



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0131209
(43) 공개일자 2016년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/02 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01)
A61K 35/68 (2015.01)
(52) CPC특허분류
A01N 63/02 (2013.01)
A01N 63/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0063067
(22) 출원일자 2015년05월06일
심사청구일자 2015년05월06일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
미첼 로버트 제임스
울산광역시 울주군 범서읍 구영로 75-25, 107동
302호 (울산구영동문굿모닝힐)
모하메드 드위다르
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
유미특허법인

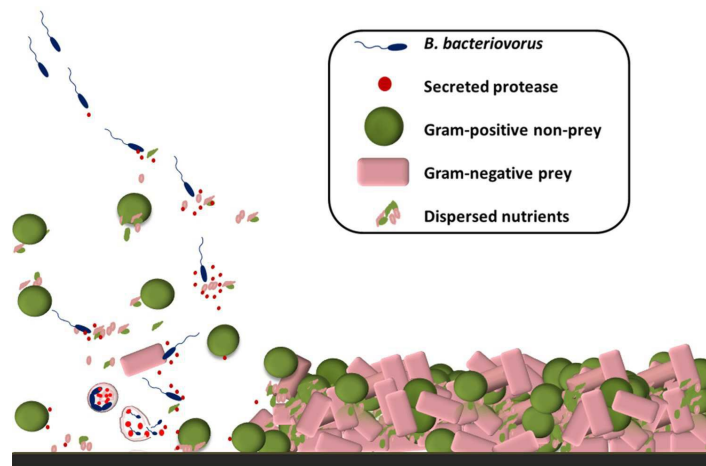
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 델로비브리오 박테리오포루스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 생물막 억제 또는 제거용 조성물 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 델로비브리오 박테리오포루스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 및 엔테로코커스 페카리스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주의 생물막 억제 또는 제거용 조성물, 이를 포함하는 항생제 내성 조성물, 및 이들 균주들의 감염 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 35/68 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2008590

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원

연구과제명 포식미생물을 이용한 병원성 바이오필름 Biocontrol 연구

기 여 율 1/2

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1355000014

부처명 보건복지가족부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

무항생제 치료법 개발 연구과제명 텔로비브리오 박테리오투스 HD100을 이용한 슈퍼박테리아, 아시네토박터균과 장내균의

기 여 율 1/2

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

텔로비브리오 박테리오포루스(*Bdellovibrio bacteriovorus*)의 배양 상층액 또는 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는,

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 폐렴구균(*Streptococcus pneumonia*), 리스테리아 이바노비(*Listeria ivanovii*) 및 엔테로코커스 페카리스(*Enterococcus faecalis*)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주의 생물막(biofilm) 억제 또는 제거용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포 외 단백질 분해 효소는 세린 단백질 분해효소를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포 외 단백질 분해효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는,

황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 및 엔테로코커스 페카리스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주에 대한 항생제 내성 억제용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는,

황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 및 엔테로코커스 페카리스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주 감염 치료용 약학 조성물.

청구항 6

텔로비브리오 박테리오포루스(*Bdellovibrio bacteriovorus*)의 배양 상층액 또는 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는,

황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*)의 생물막을 동시에 억제 또는 제거하기 위한 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 세포 외 단백질 분해 효소는 세린 단백질 분해효소를 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 세포 외 단백질 분해효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것인, 조성물.

청구항 9

제6항의 조성물을 포함하는,

황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카에 대한 항생제 내성 억제용 조성물.

청구항 10

제6항의 조성물을 포함하는,

황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카 감염 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 델로비브리오 박테리오포루스(*Bdellovibrio bacteriovorus*)의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 폐렴구균(*Streptococcus pneumonia*), 리스테리아 이바노비(*Listeria ivanovii*) 및 엔테로코커스 페카리스(*Enterococcus faecalis*)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주의 생물막(biofilm) 억제 또는 제거용 조성물, 이를 포함하는 항생제 내성 조성물, 및 이들 균주들의 감염 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대부분의 세균은 자연 상태에서 다당류(polysaccharides) 또는 단백질을 이용하여 표면에 부착하는 고착성 미생물 군집인 생물막을 형성한다. 생물막은 폴리머 기질(다당류와 폴리펩타이드가 주성분임)로 된 점액질의 외막(extracellular matrix; mucosal surface)이 세균 집락을 둘러싸고 있는 형태이다. 즉, 생물막은 고형(solid)의 생물학적 표면(biological surface)인 세균 집락과 비생물학적 표면(non-biological surface)인 외막으로 구성된 복합체이다. 생물막은 자연계에 흔하게 발견되는데, 예컨대 바위나 연못에서 발견되는 점액질이 바로 그것이다. 생물막은 세균으로 이루어진 작은 도시라 할 수 있으며, 그 속에서 세균은 서로 의사소통을 하고, 외부 세계에 대하여 방어를 한다. 이로 인하여 생물막은 항생제를 포함한 여러 환경 스트레스(environmental stress)에 대해서 저항성을 나타내고, 만성 감염에 대한 세균의 내성에 기여한다.

[0003] 생물막은 일반 자연 환경 외에 세균 감염성 질환과 관련하여서도 자주 발견된다. 사람의 장기에 형성되기도 하고 치아의 플라크 형태로 나타나기도 하며, 산업용 장비나 의료용 이식 기구에 생길 수도 있다. 이런 탓에 생물막은 치주 질환(periodontal disease)이나 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)에 동반하는 폐렴, 중이(middle ear)에 생기는 이통(earache) 등을 연구하는 학자들의 관심 대상이 되어 왔다. 미국 국립보건연구소는 2002년 보고에서는 박테리아균의 최대 80%가 이 같은 생물막 형성을 통해 병원균을 퍼트리고 있는 것으로 추산했다. 별개로 부유하던 세균(planktonic bacteria)에 대해 약효를 나타내던 항생제도 세균이 생물막을 형성하면 효능을 상실하는 경향이 커진다고 한다(*Trends Microbiol* 9: 34-39, 2001).

[0004] 세균이 생물막을 형성하면 생물막에 존재하는 외막을 항체 등이 투과할 수 없어 숙주의 면역체계(host immune system)를 무력화시키고, 항생제에 대한 세균의 저항성이 약 1,000배까지 높아질 수 있다고 한다(*Antimicrob Agents Chemother* 47: 3407-3414, 2003). 이런 생물막 형성에 따른 항생제에 대한 저항성의 증가 원인은 아직 정확하게 밝혀져 있지는 않으나, 생물막이 형성됨으로써 주위 환경과 교환 작용에 대한 의존성이 낮아지고, 점액성 다당류로 구성된 외막이 항생물질이 개개의 세균까지 전달되는 것을 방해하기 때문이며, 생물막이 형성되면 그 생물막 속에 존재하는 내성이 없던 세균들도 주위의 내성세균으로부터 수평 유전자 전이(horizontal gene transfer)를 통하여 내성인자 관련 유전자를 획득하여 내성 세균화가 진행되기 때문으로 설명할 수 있다.

[0005] 따라서, 생물막이 형성되게 되면 이는 항생제 내성 상태가 되었다고 볼 수 있고, 감염증 치료에 널리 사용되던 항생제의 작용이 어렵게 되어 결과적으로 항생제에 의한 치료 효과가 약화되는 문제점이 생기게 된다. 다르게 말하면, 생물막이 형성된다는 것은 만성적인 세균 감염 상태에 돌입한다는 것을 의미한다. 이러한 경우에는, 상

기에 기술했듯이 세균들의 항생제에 대한 감수성이 낮아져 항생제를 사용해도 거의 효과가 없으며, 이를 극복하기 위해 단순히 항생제를 과다 처방하면 세균의 항생제 내성만을 키우게 된다. 특히 생물막을 형성하고 있는 세균에 의한 감염은 여러 가지 항생제에 대해 내성을 갖는 다제내성(multi-drug resistance) 균에 의한 경우가 많아 더욱 문제가 심각하다.

[0006] 생물막을 형성하는 세균들 중, 황색포도상구균은 그람 양성(Gram positive)의 병원성 세균으로, 화농, 농양형성, 다양한 화농성 감염, 패혈증을 유발하는 전 세계적인 의인성 감염 발생의 원인균이다. 황색포도상구균은 국내에서 조사된 항생제 메티실린에 대한 내성률이 평균 73%로 세계 최고 수준인 매우 위험한 병원균이다. 이는 항생제를 써도 죽지 않는 황색포도상구균이 73%가 된다는 뜻으로 내성이 매우 심각한 병원균이라고 할 수 있다. 황색포도상구균에 의한 생물막이 형성되면 만성적 감염증을 초래되고, 생물막이 형성된 황색포도상구균에 의해 유발된 질환의 치료는 다른 세균에 의해 형성된 생물막으로 인한 질환의 치료에 비해서도 특히 어렵다. 왜냐하면, 질환의 치료를 위해 약물을 사용해도 생물막으로 인한 약물전달의 어려움이 있을 뿐 아니라 설사 약물이 전달 되었다 할지라도 내성균주가 많은 황색포도상구균의 특성상 기존 항생제에 기반한 치료는 효과적이지 않기 때문이다.

[0007] 세균의 생물막 형성 억제와 관련하여, 스트렙토마이세스 알부스(*Streptomyces albus*) 추출물이 비브리오 하비(*Vibrio harvey*)의 생물막 형성을 억제하고(*Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 1137-1144, You et al. 2007), 로도코커스속 BFI 332로부터 생산된 인돌-3-아세트알데하이드는 장출혈 대장균 0157:H7의 생물막 형성을 억제하는 것(한국공개특허 10-2013-0128141)이 알려져 있다. 또한, 황색포도상구균의 생물막 억제와 관련하여, 리소스타핀(lysostaphin)을 이용하는 방법이 알려져 있으나(*Antimicrob Agents Chemother* 47: 3407-3414, 2003), 황색포도상구균 중에는 리소스타핀에 민감하지 않은 균주(lysostaphin-resistant strain)가 상당히 존재하고(*J Clin Microbiol* 11: 724-727, 1980; *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3407-3414, 2003), 리소스타핀에 내성을 획득한 황색포도상구균이 생기고 있다는 점에서 문제가 있다.

[0008] 상기 살펴본 바와 같이, 미생물의 생물막의 생성을 효과적으로 억제하고 제거하지 못하는 경우 산업 및 의학에서 심각한 문제를 일으킬 수 있다. 따라서, 생물막의 형성으로 인한 항생제 치료의 무력화를 막기 위해서는, 생물막의 형성을 억제하고, 생물막이 형성되더라도 생물막을 제거할 수 있는 새로운 물질 또는 기존 항생제가 효능을 발휘할 수 있도록 생물막에 존재하는 외막을 분해 해 줄 수 있는 물질의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 델로비브리오 박테리오포루스의 배양 상층액 또는 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는, 황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 및 엔테로코커스 페카리스로 이루어진 균에서 선택되는 하나 이상의 균주의 생물막 억제 또는 제거용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는, 황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 및 엔테로코커스 페카리스로 이루어진 균에서 선택되는 하나 이상의 균주에 대한 항생제 내성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는, 황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 및 엔테로코커스 페카리스로 이루어진 균에서 선택되는 하나 이상의 균주 감염 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 델로비브리오 박테리오포루스(*Bdellovibrio bacteriovorus*)의 배양 상층액 또는 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는, 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*)의 생물막을 동시에 억제 또는 제거하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카에 대한 항생제 내성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카 감염 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 델로비브리오 박테리오포루스의 배양 상층액이 황색포도상구균의 생물막 제거 활성이 있음을 확인하였고(실험결과 1), 이러한 활성은 델로비브리오 박테리오포루스가 세포 외로 분비하는 단백질 분해효소에 의한 것임을 확인하였다(실험결과 2).
- [0016] 또한, 본 발명의 또 다른 실시예에서는 다양한 세균들에 대하여 델로비브리오 박테리오포루스의 배양 상층액의 효과를 확인하였고, 그 결과, 황색포도상구균 뿐만 아니라, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 또는 엔테로코커스 페카리스의 생물막에 대하여 효과가 있는 것을 확인하였다(실험결과 3).
- [0017] 나아가, 본 발명의 또 다른 실시예에서는 살모넬라 엔테리카가 단독으로 존재하는 경우 델로비브리오 박테리오포루스 배양 상층액을 처리하여도 살모넬라 엔테리카의 생물막은 전혀 감소하지 않고 오히려 증가하나(도 2a), 황색포도상구균과 살모넬라 엔테리카의 혼합된 생물막에 델로비브리오 박테리오포루스 배양 상층액을 처리하는 경우 황색포도상구균뿐만 아니라 살모넬라 엔테리카의 생물막도 제거되는 것을 확인하였다(실험결과 4).
- [0018] 이와 같이, 본 발명에서는 델로비브리오 박테리오포루스가 세포 외로 분비하는 단백질 분해효소가 황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 또는 엔테로코커스 페카리스의 생물막 제거 효과가 있고, 나아가 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카의 생물막을 동시에 억제할 수 있음을 확인하였고, 이를 이용하여 균주에 대한 항생제 내성 억제 또는 균주 감염 치료에 적용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명의 하나의 양태는 델로비브리오 박테리오포루스의 배양 상층액 또는 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는, 황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 및 엔테로코커스 페카리스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주의 생물막 억제 또는 제거용 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명에서 "델로비브리오 박테리오포루스"는, 분류학적으로 델로비브리오 속에 속하는 그람 음성 세균 및 호기성 세균을 말하며, 다른 그람 음성 세균들을 포식하는 포식성 균주이나, 그람 양성 세균에 대해서는 포식 능력이 거의 없는 것으로 알려져 있다. 하지만, 모든 그람 음성 세균을 포식하는 것은 아니며, 생물막 형성 억제 또는 제거 효과와 관련하여서는 전혀 알려진 바가 없다.
- [0022] 델로비브리오 박테리오포루스의 계놈은 2004년에 완전히 해독되었으며 (Science vol.303, p.689-692, 2004), 전체 계놈 서열에 대한 정보는 NCBI Genbank 등록번호 BX842601.2 에 공개되어 있다. 또한, 상기 균주는 기탁번호 ATCC 15356, DSM 50701, NCIB 9529 등으로 기탁되어 있는 것으로 알려져 있으므로, 당업자라면 누구나 용이하게 델로비브리오 박테리오포루스를 입수할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 "세포 외 단백질 분해 효소"는 균주가 자신의 세포 바깥쪽으로 분비하는 단백질 분해 효소를 총칭하는 의미이다. 구체적으로 본 발명에서는 델로비브리오 박테리오포루스가 세포 바깥쪽으로 분비하는 단백질 분해효소를 의미하고, 세포 바깥쪽으로 분비됨으로써 상기 단백질 분해효소는 배지 내에 존재할 수 있다. 그에 따라, 본 발명의 일 구현예로, 상기 세포 외 단백질 분해 효소는 델로비브리오 박테리오포루스 균주의 배양 상층액에 포함된 것 일 수 있다.
- [0024] 따라서, 본 발명의 조성물은, 델로비브리오 박테리오포루스 유래의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함할 수 있을 뿐만 아니라, 나아가 상기 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 어떠한 형태도 본 발명의 조성물의 범위에 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 상기 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 균주 또는 전세포(whole cell), 상기 균주 또는 전세포의 파쇄액 또는 이의 분액, 또는 배양물 (예를 들어, 배양 상층액) 등을 포함할 수 있으며, 세포외 단백질 분해 효소를 포함하고 있는 한 조성물의 형태는 제한되지 않는다.
- [0025] 일례로, 상기 델로비브리오 박테리오포루스 균주의 배양 상층액은 델로비브리오 박테리오포루스 균주를 배양하고 원심분리한 후의 상층액일 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명에서 상기 세포 외 단백질 분해효소는 세린 단백질 분해효소를 포함할 수 있다. 세린 단백질 분해 효소란, 활성 중심에 세린, 히스티딘 및 아스파르트산 잔기를 가지는 효소를 의미하고, 예를 들어 본 발명에서는, Bd2692(Uniprot 등록번호 Q6MJS6, 서열번호 1), Bd1432(Uniprot 등록번호 Q6MN31, 서열번호 2), Bd1283(Uniprot 등록번호 Q6MNH2, 서열번호 3), Bd2545(Uniprot 등록번호 Q6MK66, 서열번호 4), Bd2269(Uniprot 등록번호 Q6MKV8, 서열번호 5) 또는 Bd0376(Uniprot 등록번호 Q6MQT4, 서열번호 6)일 수 있고, 바람직하게는 Bd2692(Uniprot 등록번호 Q6MJS6, 서열번호 1)일 수 있다..
- [0027] 본 발명에서, 황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 또는 엔테로코커스 페카리스는 생물막을 형성함으로써 항생제 내성을 획득할 수 있고, 이는 하나의 항생제 내성만에 국한되는 것이 아니라 다

종류의 항생제에 대하여 내성을 획득한 것일 수 있다. 하지만, 본 발명의 조성물은 항생제 없이도 사용 가능하고, 상기 균주뿐만 아니라 상기 균주가 형성하는 생물막의 형성을 억제하고 이미 형성된 생물막을 제거할 수 있으므로, 항생제 내성 또는 다약제 내성을 획득한 균주에 대해서도 본 발명의 조성물이 우수하게 적용될 수 있다.

[0028] 따라서, 또 하나의 양태로서 본 발명은, 상기 언급한 생물막 억제 또는 제거용 조성물을 포함하는 황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 및 엔테로코커스 페카리스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주에 대한 항생제 내성 억제용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카에 대한 항생제 내성 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0029] 또 하나의 양태로서 본 발명은, 본 발명의 생물막 억제 또는 제거용 조성물을 포함하는 황색포도상구균, 표피포도상구균, 폐렴구균, 리스테리아 이바노비 및 엔테로코커스 페카리스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주 감염 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카 감염을 동시에 치료하기 위한 약학 조성물에 관한 것이다.

[0030] 세균에 의해 유발된 질환의 치료는 생물막이 형성된 경우 매우 어려운데, 질환의 치료를 위해 약물을 사용해도 생물막으로 인한 약물전달의 어려움이 있을 수 있기 때문이다. 따라서, 본 발명의 조성물을 사용하여 균주의 생물막 형성을 억제하고, 이미 형성된 생물막을 제거함으로써 세균에 대한 항생제 내성을 억제하고, 나아가 세균에 의한 감염을 치료할 수 있다.

[0031] 상기 감염은, 세균이 식품과 함께 혼입되어 인체에 감염을 일으킬 수 있고, 집파리 등을 통하여 세균이 인체에 옮겨져 감염이 일어날 수 있고, 가구나 실내의 먼지에도 세균이 존재할 수 있어 인체에 감염이 일어날 수 있으나, 이에 제한되지 않고 인체에 대하여 직접적 또는 간접적으로 감염을 일으킬 수 있는 모든 경로를 포함한다. 예를 들어, 세균은 종종 병원 또는 수술을 통하여 감염이 일어나기도 하는데, 병원에서 사용되는 집기, 기구, 도구 등의 물건을 통하여 인체에 감염을 일으키기도 하고, 인체에 사용되는 인공장기를 포함하는 각종 기기를 통하여 감염을 일으키기도 한다.

[0032] 일 구현예로, 본 발명의 조성물에는 추가적 치료의 효과를 얻기 위하여 항균 활성이 입증된 성분이 추가로 포함될 수 있다. 기존의 다른 항생제 또는 기타의 효능이 입증된 물질과 병용될 경우에는 본 발명의 조성물이 생물막을 억제하거나 분해해 줌으로 기존 항생제나 기타의 효능이 입증된 물질이 초기 목적대로 효능을 발휘할 수 있게 된다. 본 발명에서 조성물의 세균에 대한 감염 치료 용도에 있어, 조성물의 유효 용량은 보통으로 숙련된 의사가 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 특정 용량은 치료하고자 하는 인간을 포함한 동물의 일령 또는 연령, 체중 및 임상 증상과 투여방법에 의해 좌우될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 도포, 분무, 분사 및 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 통해 투여할 수도 있으며, 비경구 투여의 경우 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수도 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수도 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수도 있다. 본 발명의 조성물의 세균 관련한 질환의 치료에의 활용은 기존의 항생제에 기반한 치료에 비해 추가적 이점을 제공할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일구현예로, 생물막을 형성하는 균주가 생물학적 환경에 존재할 수도 있고 비생물학적 환경에 존재할 수도 있으므로, 델로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 조성물을 생물막을 형성하는 균주가 존재할 수 있는 환경에 처리하여 생물막의 형성을 억제하거나 제거함으로써 환경 소독 또는 환경 정화를 할 수 있고, 의료기구 등에 처리하는 경우 의료 세정을 할 수 있다. 이러한 목적의 조성물에는 추가적

효과를 얻기 위하여 박테리아에 대해 항균 활성이 입증된 성분이 추가로 포함될 수 있으며, 통상의 소독용, 의료세정용, 환경 정화용 조성물에 들어가는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 이에 한정되는 것은 아니지만 본 발명의 조성물을 스프레이 형태로 생물막 형성을 막고자 하는 부분, 즉 인공관절, 도뇨관 표면, 내시경 또는 상처에 뿌리는 방법으로 사용하는 것을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생물막 형성 부위에서의 도포, 분무 또는 분사하여 사용할 수도 있다.

[0035] 본 발명은 또 하나의 양태로, 황색포도상구균의 생물막 및 살모넬라 엔테리카의 생물막이 동시에 존재하는 환경에서, 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카의 생물막을 동시에 억제 또는 제거할 수 있다.

[0036] 환경에서의 미생물 군주는 그람 양성균 및 그람 음성균이 혼합되어 있는 것이 대부분이므로, 본 발명의 조성물은 다양한 군주가 혼합되어 있는 환경에도 우수하게 적용될 수 있다.

[0037] 또한, 이를 이용하여 상기 설명한 바와 같이 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카에 대한 항생제 내성 억제 또는 감염 치료용 약학 조성물로 이용할 수 있으며, 이에 대하여는 상기 설명한 내용이 적용될 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 생물학적 환경 또는 비생물학적 환경에 존재하는 생물막을 형성하는 다양한 미생물의 생물막 형성을 억제하거나 또는 이미 생성된 생물막을 제거하기 위하여, 텔로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해효소를 포함하는 조성물을 제공하며, 이는 생물막을 형성하는 미생물의 감염으로 인한 질환의 치료에 이용할 수 있고, 특히, 생물막을 형성함으로써 다약제 내성을 가진 미생물에 대해서도 생물막의 형성 억제 및 제거를 통하여 용이하게 제거할 수 있으므로, 생물-조절 제제 또는 화학 항생제의 대체제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1a는 96 well plates에서 포식성 기주 의존적 텔로비브리오 박테리오포로스 배양 상층액이 황색포도상구균 생물막 제거할 수 있음을 확인한 결과를 나타낸다. "Control"은 HEPES 버퍼만을 첨가한 대조군, "HDB sup"은 기주 의존적 텔로비브리오 박테리오포로스 배양 상층액을 첨가한 경우, Boiled HDB sup은 기주 의존적 텔로비브리오 박테리오포로스 배양 상층액을 끓여서 첨가한 경우, "HDB sup+AEBSF"는 기주 의존적 텔로비브리오 박테리오포로스 배양 상층액과 함께 AEBSF를 첨가한 경우, "Control+AEBSF"는 HEPES 버퍼와 함께 AEBSF를 첨가한 경우, "대장균 lysate"는 대장균 용해물을 첨가한 경우를 나타낸다.

도 1b는 실리카 칩에 생성된 황색포도상구균 생물막을 공초점 현미경(Confocal) 및 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 이미지를 나타낸다. "Control"은 HEPES 버퍼만을 첨가한 대조군, "HDB sup"은 기주 의존적 텔로비브리오 박테리오포로스 배양 상층액을 첨가한 경우를 나타낸다.

도 1c는 텔로비브리오 박테리오포로스 공격 단계(Attack phase) 세포가 배지 내로 단백질 분해효소를 활발히 생산하는 것을 확인하기 위하여, 시간대 별로 텔로비브리오 박테리오포로스 배양 배지 샘플을 채취하여 단백질 분해효소 활성을 측정된 결과를 나타낸다.

도 1d는 도 1c의 실험 과정에서 시간대 별로 텔로비브리오 박테리오포로스의 생균수를 나타낸다.

도 1e는 도 1c의 실험 과정에서 0 시간 및 6시간 샘플에서의 황색포도상구균 생물막의 남아있는 양을 나타낸다.

도 2a는 다양한 세균 종에 의해 형성된 생물막에 대한 포식성 상층액의 다른 효과를 확인한 결과를 나타낸다. "Control"은 HEPES 버퍼만을 첨가한 대조군, "HDB sup"은 기주 의존적 텔로비브리오 박테리오포로스 배양 상층액을 첨가한 경우를 나타낸다.

도 2b는 96 well plate에서 텔로비브리오 박테리오포로스 배양액의 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카의 혼합된 생물막 제거 활성을 확인한 결과를 나타낸다. "Control"은 HEPES 버퍼만을 첨가한 대조군, "HDB sup"은 기주 의존적 텔로비브리오 박테리오포로스 배양 상층액을 첨가한 경우를 나타낸다.

도 2c는 실리카 칩에 형성된 혼합된 생물막에 대한 공초점 및 주사전자 현미경 이미지를 나타낸다. 황색포도상구균은 녹색 형광을 나타내고, 살모넬라 엔테리카는 적색 형광을 나타낸다. "Control"은 HEPES 버퍼만을 첨가한 대조군, "HDB sup"은 기주 의존적 텔로비브리오 박테리오포로스 배양 상층액을 첨가한 경우를 나타낸다.

도 3a는 포식 사이클 동안에 시간 대 별로 분비된 단백질 분해효소에 대한 RT-qPCR 분석 결과를 나타낸다.

도 3b는 정제된 텔로비브리오 박테리오포로스 단백질 분해효소의 황색포도상구균 생물막 제거 활성을 확인한 결

과를 나타낸다.

도 4는 델로비브리오 박테리오포루스가 혼합된 종의 생물막을 분해하는 모식도를 나타낸다.

도 5는 세척한 공격 단계의 기주 의존적 델로비브리오 박테리오포루스도 황색포도상구균 생물막을 제거할 수 있음을 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 세척한 델로비브리오 박테리오포루스 세포는 영양 배지(nutrient broth, NB)에서 단백질 분해효소를 생성하였으나, HEPES 버퍼에서는 생성하지 않음을 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 세균의 생물막에 대한 델로비브리오 박테리오포루스 상층액의 효과는 주로 세린 단백질 분해효소에 의한 것임을 확인한 결과를 나타낸다. "Control"은 HEPES 버퍼만을 첨가한 대조군, "HDB sup"은 기주 의존적 델로비브리오 박테리오포루스 배양 상층액을 첨가한 경우, "HDB sup + AEBSF"는 기주 의존적 델로비브리오 박테리오포루스 배양 상층액에 세린 단백질 분해효소 억제제인 AEBSF를 30분 동안 처리한 후 첨가한 경우를 나타낸다.

도 8a는 살모넬라 엔테리카 생물막에 대한 단백질 분해효소 K 및 세린 단백질 분해효소 Bd2692의 효과를 크리스탈 바이올렛(Crystal violet, CV)으로 염색하고 에탄올을 첨가하고 560nm에서 흡광도를 측정하여 확인한 결과를 나타낸다.

도 8b는 도 8a의 실험과정 중 크리스탈 바이올렛으로 염색하고 에탄올을 첨가하기 전에 각각의 wells의 사진을 나타낸다. 오른쪽 사진은 wells의 바닥 모습을 나타내고, 왼쪽 사진은 측면 모습을 나타낸다.

도 9는 델로비브리오 박테리오포루스 상층액, 단백질 분해효소 K 및 Bd2692에 의해 살모넬라 엔테리카 플라젤린(플라젤라 필라멘트의 주요 단백질)의 감소를 보여주는 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸다. lane 1 및 10은 단백질 protein ladder, lane 2 및 9는 HEPES 10%를 처리한 대조군, lane 3 및 4는 델로비브리오 박테리오포루스 상층액 10%가 처리된 군, lane 5, 6 및 7은 단백질 분해효소 K를 100, 10, 및 1ng/ml로 각각 처리한 군, lane 8은 Bd2692를 1 ng Pro. K equiv /ml 농도로 처리한 군을 나타낸다.

도 10은 살모넬라 엔테리카 세포에 붙어있는 손상되지 않은 플라젤라에 대한 델로비브리오 박테리오포루스 상층액 및 단백질 분해효소 K의 효과를 확인한 결과를 나타낸다. Lane 1, 6은 protein ladder, lane 2는 살모넬라 엔테리카 대조군, lane 3은 포식성 상층액을 처리한 살모넬라 엔테리카, lane 4는 단백질 분해효소 K 100ng/ml를 처리한 살모넬라 엔테리카, lane 5는 단백질 분해효소 1000ng/ml를 처리한 살모넬라 엔테리카를 나타낸다.

도 11은 대장균 BL21/DE3에 클로닝한 단백질 분해효소에 대하여 SDS-PAGE 젤 전기영동 및 웨스턴 블랏 분석을 수행한 결과 이미지를 나타낸다. Lane 1은 DNA ladder, lane 2는 대조군 대장균 BL21 배양액, lane 3 내지 5는 Bd2692, Bd1283, 및 Bd1432를 발현하는 배양액을 각각 나타낸다. B) 내지 D)는 도 11에서 각 화살표로 표시된 Bd2692, Bd1283, 및 Bd1432에 해당하는 밴드 이미지를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040]

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0041]

실험예 1. 미생물 및 배양 조건

[0042]

본 발명에서 대장균(*Escherichia coli*) MG1655, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) KACC 10768, 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*) KACC 13234, 폐렴구균(*Streptococcus pneumonia*) KACC 15313, 스트렙토코커스 이퀴너스(*Streptococcus equinus*) KACC 13808, 리스테리아 이바노비 subsp. 이바노비(*Listeria ivanovii* subsp. *Ivanovii*) KACC 10767, 엔테로코커스 페카리스(*Enterococcus faecalis*) KACC 11304, 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) KACC 10001, 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*) KACC 10167, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) PA01, 살모넬라 엔테리카 subsp. 엔테리카(*Salmonella enterica* subsp. *Enterica*) KACC 11595 균주를 사용하였다. 이들 균주는 Korean RDA-Genebank Information Center (genebank.rda.go.kr)에서 얻었다. 또한, 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 및 아시네토박터 보우메니(*Acinetobacter baumannii*)의 두 임상 세균 독립체(clinical bacterial isolate)를 사용하였다. 슈도모나스 종(*Pseudomonas* sp.) DSM 50906 및 포식성 세균 델로비브리오 박테리오포루스는 둘 다 German collection of Microorganisms and cell cultures(DSMZ)로부터 구입하였다. 모든 균주는 글리세롤 Stock에서 영하 80℃에서 보관하였다. 필요시, 균주들은 tryptic soy broth (TSB, Acumedia, USA)로 준비된 agar plate에 스트레킹하고, 단일 콜로니들은

생물막 실험에 사용하기 전에 TSB 배지에 접종하고 37℃에서 밤새 배양하였다. 슈도모나스 중 균주는 예외적으로 생장을 위해서 훨씬 좋다는 것을 확인한 30℃에서 배양하였다. 페렴구균은 내부 5% CO₂ 배양기에서 37℃로 배양하였다.

[0043] 포식성 세균 텔로비브리오 박테리오포루스는 Ca 및 Mg 염이 각각 4mM 및 2mM의 농도로 첨가된 HEPES 버퍼에서 항상 배양하고 유지하였다. 이 버퍼는 모든 실험에서 대조군으로 사용하였다. 세균이 없는 포식성 세균 배양 상층액을 얻기 위하여, 대장균 MG1655 먹이가 자라고 있는 배지에서 24시간 포식성 배양한 배양액을 0.22µm 필터로 3번 여과하여 모든 대장균 및 포식성 세균을 제거하였다.

[0044] 실험예 2. 단백질 분해효소 정량분석(Quantitative protease assay)

[0045] 텔로비브리오 박테리오포루스 상층액 및 다른 용액의 단백질 분해효소의 활성을 azocoll reagent (Sigma, USA)를 이용하여 측정하였다. 단백질 분해효소 K(proteinase K)를 표준으로 사용하였다.

[0046] 실험예 3. 96-well plates 생물막 제거 어세이

[0047] 생물막을 형성하기 위해서, TSB(trypticase soy broth)에서 밤새 배양한 하기 표 1의 각 균주를 백배로 희석하여 새로운 TSB 배양액에 접종하였다. 96-well 플레이트 내 각각의 웰에 180µl의 상기 배양액을 첨가하였다. 각각의 웰에는 20µl의 PYE 배지, HIB 상층액 또는 다른 첨가물 중 하나를 첨가하였다. 첨가된 플레이트는 교반없이 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 증류수로 조심스럽게 세척하고 건조한 후에, 0.1%의 크리스탈 바이올렛을 각각의 웰에 첨가하였다. 첨가된 플레이트는 상온에서 20분 동안 배양하고, 세척하고 건조하였다. 다음, 2% 아세트산을 보충한 에탄올 250 µl를 각각의 웰에 30분 동안 첨가하였다. 그 후, Glomax Multi+ (Promega, USA)를 이용하여 560nm에서 각 웰의 흡광도를 측정하였다. 하기 표 1의 각 균주의 생물막 제거 실험을 위해서, 상기 기재한 방법에 따라 하기 표 1의 각 균주의 생물막을 준비하였다. 배지를 제거하고 각 웰을 10% PYE 배지, 10% HIB 상층액, 100 µg/ml의 단백질 분해효소 K (Invitrogen, USA) 또는 20 µg/ml DNase I(Invitrogen, USA) 중의 하나가 보충된 200 µl의 HEPES 버퍼(with 2 mM CaCl₂ and 3 mM MgCl₂)로 채웠다. 그 후, 채워진 플레이트는 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 세척하고 CV로 염색하였다. 상기 기재한 방법에 따라 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0048] 그 결과를, 하기 표 1에 정리하였으며, 실험 균주 각각에 대한 생물막 양에 대한 실제적인 값을 나타낸다.

표 1

균주	Biofilm mass (OD ₅₆₀)
황색포도상구균	0.79±0.08
표피포도상구균	1.43±0.29
페렴구균	0.29±0.04
리스테리아 이바노비	0.74±0.05
엔테로코커스 페카리스	0.45±0.04
바실러스 세레우스	0.18±0.02
클렙시엘라 뉴모니아	1.32±0.07
버크홀데리아 세파시아	0.49±0.02
대장균 MG1655	1.07±0.13
아시네토박터 보우메니	0.74±0.09
슈도모나스 중	2.82±0.07
녹농균 PA01	0.96±0.09
살모넬라 엔테리카	0.83±0.09

[0050] 실험예 4. 부착된 살모넬라 엔테리카 플라젤라(flagella) 및 추출된 플라젤린(flagellin)에 대한 텔로비브리오 박테리오포루스, 및 단백질 분해효소 K의 효과

[0051] 플라젤라 추출을 위해 살모넬라 엔테리카를 밤새 배양하고 원심분리한 후 세포들을 pH 2.0으로 조정된 정상 식염수에 재현탁하였다. 상층액은 분리하고 플라젤린(플라젤라 필라멘트의 주요 단백질)을 정제하였다. 손상되지

않고 부착된 플라젤라에 대한 단백질 분해효소의 효과를 실험하기 위하여, 단백질 분해효소가 있는 조건 또는 없는 조건에서 살모넬라 엔테리카 세포를 24시간 동안 배양하고 플라젤린을 추출하고 추출량을 비교하였다. 구체적인 실험방법은 아래와 같다.

[0052] 4-1. 살모넬라 엔테리카의 추출된 플라젤린에 대한 텔로비브리오 박테리오포루스 상층액, 및 단백질 분해효소 K의 활성 확인

[0053] 살모넬라 엔테리카를 LB 배지에서 35℃로 80rpm으로 밤새 배양하였다. 세포 들은 100rcf로 30분 동안 원심분리하고, 펠렛을 수확하여 정장식염수(20ml)에 재현탁하였다. 현탁액의 pH를 2.0으로 조정하고 30분동안 지속적으로 교반하며 상온에서 배양하였다. 이후, 4℃, 16,000rcf로 1시간 동안 원심분리하였다. 현탁액을 분리하고 pH를 7.0으로 조종하였다. 2/3 포화(2.67 M)에 도달하기 위하여 교반하면서 증류수 내 황산암모늄(Ammonium sulfate) 용액을 천천히 첨가하였다. 혼합물은 4℃에 밤새 보관한 후 원심분리하고 침전된 플라젤린을 2ml의 순수(pure water)에 용해시켰다. 플라젤린 용액은 30KDa cut-off 필터를 통하여 여과하고 남아있는 플라젤린은 세척하고 물에 용해시켰다. 플라젤린은 SDS-PAGE 젤의 밴드를 자르고, 트립신으로 소화시키고, 및 Matrix assisted laser desorption/ionization - Time of flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF, Ultraflex III, Bruker)를 이용한 분석을 통하여 확인하였다. 실험을 위하여, 플라젤린의 최종 농도를 약 60 μ g/ml로 하여 HEPES 버퍼 단독으로 혼합하고(대조군), 10%(v/v) 농도의 포식성 상층액과 혼합하고, 1 ng $\text{Pro. K equiv. / ml}$ 농도의 Bd2692와 혼합하고, 또는 다른 농도의 단백질 분해효소 K와 혼합하였다. 모든 샘플은 37℃에서 밤새 배양한 후 SDS-PAGE 젤에서 분석하기 전에 95℃에서 로딩 버퍼와 함께 가열하였다.

[0054] 4-2. 부착된 살모넬라 엔테리카 플라젤라에 대한 포식성 상층액 및 단백질 분해효소 K의 효과 확인

[0055] 살모넬라 엔테리카의 단일 콜로니를 3ml의 TSB broth에 접종하고 배양하였다. 1L의 TSB media에 계대 배양하고 37℃에서 40rpm으로 밤새 배양하였다. 배양액은 원심분리하고 대부분의 배지(90%)를 제거하였다. 살모넬라 엔테리카 생물막 처리 동안의 상태를 묘사하기 위하여 작은 양의 영양분(10% 사용한 TSB media)을 남겨두었다. 여분의 사용한 TSB와 함께 Ca 및 Mg 염으로 HEPES 버퍼 내에서 OD 2.0으로 세포를 재현탁하고 첨가하였다. 현탁액은 100ml의 플라스크에 50ml씩 각각 나누었다. 실험 샘플은, 10%의 포식성 상층액, 100 또는 1000ng/ml의 단백질 분해효소 K를 각각 첨가하였다. 대조군 샘플은, HEPES 버퍼만 첨가하였다. 모든 샘플은 37℃에서 교반 없이 24시간 동안 다시 배양하였다. 원심분리하고, 식염수로 두번 세척한 후 0.5ml의 식염수 용액으로 재현탁하고 pH 2.0으로 조정하였다. 이후, 상온에서 1시간 동안 교반하면서 배양한 후 원심분리하고 상층액을 얻었다. SDS-PAGE 분석을 위하여, 각각의 상층액 중 15 μ l를 각 well에 첨가하였다.

[0056] 실험예 5. 실리콘 칩 생물막 제거 어세이

[0057] 1cm×1cm 실리콘 칩을 자르고 준비하였다. 실리콘 칩은 70% 에탄올을 이용하여 살균하였고, UV를 처리하였다. 실리콘칩은 12-well plates로 무균상태에서 옮기고 황색포도상구균 또는 다른 균주를 밤새 배양한 배양액으로 접종된 TSB 배지를 첨가하였다. 실리콘 칩위에 생물막을 형성하기 위하여, plates는 교반없는 배양기에서 37℃로 배양하였다. 24시간 후에, 실리콘 칩은 HDB 상층액 또는 다른 첨가제로 10% 보충된 HEPES 버퍼를 포함하는 새로운 plates로 옮겼다. 24시간을 더 배양한 후에, 실리콘 칩은 PBS를 이용하여 부드럽게 세척하고, 염색한 후, 공초점 및 SEM 현미경을 이용하여 시각화하였다.

[0058] 공초점현미경으로 관찰하기 위하여, 황색포도상구균 생물막은 CellTrace™ CFSE stain (Life Technologies, USA) (1 μ g/ml)을 포함하는 HEPES 버퍼 내 칩을 가라앉혀서 염색 한 후, 여분의 염색약을 제거하기 위하여 부드럽게 세척하였다. 황색포도상구균 및 살모넬라 엔테리카의 혼합 생물막 실험을 위하여, 살모넬라 엔테리카는 적색 형광 단백질(red fluorescent protein)을 코딩하고 테트라사이클린 저항성(tetracycline resistance)을 갖게 하는 pHKT3 플라스미드로 형질전환하였다. 결과적으로, S aureus는 녹색 형광을 나타내고, 살모넬라 엔테리카는 적색 형광을 나타내었다. 이러한 방법으로, 혼합된 생물막에서 서로 다른 두 균주를 다르게 시각화하였다.

[0059] 실험예 6. 포식 순환 동안의 시간적인 측면에서의 RNA 추출(Time-wise RNA extraction) 및 RT-qPCR 분석

[0060] HEPES 버퍼 내 델로비브리오 박테리오포루스를 밤새도록 배양한 세가지 배양액을 bdelloplast 및 포식되지 않은 대장균 세포를 제거하기 위하여 0.45 μ m 필터를 통하여 여과하였다. 여과액은 10배로 농축하고 4.3의 OD 600으로 이미 조정된 HEPES 버퍼 내에서 대장균 현탁액과 혼합하고 진탕 배양기에서 1시간 동안 30℃에서 배양하였다. 두 가지 현탁액을 혼합한 후, 배양액의 최종 감염 다중도(multiplicity of infection, MOI)는 약 3.7이었다. 샘플은 혼합하기 직전(Attack phase samples) 및 혼합한 후 다른 시간 대(15, 30, 60, 120, 및 180 분)에 델로비브리오 박테리오포루스 배양액에서 채취하였다.

[0061] 각각의 샘플은, 200 rcf에서 2분 동안 원심분리하고 상층액은 다른 용기로 옮겼다. 이는 대장균을 침입하지 못한 공격 단계가 아닌 델로비브리오 박테리오포루스의 대부분을 제거하기 위해 수행하였다. RNA는 Trizol/chloroform 추출 방법으로 추출하고, RT-qPCR 분석을 수행하였다. RT-qPCR 분석에 사용한 프라이머는 아래 표 2에 나타내었다. 각각의 유전자 발현량은 16S rRNA 유전자 발현과 비교하여 계산하였고, 포식의 모든 단계 동안에서 관찰된 최대 발현 수준에 관하여 나타내었다.

표 2

Primer	Sequence	서열번호
Bd0376 For	AATAAATCATAAGTGACGGCATTAAATTCAC	7
Bd0376 Rev	AATAAATCATAAAATGCTGGTCTGAGCATAGC	8
Bd1283 For	AATAAATCATAAACGGGTATCGACATCAAACA	9
Bd1283 Rev	AATAAATCATAAGGAAACAAAGTTCAGCCAT	10
Bd1432 For	AATAAATCATAAGCGGGATACAACTGAACAA	11
Bd1432 Rev	AATAAATCATAACCGCTCATGTATCCGTACTT	12
Bd2269 For	AATAAATCATAAGATGAAGCTCACCCTCTTT	13
Bd2269 Rev	AATAAATCATAATGCTTTAGGAGCAACACCAG	14
Bd2545 For	AATAAATCATAATTTATCTCCAACACCGGAAA	15
Bd2545Rev	AATAAATCATAAAATGGCATTTGGCTGTAGAAC	16
Bd2692 For	AATAAATCATAAGGTCTGATCGACGGTGGTAT	17
Bd2692 Rev	AATAAATCATAAGAAATGATCTGAGCGCCTT	18

[0063] **실험예 7. 델로비브리오 박테리오포루스로부터 분비된 단백질 분해효소 클로닝 및 대장균 BL21/DE3에서의 발현**

[0064] 클로닝을 위한 단백질 분해효소로 Bd2692, Bd1283, and Bd1432를 선별하였다. 각각을 코딩하는 유전자는 PCR 증폭하였고, 벡터 pET31b+ (Invitrogen, USA)에 연결한 후 클로닝하고 대장균 BL21/DE3에서 발현시켰다. 구체적인 클로닝 방법은 아래와 같다.

[0065] 세린 단백질 분해효소로 Bd2692, Bd1283, 및 Bd1432를 선별하였다. 종결 코돈(stop codon)없이 델로비브리오 박테리오포루스의 게놈 DNA로부터 이들 단백질 분해효소의 유전자를 PCR 증폭하고, NdeI 및 XhoI 제한효소의 인식 자리를 이들 말단에 삽입하였다. PCR 산물은 2가지 제한 효소를 이용하여 소화시켰다. Bd1432은, 게놈 서열의 내부를 절단하는 것으로 알려진 XhoI 대신에 SalI (Fermentas, USA)를 사용하였다. 그 후, PCR 산물은 pET31b+ 벡터(Invitrogen, USA)에 삽입시켰다. 재조합 플라스미드는 BL21 star (DE3)/pLysS competent cells (Invitrogen, USA)로 형질전환시켰다. 형질전환된 세포는 glucose (1% w/v), Carbenicillin (100 μ g/ml), and Chloramphenicol (30 μ g/ml)가 보충된 LB agar plates에서 배양하였다. 단일 콜로니를 LB-glucose 액체 배지에 접종하고 단백질 분해효소의 유도 및 발현을 위해서 37℃에서 배양하였다. IPTG 0.25 mM을 이용하여 OD600값이 약 0.8 내지 1.0일 때 완료되었다. 유도된 배지는 3시간 동안 30℃에서 배양하고 세포를 수확하여 이후 실험을 위하여 영하 20℃에서 보관하였다. 유도된 세포를 해동하고, 초음파처리를 통하여 용해시켰다. 형질전환된 단백질 분해효소를 Ni-NAT agarose(Qiagen, USA)를 이용하여 세포 용해물로부터 계속하여 정제하였다. 단백질 분해효소의 용출 후에, 10KDa 분자량 cut-off 필터(Ultracel, Amicon, USA)를 통하여 정제하고, 세척하고, 및 HEPES 버퍼에서 재현탁한 후 이후 실험을 위해서 영하 20℃에서 보관하였다.

[0066] **실험예 8. SDS-PAGE 젤 전기영동 및 웨스턴 블랏을 이용한 발현된 단백질 분해효소 분석**

[0067] 대장균 BL21로 클로닝된 단백질 분해효소의 발현을 실험하기 위하여, 수확된 세포의 용해물을 로딩하고 SDS-PAGE 젤(Biorad, USA)에서 전기영동 하였다. 젤을 Coomassie blue 염색시약(Sigma, USA)으로 염색하였다. 웨스턴 블랏 분석을 위하여, 젤 상의 단백질을 Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell (Biorad, USA)을 이용하여

PVDF 멤브레인으로 이동시켰다. 멤브레인을 세척하고 제조업자의 설명에 따라 anti-His-tag 항체(Penta His HRP conjugate kit, 5 PRIME, Germany)를 적용하였다. 멤브레인 상에서 생물발광을 확인하기 위하여 Novex ECL HRP Chemiluminescent substrate (Invitrogen, USA)를 첨가하였다. ImageQuant LAS 4010 digital imaging system (GE Healthcare Life Sciences, USA)을 이용하여 생물발광을 시각화하였다.

[0068] 실험예 9. 재현성 및 통계 분석

[0069] 모든 실험은 최소한 세 번 반복하여 수행하였고, 샘플들 간의 표준편차는 그래프에서 오차 막대로 표시하였다. 96-well plates 실험은, 각 실험마다 최소 10개의 well의 전체 수로 각 균주마다 최소 3개의 다른 콜로니를 실험하였다. 통계분석은 2개의 실험 데이터 세트를 비교하기 위하여 Student t-test를 이용하여 수행하였고, 통계적 중요성은 그래프에 *, **, 및 ***를 이용하여 나타내었고, 각각은 0.05, 0.01, 및 0.001 이하의 p-값을 나타낸다. 3 개 이상의 실험데이터 세트를 비교하기 위하여, variance test (ANOVA)를 사용하였고 Tukey post-hoc test를 사용하였다. 본 실험에서는, 중요한 통계적 차이($p < 0.05$)를 가진 그룹은 그래프 상에서 다른 문자(a, b, c, d, 및 e)로 표시하여 구별하였다.

[0070] 실험결과

[0071] 1. 야생형 델로비브리오 박테리오포루스 포식 배양액의 상층액의 황색포도상구균 생물막 제거 활성 확인

[0072] 먹이로 대장균이 자라는 기주-의존적 델로비브리오 박테리오포루스 포식성 배양액의 세균이 없는 배양 상층액을 첨가하는 경우 황색포도상구균 생물막을 제거할 수 있는 활성이 있다는 것을 확인하였다.

[0073] 도 1a에서 알 수 있는 바와 같이, 이미 형성된 황색포도상구균의 생물막을 포식 상층액(10% (v/v)) 으로 처리하여 약 70%까지 생물막이 감소한 것을 확인하였다. 게다가, 이러한 생물막-제거 활성은 30분 동안 상층액을 끓임으로써 완전히 없어질 수 있는데, 이를 통하여 이러한 활성은 열에 의존적이라는 것을 확인하였다. 더욱이, HEPES 버퍼 내 대장균 현탁액을 준비하였지만, 포식자는 없었다. 이러한 먹이 세균을 음파처리(sonication)를 통하여 용해하고, 상층액을 여과하고 살균하였다. 도 1a에서 알 수 있는 바와 같이, 대장균 용해물은 생물막에 대하여 아무런 효과가 없었고, 이를 통하여 델로비브리오 박테리오포루스에 의해서 생물막-제거 요소가 생성된다는 것을 입증하였다. 포식 상층액의 생물막-제거 효과를 입증하기 위하여, 실리카 칩 위에 황색포도상구균 생물막을 한번 더 준비하였다. 생물막을 10%의 포식 상층액 또는 HEPES 버퍼 단독으로 처리하였다. 남아있는 생물막을 공초점 및 SEM 현미경을 이용하여 시각화하여 도 1b에 나타내었다. 도 1b에서 알 수 있는 바와 같이, 상층액을 처리한 실리카 칩에서 생물막의 양이 현저하게 감소한 것을 확인하였다.

[0074] 도 1a에서 알 수 있는 바와 같이, 포식 상층액을 세린 단백질 분해효소 저해제인 AEBF(4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride)로 처리하는 경우, 상층액의 항-생물막 활성이 급격하게 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통하여, 세린 단백질 분해효소가 상층액 내에 존재하고, 항-생물막 활성을 나타내는 주요한 요인임을 확인하였다. 상층액 내 단백질 분해효소 활성의 정량적인 분석은 3.2 ± 1.3 ng/ml의 단백질 분해효소 K와 동등하였다.

[0075] 2. Bdelloplast 용해 부산물뿐만 아니라 공격 단계 델로비브리오 박테리오포루스에 의한 단백질 분해효소 생성 확인

[0076] 본 발명자들은 처음에 상층액에 존재하는 가수분해 효소는 내부 주변 세포질 성장 단계(intraperiplasmic growth phase)의 부산물이고 delloplast의 용해 동안 델로비브리오 박테리오포루스의 자손(progency)과 함께 방출되는 것으로 생각하였다. 그러나, 공격 단계 기주 의존적 세포를 세척하고 형성된 황색포도상구균 생물막에 단독으로 첨가한 결과, 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 생물막을 거의 50%정도 완하시켰다. 이를 통하여, 공격 단계 기주 의존적 델로비브리오 박테리오포루스에 의해 효소들이 생성되고 외부로 분비되는 것을 확인하였다.

[0077] 이를 입증하기 위하여, TSB에서 황색포도상구균을 밤새 배양한 배양액을 원심분리하고 배지의 대부분을 제거(90%)하고 HEPES 버퍼로 대체하였다. 현탁액은 초음파로 분쇄하고, 멸균하고 여과하였다. 이어서, 세척한 델로비브리오 박테리오포루스 세포를 배지에 첨가하고 단백질 분해효소 활성을 시간에 따라 관찰하였다. 도 1c에서 알 수 있는 바와 같이, 공격 단계 델로비브리오 박테리오포루스는 배지로 단백질 분해효소를 분비하고, 6시간

후에 최고의 활성에 도달하였다. 또한, 도 1d에서 알 수 있는 바와 같이, 살아있는 델로비브리오 박테리오포루스의 수는 실험 시간(20h) 내내 지속적으로 남아있었다. 6시간 샘플을 0.22um 필터 살균하고 96 well plates 내 황색포도상구균 생물막에 첨가(10%)한 경우, 0시간 샘플은 전혀 효과가 없었던 반면에 예상한대로 생물막의 양이 현저히 완화된 것을 확인하였다.

[0078] 계속된 실험에서, 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 세척한 델로비브리오 박테리오포루스 세포를 다른 추가적인 양분없이 HEPES 버퍼에서만 재현탁한 경우, 시간에 따라 현탁액에서 단백질 활성이 전혀 검출되지 않았다. 이와는 반대로, 델로비브리오 박테리오포루스 세포를 영양배지(nutrient broth, NB)에 재현탁한 경우, 용해되고 멸균된 황색포도상구균 용액에서 관찰된 것과 유사하게 배지의 단백질 활성이 꾸준히 증가하는 것을 확인하였다.

[0079] 3. 다른 세균 생물막들에 대한 포식성 상층액의 효과의 차이 확인

[0080] 다른 속의 다양한 다른 균주에 의해 형성된 생물막에 대하여 포식성 상층액의 효과를 확인하였다. 그 결과 포식성 상층액은 보편적으로 그람-양성 생물막에 대한 좀 더 뚜렷한 효과를 갖는 것을 확인하였고, 도 2a에서 알 수 있는 바와 같이, 황색포도상구균을 포함하는 7개의 균주 실험 중에, 5번은 상층액을 처리하는 경우 바이오매스(biomass)가 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 이와는 대조적으로, 살모넬라 엔테리카의 생물막은 실제로 증가한 반면에, 그람-음성 생물막에 대해서는 상층액이 영향을 미치지 못하는 것을 확인하였다.

[0081] 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 상층액의 첨가에 의해 크게 영향을 받는 생물막의 경우, AEBSF 처리된 상층액 샘플과 함께 실험을 다시 한번 반복하였다. 황색포도상구균의 실험에서, AEBSF가 상층액 활성을 크게 억제할 수 있음을 통하여 생물막 제거 활성이 세린 단백질 분해효소에 의한 것임을 확인하였다.

[0082] 상층액 및 단백질 분해효소가 살모넬라 엔테리카와 같은 세균의 생물막을 증가시키는 이유를 이해하기 위하여, 단백질 분해효소 K를 이용하여 실험을 수행하였다. 그 결과, 도 8a에서 알 수 있는 바와 같이, 단백질 분해효소 K가 사용한 농도에 비례하여 살모넬라 엔테리카 생물막에 대하여 유사하거나 더 뚜렷한 향상을 유도하는 것을 확인하였다. 형성된 생물막을 시각화하여, 단백질 분해효소 K로 처리된 생물막은 well의 바닥뿐만 아니라 air liquid interface까지 생물막이 존재하는 것을 확인하였다. 이와는 대조적으로, 도 8b에서 알 수 있는 바와 같이, 대조군의 생물막은 단지 air-liquid interface에만 존재하였다. 포식성 상층액을 이용하는 경우 이와 유사한 효과를 확인하였다.

[0083] 계속된 실험에서, 살모넬라 엔테리카 플라젤린을 가수분해하는 포식성 상층액 및 단백질 분해효소 K의 효과를 실험하였다. 도 9에서 알 수 있는 바와 같이, 정제된 플라젤린 단백질은 상층액 및 단백질 분해효소 K에 의해 효과적으로 분해되었다. 또한, 살모넬라 엔테리카에 붙어있는 동안에 플라젤린을 직접 분해시키는 이러한 단백질 분해효소의 효과를 실험하였다. 이를 위하여, 살모넬라 엔테리카 세포는 포식성 상층액 또는 단백질 분해효소 K와 함께 24시간동안 배양하였다. 그 후, 각각의 샘플 내 살모넬라 엔테리카 세포로부터 플라젤린을 추출하고 SDS-PAGE 젤 분석을 통하여 플라젤린의 양을 비교하였다. 그 결과, 젤 상에서 플라젤린의 예상 크기에 해당하는 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었다. 도 10에서 알 수 있는 바와 같이, 플라젤린의 감소는 기주 의존적 델로비브리오 박테리오포루스의 상층액이 처리된 살모넬라 엔테리카에서 뚜렷하게 나타나지 않았다. 그러나, 단백질 분해효소 K가 처리된 경우, 특히 1000ng/ml의 농도로 처리한 경우, 추출된 플라젤린의 양에서 뚜렷한 감소를 확인하였다. 또한, Bradford assay 를 통한 각 샘플에서 단백질 농도 측정은 단백질 분해효소 K를 처리한 세포에서 플라젤린 농도의 감소를 확인하였고, 구체적으로, 처리하지 않은 세포의 경우 259.6 ± 5.2 에서 각각의 세포에 대하여 상층액 및 단백질 분해효소 K(100 ng/ml 및 1000 ng/ml)를 처리한 경우 235.4 ± 41.6 , 209.8 ± 10.6 , 및 208.9 ± 7.6 으로 감소하였다.

[0084] 4. 델로비브리오 박테리오포루스의 황색포도상구균과 살모넬라 엔테리카의 혼합된 생물막 제거 효과 확인

[0085] 델로비브리오 박테리오포루스에 대하여 각각 먹이 및 먹이가 아닌 두 병원체인 살모넬라 엔테리카 및 황색포도상구균으로 이루어진 독립적 및 혼합된 생물막을 96-well plate에 준비하였다. 도 2b에서 알 수 있는 바와 같이, 각각의 생물막에 대한 크리스탈 바이올렛 염색은 델로비브리오 박테리오포루스 배양액으로 처리한 독립적 또는 혼합된 종의 생물막에 대하여 먹이든 먹이가 아니든 생물막 양을 각각 감소시키는 것을 입증하였다. 좀 더 심도있는 연구를 위하여, 혼합된 생물막을 실리카 칩위에 준비하고 공초점 현미경 및 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM)을 이용하여 시각화하였다. 공초점 현미경 이미지에 관한 도 2c에서 알 수 있는 바와 같이, 두 가지 세균 종은 두 표면의 생물막 내에서 모두 균등한 분포를 나타내었다. 이는 살모넬라 엔테리카는

bacillus-shaped 세포 인 반면에 황색포도상구균은 명백하게 구균(cocci)으로 관찰되는 SEM 이미지에 의하여 입증하였다. 델로비브리오 박테리오포루스를 처리한 생물막 내에서 두 병원체의 존재는 모두 크게 감소하였으나, 형광 및 SEM 이미지에서 알 수 있는 바와 같이, 처리 후에 먹이가 아닌 황색포도상구균이 확인되었다. 그러나, 중요한 것은, 생물막 내 황색포도상구균의 존재가 살모넬라 엔테리카에 대한 뚜렷한 보호를 제공하지 못하며, 살모넬라 엔테리카 균주는 델로비브리오 박테리오포루스에 의해 거의 완벽하게 포식되는 것을 확인하였다.

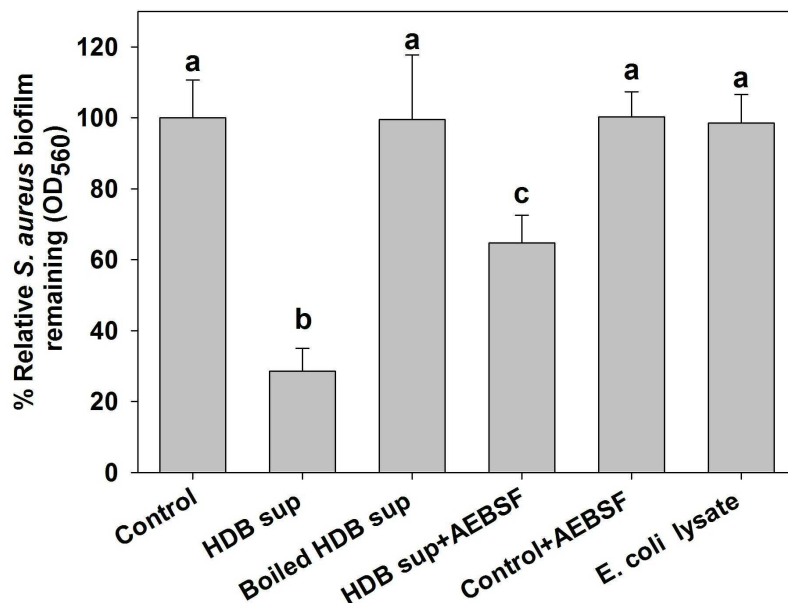
[0086] 5. 델로비브리오 박테리오포루스의 세포 외 세린 단백질 클로닝과 발현 및 세균 생물막 모델에서의 효과 확인

[0087] 델로비브리오 박테리오포루스 HD 100 균주의 게놈 염기서열로부터, 잠재적인 세포 외 세린 단백질 분해효소로서 11개의 유전자를 확인하였다. 결과적으로, 6개의 유전자를 선별하였고 포식 사이클 동안의 포식 패턴을 RT-qPCR 을 이용하여 확인하였다. 도 3a에서 알 수 있는 바와 같이, Bd0376, Bd1432, Bd1283 및 Bd2545을 포함하는 선별한 유전자 중 4개는, 공격 단계 동안 대부분 발현하였다. Bd2269 및 Bd2692의 2개의 다른 세린 단백질 분해효소의 발현은 공격 단계/증식 단계 변화 동안에도 크게 변하지 않았으나, 후기 내부 주변 세포질 성장 단계(late intraperiplasmic growth phase) 동안에 발현이 크게 유도되었다(180 min post attack).

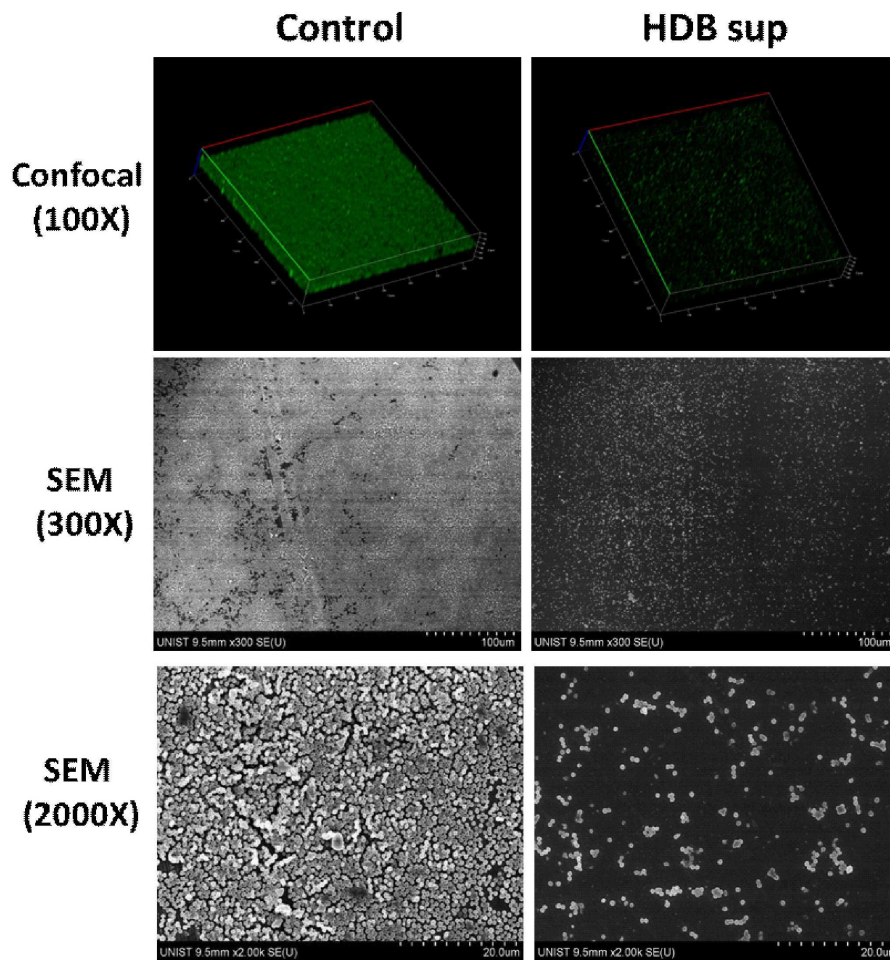
[0088] 결과적으로, 포식성 상층액으로 생물막-제거 활성화에 기여하는 세린 단백질 분해효소를 연구하기 위해서, Bd1283, Bd1432 및 Bd2692을 포함하는 3개의 세린 단백질 분해효소를 선별하였다. 각각의 단백질을 코딩하는 유전자를 클로닝하고 대장균 BL21(DE3)를 숙주 세포로 하여 발현시켰다. 대장균 BL21(DE3)에서의 Bd1283 및 Bd1432의 2 단백질 분해효소의 발현이 SDS-PAGE 젤 상에 뚜렷하지 않음에도 불구하고, 웨스턴 블랏 분석을 통하여 발현을 확인하였다(도 11). 단백질 분해효소는 정제하고 활성을 Azo-dye protease assay를 이용하여 단백질 분해효소 K와 관련하여 정상화하였다. 1 ng Pro.K equiv. /ml 규정도(equivalent concentration)를 이용하여, 도 3b 에서 알 수 있는 바와 같이, 96-well plates에서 모든 3가지 단백질이 황색포도상구균 생물막을 분산시킬 수 있음을 확인하였다. Bd2692는 그 활성이 다른 세린 단백질 분해효소보다 현저히 우수하고, 더욱이 10ng/ml의 단백질 분해효소 K보다 우수한 것을 확인하였다. 또한, 살모넬라 엔테리카 생물막에 Bd2692의 첨가는 포식성 상층액 및 단백질 분해효소 K에서 관찰된 것과 유사한 방법으로 생물막을 강화시키는 것을 확인하였다.

도면

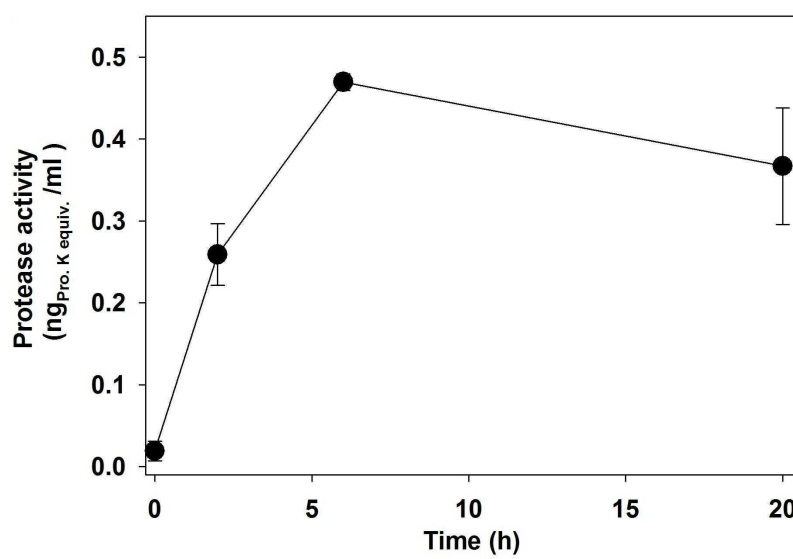
도면1a



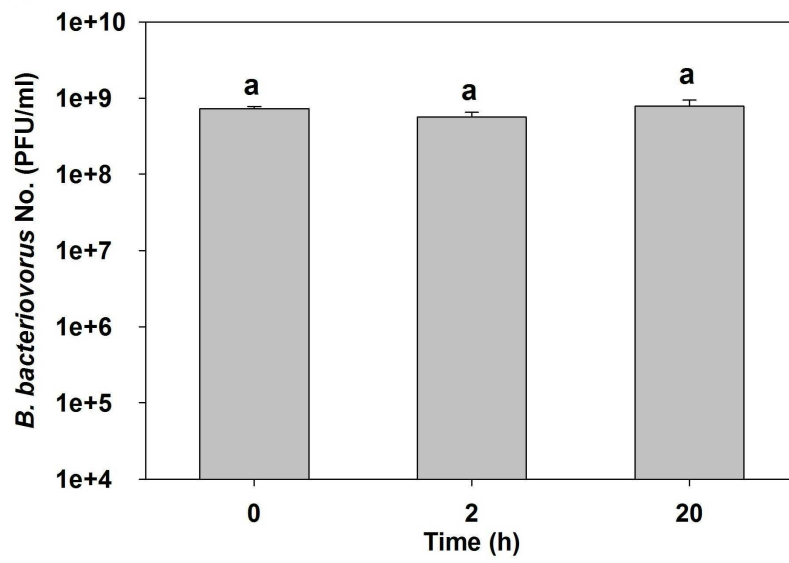
도면1b



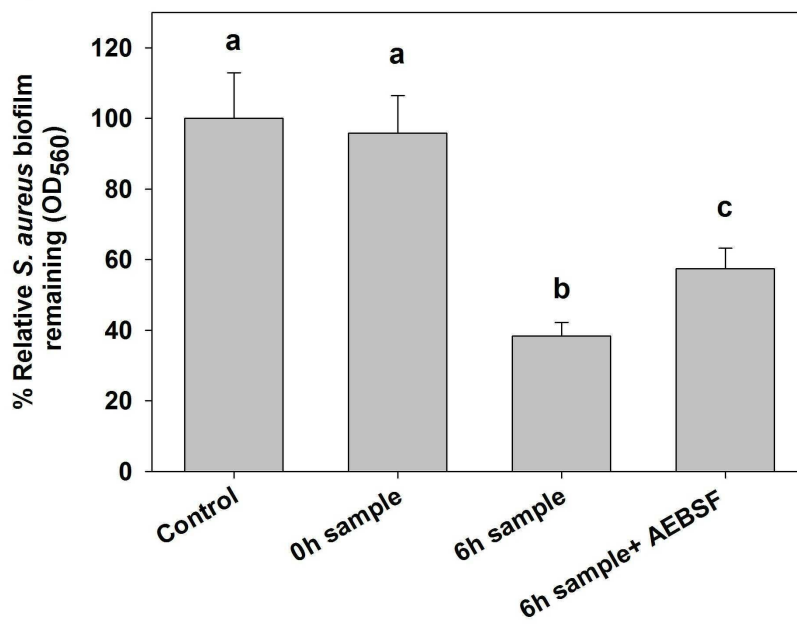
도면1c



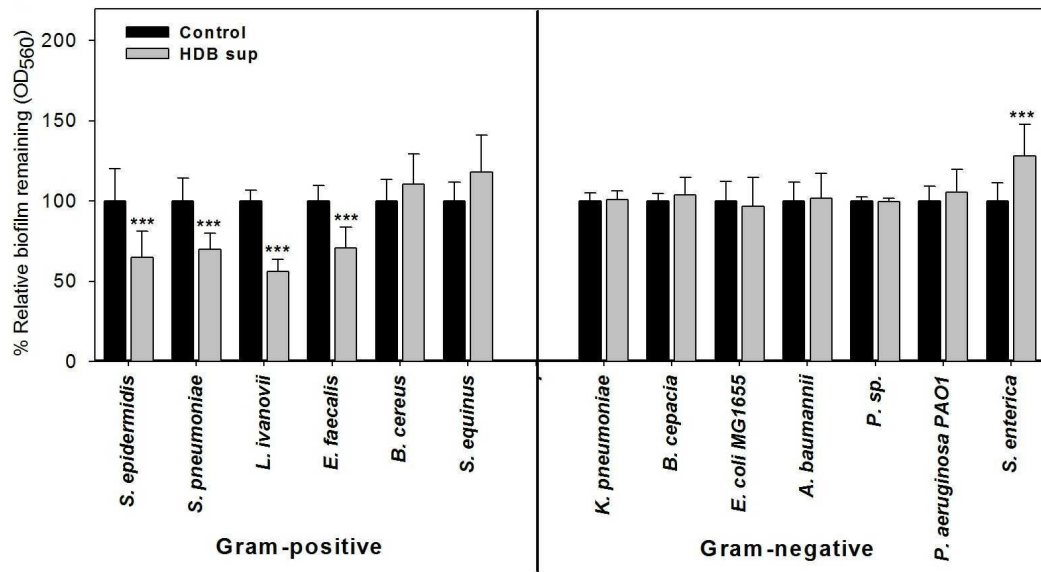
도면1d



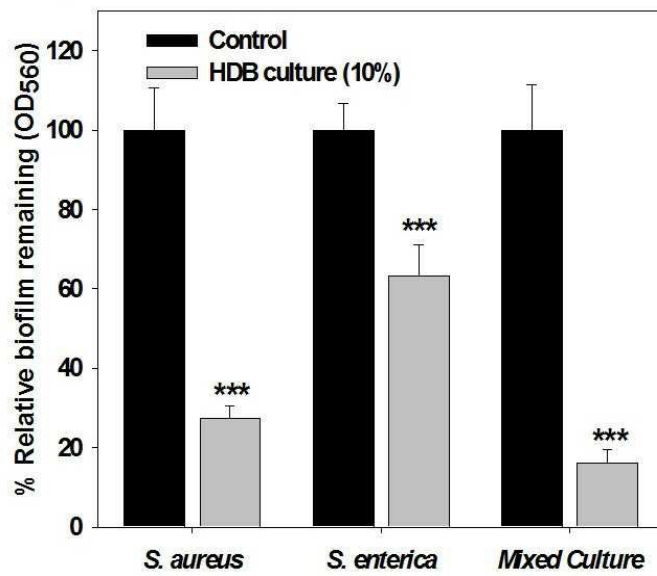
도면1e



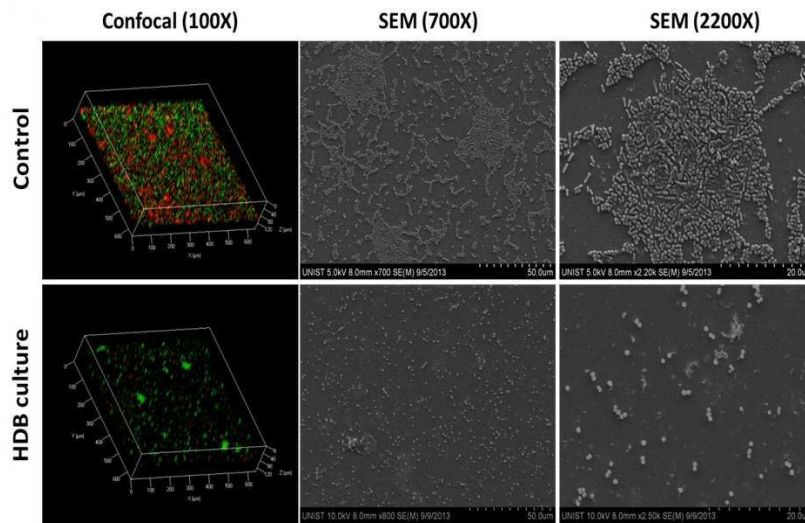
도면2a



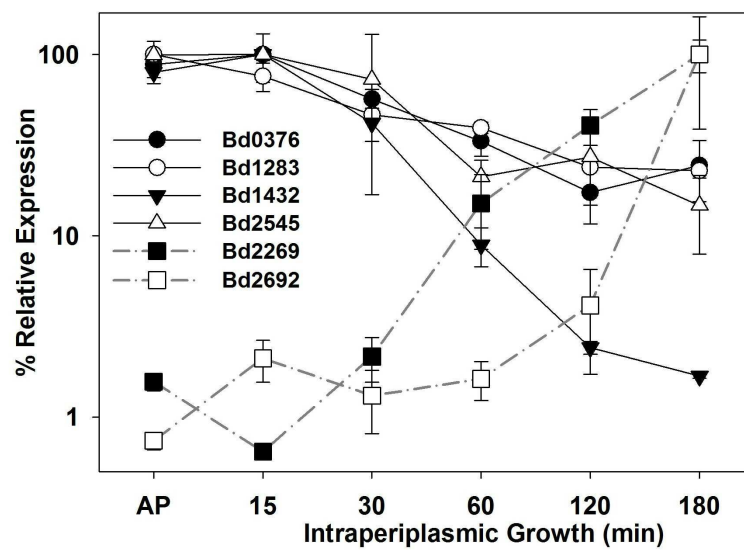
도면2b



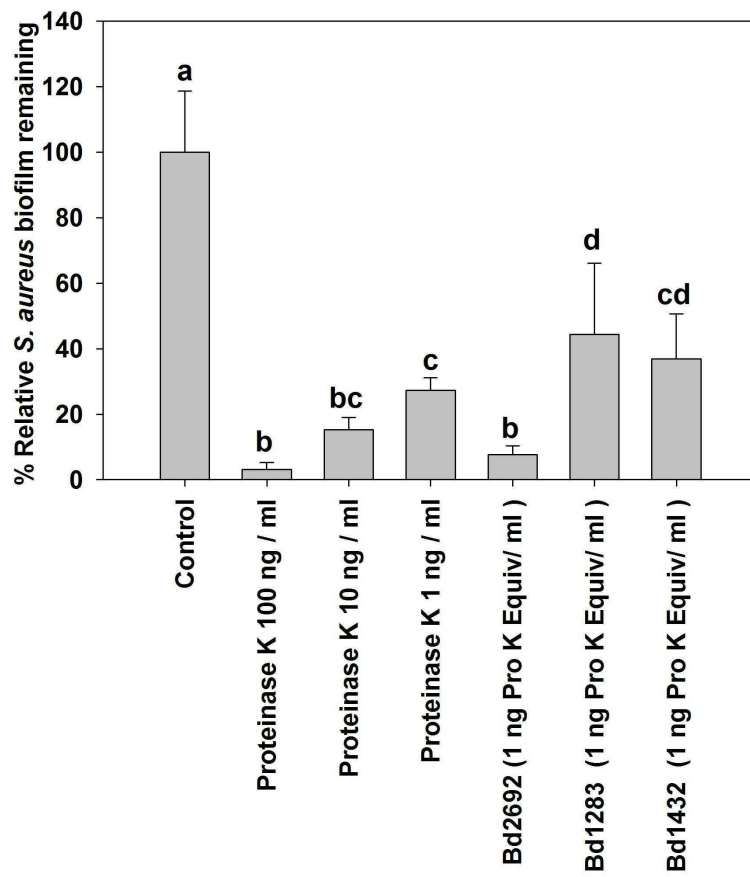
도면2c



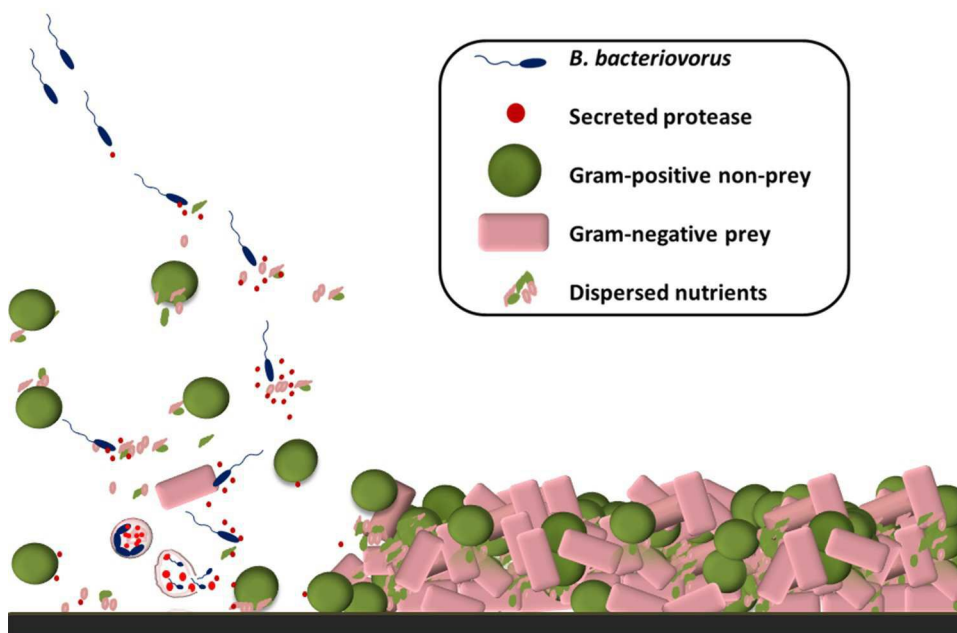
도면3a



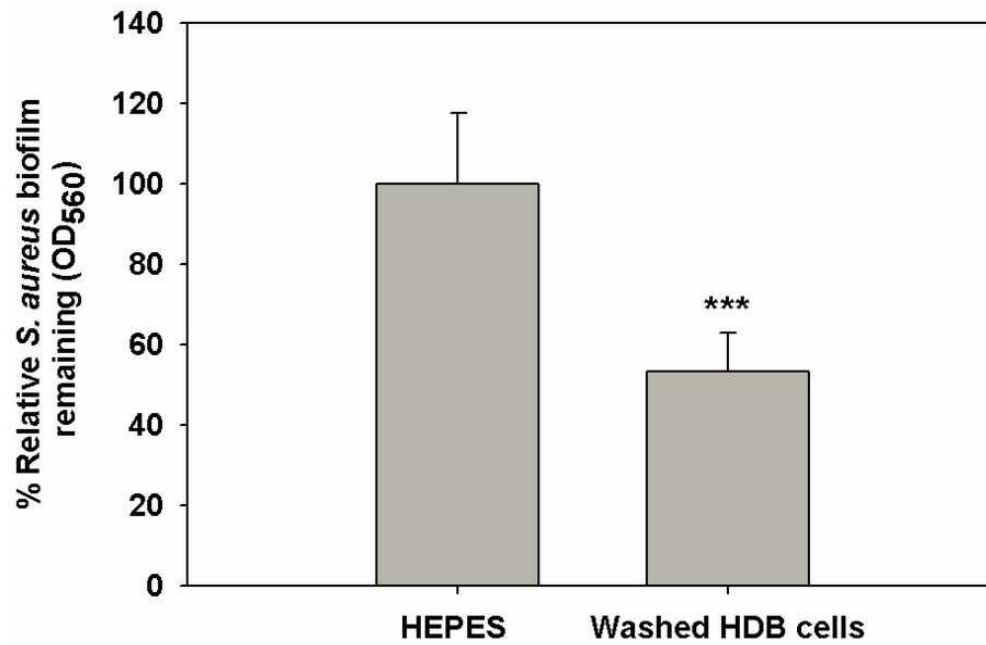
도면3b



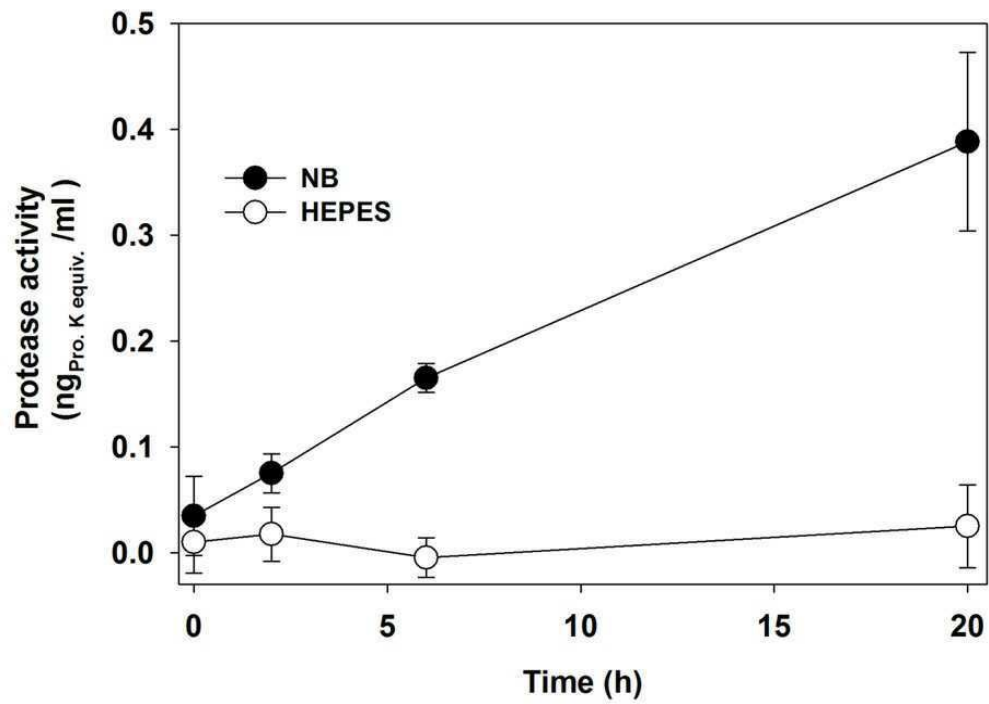
도면4



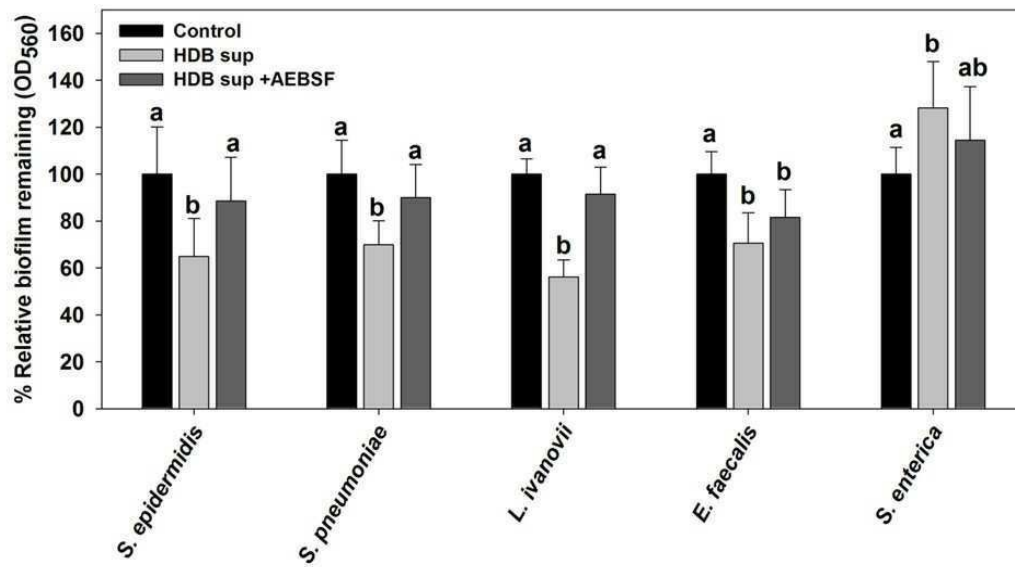
도면5



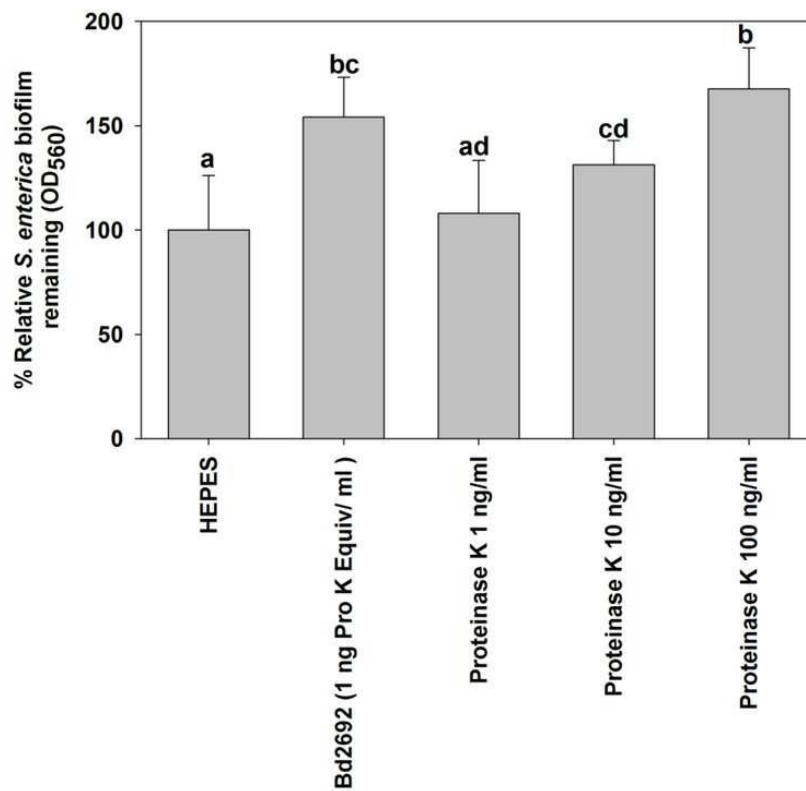
도면6



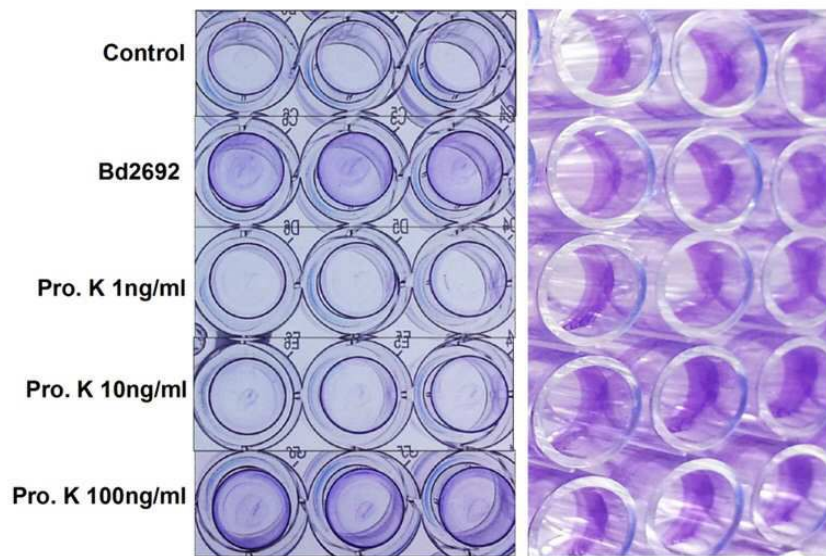
도면7



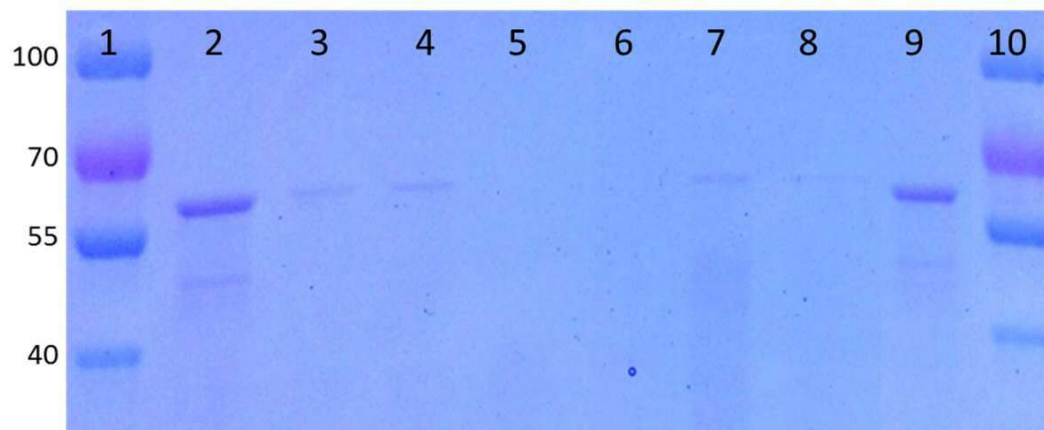
도면8a



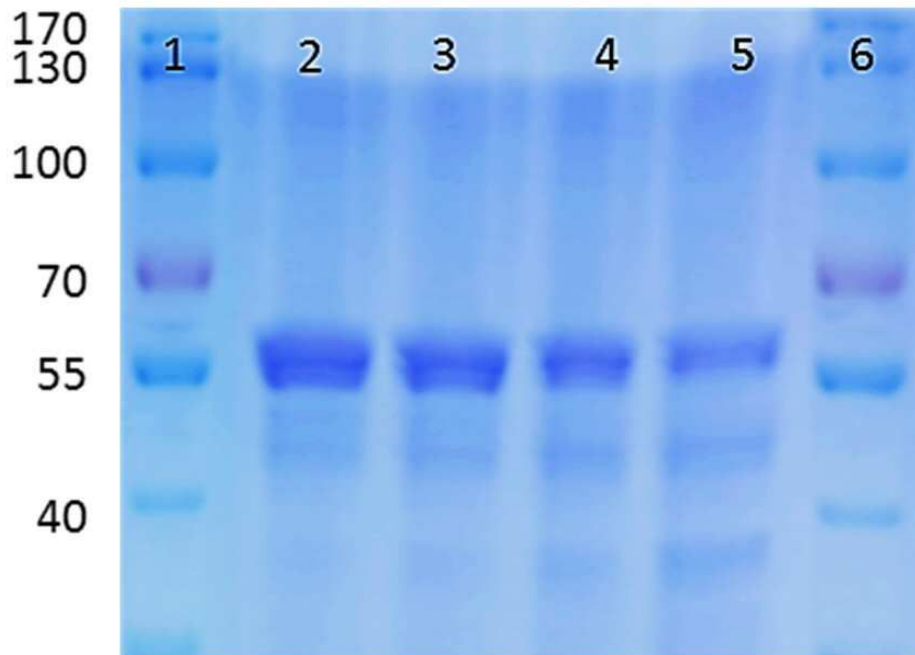
도면8b



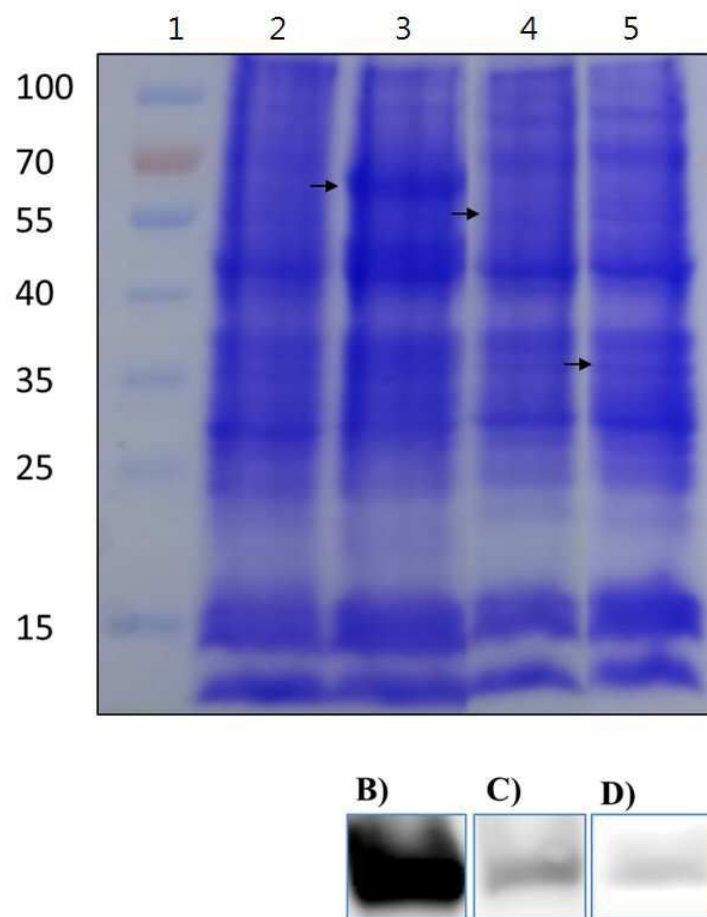
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> UNIST ACADEMY-INDUSTRY RESEARCH CORPORATION
 <120> Composition comprising extracellular protease of Bdellovibrio
 bacteriovorus for repressing or removing biofilm and using the
 same
 <130> DPP20150069KR
 <160> 18
 <170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Bdellovibrio bacteriovorus
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(513)
 <223> Bd2692
 <400> 1

Met Lys Arg Ala Leu Leu Val Gly Ala Val Leu Phe Gly Ser Gln Ala
 1 5 10 15

Phe Ala Gly Glu Tyr Leu Val Lys Tyr Ser Asn Thr Arg Ala Phe Asn
 20 25 30

Met Leu Asn Thr Met Thr Thr Ser Lys Val Ser Thr Ile Gln Met Met
 35 40 45

Asp His Asn Asp Thr Ala Ser Leu Val Leu Val Asp Val Asn Lys Lys
 50 55 60

His Glu Ala Gln Ala Leu Ala Ser Leu Leu Ser Gln Pro Gly Val Glu
 65 70 75 80

Tyr Ile Val Pro Asn Phe Lys Ile Arg Ala Phe Thr Ala Pro Val Asp
 85 90 95

Ala Ala Ala Leu Lys Glu Gln Trp Ala Ile Ala Lys Val Gln Ala Glu
 100 105 110

Lys Ala Trp Gln Arg Ala Gly Asn Lys Gly Ser Lys Asn Val Ile Val
 115 120 125

Ala Val Ile Asp Thr Gly Val Asp Tyr Thr His Pro Ala Leu Ala Pro
 130 135 140

Asn Met Ile Thr Gly Tyr Asp Phe Arg Asp Asn Asp Ala Asp Pro Met
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Phe Gln Asn Pro Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly
165 170 175

Ala Val Gly Ala Thr Gly Leu Ile Asp Gly Gly Ile Val Gly Leu Ser
180 185 190

Pro Glu Val Ser Met Met Pro Leu Arg Phe Leu Gly Ala Asp Gly Ser
195 200 205

Gly Asp Leu Asn Asn Ala Ile Lys Ser Ile Asp Tyr Ala Val Glu Lys
210 215 220

Gly Ala Gln Ile Ile Ser Ala Ser Trp Gly Ala Ala Val Pro Arg Ser

225 230 235 240

Gln Ala Ala Pro Leu Leu Glu Ala Val Lys Arg Ala Asp Asp Lys Gly
245 250 255

Val Ile Phe Ile Ala Ala Ala Ala Asn Asp Gly Lys Asn Asn Asp Lys
260 265 270

Thr Glu Met Phe Pro Ala Asn Asn Gly Tyr Pro Asn Ser Ile Thr Val
275 280 285

Ala Ala Ser Gly Pro Ala Asp Ala Lys Pro Ser Trp Ser Asn Tyr Gly
290 295 300

Thr Ala Thr Val His Val Ser Ala Pro Gly Glu Asn Ile Met Ser Thr
305 310 315 320

Leu Pro Lys Asn Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr
325 330 335

Pro Leu Val Ser Gly Leu Val Ala Leu Met Lys Ala Gln Asp Pro Ser
340 345 350

Leu Thr Gly Ala Gln Ile Arg Ala Ile Leu Gln Thr Thr Gly Ala Lys
355 360 365

Val Ser Ile Glu Thr Ala Cys Asn Cys Arg Val Asp Ala Tyr Glu Ala

370 375 380

Val Glu Ala Val Met Ser Lys Lys Met Val Val Val Pro Ala Ala Ala

385 390 395 400
 Thr Ile Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ala Leu Ser Val Leu His Gly Lys
 405 410 415
 Ala Pro Phe Lys Phe Ala Ser Ser Asn Ser Ser Val Ala Ser Val Ser
 420 425 430
 Asp Asn Gly Thr Leu Thr Ala Ala Ser Asn Gly Ser Thr Val Val Thr
 435 440 445

 Val Thr Asp Ala Asp Gly Lys Thr Ala Ser Thr Leu Asn Ile His Val
 450 455 460
 Gly Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asn Asn Pro Pro Pro Asp Asn Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Leu Pro Asp Pro Gly Gln Pro Gly Glu Cys Pro Leu Gly Asp Pro
 485 490 495
 Ala Ile Cys Gln Ile Ile Cys Gln Ile Lys Pro Asp Leu Pro Phe Cys
 500 505 510
 Gln

<

210> 2
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> Bdellovibrio bacteriovorus
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(303)
 <223> Bd1432
 <400> 2

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

Trp Val Asn Pro Arg Glu Lys Asp Asn Met Lys Asp Asp Asp Gly Asn

50 55 60
 Gly Tyr Ala Asp Asp Leu His Gly Trp Asn Phe Val Ser Asn Asn Asn
 65 70 75 80
 Asp Leu Thr Asp Asn His Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ile Ile
 85 90 95
 Gln Gln Arg Thr Arg Ser Ser Arg Val Lys Phe Met Ile Leu Lys Tyr
 100 105 110
 Tyr Asp Pro Ser Ile Pro Ala Asn Asp Asn Leu Met Asn Thr Val Lys

 115 120 125
 Ala Ile Arg Tyr Ala Thr Lys Met Lys Ala Asp Ile Ile Asn Tyr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Asp Glu Arg Ser Pro Met Glu Glu Ala Ala Ile Arg Asp
 145 150 155 160
 Ala Gln Glu Gln Gly Ile Leu Phe Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly
 165 170 175
 Arg Asn Thr Asp Leu Val Gly Tyr Tyr Pro Ala Gly Tyr Lys Leu Asn
 180 185 190

 Asn Ile Ile Ser Val Ala Ala Met Asp Ser Gln Arg Arg Leu Leu Ala
 195 200 205
 Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gly Ser Val Asp Ile Ala Ala Pro Gly Lys
 210 215 220
 Asn Val Phe Ser Ala Leu Pro Gly Gly Lys Tyr Gly Tyr Met Ser Gly
 225 230 235 240
 Thr Ser Gln Ala Thr Ala Trp Val Ser Gly Leu Ala Ala Ser Leu Met
 245 250 255
 Leu Asn Arg Pro Trp Glu Thr Leu Ala Pro Gln Glu Ile Lys Asn Ala

 260 265 270
 Leu Val Lys Ser Gly Ile Lys Asp Arg Gln Leu Ser Lys Lys Ile Arg
 275 280 285
 Ser Gln Thr Arg Ile Ser Asn Leu Gln Ala Gly Leu Asn Leu Glu
 290 295 300
 <210> 3

<211> 467
 <212> PRT
 <213> Bdellovibrio bacteriovorus
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(467)
 <223> Bd1283
 <400> 3

Met Phe Val Ala Lys Gly Ala Tyr Leu Met Phe Ser Arg Lys Met Ile

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

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

145	150	155	160
Asn	Phe	Val	Ser
Asn	Asn	Pro	Lys
Leu	Asp	Asp	Asn
His	Gly	His	Gly
165	170	175	
Thr	His	Ile	Ala
Gly	Ile	Ile	Gly
Ala	Glu	Ala	Gly
Asn	Gly	Lys	Gly
180	185	190	
Ile	Thr	Gly	Ile
Ala	Pro	Glu	Val
Ser	Leu	Met	Ile
Leu	Lys	Tyr	Tyr

195 200 205
 Asp Pro Lys Val Pro Gly Thr Asp Asn Leu Lys Asn Thr Val Ala Ser
 210 215 220

 Ile Arg Tyr Ala Val Lys Met Gly Ala His Ile Ile Asn Tyr Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Glu Phe Ser Gln Glu Glu His Asp Ala Ile Ala Glu Ala
 245 250 255
 Glu Lys Lys Gly Ile Leu Phe Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Arg Ser
 260 265 270
 Asn Ser Asp Gln His His Tyr Tyr Pro Ala Asp Tyr Lys Leu Ser Asn
 275 280 285
 Ile Ile Ser Val Thr Ala Ile Asp Pro Ser Thr Gln Val Leu Ala Ser

 290 295 300
 Ser Asn Tyr Gly Val Glu Thr Val Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asn
 305 310 315 320
 Ile Leu Ser Cys Leu Pro Gly Asn Ser Tyr Gly Tyr Met Thr Gly Thr
 325 330 335
 Ser Gln Ala Thr Ala Phe Val Thr Gly Ala Ala Ala Leu Val Met Ala
 340 345 350
 His Lys Gln Ser Phe Ser Ala Ser Asp Val Lys Lys Tyr Ile Leu Ala
 355 360 365

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

 435 440 445

Met Gly Thr Lys Val Arg Pro Ser Lys Leu Gly Thr Lys Gln Glu Asn
450 455 460

Glu Gly Phe
465

<210> 4
<211> 628
<212> PRT
<213> Bdellovibrio bacteriovorus
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(628)
<223> Bd2545
<400> 4

Met Thr Pro Ile Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ser Leu Val Leu Ile Gly
1 5 10 15

Trp Asn Ala Gly Ala Gln Thr Ala Pro Glu Ala Val Pro Gly Glu Tyr
20 25 30

Leu Ile Lys Phe Lys Ala Ser Ser Gly Gly Ala Gly Leu Ala Gln Thr
35 40 45

Lys Leu Gln Gly Lys Ala Asn Leu Lys Ala Ala Phe Pro Gly Leu Gly
50 55 60

Val Phe Gln Val Ser Met Lys Ser Asp Val Asp Glu Lys Ala Thr Phe
65 70 75 80

Glu Ala Leu Lys Asn Asp Pro Asp Ile Glu Tyr Ile Glu Pro Asn Phe
85 90 95

Val Leu Lys Lys Asn Glu Val Glu Pro Asn Gly Pro Val Glu Arg Leu
100 105 110

Ser Tyr Glu Gln Val Val Ala Ser Gly Tyr Val Ser Ser Asn Pro Ser
115 120 125

Val Tyr Ser Gln Ser Thr Ala Asp Thr Arg Val Ala Asp Ser Trp Gly
130 135 140

Tyr Gln Thr Ala Leu Asp Ala Gln His Gly Lys Val Ile Val Ala Val
145 150 155 160

Val Asp Thr Gly Leu Asp Lys Ala His Asp Val Phe Lys Pro Tyr Asn

165 170 175

Ala Asn Gly Thr Gly Gly Thr Gly Ala Leu Trp Ile Asn Gln Ile Glu

180 185 190

Ala Ser Gly Thr Pro Gly Val Asp Asp Asp Gln Asn Gly Phe Val Asp

195 200 205

Asp Ile Asn Gly Trp Asn Phe Ile Ser Asn Thr Gly Asn Phe Tyr Asp

210 215 220

Asp Asp Asp His Gly Thr His Val Ala Gly Ile Val Val Gly Ala Gly

225 230 235 240

Gln Asn Ile Phe Ala Arg Pro Leu Ala Glu Ser Lys Ile Gln Ile Met

245 250 255

Pro Leu Lys Phe Leu Gly Ala Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Ala

260 265 270

Ile Lys Ala Ile Tyr Tyr Ala Val Asn Asn Gly Ala Lys Val Ile Asn

275 280 285

Asn Ser Trp Gly Gly Ser Gly Tyr Ser Arg Ser Leu His Asp Ala Ile

290 295 300

Thr Tyr Ala Tyr Asp His His Val Leu Val Val Ser Ala Ala Gly Asn

305 310 315 320

Tyr Gly Ser Asn Asn Asp Ser Ala Pro Met Tyr Pro Ala Asn Tyr Asp

325 330 335

Val Pro Ser Asn Ile Ala Ile Ala Ser Thr Ser Lys Trp Asp Asp Arg

340 345 350

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

355 360 365

Gly Glu Tyr Ile Glu Ser Thr Val Pro Gly Asn Glu Thr Leu Lys Met

370 375 380

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

385 390 395 400

Ala Leu Arg Glu Ala Pro Gly Leu Ser Gly Tyr Gln Leu Lys Gln Leu

405 410 415
Val Ile Gln Ser Ala Asp Gln Val Tyr Ser Leu Asn Gly Ile Val Ser
420 425 430
Ser Ser Ala Arg Ile Asp Ala Leu Ser Leu Leu Thr Gly Ala Gln Ser
435 440 445
Met Ala Ser Ala Gln Ser Ser Gln Pro Ser Tyr Lys Pro Ser Tyr Leu

450 455 460
Ser Glu Arg Ser Val Ala Ser Asp Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys
465 470 475 480
Gly Leu Val Arg Ser Val Ile Asn Gln Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gly
485 490 495
Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Gly Val Val Phe Gly Leu Leu Met Val
500 505 510
Pro Leu Ile Leu Trp Gln Val Leu Arg Ala Arg Asp Pro Lys Ala Arg
515 520 525

Arg Lys His Asp Arg Phe Lys Met Ser Ser Glu Ile Arg Val Gln Val
530 535 540
Gly Asp Arg Glu Leu Val Gly Ser Val Asn Thr Ile Ser Gln Gly Gly
545 550 555 560
Leu Ser Phe Asn Thr Asp Gln Ala Leu Glu Lys Gly Gly Ile Val Thr
565 570 575
Met Arg Ile Gln Ser Pro Asp Gly His Glu Val Ile Glu Val Gln Gly
580 585 590
Gln Val Val Trp Cys Glu Glu Asn Lys Ala Tyr Gly Val Ala Phe Glu

595 600 605
Asn Ala Arg Thr Gly Thr Leu Ala Met Ile Arg Asp Trp Thr Ser Gly
610 615 620
Leu Ile Lys Thr

625

<210> 5

<211> 549

<212> PRT

<213> Bdellovibrio bacteriovorus

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(549)

<223> Bd2269

<400> 5

Met Lys Ser Met Asp Met Gly Gly Ile Val Met Lys Phe Asn Val Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Leu Val Ile Met Lys Asp Gln Gln Ser Phe Asn Lys Ala His Met

35 40 45

Ala Tyr Lys Met Lys Gly Ser Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Asp Leu Gly

50 55 60

Val Gln Ser Gln Ala Val Gly Gln Leu Glu Asp Ser Leu Ala Asn Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Ala Asn Pro Ala Val Ala Tyr Val Glu Lys Glu Ile Phe His Asp

100 105 110

Ala Pro Ala Pro Val Lys Gly Phe Leu Gly Gln Ser Arg Gln Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Leu Asp Thr Gly Ile Asp Glu Ala His Pro Ser Leu Ala Ala Asn

165 170 175

Phe Glu Lys Gly Lys Asp Phe Thr Gly Asp Ser Asn Gly Ser Asp Phe

180 185 190

Ser Asp Lys Val Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Gly

195 200 205

Val Leu Asp Asn Thr Gly Phe Thr Gly Val Ala Pro Lys Ala Lys Val

210 215 220
 Leu Ala Gly Arg Val Cys Ser Glu Gln Gly Cys Ser Asn Val Ala Ile
 225 230 235 240

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

 305 310 315 320
 Tyr Gly Pro Glu Leu Ala Val Val Ala Pro Gly Val Ala Val Val Ser
 325 330 335
 Ser Val Pro Gln Gly Thr Gly Arg Glu Ser Ala Val Ser Val Ser Asn
 340 345 350
 Gly Gln Lys Thr Val Lys Val Ala Ser Ser Thr Phe Gln Gly Ala Arg
 355 360 365
 Glu Ile Leu Thr Pro Glu Thr Asn Val Leu Val His Ala Asn Leu Gly
 370 375 380

 Lys Pro Glu Asp Phe Ala Lys Val Asp Val Lys Gly Lys Tyr Ala Leu
 385 390 395 400
 Ile Ser Arg Gly Glu Ile Thr Phe Gly Asp Lys Val Lys Asn Ala Ile
 405 410 415
 Lys Ala Gly Ala Ala Gly Val Val Val Tyr Asn Asn Ala Pro Gly Leu
 420 425 430
 Ile Gln Gly Ala Leu Thr Asp Asp Gly Ser Val Leu Pro Val Gly Val
 435 440 445
 Phe Met Ile Glu Gln Thr Val Gly Leu Glu Met Val Arg Val Ile Asn

 450 455 460

Ser Gly Lys Val Ala Thr Ala Thr Leu His Thr Met Ala Thr Asp Tyr
465 470 475 480
Ala Pro Phe Asp Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ser Gly Val
485 490 495
Val Ala Leu Met Lys Ala Ala Asn Lys Ala Leu Thr Gly Ala Gln Val
500 505 510
Lys Glu Ile Leu Lys Arg Thr Ala Thr Pro Leu Ser Pro Asn Ser Ala
515 520 525

Asn Glu Leu Gly Ala Gly Ile Val Asn Ala Glu Ala Ala Val Gln Ala
530 535 540
Ala Ile Asp Ala Lys
545
<210> 6
<211> 565
<212> PRT
<213> Bdellovibrio bacteriovorus
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(565)
<223> Bd0376
<400> 6
Met Leu Ala Gly Leu Ala Val Ile Ala Thr Ile Thr Gly Thr Leu Phe
1 5 10 15
Thr Asn Cys Ala Lys Asn Ser Phe Thr Ala Val Gly Glu Glu Leu Val
20 25 30

Gly Thr Gly Ala Asp Pro Leu Leu Gly Tyr Ala Trp His Ile Asn Asn
35 40 45
Thr Gly Gln Lys Val Phe Ala Thr Asp Ala Gly Thr Ala Gly Val Asp
50 55 60
Leu Asn Leu Leu Gln Ser Trp Thr Gly Gly Leu Thr Gly Ser Gly Ile
65 70 75 80
Lys Ile Val Ile Ser Asp Asp Gly Val Gln Asp Ala His Pro Asp Leu
85 90 95

Lys Asp Asn Phe Leu Tyr Gly Val Ser Lys Asn Tyr His Thr Ser Gly

100 105 110

Thr Asn Asn Ala Pro Pro Asn Ser Ala Asp Asp Asn His Gly Thr Ala

115 120 125

Val Ala Gly Leu Ala Ala Ala Val Gly Asp Asn Gly Val Gly Ser Lys

130 135 140

Gly Val Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Leu Ala Tyr Asn Phe Leu Ser Thr

145 150 155 160

Gly Val Ser Gln Thr Phe Ser Arg Met Ala Glu Gln Leu Ser Gly Gly

165 170 175

Tyr Asp Val Tyr Asn Met Ser Trp Gly Asn Ser Gln Asn Tyr Leu Pro

180 185 190

Asp Pro Val Ala Ala Trp Glu Thr Ala Leu Leu Asn Gly Val Leu Asn

195 200 205

Gly Arg Ser Gly Lys Gly Ser Ile Tyr Val Lys Ser Ala Gly Asn Asp

210 215 220

Phe Leu Val Glu Cys Lys Gly Ser Thr Asp Thr Tyr Cys Ile Gly Asn

225 230 235 240

Ser Asn Leu Asp Pro Asp Asn Ser Thr Pro Tyr Thr Ile Leu Val Thr

245 250 255

Ala Leu Asn Ser Thr Gly Asp Ala Ala Ser Tyr Ser Ser Val Gly Ser

260 265 270

Asn Val Trp Ile Ser Ser Phe Gly Gly Glu Ser Gly Asp Asp Ser Pro

275 280 285

Ala Met Val Thr Thr Asp Arg Thr Gly Cys Thr Ala Gly Tyr Ala Gln

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Asn Cys Asn Tyr Thr Thr Thr Phe Asn Gly Thr Ser Ser Ala Ala

325 330 335

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

340 345 350
 Leu Asn Trp Arg Asp Val Lys Tyr Ile Leu Ala Lys Thr Ala Val Gln
 355 360 365
 Val Arg Pro Asn Ser Gly Ala Ile Ser Asn His Pro Leu Arg Asn Tyr
 370 375 380
 Pro Gly Asn Ser Ser Lys Asn Val Ile Leu Pro Thr Gly Ala Val Trp

 385 390 395 400
 Glu Asn Ala Trp Val Thr Asn Ser Ala Gly Phe Lys Phe His Asn Trp
 405 410 415
 Tyr Gly Phe Gly Arg Val Asp Val Asp Ala Ala Val Ala Met Ala Lys
 420 425 430
 Asn Tyr Thr Ser Thr Phe Thr Ala Gly Leu Ser Gly Thr Ser Trp Ile
 435 440 445
 Glu Asn Thr Thr Arg Val Ala Ile Pro Asp Tyr Ser Ala Thr Gly Val
 450 455 460

 Ser Asn Thr Val Thr Val Thr Asp Asn Leu Arg Ile Glu Gly Val Arg
 465 470 475 480
 Ile Arg Leu Lys Val Asp His Asp Arg Val Gly Asp Leu Gly Val Glu
 485 490 495
 Leu Thr Ser Pro Ser Gly Thr Lys Ser Met Ile Leu Asn Met Arg Asn
 500 505 510
 Ser Leu Leu Gly Gln Val Asp Tyr Asp Asn Glu Val Phe Leu Ser Asn
 515 520 525
 Ala Phe Phe Gln Glu Arg Ser Asn Gly Thr Trp Thr Ile Lys Val Ile

 530 535 540
 Asp Gly Gly Ser Thr Phe Asn Gly Asp Leu Val Ser Trp Gly Leu Gln
 545 550 555 560
 Ile Ile Gly Thr Pro
 565

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bd0376 Forward primer

<400> 7

aataaatcat aagtgacggc attaaattcc ac 32

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bd0376 Reverse primer

<400> 8

aataaatcat aaaatgctgg tctgagcata gc 32

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bd1283 Forward primer

<400> 9

aataaatcat aaacgggtat cgacatcaaa ca 32

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bd1283 Reverse primer

<400> 10

aataaatcat aaggaaacaa agttccagcc at 32

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bd1432 Forward primer

<400> 11

aataaatcat aagcgggata caaactgaac aa 32

<210> 12

<211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bd1432 Reverse primer
 <400> 12
 aataaatcat aaccgctcat gtatccgtac tt 32
 <210> 13
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bd2269 Forward primer
 <400>
 13
 aataaatcat aagatgaagc tcaccgtct tt 32
 <210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bd2269 Reverse primer
 <400> 14
 aataaatcat aatgctttag gagcaacacc ag 32
 <210> 15
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bd2545 Forward primer
 <400> 15
 aataaatcat aatttatctc caacaccgga aa 32
 <210> 16
 <
 211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bd2545 Reverse primer
 <400> 16

aataaatcat aaaatggcat tggctgtaga ac 32

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bd2692 Forward primer

<400> 17

aataaatcat aaggtctgat cgacggtggt at 32

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bd2692 Reverse primer

<400> 18

aataaatcat aaagaaatga tctgagcgcc tt 32