간극(periplasmic space)으로 분비시키는 방법은 재조합 단백질의 생산 측면에서 여러 가지 장점을 갖는다. 먼저 과발현되는 단백질이 세포질 내에서 봉입체를 형성하기 전에 세포질 밖으로 분비시킴으로써 가용성 형태의 활성 단백질을 만들어 낼 수 있다. 또한, 세포간극에는 세포질에 비해 적은 종류의 단백질이 존재하기 때문에 원하는 유용 단백질을 분리 정제하는데 보다 용이하며, 대부분의 프로테아제(protease)가 존재하는 세포질과 분리되기 때문에 세포내 프로테아제에 의한 분해를 막을 수 있다. 또한, 세포간극의 경우 세포질보다 더욱 산화된 주변 환경에 의하여 이황화(disulfide) 결합의 형성이 훨씬 쉽게 이루어지고 결국 올바른 접힘이 형성되어 봉입체의 형성이 현저히 줄어든다.
- [0007] 한편, 한국공개특허 제2018-0004999호에는 '병원체 유래 항원을 포함하는 융합단백질 및 이를 포함하는 바이러스 유사 입자'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0665054호에는 '유전자 재조합 기법을 이용한 돼지 수포병 바이러스 유사입자 및 그 제조방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 단백질에 대한 나노운반체로서의 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자의 제조방법에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 단백질의 나노운반체로서 이용가능한 바이러스 유사 입자를 제조하기 위해, 세포간극 표적용 시그널 펩타이드 서열, 목적 단백질 서열 및 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질 코딩 서열이 순차적으로 연결된 재조합 벡터를 제작하였다. 본 발명에서는 세포간극 표적을 통해 최종 생산된 바이러스 유사 입자의 안정성이 향상되고, 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질의 유전자 서열에서 2개의 염기 자리를 침묵 돌연변이시켜 재조합 바이러스 유사 입자의 순도가 증진되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 세포간극 표적용 시그널 펩타이드 코딩 유전자; 목적 단백질을 코딩하는 유전자; 및 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질의 돌연변이 유전자;가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 재조합 바이러스 유사 입자(virus like particle)의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자의 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 재조합 벡터 및 이를 이용한 바이러스 유사 입자의 제조방법은 순도 및 안정성이 증가된 재조합 바이러스 유사 입자를 생산할 수 있고, 생산된 재조합 바이러스 유사 입자는 나노촉매, 의약품 전달체, 유전자 치료제 또는 면역치료제 등의 분야에 다양하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질(PVY)과 PVY에 탄산무수화효소(CA)가 융합된 CA-PVY의 발현 경향을 확인한 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 염색 겔 사진의 결과이다. T; 세포 용해물, S; 수용성 분획물, IS; 불용성 분획물, P; 정제된 단백질, 화살표; 재조합 단백질.

도 2는 정제된 CA-PVY(탄산무수화 효소+감자 바이러스 Y의 피막 단백질)와 peri_CA-PVY(세포간극 표적용 시그널 펩타이드+탄산무수화효소+감자 바이러스 Y의 피막 단백질)의 안정도(stability)를 확인한 쿠마씨 블루 염색 겔 사진의 결과이다. M; 마커(marker), before; -20℃에서 보관된 샘플, after; 37℃에서 7일 동안 보관된 샘플, 화살표; 재조합 단백질.

도 3은 peri_CA-PVY와 peri_CA-PVY_val* (침묵 돌연변이가 유발된 감자 바이러스 Y의 피막 단백질)의 발현 순도 향상 효과를 확인한 쿠마씨 블루 염색 겔 사진의 결과이다. 화살표; 비정상적인 크기의 재조합 단백질.

도 4는 전자현미경을 통해 재조합 단백질 PVY, peri_CA-PVY 및 peri_CA-PVY_val*의 형태를 확인한 결과 사진이다. 화살표; 바이러스 유사 입자의 직경.

도 5는 바이러스 유사 입자 peri_CA-PVY_val*에서 탄산무수화효소의 활성을 알아보기 위해 이산화탄소의 수화 활성을 측정한 결과이다. blank; 투석(dialysis) 버퍼를 이용하여 자연적인 이산화탄소 수화반응 시간 측정.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포간극 표적용 시그널 펩타이드 코딩 유전자; 목적 단백질을 코딩하는 유전자; 및 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질의 돌연변이 유전자;가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0015] 본 발명의 재조합 벡터에 있어서, 상기 세포간극 표적용 시그널 펩타이드 코딩 유전자 서열은 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상동체는 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열이다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에서, 상기 세포간극 표적용 시그널 펩타이드는 pelB(pectate lyase subunit), MalE(maltose-binding protein subunit), LamB(maltoporin), LivK(leucine binding protein subunit), PhoA(alkaline phosphatase subunit) 또는 OmpA(outer membrane protein) 동일 수 있고, 바람직하게는 pelB 신호 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에서, 상기 세포간극 표적용 시그널 펩타이드는 대장균의 세포간극(periplasmic space) 신호서열의 일종으로, 본 발명의 재조합 단백질이 발현되면 대장균의 세포간극으로 상기 재조합 단백질을 이동시켜 정확한 이황화 결합을 유도하고, 목적 단백질의 불용성 응집체 형성을 억제하여 불필요한 대장균 유래의 단백질을 최소로 함으로써 정제과정을 용이하게 할 수 있다. 또한, 세포질에서 발현된 재조합 단백질은 접힘(folding)이 일어나기 전에 세포간극으로 이동시키고, 세포질에 존재하는 프로테아제(protease)에 오염되는 것을 저해하여 단백질의 분해를 감소시킴으로써, 재조합 단백질의 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에서, 상기 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질의 돌연변이 유전자는

감자 바이러스 Y 피막 단백질의 야생형 유전자인 서열번호 3의 염기서열에서 105번째 및 111번째의 구아닌(guanine, G)이 각각 티민(thymine, T)과 시토신(cytosine, C)으로 치환된 것으로, 바람직하게는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 3과 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질 코딩 유전자는 동일한 아미노산 서열로 번역된다. 상기 번역된 아미노산 서열 즉, 감자 바이러스 Y 피막 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 염기 치환이 일어난 자리는 치환 전·후 모두 발린(valine)으로 동일하게 번역되며 각각 서열번호 4의 아미노산 서열에서 35번째와 37번째 위치에 해당된다.

- [0019] 상기 감자 바이러스 Y 피막 단백질의 야생형 유전자의 염기 치환은 침묵 돌연변이(silent mutation)를 유발하는데, 침묵 돌연변이는 하나의 염기쌍이 치환되어도 아미노산 서열에는 영향을 미치지 않는 것이 특징이다. 본 발명에서 감자 바이러스 Y 피막 단백질의 야생형 유전자에 침묵 돌연변이를 유발한 이유는, 감자 바이러스 Y 피막 단백질의 야생형 유전자인 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하여 발현시킨 결과, 원래 크기보다 작은 크기의 단백질이 생산되는 것을 확인하였고, 이의 원인을 조사한 결과, 상기 감자 바이러스 Y 피막 단백질의 야생형 유전자인 서열번호 3의 염기서열에서 발린을 코딩하는 35번째 코돈(GTG) 자리가 개시코돈으로 인식되어 잘못된 단백질 번역과정이 유도된 것을 확인할 수 있었다. 이에, 상기 발린 코돈 및 이의 2개 아미노산 뒤에 위치하며 잠재적 개시코돈으로 인식이 가능한 것으로 사료되는 37번째 발린 코돈에서 3번째 위치 염기를 치환시켜 개시코돈으로 인식되지 않도록 하여 정상적인 크기의 재조합 단백질만 발현되도록 하여, 재조합 단백질(바이러스 유사 입자)의 순도를 증진시켰다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에서, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질의 돌연변이 유전자 사이에 GS 링커를 코딩하는 염기 서열이 삽입될 수 있으며, 상기 GS 링커는 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 용어 "목적 단백질(target protein)"은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현 벡터에 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 삽입하여 형질전환체에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.
- [0022] 본 발명의 재조합 벡터에 있어서, 상기 목적 단백질은 의료, 연구용 및 산업용 단백질, 예를 들어, 효소, 항원, 항체, 세포수용체, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 다양한 종류의 단백질일 수 있고, 바람직하게는 효소 단백질일 수 있고, 더욱 바람직하게는 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 또한, 상기 탄산무수화효소는 바람직하게는 하이드로게노비브리오 마리누스(*Hydrogenovibrio marinus*) 유래의 탄산무수화효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 상기 탄산무수화효소는 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 탄산무수화효소를 코딩하는 서열은 서열번호 6의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0026] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.
- [0027] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린, 테트라사이클린 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 본 발명에 따른 형질전환된 숙주세포는 바이러스 유래 피막 단백질 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환되어, 바이러스 유래 피막 단백질과 융합된 재조합 단백질을 발현한다. 상기 바이러스 유래 피막 단백질과 융합된 재조합 단백질은 바이러스 유사 입자(virus like particle)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 벡터를 원핵 세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된

어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* BL21, *E. coli* JM109, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 숙주세포는 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명은 또한,

[0032] 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및

[0033] 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 재조합 바이러스 유사 입자(virus like particle)의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계;를 포함하는 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 순도 및 안정성이 증진된 바이러스 유사 입자를 제공한다.

[0034] 본 발명의 재조합 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은 CaCl_2 방법, 하나한 방법(Hanahan, D., 1983 J. Mol. Biol. 166, 557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다.

[0035] 본 발명의 바이러스 유사 입자의 제조방법에 있어서, 상기 형질전환된 숙주세포의 배양은 공지된 기술을 이용하여 발현시키고자 하는 바이러스 유사 입자의 제조에 적합한 배지에서 이루어질 수 있다. 적합한 배양 배지는 상업적으로 입수하시거나 예를 들면, American Type Culture Collection의 카탈로그와 같은 간행물에 기재된 성분 및 조성비에 따라 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 또한, 본 발명의 바이러스 유사 입자의 제조방법은, 바이러스 유사 입자가 발현된 숙주세포로부터 바이러스 유사 입자를 분리 및 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분리 방법은 예를 들어 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상적인 방법에 의해서 배지로부터 분리될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 나아가 분리된 단백질은 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 투석, 전기영동, 분별 용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하는 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 재료 및 방법

[0039] 1. 균주 배양

[0040] 유전자 재조합 벡터 제작을 위해서는 *E. coli* TOP10 균주를, 단백질 발현을 위해서는 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 사용하였다. 대장균은 Luria-Bertani(LB) 배지에서 37°C, 180 rpm 조건으로 배양하였으며, 필요에 따라 50 μg /mL 암피실린이 첨가되었다. 단백질 발현 시에는 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 첨가 후 온도를 25°C로 낮춰 배양하였다.

[0041] 2. 탄산무수화효소 및 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질이 결합된 융합 단백질(CA-PVY) 클로닝

[0042] 감자 바이러스 Y의 피막 단백질(Potato Virus Y coat protein, 이하, PVY) 유전자는 전체 서열(GenBank accession number; ADH52720)의 유전자 합성을 통해 얻었으며, 5' 말단과 3' 말단에 각각 *Nde*I과 *Xho*I 제한효소 서열을 추가하여 합성하였다. 상기 합성된 유전자를 *Nde*I과 *Xho*I의 동일한 제한효소로 처리된 pET-22b(+) 벡터에 클로닝하였으며, 완성된 벡터는 pET-PVY로 명명되었다.

[0043] 하이드로게노비브리오 마리누스(*Hydrogenovibrio marinus*) DSM 11271 균주 유래의 α -탄산무수화효소 단백질(carbonic anhydrase, 이하, CA; 서열번호 7)과 PVY의 융합 단백질을 제작하기 위해 PCR로 각각의 증폭된 DNA 조각을 획득하였다. 상기 증폭된 CA와 PVY의 PCR 조각 사이에 GS 링커(GGGGSGGGGS; 서열번호 15)가 추가적으로 연결되도록 하였으며, 각각의 PCR 조각 끝부분에 오버랩(overlap) 서열을 갖도록 디자인하였다. 오버랩 PCR을 통해 5' 말단에 *Nde*I과, 3' 말단에 *Xho*I의 제한효소 서열을 가지고 있는 세포질 발현을 위한 CA-PVY의 PCR 산물을 획득하였다. PCR 산물은 pGEM-T Easy 벡터에 클로닝하고 염기서열을 분석한 후 *Nde*I과 *Xho*I 제한효소 서열을 이용하여 발현용 벡터 pET-22b(+)에 클로닝하였다. 완성된 벡터는 pET-CA_PVY로 명명되었다.

[0044] 세포간극(periplasmic space)으로 재조합 단백질을 표적화하기 위한 벡터를 제작하기 위해, 상기 pET-CA_PVY를

주형으로 하여 5' 말단 *Nco*I과 3' 말단 *Xho*I 제한효소 서열을 지니는 PCR 조각을 얻었으며, 이를 pET-CA_PVY와 유사한 과정을 거쳐 pET-22b(+) 벡터에 클로닝하여 최종적으로 pET-peri_CA_PVY를 완성하였다. PCR에 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1과 같고, CA_PVY와 peri_CA_PVY의 C-말단에는 pET-22b 벡터로부터 제공되는 히스티딘 태그(Histidine tag)가 융합되어 있고, peri_CA_PVY의 N-말단에는 pET-22b 벡터로부터 제공되는 세포간극 표적용 시그널 펩타이드(pelB 신호서열)가 연결되어 있다.

표 1

CA-PVY 및 peri-CA-PVY 클로닝을 위한 프라이머 정보

프라이머 명칭	프라이머 서열 (5' → 3') (서열번호)	
CA	F	CATATGGCTGTTCAACATAGCAATGCCCC (8)
CA	R	GCGTCAATGGTGTCTGTTGCCACTGCCTCCACCGCGCTGCCACCTCCGCCGTAA TATTGATAGTAACGGTGATCC (9)
PVY	F	GGCAACGACACCATTG (10)
PVY	R	CTCGAGCATATTTTAAACGCC (11)
peri_CA_PVY	F	CCATGGCTGTTCAACATAGCAATG (12)
peri_CA_PVY	R	CTCGAGCATATTTTAAACGCC (11)

밑줄 : 제한 효소 서열

굵은 글씨체 : GS 연결체(linker) 서열

기울임 글씨체 : 오버랩(overlap) 서열

3. 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질의 돌연변이 유전자 제작

감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질(PVY)의 돌연변이 유전자를 얻기 위해, PVY를 구성하는 아미노산 서열(서열번호 4)의 35번째와 37번째에 해당하는 아미노산 발린(valine)에서 침묵 돌연변이(silent mutation)를 유도하였다. 침묵 돌연변이는 하나의 염기쌍이 치환되어도 발현된 단백질에는 영향을 주지 않는 것이 특징이므로, PVY의 돌연변이 유전자(서열번호 5)로 코딩된 단백질의 아미노산 서열과 PVY의 야생형 유전자(서열번호 3)로 코딩된 단백질의 아미노산 서열은 동일하다.

본 발명에서는 PVY 야생형 유전자의 염기서열(서열번호 3)에서 105번째 및 111번째의 구아닌(G)을 각각 티민(T)과 시토신(C)으로 치환시키기 위해 PCR을 수행하였으며, 최종적으로 pET-peri_CA_PVY_val*을 완성하였다. PCR에 사용된 프라이머 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

침묵 돌연변이를 위한 PCR 프라이머 정보

프라이머 명칭	프라이머 서열 (5' → 3') (서열번호)	
peri_CA_PVY-val*	F	AAGAAAAGGAGAAAGACGTTAACGTCGGCACCAGCGGCA (13)
	R	TGCCGCTGGTGCCGACGTTAACGTCTTTCTCTTTTCTT (14)

4. 단백질 발현 및 세포 분획

상기 제작된 재조합 벡터(pET-PVY, pET-CA_PVY, pET-peri_CA_PVY 및 pET-peri_CA_PVY_val*)를 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 도입하여 37℃, 180 rpm에서 배양하였다. 세포 농도가 OD₆₀₀에서 0.6~0.8에 도달하였을 때, 0.1 mM의 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가한 후 25℃에서 12시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 4℃에서 4,000xg의 조건으로 15분 동안 원심분리하여 세포를 회수하였고, 용해버퍼(lysis buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)를 사용하여 세포를 재현탁(resuspension)시켰다. 상기 현탁된 세포들은 차가운 상태에서 초음파처리(ultrasonication)로 파쇄하였

고, 과쇄액은 4℃에서 10,000xg의 속도로 10분 동안 원심분리하였다. 이 후 상등액은 수용성 분획물(soluble fraction, S)로 명명하였고, 펠렛(pellet)은 동일한 부피의 용해버퍼로 재부유시켜 불용성 분획물(insoluble fraction, IS)로 명명하였다. 각각의 세포 분획물은 이후 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후 쿠마씨 블루(comassie blue) 염색을 통해 재조합 단백질의 발현 양상을 분석하였다.

[0052] **5. 재조합 단백질의 정제**

[0053] 상기 수용성 분획물(S)로부터 얻어진 수용성 분획물에 Ni-NTA 레진(QIAGEN, 독일)를 첨가하여 반응시키고, 비특이적 결합을 최대한 감소시키기 위해 세척버퍼(wash buffer; 50mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 60 mM imidazole, pH 8.0)로 세척한 후, 용출 버퍼(elution buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 단백질을 정제하였으며, 상기 정제된 단백질을 4℃에서 투석 버퍼(dialysis buffer; 20 mM sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, pH 7.5)로 투석시켜 버퍼를 교환하였다. 상기 정제된 재조합 단백질은 바이러스 유사 입자로 사용될 수 있다.

[0054] **6. 재조합 단백질의 N-말단 분석**

[0055] 상기 정제된 단백질을 이용하여 SDS-PAGE를 수행한 후 PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인(Millipore, 미국)에 블롯팅(blotting)한 다음 쿠마씨 블루로 염색하였다. 증류수로 5분간 3번 반복하여 세척한 후에 타겟 단백질의 밴드를 잘라내었다. 이를 Procise 492 sequencer(Applied Biosystems, 미국)를 이용하여 에드만 분해(Edman degradation)를 수행하였다.

[0056] **7. 재조합 단백질의 정량**

[0057] 상기 정제된 단백질을 변성버퍼(denaturing buffer; 6 M guanidine hydrochloride GuHCl/20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5)와 섞어 100℃에서 5분 동안 가열하여 변성시킨 후 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도와 단백질 아미노산 서열을 통해 계산된 280 nm에서의 흡광 계수(extinction coefficient)를 통해 단백질의 농도를 확인하였다. 흡광 계수 계산은 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)을 이용하여 수행되었다.

[0058] **8. 재조합 단백질의 안정성 분석**

[0059] 프로테아제(protease) 오염에 의한 분해 안정성을 알아보기 위해 샘플을 37℃에서 7일 동안 방치한 후 SDS-PAGE 및 쿠마씨 블루 염색을 통해 분석하였다. 대조군은 -20℃에서 냉동 보관한 샘플을 사용하였다.

[0060] **9. 자가조립 효율 측정**

[0061] 샘플을 초고속 원심분리기(XL-90, rotor: SW41 Ti; Beckman, 미국)로 4℃에서 150,000xg의 속도로 1시간 동안 원심분리한 후, 분리 전 총 단백질 농도와 분리 후의 상층액 단백질 농도를 비교함으로써 자가조립 효율을 다음과 같이 계산하였다.

[0062] 자가조립 효율 (%) = $100 \times (1 - \text{분리 후 상층액 단백질 농도} / \text{분리 전 총 단백질 농도})$

[0063] **10. 전자 현미경 분석**

[0064] 전자 현미경 분석은 단백질 샘플을 탄소-코팅된 구리 그리드(carbon-coated copper grid)에 고정화 및 2% 아세트산우라닐(uranyl acetate)로 염색한 후 진공 오븐(vacuum oven)에서 1시간 동안 건조시키고 120 kV 전자현미경 (Tecnai 12; FEI, 미국)으로 분석하였다.

[0065] **11. 탄산무수화효소 활성 측정**

[0066] 탄산무수화효소 활성은 이산화탄소 수화 측정법(CO₂ hydration assay)을 이용하여 분석하였다. 차가운 20 mM Tris 버퍼(100 μM phenol red, pH 8.3) 600 μl를 10 μl의 샘플과 혼합하고 1회용 큐벳에 넣은 후 4℃로 설정된 스펙트로미터(spectrometer)에 넣어 5분 동안 반응시킨 후 차가운 CO₂ 포화용액 400 μl를 빠르게 첨가하여 혼합한 다음 570 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. pH 7.5에 대응하는 흡광도 1.2에서 pH 6.5에 대응하는 흡광도 0.18까지, 흡광도가 떨어지는 데 걸리는 시간(t)을 구하였다. 마찬가지로 샘플 대신 블랭크버퍼(blank buffer; dialysis buffer)를 이용하여 자연적인 이산화탄소 수화 반응에 의해 걸리는 시간(t₀)을 구하였다. 효소 활성 WAU(Wilbur-Anderson Unit)는 (t₀-t)/t를 이용하여 계산하였다.

[0067] **실시예 1. 융합 단백질 CA-PVY의 발현**

[0068] 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질(PVY)과, PVY에 탄산무수화효소(CA)를 결합한 융합단백질 CA_PVY를 각각 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 이용하여 발현시켰다. 그 결과, PVY와 CA_PVY가 수용성 형태의 단백질로 발현·정제되었음을 확인하였다(도 1).

[0069] **실시예 2. CA-PVY의 세포간극 이동을 통한 단백질 분해 억제**

[0070] 정제된 CA_PVY의 안정성을 분석한 결과, -20℃에서 보관(before)된 CA_PVY에서는 단백질 분해가 거의 일어나지 않았으나, 37℃에서 7일 동안 반응(after)시킨 CA_PVY는 단백질 분해가 일어나는 것을 확인함으로써, CA_PVY의 안정도가 높지 않음을 알 수 있었다(도 2).

[0071] 이는 세포 내에서 발현된 CA-PVY가 자가조립된 바이러스 유사 입자 형태로 형성되는 과정에서, 세포질에 존재하는 프로테아제(protease)가 바이러스 유사 입자 내에 포함되어 오염시킴으로써 단백질을 정제함에도 불구하고 단백질 분해가 서서히 일어나기 때문인 것으로 유추되었다.

[0072] 이에, 본 발명에서는 pelB 신호 서열을 이용하여 세포질에서 발현된 재조합 단백질을 접힘(folding)이 일어나기 전에 세포간극(periplasmic space)으로 이동시킨 후 이를 정제하여 형성된 재조합 바이러스 유사 입자의 안정성을 분석하였다. 그 결과, -20℃에서 보관(before)된 peri_CA_PVY와 37℃에서 7일 동안 반응(after)시킨 peri_CA_PVY 모두에서 단백질 분해가 거의 일어나지 않는 것을 확인하였다. 이를 통해, 세포간극 표적화를 통해 재조합 바이러스 유사 입자의 안정성이 증가될 수 있음을 알 수 있었다(도 2).

[0073] **실시예 3. 재조합 단백질 정제 순도 향상을 위한 돌연변이체 개발**

[0074] 상기 실시예 2를 통해 peri_CA_PVY의 안정성이 증가되는 것을 확인하였으나, 여전히 비정상적인 크기의 재조합 단백질(도 3의 화살표)이 발현되었고, 이러한 이유를 확인하기 위해 비정상적인 크기의 단백질 N-말단을 분석하였다. 그 결과, 비정상적인 크기의 단백질은 메티오닌(Met, M)-아스파라진(Asn, N)-발린(Val, V)-글라이신(Gly, G)-트레오닌(Thr, T)의 서열로 시작하는 단백질임을 확인하였다. 또한, PVY의 아미노산 서열도 분석하여 발린(V)-아스파라진(N)-발린(V)-글라이신(G)-트레오닌(T)의 서열이 존재하는 것을 확인하였다.

[0075] 상기 두 서열을 비교·분석한 결과, PVY 아미노산 서열 내의 발린 코돈(GTG)이 개시 코돈으로 인식되어 원래의 재조합 단백질 크기 보다 작은 크기의 재조합 단백질이 발현되어 순도가 감소하는 것으로 판단되었다. 따라서, 상기 발린이 개시 코돈으로 인식되지 못하도록 침묵 돌연변이(silent mutation)를 유발시킨 후 발현된 peri_CA_PVY_val*와 peri_CA_PVY의 발현 순도를 비교하였다.

[0076] 그 결과, peri_CA_PVY에서는 비정상적인 크기의 단백질(화살표)이 발현되었으나, 침묵 돌연변이가 일어난 peri_CA_PVY_val*에서는 비정상적인 크기의 단백질이 발현되지 않았다(도 3). 상기 결과를 통해 pelB 신호 서열 및 침묵 돌연변이가 일어난 PVY를 이용하여 순도 및 안정성이 증진된 재조합 바이러스 유사 입자를 생산할 수 있는 것으로 판단되었다.

[0077] **실시예 4. 전자 현미경을 통한 구조체 관찰**

[0078] 전자 현미경을 통해 바이러스 유사 입자 형태인 재조합 단백질 PVY, peri_CA_PVY 및 peri_CA_PVY_val*의 구조체를 비교하였다. 그 결과, 대조구인 바이러스 유사 입자 PVY는 기존에 알려진 것과 같이 직경이 약 11 nm이고, 바이러스 유사 입자 peri_CA_PVY_val*는 직경이 23 nm인 것으로 보아 바이러스 유사 입자 표면에 탄산무수화효소(CA)가 융합되어 성공적으로 자가조립되었음을 알 수 있었다(도 4).

[0079] 본 발명의 peri_CA_PVY_val* 바이러스 유사 입자는 감자 바이러스 Y 유래 피막 단백질을 이용한 재조합 바이러스 유사 입자의 제조에 관한 기존 연구(Molecular Biotechnology, 2012, 52:129-139)에 비해, 현저히 큰 목적 단백질이 융합되었으나, 성공적으로 바이러스 유사 입자가 자가조립되는 것을 확인하였다.

[0080] **실시예 5. 재조합 바이러스 유사 입자의 형성 효율**

[0081] 고속원심분리를 통한 바이러스 유사 입자의 침전 정도를 분석하여, 재조합 바이러스 유사 입자의 형성 효율을 측정하였다.

[0082] 그 결과, CA_PVY는 65% 수준의 바이러스 유사 입자의 형성 효율을 보였으나, peri_CA_PVY_val*는 80% 수준의 바

이러스 유사 입자 형성 효율을 보였다. 이를 통해, 세포간극 표적화 및 침묵 돌연변이가 유발된 PVY로 인해 재조합 바이러스 유사 입자의 안정성 및 순도가 증가되어, 재조합 바이러스 유사 입자의 형성 효율 또한 향상되었음을 유추할 수 있었다.

[0083] **실시예 6. 자가조립된 바이러스 유사 입자의 활성**

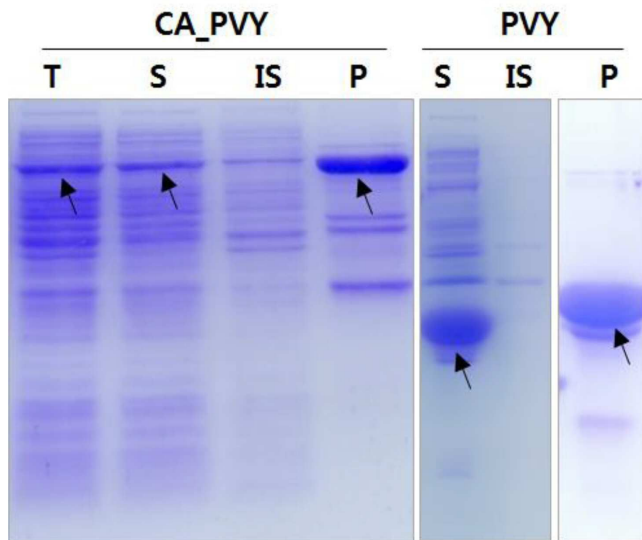
[0084] 자가조립된 바이러스 유사 입자가 실제로 활성을 갖고 있는지 확인하기 위해 이산화탄소 수화 측정법(CO_2 hydration assay)을 통해, 본 발명의 바이러스 유사 입자 내에 포함되어 있는 탄산무수화효소의 활성을 측정하였다.

[0085] 그 결과, peri_CA_PVY_val^* 는 자연적인 이산화탄소 수화 반응(blank)에 비해 이산화탄소 수화 반응 속도가 빠르게 진행되는 것이 관찰되어, 재조합 바이러스 유사 입자의 탄산무수화효소가 활성을 가지고 있음을 확인하였다(도 5). 또한, 효소 활성을 환산한 결과, 2,200 WAU/mg of protein의 높은 활성이 확인되었다.

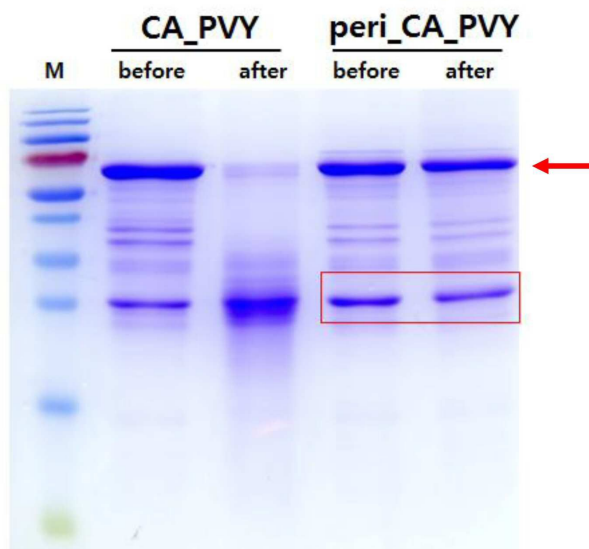
[0086] 이를 통해, 활성을 가진 탄산무수화효소와 감자 바이러스 Y의 껍막 단백질의 융합 단백질이 온전하게 자가조립되어 고집적(high integrated)의 바이러스 유사 입자를 형성했음을 알 수 있었다.

도면

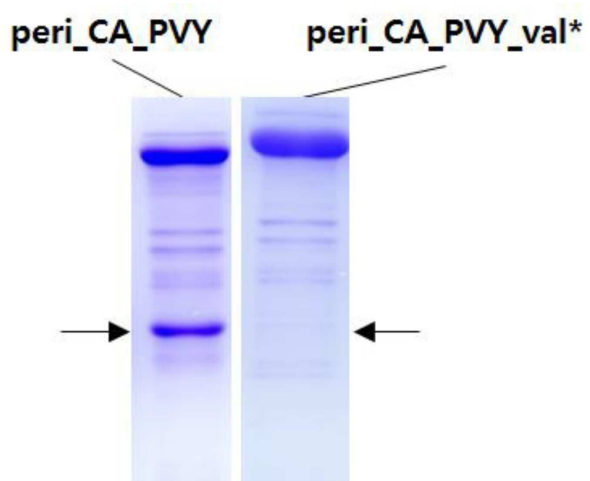
도면1



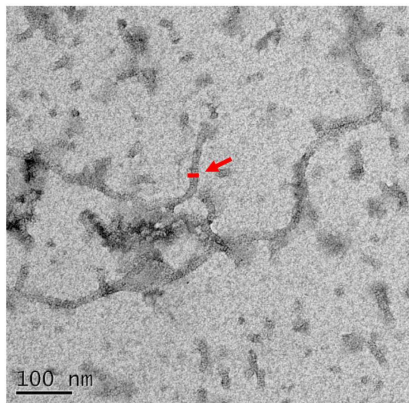
도면2



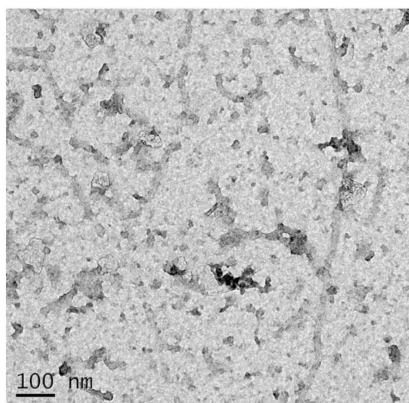
도면3



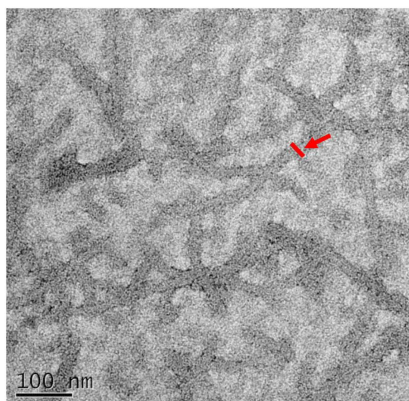
도면4



PVY

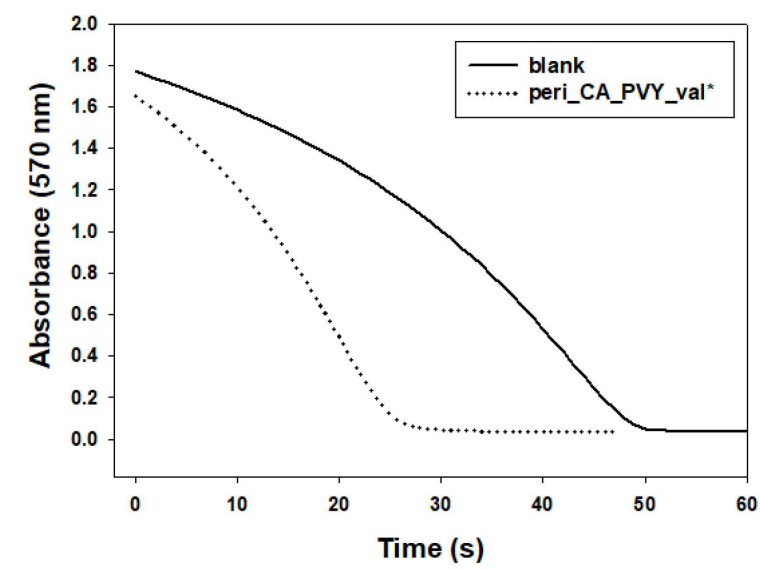


peri_CA_PVY



peri_CA_PVY_val*

도면5



서열 목록

- <110>

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

Method for producing virus like particle with enhanced purity and stability as nanocarrier for protein
- <130>

PN18075
- <160>

15
- <170>

KopatentIn 2.0
- <210>

1
- <211>

66
- <212>

DNA
- <213>

Artificial Sequence
- <220><223>

pelB signal peptide
- <400>

1
- atgaaataacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tctcgctgc ccagccggcg

60
- atggcc

66
- <210>

2
- <211>

22
- <212>

PRT
- <213>

Artificial Sequence
- <220><223>

pelB signal peptide
- <400>

2

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala

20

<210> 3

<211> 807

<212> DNA

<213> Potato virus Y

<400> 3

atgggcaacg acaccattga cgcgggcggc agcaccaaaa aggacgcgaa gcaagaacaa 60

ggcagcatcc aaccgaacct gaataaagaa aaggagaaag acgtgaacgt gggcaccagc 120

ggcacctaca ccgtgccg cg tatcaaggcg attaccagca aaatgcgtat gccgaagagc 180

aaaggcgcga ccgttctgaa cctggagcac ctgctggaat atgcgccga gcaaatcgat 240

attagcaaca ccgtgacgac ccagagccaa ttcgacacct ggtacgaagc ggtgcagctg 300

gcgtacgaca tcggtgaaac cgaaatgccg accgtgatga acggtctgat ggtttggtgc 360

atcgaacacg gcaccagccc gaacattaac ggcgtgtggg ttatgatgga cggatgatgag 420

cagggtggaat acccgctgaa gccgatcgtt gagaacgcga aaccgacct gcgtcaaatt 480

atggcgcaact tcagcgacgt ggcggaggcg tatattgaaa tgcgtaacaa gaaagaaccg 540

tacatgccgc gttatggcct ggttcgtaac ctgcgtgacg gtagcctggc gcgttacgcg 600

ttcgattttt atgaagtac cagccgtacc ccggttcgtg cgcgtaagc gcacatccag 660

atgaaggctg cgcgctgaa aagcgcgcaa agccgtctgt ttggtctgga tgggtggcatt 720

agcacccaag aggaaaacac cgaacgtcac accaccgaag atgttagccc gagcatgcac 780

accctgctgg gcgttaaaaa tatgtga 807

<210> 4

<211> 268

<212> PRT

<213> Potato virus Y

<400> 4

Met Gly Asn Asp Thr Ile Asp Ala Gly Gly Ser Thr Lys Lys Asp Ala

1 5 10 15

Lys Gln Glu Gln Gly Ser Ile Gln Pro Asn Leu Asn Lys Glu Lys Glu

20 25 30

Lys Asp Val Asn Val Gly Thr Ser Gly Thr Tyr Thr Val Pro Arg Ile
 35 40 45
 Lys Ala Ile Thr Ser Lys Met Arg Met Pro Lys Ser Lys Gly Ala Thr
 50 55 60
 Val Leu Asn Leu Glu His Leu Leu Glu Tyr Ala Pro Gln Gln Ile Asp
 65 70 75 80

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

 145 150 155 160
 Met Ala His Phe Ser Asp Val Ala Glu Ala Tyr Ile Glu Met Arg Asn
 165 170 175
 Lys Lys Glu Pro Tyr Met Pro Arg Tyr Gly Leu Val Arg Asn Leu Arg
 180 185 190
 Asp Gly Ser Leu Ala Arg Tyr Ala Phe Asp Phe Tyr Glu Val Thr Ser
 195 200 205
 Arg Thr Pro Val Arg Ala Arg Glu Ala His Ile Gln Met Lys Ala Ala
 210 215 220

 Ala Leu Lys Ser Ala Gln Ser Arg Leu Phe Gly Leu Asp Gly Gly Ile
 225 230 235 240
 Ser Thr Gln Glu Glu Asn Thr Glu Arg His Thr Thr Glu Asp Val Ser
 245 250 255
 Pro Ser Met His Thr Leu Leu Gly Val Lys Asn Met
 260 265
 <210> 5
 <211> 807

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PVY coat protein_valine silent mutant

<400> 5

atgggcaacg acaccattga cgcgggcggc agcaccaaaa aggacgcgaa gcaagaacaa 60

ggcagcatcc aaccgaacct gaataaagaa aaggagaaag acgtgaacgt gggcaccagc 120

ggcacctaca ccgtgccgcg tatcaaggcg attaccagca aaatgcgtat gccgaagagc 180

aaaggcgcga ccgttctgaa cctggagcac ctgctggaat atgcgccgca gcaaatcgat 240

attagcaaca cccgtgcgac ccagagccaa ttcgacacct ggtacgaagc ggtgcagctg 300

gcgtacgaca tcggtgaaac cgaaatgccg accgtgatga acggtctgat ggtttggtgc 360

atcgaaaacg gcaccagccc gaacattaac ggcgtgtggg ttatgatgga cggatgatgag 420

caggtggaat acccgctgaa gccgatcgtt gagaacgcga aaccgaccct gcgtcaaatt 480

atggcgcaact tcagcgacgt ggcgaggcg tatattgaaa tgcgtaacaa gaaagaaccg 540

tacatgccgc gttatggcct gggttcgtaac ctgcgtgacg gtagcctggc gcgttacgcg 600

ttcgattttt atgaagtgcag cagccgtacc ccggttcgtg cgcgtgaagc gcacatccag 660

atgaaggctg cggcgctgaa aagcgcgcaa agccgtctgt ttggtctgga tgggtgcatt 720

agcacccaag aggaaaacac cgaacgtcac accaccgaag atgttagccc gagcatgcac 780

accctgctgg gcgttaaaaa tatgtga 807

<210> 6

<211> 897

<212> DNA

<213> Hydrogenovibrio marinus

<400> 6

atggctgttc aacatagcaa tgccccattg attgacttgg gcgcggaaat gaaaaaacag 60

cacaaggagg cagctccgga aggcgctgcg ccggtcaag gtaaggcacc tgccgcggaa 120

gccaaaaaag aagaagcacc taaacaaaaa ccggttgtgc ataaccaca ttggtcttat 180

tcgggagaag aaggcccgga ccattgggga gacttgtcgc ctgattatgc aacctgtaaa 240

accggcaaaa atcagtcacc aattaacttg atggcagatg atgccgttgg caccacttca 300

ctaccgggct ttgatgtgca ctaccgtgat acggttctta aagtcacaa caacggccac 360

acgtgcaag ccaacgtgcc tttgggtagc tatatcaaaa tcaaaaatca gcgttatgag 420

ctgttgacgt atcattttca taccacctca gaacatcagt tgaacggttt caattatccg 480

atggagtgc atttggttca ccgagatggt cgtgggcatt atctggtaat tggatatttg 540
 ttcagagagg gtaaagagaa cgatgcgttg caaactatcc tgaaccactt gcctaaaaaa 600
 gtcggtaaac aggaaatttt taatggcatt gaatttaate caaatgtctt tttccctgaa 660
 agtaaaaaat tctttaaata cagcggctct ttaaccacac cgccttgtag ggaaggggtt 720
 tattggatgg tgttcaaaca accaatcgaa gcgtcggcgg agcaacttga aaagatgaac 780

gaattaatgg gggcgaatgc tcgtcctgtt caggatttgg aagctcgctc gttgttgaaa 840
 tcttggagca atcctaaaaa cgatagtcag gatcaccgtt actatcaata ttactga 897

<210> 7

<211> 298

<212> PRT

<213> Hydrogenovibrio marinus

<400> 7

Met Ala Val Gln His Ser Asn Ala Pro Leu Ile Asp Leu Gly Ala Glu

1 5 10 15

Met Lys Lys Gln His Lys Glu Ala Ala Pro Glu Gly Ala Ala Pro Ala

20 25 30

Gln Gly Lys Ala Pro Ala Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Ala Pro Lys

35 40 45

Pro Lys Pro Val Val His Asn Pro His Trp Ser Tyr Ser Gly Glu Glu

50 55 60

Gly Pro Asp His Trp Gly Asp Leu Ser Pro Asp Tyr Ala Thr Cys Lys

65 70 75 80

Thr Gly Lys Asn Gln Ser Pro Ile Asn Leu Met Ala Asp Asp Ala Val

85 90 95

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

100 105 110

Leu Lys Val Ile Asn Asn Gly His Thr Leu Gln Ala Asn Val Pro Leu

115 120 125

Gly Ser Tyr Ile Lys Ile Lys Asn Gln Arg Tyr Glu Leu Leu Gln Tyr

130 135 140

His Phe His Thr Pro Ser Glu His Gln Leu Asn Gly Phe Asn Tyr Pro

145 150 155 160

Met Glu Leu His Leu Val His Arg Asp Gly Arg Gly His Tyr Leu Val
165 170 175

Ile Gly Ile Leu Phe Arg Glu Gly Lys Glu Asn Asp Ala Leu Gln Thr
180 185 190

Ile Leu Asn His Leu Pro Lys Lys Val Gly Lys Gln Glu Ile Phe Asn
195 200 205

Gly Ile Glu Phe Asn Pro Asn Val Phe Phe Pro Glu Ser Lys Lys Phe
210 215 220

Phe Lys Tyr Ser Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Thr Glu Gly Val
225 230 235 240

Tyr Trp Met Val Phe Lys Gln Pro Ile Glu Ala Ser Ala Glu Gln Leu
245 250 255

Glu Lys Met Asn Glu Leu Met Gly Ala Asn Ala Arg Pro Val Gln Asp
260 265 270

Leu Glu Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser Trp Ser Asn Pro Lys Asn Asp
275 280 285

Ser Gln Asp His Arg Tyr Tyr Gln Tyr Tyr
290 295

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

catatggctg ttcaacatag caatgcccc 29

<210> 9

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gcgtcaatgg tgtcgttgcc actgcctcca ccgccgtgc cacctccgcc gtaatattga 60

tagtaacggt gatcc	75
<210> 10	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 10	
ggcaacgaca ccattg	16
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 11	
ctcgagcata tttttaacgc c	21
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 12	
ccatggctgt tcaacatagc aatg	24
<210> 13	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 13	
aagaaaagga gaaagacgtt aacgtcggca ccagcggca	39
<210> 14	
<211>	
> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer

<400> 14

tgccgctggg gccgacgtta acgtctttct ccttttctt

39

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GS linker sequence

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10