



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0061486
(43) 공개일자 2018년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/88 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/86 (2006.01) G01N 33/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/88 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0159653
(22) 출원일자 2016년11월28일
심사청구일자 2016년12월08일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(72) 발명자
오상석
서울특별시 용산구 녹사평대로 168-12 (이태원동) 박지용
광주광역시 북구 첨단과기로 123 C동 1201호 (오룡동,교수아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

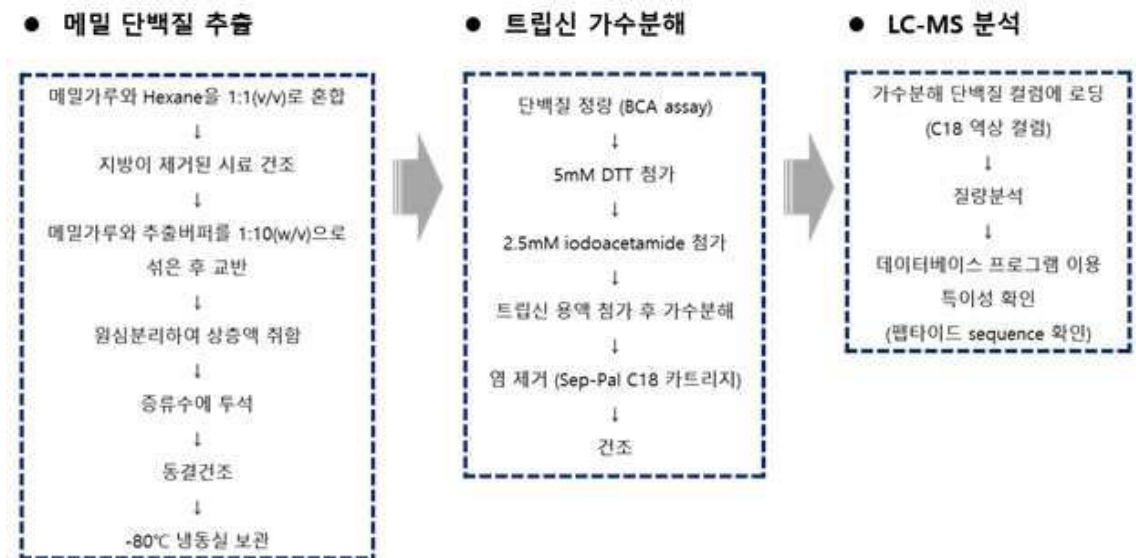
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 식품 내 메밀 알레르겐 검출용 펩타이드 및 이를 이용한 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 식품 내 메밀 알레르겐 검출용 메밀 단백질 유래의 마커 펩타이드 및 이를 이용하여 식품 내 메밀 알레르겐을 검출하는 방법으로서, 종래 검출법 대비 검출 민감도가 높을 뿐 아니라 가공된 식품 또는 매트릭스 내에서도 안정적으로 메밀 알레르겐을 검출할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 30/86 (2013.01)

G01N 33/02 (2013.01)

(72) 발명자

이채윤

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 221동 1101호(신천동, 파크리오)

최승미

경기도 부천시 원미구 도약로 206, 213동 903호 (약대동, 두산위브트레지움)

구용의

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 만수2길 12

오현숙

대구광역시 달서구 장산남로 33, 108동 2206호(용산동, 용산롯데캐슬그랜드)

이정미

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 87, 501동 1002호 (모아미래도아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1475009201

부처명 식품의약품안전처

연구관리전문기관 식품의약품안전평가원

연구사업명 식품등안전관리

연구과제명 알레르기 유발식품 안전관리를 위한 연구(1)

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2016.01.01~2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 식품 내 메밀 알레르겐 검출용 마커 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 마커 펩타이드의 액체 크로마토그래피-질량분석(LC-MS)스펙트럼과 시료의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 비교하여 식품 내 메밀 알레르겐을 특이적으로 검출하는 것인, 마커 펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 액체 크로마토그래피-질량 분석은 선택 반응 모니터링(Selected reaction monitoring, SRM) 모드 및 데이터 의존적 습득(Data dependant acquisition, DDA) 모드로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 모드에서 수행되는 것인, 마커 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 마커 펩타이드의 검출 한계가 0.01 내지 0.7nM인 것인, 마커 펩타이드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 마커 펩타이드는,

분자량이 1420.50Da,

전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 711.41m/z, 및

생성 이온의 질량 대비 전하 값이 803.5 (y6), 966.46 (y7), 및 1095.5 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 것을 특징으로 하는, 마커 펩타이드.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 마커 펩타이드는,

분자량이 1344.50Da,

전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 673.63m/z, 및

생성 이온의 질량 대비 전하 값이 417.85 (y4), 564.9 (y5) 및 937.4 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 것을 특징으로 하는, 마커 펩타이드.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 마커 펩타이드는,

분자량이 1528.5Da,

전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 765.43m/z, 및

생성 이온의 질량 대비 전하 값이 488.34 (y4), 803.45 (y6) 및 973.52 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 것을 특징으로 하는 마커 펩타이드.

청구항 8

서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 마커 펩타이드를 이용하여 식품 내 메밀 알레르겐을 특이적으로 검출하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 검출 방법은

시료 내 단백질을 분리하는 단계;

상기 분리된 단백질을 가수분해하는 단계;

상기 가수분해된 단백질을 액체 크로마토그래피-질량분석(LC-MS)하는 단계; 및

상기 분석 결과를 이용하여 서열번호 1 내지 3의 서열로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 마커 펩타이드 존재 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 검출 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 액체 크로마토그래피-질량 분석은 선택 반응 모니터링(Selected reaction monitoring, SRM) 모드 및 데이터 의존적 습득(Data dependant acquisition, DDA) 모드로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 모드에서 수행되는 것인, 검출 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 마커 펩타이드 존재 여부 확인 단계는 액체 크로마토그래피-질량분석으로 도출된 분자량, 전구체 이온의 질량 대비 전하 값 및 생성 이온의 질량 대비 전하 값으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼과 비교하여 식품 내 메밀 알레르겐이 있는 것으로 결정하는 것인, 검출 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 가수분해된 단백질의 LC-MS 분석결과,

분자량이 1420.50Da,

전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 711.41m/z, 및

생성 이온의 질량 대비 전하 값이 803.5 (y6), 966.46 (y7), 및 1095.5 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 경우 식품 내 상기 서열번호 1의 서열로 이루어진 마커 펩타이드가 존재하는 것으로 결정하는 것인, 검출 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 가수분해된 단백질의 LC-MS 분석결과,

분자량이 1344.50Da,

전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 673.63m/z, 및

생성 이온의 질량 대비 전하 값이 417.85 (y4), 564.9 (y5) 및 937.4 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 경우 식품 내 상기 서열번호 2의 서열로 이루어진 마커 펩타이드가 존재하는 것으로 결정하는 것인, 검출 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 가수분해된 단백질의 LC-MS 분석결과,

분자량이 1528.5Da,

전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 765.43m/z, 및

생성 이온의 질량 대비 전하 값이 488.34 (y4), 803.45 (y6) 및 973.52 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 경우 식품 내 상기 서열번호 3의 서열로 이루어진 마커 펩타이드가 존재하는 것으로 결정하는 것인, 검출 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 가수분해는 트립신에 의해 이루어지는 것인, 검출 방법.

청구항 16

제8항에 있어서, 상기 식품은 가루 과자, 시리얼, 국수, 라면, 차 및 쿠키로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인 것인, 검출 방법.

청구항 17

식품 내 메밀 알레르겐 검출용 마커 펩타이드를 스크리닝하는 방법으로서, 메밀 단백질을 추출하는 단계; 상기 분리된 단백질을 가수분해하는 단계; 상기 가수분해된 단백질을 질량분석(MS)하는 단계; 및 후보 마커 펩타이드 선정 단계를 포함하는, 스크리닝 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 후보 선정 단계는

메밀 단백질에 해당하는 단백질을 선별하는 단계,

메밀 외 곡류 또는 씨앗류에 존재하는 펩타이드를 제외하는 단계,

이론적 가수분해 결과와 비교하여 일치하지 않는 펩타이드를 제외하는 단계,

메밀의 주요 알레르겐 내 포함된 펩타이드를 선별하는 단계,

2종 이상의 가공 식품 내 존재하는 펩타이드를 선별하는 단계,

펩타이드 길이가 11 내지 13mer인 펩타이드를 선별하는 단계 및

피크 강도가 5 내지 13인 펩타이드를 선별하는 단계로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 선별단계를 포함하는 것인, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식품 내 메밀 알레르겐을 검출하기 위한 신규 마커 펩타이드 및 이의 LC/MS 분석을 통한 식품 내 메밀 알레르겐의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 메밀은 마디풀과(Polygonacea)에 속하는 식물로, 메밀의 영양학적 가치가 알려지면서 전 세계적인 섭취가 늘고 있으나 한국과 일본에서 주요 알레르기 유발 식품으로 국내외에서 식품알 레르겐 검출법 연구가 활발히 진행되고 있다. 메밀의 종류 중 보통메밀 (Fagopyrum esculentum 또는 Fagopyrum esculentum MOENCH)과 타타리메밀 또는 쓴메밀 (Fagopyrum taticum)이 주로 식품으로 이용된다.

[0004] 현재까지 알려져 있는 메밀의 주요 알레르겐은 16, 19, 24 kDa 단백질이지만 최근 환자 혈청을 이용한 allergenicity를 확인한 연구들에서는 이 세 가지 이외에도 9 kDa, 14 kDa, 30 kDa, 43 kDa, 67 kDa과 split 19 kDa 또한 메밀의 알레르겐으로 밝혀졌다. 메밀 알레르기 증상이 없는 환자의 혈청에서도 24 kDa, 16 kDa 및 9 kDa과 결합하는 것으로 나타나(Park et al., Allergy. 55: 1035-1041, 2000) 메밀 알레르겐에 대한 보다 정확하고 체계적인 연구의 필요성이 대두되고 있다.

[0005] WHO-IUIS에는 보통메밀의 주요 알레르겐으로 24 kDa으로 알려진 Fag e1과 16 kDa인 Fag e2, 그리고 19 kDa의 Fag e3 세 가지 알레르겐이 등록되어있다. 반면 Allergome에는 WHO-IUIS에 등록된 3 가지 알레르겐 외에 Fag e T1이라는 trypsin inhibitor도 포함되어 있다. Fag e1은 Urisu의 논문(Urisu et al., Shinshu University Press, Matsumoto, Japan, pp. 965-974, 1995)에 의해 밝혀진 24 kDa의 주요 알레르겐을 의미하며 현재까지 가장 많은 연구에서 주요 메밀 알레르겐으로 다루고 있는 단백질이다. 이는 11-12S globulin의 β chain으로 추측

된다. ag e2는 2S albumin에 속하는 16 kDa의 알레르겐이며 최근 연구에서 α -amylase/trypsin inhibitor와 38%의 homology를 보였다. Fag e3는 7S Vicilin-like globulins이며, 최근 연구에서 쌀의 2S storage albumin과 50%의 homology를 나타내었다. Fag e T1은 WHO-IUIS에서는 포함하고 있지 않은 알레르겐이며 trypsin inhibitor로서 기능을 하며, 9 kDa 알레르겐이 Fag e T1과 동일한 것으로 밝혀졌다(Park et al., Allergy. 55: 1035-1041, 2000).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 식품 내 메밀 알레르겐 검출용 마커 펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 마커 펩타이드를 이용하여 식품 내 메밀 알레르겐을 특이적으로 검출하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 메밀은 한국과 일본의 주요 알레르기 유발 식품으로서, 국내외적으로 LC-MS를 이용한 식품알레르겐 검출법 연구가 활발히 진행되고 있으나 주로 밀, 계란, 우유 등 서구의 주요 알레르기 유발식품에 대한 연구가 다수이다. 본 출원인은 LC-MS 분석법을 이용한 메밀 알레르겐 검출법 연구하여 식품 내 메밀 알레르겐을 우수한 민감도로 특이적으로 검출할 수 있는 마커 펩타이드를 개발하였다.
- [0012] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0013] 본 발명의 일예에서, 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 식품 내 메밀 알레르겐 검출용 마커 펩타이드를 제공한다.

표 1

서열번호	아미노산 서열
서열번호 1	VP E E Y E E E L Q R
서열번호 2	A G N E G L E W V E L K
서열번호 3	Q Q G Y D D E E F G Q G R

- [0016] 상기 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열의 마커 펩타이드는 메밀 단백질 유래인 것으로서, 액체 크로마토그래피-질량분석법(LC-MS)에 의해 식품 내 메밀 알레르겐을 특이적으로 검출할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 상기 식품 내 메밀 알레르겐을 검출하기 위해 액체 크로마토그래피-질량분석을 실시하는 경우, 선택 반응 모니터링(Selected reaction monitoring, SRM) 모드 및/또는 데이터 의존적 습득(Data dependant acquisition, DDA)모드로 수행할 수 있다. MS/MS 주사 기법에서 생성 이온 스펙트럼이 선구 이온(precursor ion)의 충돌 유발 분해에 의해 생성되고, 한 개 또는 여러 개의 특정 토막이 검출되는데, SRM 기법은 가장 감도가 좋고 선택성이 좋으며, 다단계 MS에서의 SIM 기법으로 사용된다. 선택 반응 모니터링(Selected reaction monitoring, SRM)은 토막화 반응을 선택하는 MS/MS 방법으로서 LC/MS/MS에서 감도, 즉 신호 대 잡음비(S/N)를 증가시켜서 미량 분석을 하는 데 사용되고 있는 방법이다.
- [0018] 예를 들어, 상기 LC-MS 분석에 의한 마커 펩타이드 스크리닝을 위한 모니터링 단계에서는 DDA 모드의 LC-MS 분석을 사용할 수 있고, 상기 식품 내 알레르겐 검출을 위한 시료 분석 시에는 SRM 모드의 LC-MS 분석을 사용할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 마커 펩타이드는 펩타이드 길이가 11 내지 13mer으로, 시료를 LC-MS 분석, 바람직하게는 SRM 모드로

LC-MS 분석하는데 적합하며, 특히 Fag e1 및 Fag e3과 같은 주요 메밀 알레르겐을 검출할 수 있는 것을 특징으로 한다. 특히 본 발명의 마커 펩타이드는 LC-MS 분석하는 경우 강도(intensity)가 높아 메밀 알레르겐의 검출이 용이하다.

- [0020] 종래 식품 알레르겐을 검출하는 방법으로 PCR, 면역학적 방법으로서 ELISA가 이용되고 있으나 PCR 방법의 경우 DNA를 검출하는 간접적인 방법이며 ELISA 또한 위음성 및 위양성 결과의 단점(비슷한 구조를 가진 다른 식품 단백질과 반응하는 교차반응성이 있을 수 있음)이 있으나, 본 발명의 LC-MS 분석법에 의하는 경우 식품 내 메밀 알레르겐을 직접 검출할 수 있을 뿐 아니라 검출 정확성이 높아 유용하다.
- [0021] 본 발명의 마커 펩타이드의 전구체 이온(precursor ion)의 질량 대 전하비(m/z), 전구체 이온의 전하 및 생성 이온(product ion)의 질량 대 전하비(m/z)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼, 바람직하게는 DDA 모드 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼과, 시료 단백질의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼, 바람직하게는 SRM 모드의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 비교하여 식품 내 메밀 알레르겐이 있는 것으로 결정할 수 있다.
- [0022] 상기 분자량 MW(Da)는 펩타이드의 분자량, 전구체 LC-MS 기법에서 CID를 위하여 선택되는 이온의 질량 대비 전하 값(m/z)을 의미하며 전하(charge)는 전구체 이온의 전하를, 생성 이온은 MS/MS에서 선택된 전구체 이온에 의해서 CID에 의해 생성된 이온의 질량 대비 전하값(m/z)을 의미한다.
- [0023] 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 마커 펩타이드는 메밀 단백질 13S 글로불린(globulin), 바람직하게는 Fag e 1의 메밀 알레르겐을 검출하는 것을 특징으로 한다. 상기 서열번호 1의 서열을 갖는 마커 펩타이드는 펩타이드의 분자량이 1420.50Da, 전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 711.41m/z, 전구체 이온 전하가 +2 및 생성 이온의 질량 대비 전하 값이 803.5 (y6), 966.46 (y7), 및 1095.5 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 것을 특징으로 하며 바람직하게는 상기 검출 스펙트럼을 모두 만족한다. 상기 서열번호 1의 서열을 갖는 마커 펩타이드는 열처리 등 가공 안정성이 높아 메밀을 포함하는 가공 식품, 예를 들어 메밀 가루, 메밀 과자, 메밀 국수, 메밀 소바 라면 및 메밀 쿠키 내 메밀 알레르겐을 특이적으로 검출할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 마커 펩타이드는 메밀 단백질 13S 글로불린(globulin), 바람직하게는 Fag e 1의 메밀 알레르겐을 검출하는 것을 특징으로 한다. 상기 서열번호 2의 서열을 갖는 마커 펩타이드는 펩타이드의 분자량이 1344.5Da, 전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 673.63m/z, 전구체 이온 전하가 +2 및 생성 이온의 질량 대비 전하 값이 417.85 (y4), 564.9 (y5) 및 937.4 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 것을 특징으로 하며 바람직하게는 상기 검출 스펙트럼을 모두 만족한다. 상기 서열번호 2의 서열을 갖는 마커 펩타이드는 열처리 등 가공 안정성이 높아 메밀을 포함하는 가공 식품, 예를 들어 메밀 가루, 메밀 차, 메밀 과자, 메밀 시리얼 및 메밀 국수 내 메밀 알레르겐을 특이적으로 검출할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 마커 펩타이드는 메밀 단백질 비실린 유사 단백질(Vicilin-like protein), 바람직하게는 Fag e 3 메밀 알레르겐을 검출하는 것을 특징으로 한다. 상기 서열번호 3의 서열을 갖는 마커 펩타이드는 펩타이드의 분자량이 1528.5Da, 전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 765.43m/z, 전구체 이온 전하가 +2 및 생성 이온의 질량 대비 전하 값이 488.34 (y4), 803.45 (y6) 및 973.52 (y8)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 것을 특징으로 하며 바람직하게는 상기 검출 스펙트럼을 모두 만족한다. 상기 서열번호 3의 서열을 갖는 마커 펩타이드는 열처리 등 가공 안정성이 높아 메밀을 포함하는 가공 식품, 예를 들어 메밀 가루, 메밀 차, 메밀 과자, 메밀 시리얼, 메밀 국수 및 메밀 쿠키 내 메밀 알레르겐을 특이적으로 검출할 수 있다.
- [0026] 상기 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열의 마커 펩타이드의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼은 바람직하게는 SRM 모드에서의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼이다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 일 예로서 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 마커 펩타이드를 이용하여 식품 내 메밀 알레르겐을 특이적으로 검출하는 방법을 제공한다.
- [0029] 상기 메밀 알레르겐 검출용 마커 펩타이드에 관한 사항은 메밀 알레르겐 검출 방법에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 검출 방법은, 액체 크로마토그래피-질량분석법(LC-MS)을 사용하는 것을 특징으로 하며, 예를 들어 시

료 내 단백질을 분리하는 단계; 상기 분리된 단백질을 가수분해하는 단계; 상기 가수분해된 단백질을 LC-MS 분석하는 단계; 및 상기 분석 결과를 이용하여 서열번호 1 내지 3의 서열로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 마커 펩타이드 존재 여부를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0031] 상기 액체 크로마토그래피-질량 분석 단계는 SRM 모드 및/또는 DDA 모드로 수행될 수 있으며, 상기 마커 펩타이드 존재 여부 확인단계는 가수분해된 단백질을 SRM 모드 LC-MS 분석법으로 도출된 LC-MS 스펙트럼을 사용할 수 있다.

[0032] 상기 마커 펩타이드 존재 여부 확인 단계는 LC-MS 분석법으로 도출된 분자량, 전구체 이온(precursor ion)의 질량 대 전하비(m/z), 전구체 이온의 전하 및 생성 이온(product ion)의 질량 대 전하비(m/z)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 검출 스펙트럼과 비교하여 식품 내 메밀 알레르겐이 있는 것으로 결정할 수 있다. 상기 분자량 MW(Da)는 펩타이드의 분자량, 전구체 이온은 LC-MS 기법에서 CID를 위하여 선택되는 이온의 질량 대비 전하 값(m/z)을 의미하며 전하(charge)는 전구체 이온의 전하를, 생성 이온은 MS/MS에서 선택된 전구체 이온에 의해서 CID에 의해 생성된 이온의 질량 대비 전하값(m/z)을 의미한다(김택제 등, 기체, 액체 크로마토그래피 및 질량 분석학, 2009).

[0033] 예를 들어, 상기 가수분해된 단백질의 LC-MS 분석결과, 분자량이 1420.50Da, 전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 711.41 m/z , 전구체 이온 전하가 +2 및 생성 이온의 질량 대비 전하 값이 803.5 (y6), 966.46 (y7), 및 1095.5 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 경우 식품 내 상기 서열번호 1의 서열로 이루어진 마커 펩타이드가 존재하는 것으로 결정할 수 있으며, 바람직하게는 상기 검출 스펙트럼 모두와 동일한 경우 서열번호 1의 마커 펩타이드가 존재하는 것으로 결정할 수 있다.

[0034] 상기 가수분해된 단백질의 LC-MS 분석결과, 분자량이 1344.5Da, 전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 673.63 m/z , 전구체 이온 전하가 +2, 및 생성 이온의 질량 대비 전하 값이 417.85 (y4), 564.9 (y5) 및 937.4 (y8)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 경우 식품 내 상기 서열번호 2의 서열로 이루어진 마커 펩타이드가 존재하는 것으로 결정할 수 있으며, 바람직하게는 상기 검출 스펙트럼 모두와 동일한 경우 서열번호 2의 마커 펩타이드가 존재하는 것으로 결정할 수 있다.

[0035] 또한, 상기 가수분해된 단백질의 LC-MS 분석결과, 분자량이 1528.5Da, 전구체 이온의 질량 대비 전하 값이 765.43 m/z , 전구체 이온 전하가 +2, 및 생성 이온의 질량 대비 전하 값이 488.34 (y4), 803.45 (y6) 및 973.52 (y8)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 액체 크로마토그래피-질량분석 스펙트럼을 갖는 경우 식품 내 상기 서열번호 3의 서열로 이루어진 마커 펩타이드가 존재하는 것으로 결정할 수 있으며, 바람직하게는 상기 검출 스펙트럼 모두와 동일한 경우 서열번호 3의 마커 펩타이드가 존재하는 것으로 결정할 수 있다.

[0036] 상기 단백질의 가수분해는 LC-MS 분석 전 전처리 하는 과정으로서, 트립신, 펩신, 펩티데이즈 등을 사용할 수 있으나, 트립신이 바람직하다. 트립신은 단백질 함량 100중량%를 기준으로 2 내지 4중량%로 추가하여 반응시킬 수 있으며, 반응시간은 예를 들어 12 내지 16시간 처리할 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 일 예로서, 식품 내 메밀 알레르겐 검출용 마커 펩타이드를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0039] 상기 메밀 알레르겐 검출용 마커 펩타이드에 관한 사항은 마커 펩타이드의 스크리닝 방법에 동일하게 적용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 스크리닝 방법은 메밀 단백질을 추출하는 단계; 상기 분리된 단백질을 가수분해하는 단계; 상기 가수분해된 단백질을 액체 크로마토그래피-질량분석(LC-MS)하는 단계; 및 후보 마커 펩타이드 선정 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 질량 분석 단계 후, 메밀 단백질에 해당하는 단백질을 선별하는 단계(예, Sorcerer 프로그램 및 Scaffold 프로그램 이용), 메밀 외 곡류 또는 씨앗류에 존재하는 펩타이드를 제외하는 단계(예, BLAST 프로그램 이용), 이론적 가수분해 결과와 비교하여 일치하지 않는 펩타이드를 제외하는 단계(예, PeptideMass 프로그램 이용), 주요 알레르겐 내 포함된 펩타이드를 선별하는 단계, 2종 이상의 가공 식품 내 존재하는 펩타이드를 선별하는 단계, 펩타이드 길이가 5 내지 25mer인 펩타이드를 선별하는 단계 및 피크 강도가 5 내지 13, 바람직하게는 8 내지 9인 펩타이드를 선별하는 단계로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 선별단계를 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 스크리닝 방법에서 사용되는 액체 크로마토그래피-질량분석(LC-MS) 단계는 SRM 모드 및/또는 DDA 모드에서 수행될 수 있으며, DDA 모드에서의 LC-MS 분석이 바람직하다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명은 식품 내 메밀 알레르겐 검출용 메밀 단백질 유래의 마커 펩타이드 및 이를 이용하여 식품 내 메밀 알레르겐을 검출하는 방법으로서, 종래 검출법 대비 검출 민감도가 높을 뿐 아니라, 항원-항체반응을 이용한 검출법 혹은 DNA를 검출하는 PCR 방법의 위양성 및 위음성 없이 식품 내 메밀 알레르겐을 직접 검출할 수 있으며, 가공된 식품 또는 매트릭스 내에서도 안정적으로 메밀 알레르겐을 검출할 수 있어 활용도가 높다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 본 발명의 일예에 따라 메밀 알레르겐 검출용 마커 펩타이드를 스크리닝하는 방법을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일예에 따라 시료인 메밀가루 내 메밀 알레르겐을 검출하는 방법을 나타낸 것이다.
- 도 3a 내지 도 3c는 각각 서열번호 1 내지 3의 메밀 마커 펩타이드의 SRM mode를 이용한 LC-MS 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4a 내지 도 4c는 각각 서열번호 1 내지 3의 메밀 마커 펩타이드를 다양한 농도로 SRM mode를 이용한 LC-MS 분석 결과 값(피크의 면적)으로 나타낸 표준 곡선이다.
- 도 5a 내지 도 5c는 각각 서열번호 1 내지 3의 메밀 마커 펩타이드를 매트릭스 내에서 다양한 농도로 SRM mode를 이용한 LC-MS 분석 결과 값(피크의 면적)으로 나타낸 표준 곡선이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 하기 예시적인 실시예를 들어 본 발명을 더욱 자세히 설명할 것이나, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예로 한정되는 의도는 아니다.

[0048] 실시예 1. 메밀 펩타이드

[0049] 1.1 메밀 단백질 추출

- [0050] 메밀 가루(봉평농협, 한국)와 헥산(hexane)을 1:1의 부피비로 혼합한 후 2시간 동안 교반하였다. 상기 교반에 의해 지방이 제거된 시료를 흡수지에서 6시간동안 건조하였다. 상기 지방이 제거된 시료와 0.033M NaHCO₃ 및 0.0186M의 NaCl을 포함하는 추출 버퍼를 1:10(w/v)로 혼합한 후 4℃의 온도에서 16시간 동안 교반하였다. 교반한 혼합물을 14,000xg로 30분동안 원심분리하여 상층액을 분리하고 이를 증류수에 4시간 동안 투석하여 동결건조하고 -80℃의 온도에서 냉동실 보관 하였다.

[0052] 1.2 트립신 가수분해

- [0053] 실시예 1.1에서 분리한 메밀 단백질을 BCA assay로 정량 후 8M Urea, 25mM Tris buffer를 이용하여 1 µg/µL로 희석하고 37℃의 온도에서 30분동안 5mM DTT를 첨가하고 2.5mM 아이오도아세타미드(iodoacetamide)를 첨가하여 37℃의 온도에서 30분동안 암반응하였다. 트립신 효소를 trypsin resuspension buffer (Promega, WI, USA)에 녹여 0.2 µg/µL로 희석 후 메밀 단백질 중량의 1/50에 해당하는 중량의 트립신을 상기 시료에 첨가한 후 37℃의 온도에서 16시간 동안 가수분해 하였다. 5%의 포름산(formic acid)를 첨가한 후 Sep-Pal C18 카트리지를 이용하여 염을 제거하고 SpeedVac으로 말려 0.1% FA에 녹였다.

[0055] 1.3 마커 펩타이드 후보 선정

- [0056] 1.2에서 트립신 가수분해한 단백질을 C18 역상 컬럼에 로딩한 후 Ion trap을 이용하여 DDA mode에서 질량 분석하였다. 이동상은 0.1% 포름산(formic acid), 0.1% 포름산(formic acid)이 포함된 80% ACN(acetonitrile)를 사용하였다. Sorcerer 프로그램을 이용하여 통상적인 일반 메밀(Fagopyrum esculentum) 단백질 데이터베이스에 대한 펩타이드 선정하고 Scaffold 프로그램을 이용하여 신뢰도 높은 결과 선별하였다. 분석기기는 Agilent 1100

Series HPLC pump (Agilent, Waldbronn, Germany)와 연결된 linear quadrupole ion trap mass spectrometer (LTQ, Thermo Finnigan, CA, USA)를 이용하였으며, in-house-built nano-ESI interface를 이용하였다.

[0057] 그 결과 도출된 펩타이드는 111개이며, 13S globulin 유래가 83개, Induced immature seed protein 유래가 8개, 1-Cys peroxiredoxin 유래가 4개, 16kDa allergen 유래가 6개, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유래가 3개, Vicilin-like protein 유래가 5개, inhibitor isoform 유래가 2개이다. 이는 globulin이 메밀 단백질의 70%를 차지한다는 사실과 일치한다.

[0059] 1.4 BLAST 프로그램을 이용한 펩타이드 추가 선별

[0060] 실시예 1.2의 펩타이드 111개의 메밀 특이성 여부를 확인하기 위하여 NCBI BLAST 프로그램을 이용하였다. 타타리 메밀(*Fagopyrum tataricum*)에 존재하는 펩타이드 15개, 벼, 밀, 옥수수, 보리, 호밀, 귀리와 같은 곡류에 존재하는 펩타이드 2개, 대두, 땅콩, 캐슈, 호두, 브라질넛, 참깨와 같은 씨앗류에 존재하는 펩타이드 2개를 제외하였다.

[0061] 예를 들어 서열번호 4(GFIVQAQDLK)의 펩타이드의 경우 타타리 메밀에, 서열번호 5(ADIFNPR)의 펩타이드의 경우 대두에, 서열번호 6(LSFLYPATTGR)의 펩타이드의 경우 타타리 메밀, 옥수수 및 대두에도 존재하여 대상 펩타이드에서 제외되었다.

[0063] 1.5 PeptideMass 프로그램을 이용한 펩타이드 추가 선별

[0064] 메밀 단백질의 서열을 PeptideMass 프로그램에 입력하여 이론적으로 트립신 분해한 결과와 실제 트립신을 사용하여 상기 실시예 1.2의 방법으로 가수분해한 후 LC-MS 분석한 결과를 비교하여 결과가 일치하지 않는 펩타이드를 제외하였다. 상기 실시예 1.4의 펩타이드 중 14개가 이론상의 결과와 일치하지 않아 제외되어 78개의 펩타이드를 선별하였다.

[0065] 예를 들어 서열번호 9(LRLPEESEELQR)의 펩타이드는 단백질을 이론상 분해한 in silico digestion 결과와 일치하지 않아 마커 펩타이드 후보에서 제외되었다.

[0067] 1.6 주요 알레르겐 내 펩타이드 선별

[0068] 실시예 1.5에서 선별된 78개 펩타이드 중 메밀의 주요 알레르겐 내 펩타이드를 다시 선별하였다. 주요 알레르겐 중 Fag e 1에 해당하는 펩타이드는 23개, Fag e 2에 해당하는 펩타이드는 3개, Fag e 3에 해당하는 펩타이드는 1개로 총 27개 펩타이드를 선별하였다.

[0070] 1.7 가공 방법에 따른 메밀 펩타이드 유무에 따른 펩타이드 선별

[0071] 메밀 가공식품 종류에 따라 존재하는 메밀 펩타이드의 분포가 다를 수 있어, 실시예 1.5에서 선별된 78개 펩타이드 중 대표적인 메밀 가공식품 5종, 즉 메밀 가루(전원식품), 메밀 국수(홈플러스 생 메밀면), 메밀 소바 라면(농심 메밀소바), 메밀 차(녹차원) 및 메밀 쿠키(해살이뜰)에 포함된 메밀 펩타이드와 일치하는 펩타이드를 비교하고 그 결과를 아래 표 2에 나타내었다.

표 2

메밀 가공식품	일치 펩타이드 수
메밀 가루	66
메밀 국수	61
메밀 소바 라면	2
메밀 차	15
메밀 쿠키	42

[0074] 상기 가공 식품 종류에 따른 메밀 펩타이드 분포 결과에서 2종 이상의 가공 식품에 존재하고 상기 실시예 1.6의 선별 결과와 일치하는 펩타이드 8개를 마커 펩타이드로 선정하였다.

[0075] 예를 들어 서열번호 7(AEPGLTGDTFDSAGFK)의 펩타이드는 메밀 가공식품 중 메밀 쿠키에만 존재하고, 서열번호 8(AIVLPEGSAPVR) 및 서열번호 10(QVGNPTGGVGAPGTTGAFQTS DPLGAPGSTAGLTHQDPTAIPR)의 펩타이드는 메밀 가루에만 존재하여 펩타이드 마커 후보에서 제외되었다.

[0077] 1.8 펩타이드 길이 및 피크 강도를 고려한 마커 펩타이드 선정

[0078] 실시예 1.7의 8개 펩타이드 중 LC-MS 분석 시 펩타이드의 길이가 5mer 미만, 또는 25mer를 초과하는 경우 분석 결과가 잘 나오지 않으므로 펩타이드 길이가 5 내지 25mer인 펩타이드만을 선별하였다. 또한 LC-MS 분석 시 피크 강도(Intensity), 즉 샘플에 해당 펩타이드가 스펙트럼이 몇 번 존재하는지를 나타내는 값이 높게 나올수록 샘플 내 해당 펩타이드가 많이 존재하여 검출에 용이하다는 점을 고려하여, 피크 강도가 낮게 나오는 펩타이드를 제외하여 최종적으로 아래 표 3의 3개의 펩타이드를 메밀 마커 펩타이드로 선별하였다.

[0079] 예를 들어 서열번호 10(LLAEALGTEETVRK)의 펩타이드는 메밀국수, 메밀가루, 메밀쿠키에서 검출되며 아미노산 개수가 15개로 길이 또한 적합하나, signal intensity가 2로 적게 존재하여 메밀 알레르겐 마커 펩타이드로는 적합하지 않아 후보에서 제외되었다.

표 3

특징	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
서열	VPEEYEEELQR	AGNEGLEWVELK	QQGYDDEEFGQGR
출처 단백질	13S globulin	13S globulin	Vicilin-like protein
펩타이드 길이(mer)	11	12	13
Intensity (스펙트럼 수)	9	8	9
Allergome	Fag e1	Fag e1	Fag e3
검출된 가공 식품	가루, 국수, 소바라면, 차	가루, 국수	가루, 국수, 쿠키

[0082] 실시예 2. 마커 펩타이드 검출 조건 확립

[0083] 실시예 1에서 선별된 3개 마커 펩타이드의 트랜지션을 확인하기 위해 SRM mode에서 LC-MS 스펙트럼을 확인하였다. 각 펩타이드의 트랜지션 중 가장 강도가 높은 트랜지션을 3개씩 선택하였다.

[0084] 상기 각 펩타이드의 분자량 및 트랜지션을 표 4 및 도 3a 내지 도 3c에 나타내었다.

표 4

서열번호	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
아미노산 서열	VPEEYEEELQR	AGNEGLEWVELK	QQGYDDEEFGQGR
출처 단백질	13S globulin	13S globulin	Vicilin-like protein
MW(Da)	1420.5	1344.5	1528.5
Precursor ion 질량대비 전하(m/z)	711.41	673.63	765.43
Precursor ion Charge	+2	+2	+2
Product Ion 질량 대비 전하(m/z)	803.5 (y6) 966.46 (y7) 1095.5 (y8)	417.85 (y4) 564.9 (y5) 937.4 (y8)	488.34 (y4) 803.45 (y6) 973.52 (y8)
RT(min)	31.76	41.86	28.46

[0087] 상기 트랜지션을 바탕으로, SRM mode LC-MS 분석에서 서열번호 1 내지 3의 검출 조건을 확립하였다.

[0089] 실시예 3. 표준 곡선 확인

[0090] 3.1 메틸 펩타이드 표준 곡선 확인

[0091] 실시예 1에서 선별된 3개 마커 펩타이드의 표준 곡선을 확인하였다. 3개 마커 펩타이드를 각각 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100nM (또는 fmol/ μ L)의 농도로 0.1% 포름산에 희석하고 상기 실시예 2의 검출 조건으로 각 펩타이드를 SRM mode에서 LC-MS 분석한 결과를 각각 도 4a 내지 도 4c의 표준곡선으로 나타내었다. 3개 마커 펩타이드의 최소 검출 수준은 모두 0.1nM으로 검출 민감도가 매우 높은 것을 확인하였다.

[0093] 3.2 식품 내 메틸 펩타이드 표준 곡선 확인

[0094] 메틸 펩타이드가 매트릭스가 존재하는 경우에도 검출 특이성(민감도)을 유지하는 것인지 확인하기 위하여, 실시예 1의 3개 마커 펩타이드를 우유 단백질에 첨가하여 표준 곡선 및 최소 검출 수준을 도출하였다. 상기 실시예 1.2의 방법으로 트립신 가수분해한 우유 단백질을 0.1 μ g에 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100nM (또는 fmol/ μ L)의 농도로 0.1% 포름산에 희석하고 상기 실시예 2의 검출 조건으로 각 펩타이드를 SRM mode에서 LC-MS를 분석한 결과를 각각 도 5a 내지 도 5c의 표준곡선으로 나타내었다. 3개 마커 펩타이드의 최소 검출 수준은 모두 0.5nM으로 매트릭스 내에서도 검출 민감도가 높은 수준으로 유지하고 있음을 확인하였다.

[0096] 실시예 4. LC-MS 분석에 의한 메틸 알레르겐 검출

[0097] 4.1 시료 전처리

[0098] 메틸 가루(전원식품), 메틸 국수(홈플러스 생 메밀면), 메밀 소바 라면(농심 메밀 소바), 메밀 차(녹차원) 및 메밀 쿠키(해살이뜰)에 대하여 실시예 1.1와 동일한 방법으로 단백질을 추출 한 후 실시예 1.2와 동일한 방법으로 트립신 가수분해를 하여 전처리된 시료를 준비하였다.

[0100] 4.2 검출 확인

[0101] 실시예 4.1에서 준비한 시료 단백질을 DDA mode에서 LC-MS 분석하였으며, C18 역상 컬럼에 시료를 로딩하고 Ion trap으로 질량을 분석하였다 이동상으로는 0.1% 포름산(formic acid), 0.1% 포름산 (formic acid)이 포함된 80% ACN(acetonitrile)를 사용하였다. 검출 마커로는 실시예 1에서 선별된 3개 마커 펩타이드를 사용하고, 비교예로서 실시예 1의 마커 펩타이드 선별 과정에서 걸러진 아래 표 5의 서열번호 4 내지 8의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 사용하였다.

표 5

[0102]

	서열번호	아미노산 서열
비교예 1	서열번호 4	GFIVQAQDLK
비교예 2	서열번호 5	ADIFNPR
비교예 3	서열번호 6	LSFLYPATTGR
비교예 4	서열번호 7	AEPGLTGDTEFDSAGFK
비교예 5	서열번호 8	AIVLPEGSAPVR
비교예 6	서열번호 9	LRLPEESEELQR
비교예 7	서열번호 10	QVGNPTGGVGAPGTTGAFQTSDFLGAPGSTGAGLTHQDPTAIPR

표 6

[0104]

특징	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
서열	VP EYE EELQR	AGNEG LEWVELK	QQGYDDEEFGQGR

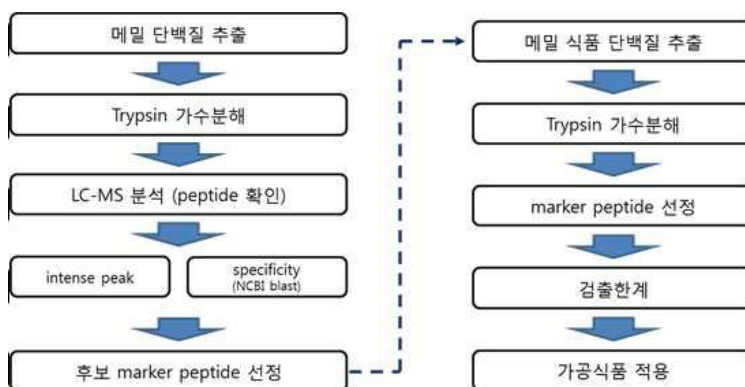
Intensity(스펙트럼 수)	4~5	4~5	1
검출된 가공 식품	가루, 국수, 소바라면, 차	가루, 국수	가루, 국수, 쿠키

[0106] 서열번호 1 내지 3의 마커 펩타이드의 검출 결과를 표 6에 나타내었고, 가공식품에서도 일정 수준 이상의 강도로 검출이 잘 됨을 확인하였다. 반면, 비교예인 서열번호 4의 펩타이드의 경우 쓴 메밀(타타리 메밀)에, 서열번호 5의 펩타이드의 경우 대두에, 서열번호 6의 펩타이드의 경우 쓴 메밀, 옥수수 및 대두에도 존재하여 메밀 알레르겐에 대한 특이도가 낮았다. 또한 서열번호 7 및 8의 펩타이드는 메밀 가공식품 중 각각 메밀 쿠키 및 메밀 가루에만 존재하여 펩타이드의 가공 안정성이 낮은 것을 확인하였다.

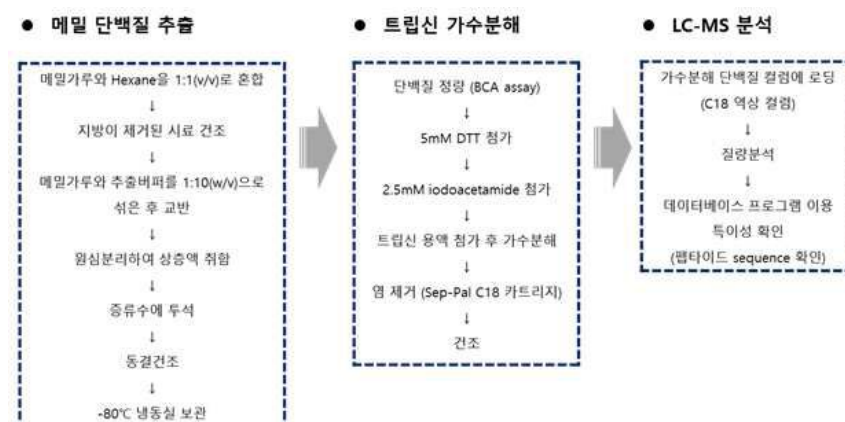
[0107] 또한 서열번호 9의 펩타이드는 단백질을 이론상 분해한 in silico digestion 결과와 일치하지 않아 검출 안정도가 낮았으며, 서열번호 10의 펩타이드는 메밀 가루에만 존재할 뿐 가공된 식품 중 메밀 국수 및 메밀 가루에는 존재하지 않으며, 펩타이드 내 아미노산이 44개로 길이가 너무 길어 검출에 적합하지 않았다.

도면

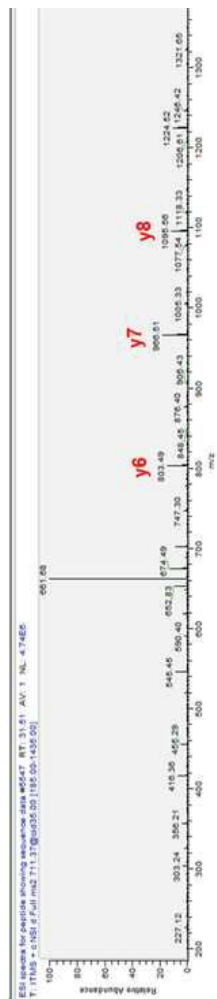
도면1



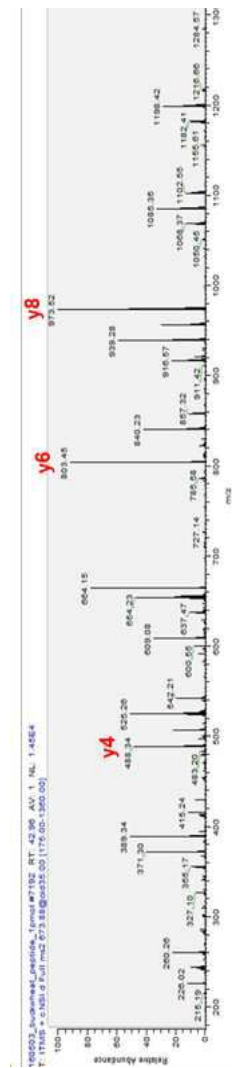
도면2



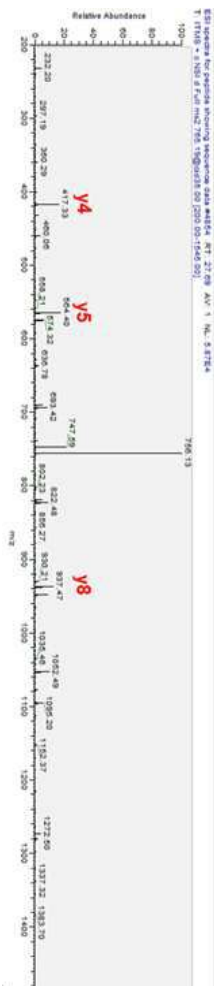
도면3a



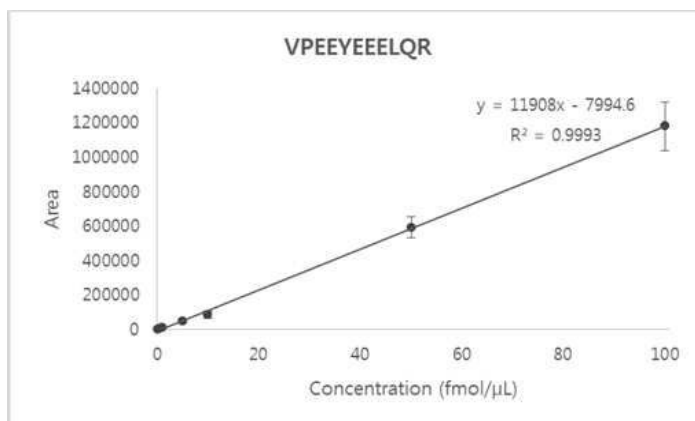
도면3b



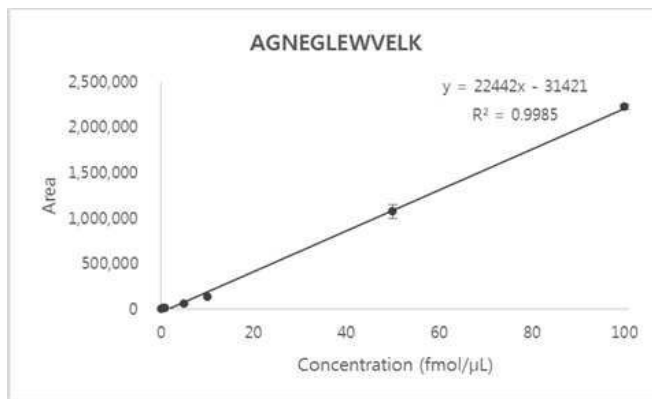
도면3c



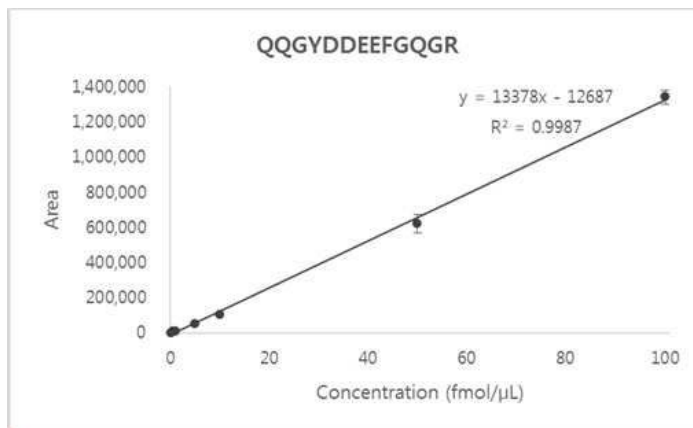
도면4a



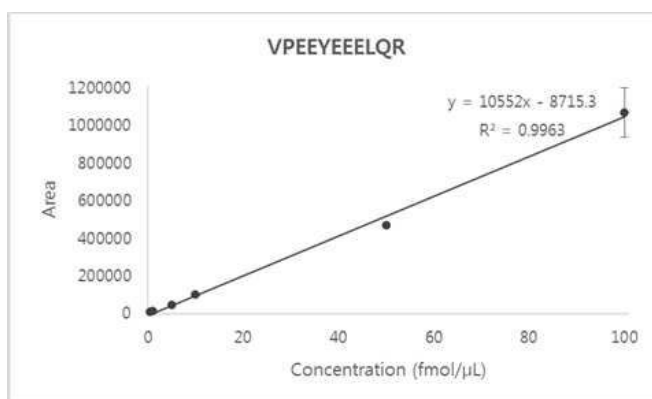
도면4b



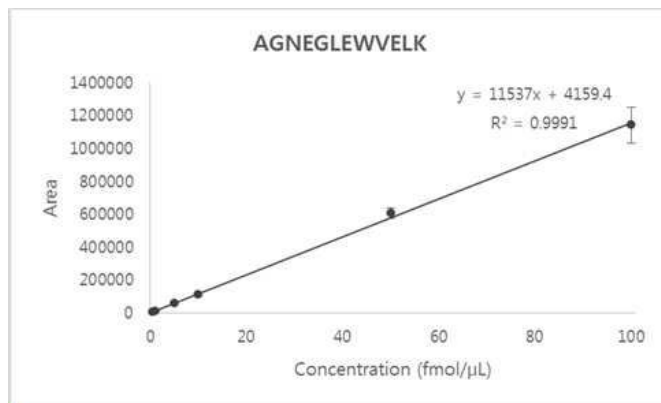
도면4c



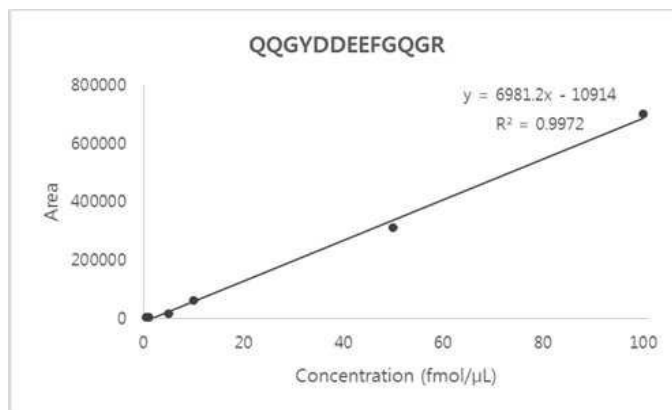
도면5a



도면5b



도면5c



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION
- <120> Marker peptide for detecting buckwheat allergen in food and
method for detecting thereof
- <130> DPP20164719
- <160> 10
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Buckwheat allergen marker peptide
- <400> 1

Val Pro Glu Glu Tyr Glu Glu Glu Leu Gln Arg

1 5 10

<210

> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Buchwheat allergen marker peptide

<400> 2

Ala Gly Asn Glu Gly Leu Glu Trp Val Glu Leu Lys

1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Buckwheat allergen marker peptide

<400> 3

Gln Gln Gly Tyr Asp Asp Glu Glu Phe Gly Gln Gly Arg

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Buckwheat peptide

<400> 4

Gly Phe Ile Val Gln Ala Gln Asp Leu Lys

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Buckwheat peptide

<400> 5

Ala Asp Ile Phe Asn Pro Arg

1 5

<210> 6

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Buckwheat peptide
 <400> 6
 Leu Ser Phe Leu Tyr Pro Ala Thr Thr Gly Arg
 1 5 10

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Buckwheat peptide
 <400> 7
 Ala Glu Pro Gly Leu Thr Gly Asp Thr Glu Phe Asp Ser Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Lys

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Buckwheat peptide
 <400> 8
 Ala Ile Val Leu Pro Glu Gly Ser Ala Val Pro Arg
 1 5 10

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Buckwheat peptide
 <400> 9

Leu Arg Leu Pro Glu Glu Ser Glu Glu Glu Leu Gln Arg
 1 5 10

<210> 10

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Buckwheat peptide

<400> 10

Gln Val Gly Asn Pro Thr Gly Gly Val Gly Ala Pro Gly Thr Thr Gly

1 5 10 15

Ala Phe Gln Thr Ser Asp Pro Leu Gly Ala Pro Gly Ser Thr Gly Ala

20 25 30

Gly Leu Thr His Gln Asp Pro Thr Ala Ile Pro Arg

35 40