

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0003160 (43) 공개일자 2018년01월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/569 (2017.01) C12N 9/36 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01) G01N 33/566 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(52) CPC특허분류 G01N 33/56911 (2013.01) C12N 9/2462 (2013.01)		(72) 발명자 이주훈 경기도 수원시 영통구 봉영로 1526, 703동 704호 (영통동, 살구마을아파트)
(21) 출원번호	10-2016-0082644	조재현 대구광역시 북구 동천로 97, 103동 503호 (동천동, 영남네오빌아트아파트)
(22) 출원일자	2016년06월30일	(74) 대리인 특허법인 하나
심사청구일자	2016년06월30일	

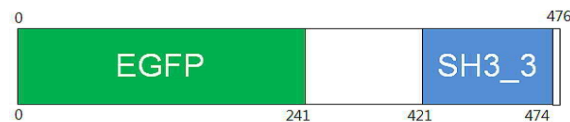
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 미생물 검출용 융합 단백질, 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 미생물 검출용 융합 단백질에 관한 것으로, 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인(cell wall binding domain) 및 형광 단백질(fluorescent protein)을 포함하는 미생물 검출용 융합 단백질이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 21/00 (2013.01)

C12Y 302/01017 (2013.01)

G01N 33/566 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20141396

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 공공복지안전연구사업

연구과제명 Endolysin의 cell-wall binding domain (CBD)을 활용한 식품내 특정 식중독균의 검출 신기

술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2015.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인(cell wall binding domain); 및
형광 단백질(fluorescent protein);을 포함하는 미생물 검출용 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 미생물 검출용 융합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인은 클로스트리듐 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*) 또는 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*)에 특이적으로 결합하는 미생물 검출용 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 형광 단백질은 GFP(green fluorescent protein), EGFP(enhanced green fluorescent protein), GFPuv(cycle 3 variant of GFP), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein) 및 YFP(yellow fluorescent protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나인 미생물 검출용 융합 단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 6

제5항의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 7

제5항의 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및
상기 숙주 세포를 배양하여 융합 단백질을 발현시키는 단계;를 포함하는 미생물 검출용 융합 단백질의 제조 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 미생물 검출용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 엔돌라이신 유래의 세포벽 결합 도메인을 포함하는 미생물 검출용 융합 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단체급식의 확대 및 외식기회 증가 등 식생활 패턴의 변화와 지구 온난화 및 실내 온도 상승 등 환경적인 변화

로 인해 식중독 발생 비율이 점차 증가하고 있으며 규모 면에서 집단화, 대형화되고 있는 실정이므로 식품 안정성 확보를 위한 대책이 시급히 요구되고 있다.

- [0003] 식품 안전성 확보는 식품 안정성 확보를 위한 미생물학적 검사의 유효성을 확보하는 것과 직접적으로 연관된다. 미생물학적 검사의 가장 핵심적인 사항은 식중독 관련 미생물 및 부패미생물의 오염 여부를 판별하고 동정하는 것이다.
- [0004] 식중독의 집단화 및 대형화로 인해 그로 인한 사회적 비용 역시 현저히 증대되고 있으므로 식중독의 예방을 위해 원인균을 조기에 발견하는 것이 중요하다.
- [0005] 그러나 식중독 유발균을 포함하는 병원성 미생물은 통상적으로 고전적인 배지법에 의해 검출되고 있으며, 상기 방법은 장시간의 증균 과정 및 분석 기간이 소요되므로 신속한 검출 결과를 담보할 수 없다.
- [0006] 문제점을 극복하기 위하여 중합효소 연쇄 반응(PCR)이 적용되고 있으나, 양성인지 판단하기 위하여 전기영동법을 수행하여야 하므로 추가 장비 및 시간이 소요되어 신속한 진단에 적합하지 않다.
- [0007] 그 외에도 식중독균을 검출하기 위하여 리포좀을 이용한 화학 발광 면역센서, 실시간 폴리머라제 연쇄반응(PCR), 수정발진자 마이크로밸런스(QCM), 표면플라즈몬 공명(SPR) 등을 이용한 면역 센서법이 개발되고 있으나, 이러한 방법들은 낮은 검출감도로 인해 실용성이 낮을 뿐만 아니라 고가의 장비가 요구되는 단점이 있다.
- [0008] 따라서, 식중독 등 인체에 치명적인 질병을 유발할 수 있는 병원성 미생물을 신속하게 식별할 수 있는 다양한 검출 기술이 개발되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 식품이나 기타 영역에서 특정 미생물에 의한 오염 여부를 용이하게 식별할 수 있는 수단을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 수단의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 측면에 따르면, 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인(cell wall binding domain); 및 형광 단백질(fluorescent protein);을 포함하는 미생물 검출용 융합 단백질이 제공된다.
- [0012] 일 실시예에 있어서, 상기 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [0013] 일 실시예에 있어서, 상기 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인은 클로스트리듐 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*) 또는 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 있어서, 상기 형광 단백질은 GFP(green fluorescent protein), EGFP(enhanced green fluorescent protein), GFPuv(cycle 3 variant of GFP), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein) 및 YFP(yellow fluorescent protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터가 제공된다.
- [0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포가 제공된다.
- [0017] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 융합 단백질을 발현시키는 단계;를 포함하는 미생물 검출용 융합 단백질의 제조 방법이 제공된다.
- [0018] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 융합 단백질을 포함하는 미생물 검출용 조성물이 제공된다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따르면, 상기 융합 단백질은 클로스트리듐 페르프린젠스 및 클로스트리듐 디피실리에 대한 특이적 발광 활성으로 인해 육안으로 식별될 수 있으므로 별도의 장비 없이도 상기 미생물의 오염 여부를 표시할 수 있다.

[0020] 또한, 상기 융합 단백질은 유전 공학적 기술에 의해 저렴한 비용으로 생산될 수 있으므로 경제성이 우수하다.

[0021] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합 단백질의 구조를 도식화한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합 단백질 및 클로스트리듐 페르프린젠스의 상호 반응을 관찰한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합 단백질 및 스탕필로코커스 아우레우스의 상호 반응을 관찰한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0024] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.

[0025] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 적혀지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카복실 방향으로 적혀진다.

[0027] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0028] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합 단백질의 구조를 도식화한 것이다.

[0029] 본 발명의 일 측면에 따르면, 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인(cell wall binding domain); 및 형광 단백질(fluorescent protein);을 포함하는 미생물 검출용 융합 단백질이 제공된다.

[0030] 상기 “단백질”은 “폴리펩티드”와 동의어로 사용될 수 있다. 상기 “단백질”은 특이적 서열 내 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 선형 중합체를 지칭한다. 상기 단백질의 아미노산 잔기는 탄수화물 및 인산염과 같은 다양한 기능기에 의해 개질될 수 있다. 다른 성분들은 헴(heme) 또는 지질과 같이 폴리펩티드 사슬과 더 느슨하게 연결될 수 있으며, 이는 공액(conjugated) 단백질을 생성할 수 있다. 폴리펩티드 사슬이 폴딩되는 다양한 방식들은 알파 나선 및 베타-병풍구조의 존재와 관련된다. 상기 “단백질”은 알파, 베타, 알파/베타 및 알파+베타인 모든 종류의 단백질을 포괄할 수 있다.

[0031] 상기 “융합 단백질”은 2개의 핵산 서열의 융합으로부터 생성되는 발현 산물을 지칭한다. 상기 단백질은 예컨대 재조합 발현 시스템에서 생성될 수 있다. 또한, 상기 “융합 단백질”은 예컨대 제1 아미노산 서열 및 제2 아미노산 서열의 융합을 의미할 수 있다.

[0032] 상기 “펩티드”는 약 2 내지 약 100개의 아미노산 잔기, 더 바람직하게는 약 4 내지 약 50개의 아미노산 잔기, 더 바람직하게는 약 5 내지 약 30개의 아미노산 잔기로 구성된 짧은 폴리펩티드를 나타내며, 여기서 하나의 아미노산 잔기의 아미노기는 펩티드 결합에 의해 다른 아미노산 잔기의 카복실기에 연결될 수 있다. 상기 펩티드는 자연적으로 발생한 펩티드이거나, 또는 합성적으로 설계되고 제조된 펩티드일 수 있다. 펩티드는 예를 들어 효소적 또는 화학적 분해에 의해 천연 단백질로부터 유래되거나 제거될 수 있으며, 또는 통상의 펩티드 합성법(예컨대, 고체상 합성) 또는 분자생물학 기법(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 참조)에 의해 제조될 수 있다.

[0033] 도 1을 참조하면, 상기 융합 단백질은 엔돌라이신에서 유래한 세포벽 결합 도메인 및 형광 단백질을 포함할 수

있다.

- [0034] 상기 엔돌라이신(endolysin)은 박테리아의 세포벽을 가수분해하는 효소로서 박테리아에 대한 용균 활성을 가질 수 있다. 상기 엔돌라이신은 파지 감염 과정에서 홀린(holin)을 매개로 하여 세포막을 통과할 수 있으며 세포벽의 펩티도글리칸 기질로 이동하여 펩티도글리칸을 가수분해할 수 있다. 상기 가수분해에 의해 세포벽에 구멍이 형성될 수 있고 삼투압의 작용으로 세포막이 분해되어 용균 작용이 일어날 수 있다.
- [0035] 상기 엔돌라이신은 하나 이상의 효소적 활성 도메인(EAD)을 포함할 수 있다. 상기 효소적 활성 도메인은 엔도펩티데이즈, N-아세틸무라모일-L-알라닌 아미데이즈, N-아세틸-뮤라미데이즈, N-아세틸-글루코사미데이즈 또는 트랜스글리코실레이즈일 수 있다.
- [0036] 상기 엔돌라이신은 효소적으로 불활성이고 숙주 세균의 세포벽에 결합하는 영역, 즉, 세포벽 결합 도메인(CBD)을 포함할 수 있다. 상기 엔돌라이신은 둘 이상의 세포벽 결합 도메인을 포함할 수 있다. 상기 세포벽 결합 도메인은 박테리아의 표면상에서 다양한 성분과 상호 결합할 수 있다. 상기 세포벽 결합 도메인은 펩티도글리칸 결합 도메인이며, 박테리아의 펩티도글리칸 구조와 결합할 수 있다.
- [0037] 일 실시예에 있어서, 상기 엔돌라이신은 박테리오파지 CPAS-15(ATCC PTA 8480)에서 유래한 엔돌라이신 LysCPAS15일 수 있다. 상기 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [0038] 본 발명자들은 미국 군주 은행(ATCC; American Type Culture Collection)에서 수득한 박테리오파지 CPAS-15의 유전자 서열을 분석하였으며, BlastP(Altschul et al, 1997) 및 Interproscan program(E. Quevillillon, 2005)을 이용하여 종래 엔돌라이신과 유사성이 높은 열린 해독틀(open reading frame)을 발견하고 LysCPAS15으로 명명하였다.
- [0039] 상기 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인은 클로스트리듐 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*) 또는 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0040] 상기 클로스트리듐 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*)는 토양, 먼지, 식품 가공에 사용된 향신료와 같은 원료, 및 동물의 장에서 흔히 발견된다. 상기 클로스트리듐 페르프린젠스가 생산하는 장독소(enterotoxin)는 보통 용혈독과 괴사독이며, 주요 독소는 4종(α , β , ϵ , i)이 존재한다. 상기 독소의 유무에 따라 6종(A 내지 F형)의 독소형(toxigenic type)으로 분류될 수 있다. 상기 클로스트리듐 페르프린젠스는 감염에 의해 페르프린젠스 A형 식중독, 장독소혈증, 괴사성 장염, 및 가스 괴저를 유발할 수 있고, A형균은 대표적인 식중독 원인균이며 C형균은 괴사성 장염의 원인균이다. 특히 가금업에서 클로스트리듐 페르프린젠스의 감염은 육용계(broiler) 무리에 대한 부정적인 경제적 영향과 함께 소화관 건강의 문제를 유발할 수 있다.
- [0041] 최근 양계 산업에 있어 클로스트리듐 페르프린젠스의 감염 및 농가의 피해가 증대되고 있다. 상기 클로스트리듐 페르프린젠스는 큰 규모의 계군에 유행될 수 있을 뿐 아니라 장시간 증상의 발현 없이 잠복할 수 있으므로 피해는 더욱 확대될 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*)는 그람 양성, 혐기성, 포자 형성 미생물이다. 상기 클로스트리듐 디피실리는 약 2 내지 5%의 정상 성인의 장관 내에 정착하여 존재하는 장내 미생물로 보고되고 있다.
- [0043] 상기 클로스트리듐 디피실리는 사람의 병원-감염 소화기 질환의 주된 원인이고, 경증에서 중증의 설사(diarrhea) 및 대장염(colitis)의 범위의 증상을 유발할 수 있다. 암피실린, 아목시실린, 세팔로스포린, 및 클린다마이신과 같은 광범위한 항생제의 치료는 정상 장내 세균총(intestinal flora)의 붕괴를 초래할 수도 있으며, 장내에서 클로스트리듐 디피실리의 콜로니화를 허용할 수 있다(Kelly and Lamont, (1998), Ann. Rev. Med. 49:375-90).
- [0044] 상기 클로스트리듐 디피실리 중 특정 균주는 독소를 생산할 수 있어 중증의 설사, 독성거대결장, 천공, 패혈증, 위막성 대장염을 유발할 수 있다. 상기 병원성 클로스트리듐 디피실리가 생산하는 독소는 장내독소(독소 A), 세포독소(독소 B) 및 2성분 독소(Binary toxin)로 알려져 있으며, 설사와 염증 반응을 야기할 수 있다. 특히, 상기 독소 A는 분비성, 출혈성 설사를 유발하며 독소 B는 세포독소로서 조직배양 세포에서 파괴적인 세포 병변 효과를 나타낼 수 있다.
- [0045] 상기 클로스트리듐 디피실리에 의한 디피실리균성 설사(CDAD)는 주요 유행병 및 치사율의 원인으로 장시간 입원으로 이어지는 의료 비용을 초래할 수 있다. 또한, 상기 클로스트리듐 디피실리는 메트로니다졸 치료에 따라

제발률이 증가하고 있으며 신규 균주들은 항생제에 저항성인 독소를 더 높은 수준으로 생산할 수 있다.

- [0046] 상기 융합 단백질은 상기 세포벽 결합 도메인을 포함하므로 특정 박테리아의 표면에 결합할 수 있다.
- [0047] 또한, 상기 융합 단백질은 형광 단백질을 포함할 수 있다. 상기 융합 단백질은 상기 형광 단백질을 포함하므로 발광에 의해 준부가 용이하게 식별될 수 있다.
- [0048] 상기 엔돌라이신 LysCPAS15에서 유래한 세포벽 결합 도메인은 클로스트리듐 페르프린젠스 또는 클로스트리듐 디피실리에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 융합 단백질은 상기 클로스트리듐 페르프린젠스 또는 클로스트리듐 디피실리에 특이적으로 결합하여 발광하므로, 상기 미생물의 검출의 용도로서 사용될 수 있다.
- [0049] 특히, 상기 융합 단백질은 별도의 장비 없이도 발광 현상이 용이하게 관찰될 수 있고 통상의 유전 공학적 기술에 의해 저렴하게 생산될 수 있으므로 경제성이 우수하다.
- [0050] 이 때, 상기 형광 단백질은 GFP(green fluorescent protein), EGFP(enhanced green fluorescent protein), GFPuv(cycle 3 variant of GFP), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein) 및 YFP(yellow fluorescent protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있으나, 빛을 내거나 변색하는 등 외부에서 용이하게 인식할 수 있는 표지를 포함하는 한 특별히 제한되지 않는다.
- [0051] 또한, 상기 세포벽 결합 도메인은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 단백질의 기능적 동등물을 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 "기능적 동등물"은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 40% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, 서열번호 1의 아미노산 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 가지는 단백질을 의미한다.
- [0053] 상기 "실질적으로 동질의 생리활성"은 상기 세포벽 결합 도메인의 구조적, 기능적 상동성으로 인한 균주-특이적 결합 활성을 의미한다. 상기 "서열 상동성"은 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 대비하여 결정되며, 비교 영역에서의 일부 핵산 서열이 추가 또는 삭제될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 융합 단백질을 포함하는 미생물 검출용 조성물이 제공된다.
- [0055] 상기 미생물 검출용 조성물은 상기 융합 단백질의 활성이 유지될 수 있으면 족하고 가공 형태나 포장 방식 등은 특별히 제한되지 않는다. 상기 미생물 검출용 조성물은 상기 융합 단백질의 미생물-특이적 발광 활성으로 인해 식품이나 기타 생활 영역에서 특정 미생물의 준부를 표시할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제조법 발현 벡터가 제공된다.
- [0057] 상기 발현 벡터는 5'에서 3' 방향으로 프로모터 서열, 형광 단백질 및 세포벽 결합 도메인을 번역 융합(translational fusion)의 형태로 포함할 수 있다.
- [0058] 상기 벡터는 연결되어 있는 핵산 단편을 운반하는 데 이용되는 핵산 분자를 의미한다. 상기 벡터는 박테리아, 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피솜, 바이러스 및 삽입가능한 DNA 단편(즉, 상동재조합에 의해 숙주 세포 게놈 안으로 삽입 가능한 단편)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 플라스미드는 벡터의 일종으로서 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또한, 상기 바이러스 벡터는 추가적인 DNA를 바이러스 게놈 안에 연결시킬 수 있다.
- [0059] 상기 벡터는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는데, 이러한 벡터를 발현 벡터라고 한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에서 발현 벡터는 플라스미드 형태이므로, 용어 플라스미드 및 벡터가 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 바이러스 벡터와 같이 동일한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터들도 포함할 수 있다.
- [0060] 예컨대, 상기 발현 벡터는 pESC-HIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pA0815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAP α A, pGAP α B, pGAP α C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6 α A, pPIC6 α B, pPIC6 α C, pPIC9K, pYC2/CT, pYD1 Yeast Display Vector, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPink™, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418,

pRS420, pRS428, yeast micron A form, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405 또는 pYJ406일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0061] 한편, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고 상기 도입된 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포는 상기 엔돌라이신의 세포벽 결합 도메인 및 형광 단백질을 포함하는 융합 단백질을 생산할 수 있다. 이 때, 상기 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 프로모터는 GPD, TEF, ADH, CYC, INU1, PGK1, PHO5, TRP1, GAL1, GAL10, GUT2, tac, T7, T5, nmt, fbp1, AOX1, AOX2, MOX1 및 FMD1 프로모터로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 숙주 세포 또는 발현 조건 등 다양한 변수를 고려하여 달리할 수 있다.
- [0063] 상기 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 상기 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결될(operably linked) 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다. 즉, 상기 융합 단백질을 암호화하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 발현이 조절될 수 있다.
- [0064] 상기 발현 벡터는 추가적인 조절 서열을 더 포함할 수 있다. 상기 조절 서열은 과지 MS-2의 레플리카아제 유전자의 샤인-달가노 서열 및 박테리오파지 람다의 cII의 샤인-달가노 서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] 또한, 상기 발현 벡터는 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는데 필요한 적절한 마커 유전자를 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자 또는 형광 단백질 유전자일 수 있으며, 상기 항생제 저항성 유전자는 히그로마이신 저항성 유전자, 카나마이신 저항성 유전자, 클로람페니콜 저항성 유전자 및 테트라사이클린 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0066] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 융합 단백질을 암호화하는 외인성의 핵산 서열을 과발현하는 재조합 숙주 세포가 제공된다. 일 실시예에 있어서, 상기 숙주 세포는 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환될 수 있다.
- [0067] 상기 숙주 세포(host cell)는 형질 전환에 의해 대사 조작될 수 있다. 상기 숙주 세포는 발현 벡터에 의한 형질 전환이 용이한 세포를 지칭하는 것으로 유전 공학적 방법에 의해 형질 전환되어 특정의 유전자를 효율적으로 발현할 수 있으면 그 종류는 특별히 제한되지 않는다.
- [0068] 상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 적합한 숙주 세포는 자연적으로 발생하거나 또는 야생형 숙주 세포일 수 있고, 또는 변화된 숙주 세포일 수 있다. 상기 야생형 숙주 세포(wide-type host cell)는 재조합 방법에 의해 유전적으로 변화되지 않은 숙주 세포일 수 있다.
- [0069] 상기 "대사 조작된(metabolically engineered)" 또는 "대사 조작(metabolic engineering)"은 미생물에서 단백질과 같이 목적하는 대사산물의 생산을 위하여, 생합성 유전자, 오페론과 연관된 유전자, 그리고 이들 핵산 서열의 제어 요소(control elements)의 합리적 경로 디자인과 어셈블리를 수반할 수 있다.
- [0070] 상기 "대사 조작된"은 유전자 조작과 적절한 배양 조건을 이용한 전사(transcription), 번역(translation), 단백질 안정성(protein stability)과 단백질 기능성(protein functionality)의 조절과 최적화에 의한 대사 흐름(metabolic flux)의 최적화를 더욱 포함할 수 있다. 생합성 유전자는 숙주에 외래성이거나, 돌연변이유발(mutagenesis), 재조합(recombination) 또는 내인성 숙주 세포에서 이중 발현 제어 서열과의 연관에 의해 변형됨으로써, 숙주(예컨대, 미생물)에 이중성일 수 있다. 적절한 배양 조건은 배양 배지 pH, 이온 강도, 영양 함량 등의 조건, 온도, 산소, 이산화탄소, 질소 함량, 습도, 및 상기 미생물의 물질대사 작용에 의한 화합물의 생산을 가능하게 하는 기타 배양 조건을 포함할 수 있다. 숙주 세포로서 기능할 수 있는 미생물에 적합한 배양 조건은 당해 기술 분야에 널리 알려져 있다.
- [0071] 따라서, 상기 "대사 조작된(engineered)" 또는 "변형된(modified)" 숙주 세포는 유전 물질을 선택된 숙주 또는 부모 미생물 내로 도입하여 세포 생리와 생화학을 변형하거나 변경함으로써 생산될 수 있다. 유전 물질의 도입을 통하여, 부모 미생물은 새로운 성질, 예를 들면, 새로운 세포 내 대사산물 또는 더욱 많은 양의 세포 내 대사산물을 생산하는 능력을 획득할 수 있다.
- [0072] 예컨대, 유전 물질의 부모 미생물 내로의 도입은 화학 물질을 생산하는 새롭거나 변형된 능력을 초래할 수 있다. 부모 미생물에 도입된 유전 물질은 화학 물질 생산을 위한 생합성 경로에 관여하는 하나 이상의 효소를 코딩하는 유전자 또는 유전자의 일부를 포함하고, 이들 유전자의 발현 또는 발현 조절을 위한 추가 구성요소,

예를 들면, 프로모터 서열을 포함할 수도 있다.

- [0073] 상기 "변화된 숙주 세포(altered host cell)"는 유전적으로 설계된 숙주 세포를 의미하며, 여기서 목적 단백질은 발현의 수준으로 생성되거나 발현의 수준보다 더 높은 수준으로 생성되거나 본질적으로 동일한 성장 조건 하에서 성장하는 미변화된 또는 야생형 숙주 세포 내에서의 목적 단백질의 발현의 수준보다 높은 수준으로 발현될 수 있다. "변형 숙주 세포(modified host cell)"은 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 과발현하도록 유전적으로 설계되는 야생형 또는 변화된 숙주 세포를 의미한다. 상기 변형 숙주 세포는 야생형 또는 변화된 모 숙주 세포보다 더 높은 수준으로 목적 단백질을 발현할 수 있다.
- [0074] 한편, 상기 "형질 전환"은 상기 벡터를 미생물 내로 운반하는 방법을 의미하며, 형질 전환 하고자 하는 세포가 원핵세포인 경우에는, CaCl_2 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.
- [0075] 형질 전환 하고자 하는 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell. Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990))등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] 효모와 같은 진균의 형질 전환의 경우, 일반적으로 리튬 아세테이트(Lithium acetate, R.D. Gietz, Yeast 11, 355360(1995)) 및 열 충격(Keisuke Matsuura, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 100, 5:538-544(2005))을 이용한 형질 전환법과 전기천공법(Nina SkoluckaAsian, Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 94-98(2011))에 의해 실시될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 융합 단백질을 발현시키는 단계;를 포함하는 미생물 검출용 융합 단백질의 제조 방법이 제공된다.
- [0078] 상기 형질 전환된 숙주 세포는 배치, 공급-배치 또는 연속 발효 조건 하에서 배양될 수 있으며, 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 상기 융합 단백질을 발현할 수 있으므로 상기 배양된 숙주 세포로부터 상기 융합 단백질을 수득할 수 있다.
- [0079] 이 때, 고전적인 배치 발효 방법은 폐쇄적인 시스템을 사용할 수 있고, 상기 배양 매질은 발효가 실행되기 전에 제조되며, 상기 매질에 유기체를 접종하고, 상기 매질에 어떠한 성분의 첨가도 없이 발효가 일어날 수 있다. 특정한 경우에서, 성장 매질의 상기 탄소원 내용물이 아닌, 상기 pH 및 산소 함량은 배치 방법 동안 변화될 수 있다. 배치 시스템의 상기 대사물 및 세포 바이오매스는 끊임없이 발효가 정지될 때까지 변화할 수 있다. 배치 시스템에서, 세포는 정지된 지체 상에서 고도성장 로그 상에 걸쳐 진척하고, 성장율이 감소되거나 멈춘 최종적으로 정지 상에 이를 수 있다. 일반적인 기간에서, 로그 상의 상기 세포는 대부분의 단백질을 만들 수 있다.
- [0080] 표준 배치 시스템의 변형은 "공급-배치 발효" 시스템이다. 상기 시스템에서, 영양(예를 들면, 탄소원, 질소원, O_2 , 및 통상적으로, 다른 영양)은 이들의 배양물의 농도가 한계치 미만으로 떨어질 때 첨가될 수 있다. 공급-배치 시스템은 이화 생성물 억제가 세포의 대사를 억제하고, 매질이 매질 내에서 영양소를 제한된 양으로 갖는 것이 바람직할 때 유용할 수 있다, 공급-배치 시스템에서의 실제 영양 농도의 측정은 pH, 용존 산소 및 CO_2 와 같은 폐기가스의 부분압과 같은 측정 가능한 인자의 변화에 기초하여 예측될 수 있다. 배치 및 공급-배치 발효는 일반적인 시스템으로서 당업계에서 널리 알려져 있다.
- [0081] 계속적 발효는 정의된 배양 매질이 계속해서 생반응기(bioreactor)에 첨가되고, 조건화된 매질의 동일한 양이 과정 동안 동시에 제거되는 개방 시스템이다. 계속적 발효는 일반적으로 세포가 처음에는 로그 상 성장에 있는 일정한 고 밀도의 배양물을 유지할 수 있다. 계속적 발효는 세포 성장 또는 마지막 생성물 농도에 영향을 미치는 하나의 인자 또는 임의의 수의 인자의 조작이 가능할 수 있다.
- [0082] 예를 들어, 탄소원 또는 질소원과 같은 제한 영양소는 고정된 속도로, 모든 다른 파라미터는 적당하게 유지될 수 있다. 다른 시스템에서, 많은 성장에 영향을 주는 인자는 배치 탁도에 의해 측정되는 세포 농도가 일정하게 유지되는 동안, 계속해서 변화할 수 있다. 계속적 시스템은 일정한 상태의 성장 조건을 유지하려고 한다. 따라서, 매질이 빠져나가는 것에 의한 세포 손실은 발효에서의 세포 성장 속도에 대항하여 균형이 맞을 수 있다. 생

성물 형성의 속도를 최대화하는 기술뿐만 아니라, 계속적 발효 과정 동안 영양소 및 성장인자를 유지하는 방법은 당업계에 알려져 있다.

[0083] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0084] 제조예 1 : 엔돌라이신 LysCPAS15의 분리 및 정제

[0085] 미국 균주 은행(ATCC)에서 수득한 박테리오파지 CPAS-15(ATCC PTA 8480)의 유전자서열을 분석한 뒤, BlastP(Altschul et al, 1997) 및 Interproscan program(E. Quevillillon, 2005)을 이용하여 엔돌라이신과 유사성이 높은 1236개의 염기쌍인 열린 해독틀(open reading frame)을 발견하고 LysCPAS15으로 명명하였다.

[0086] LysCPAS15은 2종의 아미노산 서열을 포함하는 것으로 분석되었으며, EAD 영역(enzymatically active domain)으로 알려진 N-아세틸무라모일-L-알라닌 아미데이즈(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase) 및 세포벽 결합 도메인(CBD)으로 알려진 SH3_3의 아미노산의 서열이 확인되었다.

[0087] 제조예 2 : 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)의 제조

[0088] 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 이용하여 엔돌라이신 LysCPAS15의 세포벽 결합 도메인을 암호화하는 유전자를 증폭하였다.

[0089] 정방향 프라이머(GGATCCGGAGGTAGTACTCCAAGCAT) 및 역방향 프라이머(CTCGAGCTAACTATCTCTACATATT)을 사용하여 중합효소 연쇄 반응(94℃ 3 분 94℃ 0.5 분 55℃ 0.5 분 72℃ 1 분 25 사이클, 다시 72℃ 10 분)을 수행하였다.

[0090] 중합효소 연쇄 반응에 의해 증폭된 산물을 EGFP가 클로닝된 pET28a에 도입하여 발현 벡터를 완성하였다.

[0091] 상기 제작된 벡터는 숙주 세포인 *E. coli* BL21에 전기천공법으로 도입(Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545에 의한 형질 전환법 이용) 되었으며 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 형질 전환된 숙주 세포를 선별하였다.

[0092] 선별된 숙주 세포를 LB 복합배지(Trypton 10g/l, yeast extract 5g/l, NaCl 10g/l)에서 배양하고, 상기 융합 단백질의 발현을 유도하였다.

[0093] 실험예 1 : 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)의 생화학적 특성 분석

[0094] 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)의 내열성을 평가하고자 -20 내지 80℃ 사이의 온도에서 보관한 후 효소활성을 측정하였다. 해당 온도에서 보관된 각각의 효소를 효소 저장 버퍼(Tris-HCl buffer)에 희석하고 활성을 측정하였다.

[0095] 상기 융합 단백질은 노출시간을 150밀리초로 하였을 때 -20 내지 60℃에서 클로스트리듐 페르프린젠스에 결합하여 발광하였으며, 노출시간을 500밀리초로 하였을 때 70℃에서도 관찰되었다.

[0096] 또한, 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)의 내산성을 평가하고자 pH 2 내지 pH 12의 조건에서 보관한 후 효소 활성을 측정하였다. 해당 pH에서 보관된 각각의 효소를 효소 저장 버퍼(Tris-HCl buffer)에 희석하고 활성을 측정하였다.

[0097] 상기 융합 단백질은 노출시간을 150밀리초로 하였을 때 pH 4 내지 pH 8의 범위에서 클로스트리듐 페르프린젠스와 반응하여 발광하였으며, 노출시간을 500밀리초로 하였을 때 pH 2에서도 관찰되었다.

[0098] 실험예 2 : 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)의 항균 활성 분석

[0099] 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)을 정제한 후 다양한 미생물에 대한 항균 활성을 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0100]	구분	효소 활성
	그램-양성 박테리아 (Gram-positive bacteria)	
	<i>C. perfringens</i> ATCC 3624	+++
	<i>C. perfringens</i> KTCC 3269	+++
	<i>C. perfringens</i> NCTC 8798	+++
	<i>C. perfringens</i> NCTC 8239	+++

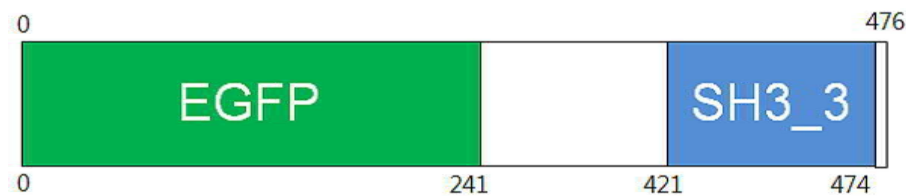
<i>C. perfringens</i> FD-1	+++
<i>C. difficile</i> ATCC 9689	+++
<i>C. indolis</i> ATCC 25771	-
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	-
<i>C. beijerinckii</i>	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 21772	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 21768	-
<i>Bacillus licheniformis</i> JCM 2505	-
<i>Bacillus pumilus</i> JCM 2508	-
<i>Bacillus circulans</i> JCM 2504	-
<i>Bacillus megaterium</i> JCM 2506	-
<i>Bacillus mycoides</i> ATCC 6452	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-
<i>Staphylococcus aureus</i> RN 4220	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35983	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 27276	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	-
그람-음성 박테리아 (Gram-negative bacteria)	
<i>Salmonella Typhimurium</i> SL 1344	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> DT 104	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> LT2c	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	-
<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43890	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43894	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	-

- [0102] 활성 측정 결과 그람 양성균인 클로스트리듐 페르프린젠스 및 클로스트리듐 디피실리와 특이적인 발광 반응이 확인된 반면, 그 이외의 미생물에 대한 결합 활성이 나타나지 않았다.
- [0103] 상기 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)은 클로스트리듐 페르프린젠스 및 클로스트리듐 디피실리와 특이적으로 결합하고 발광하므로 상기 미생물의 존재를 표시할 수 있다. 특히 발광 반응은 별도의 장비 없이도 식별이 가능하므로 융합 단백질을 이용하여 상기 미생물의 존재를 용이하게 식별할 수 있다.
- [0104] 실험예 3 : 식품에서의 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)의 활성 분석
- [0105] 식품에서 병원성 미생물의 검출여부를 확인하고자, 신선한 우유에 인위적으로 클로스트리듐 페르프린젠스를 감염(spiking)시킨 후, 5시간 동안 미생물이 증식하도록 일정 시간 배양하였다.
- [0106] 또한, 대조군으로 신선한 우유에 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)을 감염시킨 후 5시간 동안 증식시켰다.
- [0107] 클로스트리듐 페르프린젠스를 증식시킨 시료에 상기 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)을 일정량 투입한 후 발광여부를 관찰한 결과, 상기 융합 단백질은 클로스트리듐 페르프린젠스와 특이적으로 반응하여 상기 미생물의 존재가 용이하게 식별되었다(도 2).
- [0108] 반면, 스태필로코커스 아우레우스를 오염시킨 시료는 융합 단백질을 투입하였음에도 불구하고 발광 반응이 관찰되지 않았다(도 3).

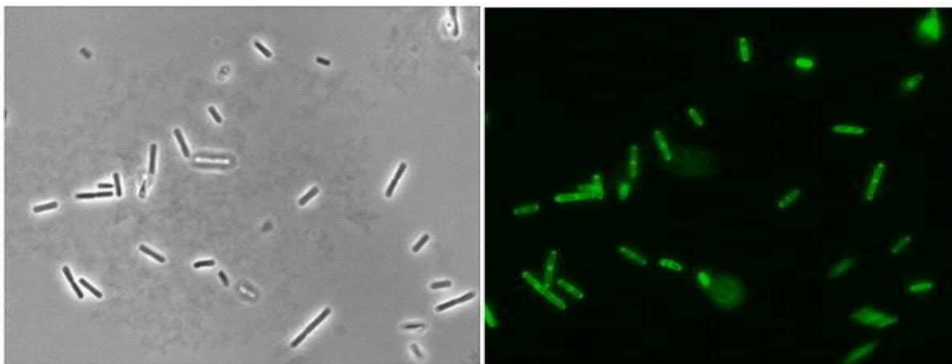
- [0109] 따라서 상기 융합 단백질(EGFP-CBD-CPAS15)의 투입에 따라 클로스트리듐 페르프린젠스 및 클로스트리듐 디피실리에 의한 오염 여부를 용이하게 식별할 수 있다.
- [0110] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0111] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

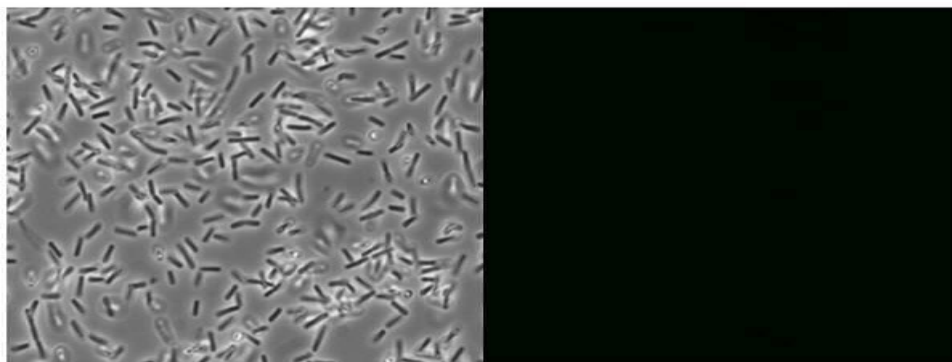
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> kyung hee university
 <120> FUSION PROTEIN FOR DETECTING MICROORGANISM, AND PREPARATION
 METHOD THEREOF
 <130> 16PP10934
 <160> 1
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LysCPAS15 cell wall binding domain
 <400> 1

Gly Gly Ser Thr Pro Ser Ile Pro Ala Asp Asn Asn Pro Lys Gly Phe
 1 5 10 15
 Tyr Glu Ser Asn Glu Thr Arg Thr Asn Ala Thr Leu Val Gly Glu Gly
 20 25 30
 Ser Ile Glu Val Leu Asp Glu Asp Cys Lys Pro Val Pro Gly Arg Phe
 35 40 45
 Ile Asp Ser Leu Asp Asn Leu Phe Val Leu Gly Ile Tyr Pro Ser Arg
 50 55 60
 Asn Phe Ile Glu Val Val Tyr Pro Gly Lys Asn Lys Lys Tyr His Ala
 65 70 75 80
 Tyr Ile Asp Ile Lys His Tyr Ser Arg Leu Ser Phe Asp Tyr His Met
 85 90 95
 Lys Tyr Gln Asn Asp Asn Gly Val Thr Tyr Val Trp Trp Asn Pro Glu
 100 105 110
 Asp Val Asn Ile Lys Asp His Asn Glu Glu Leu Gln Pro Gly Gln Lys
 115 120 125
 Ala Ser Pro Met Tyr Arg Thr Asn Gly Trp Leu Arg Ile Thr Phe Tyr
 130 135 140
 Arg Lys Asp Gly Thr Pro Ser Asp Gly Tyr Val Arg Tyr Glu Gly Glu
 145 150 155 160

Gln Ser Gln Lys Phe Tyr Glu Asp Val Lys Gln Gly Ile Val Lys Val

165

170

175

Asn Thr Ser Leu Asn Val Arg Asp Asp Val Asn Gly Asn Ile Ile Gly

180

185

190

Ser Val Phe Ser Asn Glu Arg Val Thr Ile Leu Gly Ser Lys Asn Gly

195

200

205

Trp Tyr His Ile Glu Tyr Asn Thr Ser His Gly Lys Lys Gln Gly Tyr

210

215

220

Val Ser Ser Lys Tyr Val Glu Ile Val

225

230