(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C12N 9/54 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0092663
(43) 공개일자 2006년08월23일

(21) 출원번호 10-2005-0013731
(22) 출원일자 2005년02월18일

(71) 출원인 인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 장정순
서울특별시 영등포구 여의도동 광장아파트 8-806호
주한승
서울특별시 양천구 신정4동 957-34
최장원
대구광역시 수성구 신매동 579 번지 시지천마타운 221동 1203호

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 계면활성제 및 산화제에 매우 안정한 호염, 호알카리성 단백질 분해효소 및 이를 암호화하는 유전자

요약

본 발명은 바실러스 클라우지 I-52 균주에서 생산된 단백질 분해효소 및 이를 암호화하는 유전자에 관한 것으로서, 구체적으로 극심한 환경 조건하에서도 활성을 유지하는 바실러스 클라우지 I-52 균주 유래의 단백질 분해효소 및 이를 암호화하는 유전자에 관한 것이다. 본 발명의 단백질 분해효소는 의류용 또는 콘택트 렌즈용 세제의 성분으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 식품, 사료, 천연 가죽 등의 가공 및 유기 폐기물의 처리에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 16

명세서

도면의 간단한 설명

도 1 은 pH 변화에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 2 는 온도 변화에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 3 은 염 농도 변화에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 상대 활성을 나타낸 그래프이고,

도 4 는 음이온성 계면 활성제인 소디움 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate)의 농도에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 5 는 과산화 수소수의 농도에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 6 은 소디움 퍼보레이트의 농도에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 7 은 본 발명의 단백질 분해효소를 시판되고 있는 상용세제와 함께 두었을 때, 본 발명의 단백질 분해효소가 효소 안정성을 유지하는지를 실험한 결과를 나타내는 그래프이고,

도 8 은 세제 성분인 LAS(15%) 존재하에서 바실러스 클라우지가 생산한 단백질 분해효소에 의한 세척력을 나타낸 그래프이고,

도 9 는 바실러스 클라우지가 생산한 단백질 분해효소에 의한 대두박 분해 능력을 나타낸 사진이고,

레인 M: 단백질 분자량 마커,

레인 1: 처리 전, 레인 2: 처리 후 2 시간,

레인 3: 처리 후 4 시간, 레인 4: 처리 후 8 시간,

레인 5: 처리 후 16 시간

도 10 은 바실러스 클라우지가 생산한 단백질 분해효소에 의한 대두박의 트립신 억제자(Soybean trypsin inhibitor, SBTI)의 분해 능력을 나타낸 그래프이고,

도 11 은 바실러스 클라우지 I-52의 염색체 DNA를 주형으로 하여 중합효소 연쇄반응 시 사용되는 프라이머의 위치와 증폭되는 부분을 나타내는 모식도이고,

도 12 는 각 프라이머 조합으로 중합효소 연쇄반응한 결과를 나타내는 겔 전기영동 사진이고,

레인 M: 100 bp 래더 DNA 분자량 마커,

레인 1: 프라이머 F2/R1 조합 레인 2: 프라이머 F2/R2 조합

레인 3: 프라이머 F2/R3 조합 레인 4: 프라이머 F3/R2 조합

레인 4: 프라이머 F3/R2 조합 레인 6: 프라이머 F3/R3 조합

도 13 은 프라이머 F3/R2 조합으로 얻어진 중합효소 연쇄반응 산물을 pGEM-Teay 플라스미드에 도입한 후, 이를 제한효소로 절단하여 삽입되어 있는 DNA 단편을 확인한 결과를 나타내는 겔 전기영동 사진이고,

레인 M: 람다 DNA 분자량 마커,

레인 1: 삽인된 DNA 단편의 EcoRI 처리 산물

도 14 은 성숙 프로테아제(BCAP) 발현용 플라스미드(pT7-BCAP)의 모식도이고,

도 15 는 성숙 프로테아제(BCAP)를 암호화 하는 유전자를 pT7-7 플라스미드에 도입한 후, 이를 제한효소로 절단하여 삽입되어 있는 DNA 단편을 확인한 결과를 나타내는 겔 전기영동 사진이고,

레인 M: 람다(λ) DNA 분자량 마커,

레인 1, 2 및 3: 삽입된 DNA 단편의 Nco I 과 Hind III 처리 산물, 각 클론 1, 2 및 3

도 16은 성숙 프로테아제를 발현하는 형질전환체에 IPTG를 첨가하여 배양함으로써 유도된 성숙 프로테아제를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 사진이고,

레인 M: 단백질 분자량 마커,

레인 1: IPTG 유도 전, 레인 2: IPTG 유도 후 1 시간,

레인 3: IPTG 유도 후 2 시간, 레인 4: IPTG 유도 후 3 시간,

화살표: 발현 유도된 성숙 프로테아제 밴드,

도 17 은 서열번호 1으로 기재되는 유전자를 포함하는 바실러스 클라우지(*Bacillus clausii*) 게놈 삽입용 플라스미드(pHPS-BCAP)의 모식도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 바실러스 클라우지 I-52 균주에서 생산된 단백질 분해효소 및 이를 암호화하는 유전자에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 극심한 환경 조건하에서도 활성을 유지하는 바실러스 클라우지 I-52 균주 유래의 단백질 분해효소 및 이를 암호화하는 유전자에 관한 것이다.

단백질 분해효소는 그 용도가 다양하여 혈전의 용해 등과 같은 사람의 질병 치료용 이외에도 의류용 세제의 성분, 콘택트 렌즈 세정제의 성분으로 이용될 뿐만 아니라 우유 단백질의 변형, 견섬유의 고무질 제거(silk degumming), 사료의 개선, 가죽의 침지(soaking), 제모(dehairing), 엑스선 필름(X-ray)으로부터 은의 회수 및 단백질 용액 농축에 사용되는 한외 여과막의 재생 등에 다양하게 이용되고 있다. 미생물의 산물 가운데 효소의 유용성은 이미 널리 알려진 것으로 산업용 효소 시장은 10억불 이상이라고 한다. 산업용 효소 시장 중 단백질 분해효소가 60% 이상으로 가장 큰 비율을 차지하며 그 시장성은 더욱 증가하고 있다. 단백질 분해효소는 상당히 오랜 세월동안 산업적으로 이용되어 왔는데, 의약품, 낙농업, 피혁산업, 식품산업, 사료산업, 필름 제조, 폐기물 처리, 세제 등 그 이용 범위가 매우 광범위하다.

세제 첨가제로서 단백질 분해효소는 세탁용에서부터 콘택트 렌즈 세척용, 의치 세척용 등 매우 다양하며 산업용 단백질 분해효소의 약 25%는 세탁용으로 판매되고 있다. 1956년 처음 상품명 BIO-40 이란 이름으로 세균 프로테아제가 세탁용으로 소개된 이래 현재 130억 톤의 단백질 분해효소가 세제용으로 생산되고 있다. 세제용 프로테아제는 음식물, 혈액 또는 체액 성분까지 제거할 수 있는 넓은 기질 특이성, 알카리성 환경, 계면 활성제 및 높은 온도에서 효소의 활성을 잃지 않는 안정성 등을 지니고 있어야 한다. 과거에는 식물에서 유래한 프로테아제가 주로 사용되었으나 근래에는 미생물, 특히 바실러스 속의 미생물이 단백질 분해효소 생산을 위해 가장 많이 사용되고 있다.

단백질 분해효소는 작용 양상에 따라 엑소프로테아제(exoproteases)와 엔도프로테아제(endoprotease), 활성 부위의 기능기에 따라 세린 프로테아제, 아스파르틱 프로테아제 및 시스테인 프로테아제로 분류되기도 하며 효소 활성의 최적 pH에 따라 알카리성, 중성, 산성 프로테아제, 생성 위치에 따라 세포내 프로테아제(intracellular protease), 세포외 프로테아제(extracellular protease)로 분류되기도 한다. 이들 중 알카리성 프로테아제는 주로 세제 산업에 주로 활용되는데 주로 바실러스 라이체니포미스(*Bacillus licheniformis*)와 같은 바실러스 속의 미생물과 아스페르지루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)와 같은 곰팡이를 주로 이용하지만 대부분은 바실러스 속의 미생물을 이용하여 생산한다.

단백질 분해효소를 산업적 용도에서 사용하는 경우 생체 내부의 항상적 환경에 비해 변화가 심하고, 보다 극심한 생체 외부 환경에서 단백질 분해효소가 활성을 유지해야 하기 때문에 매우 안정한 단백질 분해효소가 요구된다. 예를 들어, 계면활성제 존재 시 대부분의 단백질은 활성이 감소하거나 완전히 사라지기 때문에, 세제에 사용되는 단백질 분해효소는 극히 제한되어 있으며, 고농도로 세제를 사용할 경우 이에 함유된 단백질 분해효소의 활성을 기대하기 어렵다. 게다가 생체 외부 환경에서는 극심한 pH에 노출, 중금속에의 노출, 산화-환원 정도 등의 조건 변화가 생체 내부에 비해 훨씬 심한데, 이들

조건은 모두 일반적으로 효소의 활성에 강하게 영향을 주어, 이들 조건이 적정 범위를 벗어나면 효소는 급격히 활성을 잃게 된다. 따라서, 단백질 분해효소가 본격적으로 산업에 이용되기 위해서는, 극심하고 불안정한 물리적, 화학적 조건에도 불구하고 활성을 유지하는 것이 요구된다.

즉, 단백질 분해효소가 산업용으로 사용되기 위해서는 첫째, 계면활성제에 의하여 단백질 분해효소의 활성이 억제를 받지 말아야 하고, 둘째 산소계 표백제에 의하여 그 활성이 억제를 받지 말아야 하고, 셋째 높은 pH 조건에서 활성을 유지하는 알칼리성 단백질 분해효소이어야 하며, 넷째 중 저온(20~30℃)에서 높은 효소 활성을 가져야 하며, 다섯째 중금속에 의하여 효소 활성이 억제를 받지 말아야 하며, 여섯째 효소 활성에 칼슘이온을 필요로 하지 말아야 한다. 그 외 세제 첨가제로 사용하기 위하여 효소를 그래뉼 형태로 제조할 때, 중심 물질로 소금을 사용하기 때문에 높은 염(10% 이상의 소금)이 존재하는 조건에서도 효소의 활성을 유지하는 호염성 단백질 분해효소일 경우 산업용 효소로서 더욱 가치가 있는 것으로 알려져 있다.

호염성 단백질 분해효소의 가치는 특별히 고염도 식품에 응용에서 찾을 수 있다. 우리나라는 전통 고염도 식품인 젓갈류와 장류의 독특한 풍미는 숙성과정 중에 단백질 분해효소의 작용에 의해 단백질로부터 생성되는 아미노산에 의해 이루어지는데 이들 발효식품은 장기 유통을 위하여 15% 이상의 식염을 첨가하는데 이러한 높은 농도의 염도에서도 효소 활성을 유지하는 것이 필요하다.

상기와 같은 조건들을 충족시키는 단백질 분해효소를 제조하기 위하여 미국 특허 제534075호, 제6136553호 및 대한민국 특허 제 10-0258740호는 기존의 단백질 분해효소로부터 특이적인 돌연변이를 적용하여 보다 우수하고 안정성이 높은 단백질 분해효소를 개발하였다고 명시되어 있다. 또한, 미국 특허 제6162635호 등에서는 상기의 조건을 충족하는 단백질 분해효소를 생산하는 균주들을 토양 등 자연계로부터 탐색하여 산업용으로 사용하려고 시도하였다고 기재되어 있다. 그러나 돌연변이체는 많은 경우에 효소의 활성이 낮아지는 문제점을 가지고 있으며, 아직까지 상기의 모든 조건을 충족시키는 단백질 분해효소가 제조되지 못하고 있는 실정이다. 특히 산소계 표백제 및 계면활성제에 모두 안정한 단백질 분해효소는 극히 제한적으로 보고되고 있는 실정이다.

이에, 본 발명자들은 바실러스 클라우지(*Bacillus clausii* I-52, KCTC 10277BP, **대한민국 특허출원 10-2002-0037420, 등록번호 제046582**) 유래의 알칼리성 단백질 분해효소가 계면활성제, 산화제, 고농도의 염 존재 하에서도 매우 높은 활성을 유지하고 있음을 발견하여 산업적으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 계면활성제, 산화제, 고농도의 염에 안정하여 산업적으로 유용하게 사용할 수 있는 단백질 분해효소를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 분해효소를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 코딩하는 유전자를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 바실러스 게놈 삽입용 발현벡터를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 포함하는 의류용 또는 콘택트렌즈용 세제를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 이용하여 식품, 사료, 직물, 천연 가죽을 가공하는 방법을 제공한다.

아울러, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 이용하여 유기 폐기물을 분해하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 분해효소를 제공한다.

본 발명자들은 생장 조건이 극히 열악한 서해 연안 갯벌로부터 바실러스 클라우지(*Bacillus clausii*) 균주 I-52를 분리하고 상기 균주로부터 극심한 물리, 화학적 조건하에서도 뛰어난 안정성을 갖는 단백질 분해효소를 수득하였다. 본 발명자들은 상기 단백질 분해효소의 염기서열(**서열번호 1**) 및 아미노산 서열(**서열번호 2 및 3**)을 결정하였다.

본 발명의 단백질 분해효소는 381개의 아미노산으로 구성되어 있고 N-말단의 32 아미노산 잔기들은 시그날 서열이고, 107 번째 아미노산인 알라닌(Alanine, Ala)은 활성형 단백질의 N-말단 아미노산임을 확인하였다. 이 중, 활성형 단백질 분해효소 부분은 서열번호 3으로 기재되는 275 개 아미노산 잔기로 이루어져 있으며, 세린계 단백질 분해효소에 공통적으로 존재하는 3가지 활성관련 아미노산(catalytic triad)인 Asp32, His64 및 Ser221 잔기들을 포함하고 있어 상기 단백질 분해효소는 전형적인 세린 계열 단백질 분해효소의 한 종류임을 확인하였다.

본 발명의 단백질 분해효소는 높은 pH, 계면활성제, 산화제, 유기용매 및 중금속 등의 다양한 물리 화학적 조건하에서도 활성을 유지하는 안정한 효소이다. 본 발명의 단백질 분해효소는 pH 7.0 ~ pH 12.0의 넓은 pH 영역에서 단백질 분해활성을 나타내고, 최대 활성을 나타내기 위해서는 pH 9.0 ~ pH 12.0 인 것이 바람직하며, pH 10.0 ~ pH 11.0 인 것이 더욱 바람직하고, pH 11.0인 것이 가장 바람직하다(**도 1** 참조). 또한, 본 발명의 단백질 분해효소는 10 ~ 70℃에서 단백질 분해활성을 나타내고, 최대 활성을 나타내기 위해서는 40 ~ 65℃인 것이 바람직하고, 55 ~ 65℃인 것이 더욱 바람직하고, 60 ~ 65℃인 것이 가장 바람직하다(**도 2** 참조). 본 발명의 단백질 분해효소는 소금이 2~5% 정도로 존재할 때 효소의 최대 활성을 나타낼 뿐만 아니라 20%의 고농도로 존재할 때에도 효소 활성이 안정하게 유지하는 호염성 단백질 분해효소임을 확인하였다(**도 3** 참조). 본 발명의 단백질 분해효소는 비이온성 계면활성제 뿐만 아니라 SDS(sodium dodecyl sulfate)와 같은 강한 음이온성 계면 활성제의 존재 하에서도 높은 단백질 분해 활성을 유지하는데, 특히 5%의 SDS 로 3일 동안 처리하여도 활성을 거의 잃지 않았고(**도 4** 참조) 강력한 산화제로 알려진 과산화수소 및 소디움 퍼보레이트(sodium perborate)의 존재 하에서도 활성을 거의 잃지 않는 매우 안정한 효소로 판명되었다(**도 5** 및 **도 6** 참조). 이러한 일련의 효소학적인 특성으로부터 본 발명의 바실러스 클라우지 유래의 단백질 분해효소는 다양한 산업상 사용 가능성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 코딩하는 유전자를 제공한다.

상기와 같은 특징을 갖는 본 발명의 단백질 분해효소를 코딩하는 유전자 서열은 하기와 같이 분석하였다. 구체적으로, 바실러스 클라우지로부터 염색체 DNA 를 분리한 다음, 분리된 DNA를 주형으로, 중합효소 연쇄반응을 수행하여 본 발명의 단백질 분해효소의 DNA 단편을 얻고(**도 11** 및 **12** 참조) 이의 염기서열을 결정하였다(**서열번호 1**).

또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

본 발명에서는 극심한 조건에서도 활성을 유지할 수 있는 본 발명의 단백질 분해효소를 활성 형태로 생산하기 위해 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 분해효소 유전자를 형질전환용 발현벡터에 도입하였다. 이렇게 제조된 발현벡터를 본 발명에서는 “pT7-BCAP"(BCAP: *Bacillus clausii* Alkaline Protease)이라 명명하였다(**도 14** 참조).

또한, 본 발명은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

상기 제조된 발현벡터는 적당한 숙주세포에 형질도입시킴으로써 활성 형태의 단백질 분해효소를 발현할 수 있는 형질전환체를 제조할 수 있다. 본 발명에서는 상기 형질전환 벡터 pT7-BCAP 를 대장균에 형질 도입시킴으로써 안정한 형태로 본 발명의 단백질 분해효소를 생산할 수 있는 형질전환체를 제조하였다 (**도 15** 참조).

또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 바실러스 게놈 삽입용 재조합 발현벡터를 제공한다.

본 발명의 단백질 분해효소를 암호화하는 프로모터 부분을 포함하는 서열번호 1의 DNA를 바실러스 클라우지의 게놈에 삽입(integration)하기 위한 재조합 발현벡터를 제작하여 “pHPS-BCAP”라 명명하였다(**도 17** 참조). 상기 발현벡터는 바실러스 클라우지의 염색체에 삽입되어 염색체 내의 BCAP 카피 수를 증가시키는데 이용될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

상기 발현벡터 pHPS-BCAP를 *E. coli* JM109에 형질전환시키고 이를 2005년 1월 26일자로 한국생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호:KCTC 10772BP)

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 포함하는 의류용 또는 콘택트렌즈용 세제, 상기 단백질 분해효소를 이용하여 식품, 사료, 직물, 천연 가죽을 가공하는 방법 및 상기 단백질 분해효소를 이용하여 유기 폐기물을 분해하는 방법을 제공한다.

단백질 분해효소를 산업적 용도에서 사용하는 경우 생체 내부의 항상적 환경에 비해 변화가 심하고, 보다 극심한 생체 외부 환경에서 단백질 분해효소가 활성을 유지해야 하기 때문에 매우 안정한 단백질 분해효소가 요구된다. 즉 생체 외부 환경에서는 극심한 pH에 노출, 중금속에의 노출, 산화-환원 정도 등의 조건 변화가 생체 내부에 비해 훨씬 심한데, 이들 조건은 모두 일반적으로 효소의 활성에 강하게 영향을 주어, 이들 조건이 적정 범위를 벗어나면 효소는 급격히 활성을 잃게 된다. 따라서, 단백질 분해효소가 본격적으로 산업에 이용되기 위해서는, 극심하고 불안정한 물리적, 화학적 조건에도 불구하고 활성을 유지하는 것이 요구된다.

상기 단백질 분해효소는 알카리성 환경, 계면 활성제 및 높은 온도에서 효소의 활성을 잃지 않는 안정성을 지니고 음식물, 혈액 또는 체액 성분까지 제거할 수 있는 넓은 기질 특이성을 가지므로 포함하는 상기 단백질 분해효소는 SDS, 옥틸글루코시드(octylglucoside), Brij-35, Triton 계열 및 Tween 계열등 공지의 합성 계면활성제 또는 천연 계면활성제와 함께 상기 세제의 성분으로 포함될 수 있다. 이와 더불어 광범위한 pH, 산화-환원 환경에서도 활성을 유지하므로, 식품, 사료, 직물, 천연가죽 등의 가공 공정에도 폭넓게 사용할 수 있고 중금속의 존재 하에서도 높은 활성을 유지하므로 폐기물 분해에도 사용할 수 있다.

상기 단백질 분해효소를 포함하는 세제는 일반적인 의류용 또는 콘택트렌즈용 세제의 제조 방법에 따라 제조될 수 있고 상기 단백질 분해효소를 이용한 가공 방법 또는 분해 방법에 특별한 제약은 없다. 공지의 방법에 본 발명의 단백질 분해효소를 첨가하여 실시하는 모든 방법이 본 발명의 범주에 포함된다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

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

<실시예 1> 단백질 분해효소의 염기서열 및 아미노산 서열 분석

<1-1> 게놈 DNA 분리

호염성, 호알카리성 미생물 바실러스 클라우지(*Bacillus clausii)*를 3 ml Trypitic soy broth(TSB)에 접종하여 37℃에서 250 rpm 으로 진탕배양한 후 100 ml 의 TSB 배지를 포함하는 500 ml 의 삼각 플라스크에 재접종하여 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 5,000× g로 원심 분리하여 수확된 바실러스에 라이소좀(lysozyme)과 단백질 가수분해효소 K (Proteinase K)를 첨가하여 상온에서 18 시간 동안 반응시키고, 같은 부피의 페놀 용액을 첨가하여 상온에서 20 분간 잘 섞어 준 후 13,000 ×g 로 20 분간 원심 분리하여 상등액을 회수하였다. 동일한 과정을 반복한 후 상등액에 같은 부피의 클로로포름과 이소아밀알코올(chloroform/isoamyl alcohol) 혼합액(24:1)을 첨가하여 상온에서 20 분간 잘 섞어 준 후 13,000 ×g 로 20 분간 원심 분리하여 상등액을 회수하였다. 이에 같은 부피의 클로로포름을 첨가하여 상온에서 20 분간 잘 섞어 준 후 13,000 ×g 로 20 분간 원심 분리하여 상등액을 회수하고 2 배 부피의 에탄올을 첨가한 후, DNA 침전물이 생성될 때 까지 상온에서 천천히 섞어 주었다. 멸균된 파스퇴르 피펫으로 용액 속의 게놈 DNA를 회수하고 회수한 DNA 는 70% 에탄올로 세척하여 잔존하는 염을 제거하며, 무균 조작대(clean bench)에서 건조시킨 후, 1 ml TE 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.2/1 mM EDTA)에 용해하였다. 수득한 DNA 는 1% agarose 전기영동을 수행하여 확인하였다.

<실시예 1-2> 염기서열 분석

서열번호 4, 5로 기재되는 정방향 프라이머 F2 및 각각 서열번호 6, 7, 8로 기재되는 역방향 프라이머 R1, R2, R3를 합성하였다(**도 11** 참조).

<1-1> 에서 분리한 바실러스 클라우지 게놈 DNA 를 주형으로 하고 상기 프라이머를 여러 가지로 조합하여 하여 중합효소 연쇄반응을 시켰다. Taq DNA 중합효소를 이용하여 94℃에서 2분간 전변성(per-denaturation) 시키고, 94℃에서 1 분, 60℃ 에서 1 분, 72℃ 에서 1 분씩의 조건으로, 30 싸이클의 PCR 을 수행한 결과, 각 프라이머 조합에 따른 PCR 산물

을 수득하였다(**도 12** 참조), 이 중 프라이머 F3/R2 의 조합으로 얻어진 PCR 산물을 발현벡터 pGEM T easy(Promega, USA)에 클로닝하여(**도 13** 참조) 염기서열을 분석한 결과, 전체 DNA 크기는 2280 bp 이었으며 (서열번호 1), TCTACT (872-877)은 -35 sequence, TACAAT(897-902)는 -10 sequence 로 바실러스 클라우지 유래 단백질 분해효소에 대한 프로모터 부분을 포함하는 바실러스 클라우지 유래 단백질 분해효소의 전체 유전자임을 확인하였다.

<1-3> 아미노산 서열 분석

<1-2> 에서 얻어진 전체 DNA의 염기서열(**서열 번호 1**)을 블라스트(BLAST)로 분석한 결과, 상기 DNA는 서열번호 2로 기재되는 381개 아미노산을 암호화하는 1143 bp 의 개방해독틀(Open reading frame)로 구성되어 있고 N-말단의 32 아미노산 잔기들은 시그날 서열, 107 번째 아미노산인 알라닌(Alanine, Ala)이 활성형 단백질의 N-말단 아미노산임을 확인하였다. 이 중, 활성형 단백질 분해효소 부분은 서열번호 3으로 기재되는 275 개 아미노산 잔기로 이루어져 있으며, 세린계 단백질 분해효소에 공통적으로 존재하는 3가지 활성관련 아미노산(catalytic triad)인 Asp32, His64 및 Ser221 잔기들을 포함하고 있어 상기 단백질 분해효소는 전형적인 세린 계열 단백질 분해효소의 한 종류임을 확인하였다. 상기의 서열번호 3으로 기재되는 활성형 단백질 부분을 바실러스 클라우지 활성형 단백질(*Bacillus clausii* Alkaline Protease)이라는 의미에서 BCAP이라 명명하였다.

<실시예 2> 활성형 단백질 분해효소 발현벡터 구축 및 형질전환

본 발명에서 분석된 바실러스 클라우지 유래 활성형 단백질 분해효소의 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하기 위하여, pGEM T easy-BCAP를 주형으로 하고, 서열번호 9 및 10으로 기재되는 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다. Taq DNA 중합효소를 이용하여 94℃에서 2분간 전변성(per-denaturation) 시키고, 94℃에서 1 분, 60℃ 에서 1 분, 72℃ 에서 1 분씩의 조건으로, 30 싸이클의 PCR 을 수행하여 증폭된 서열번호 3으로 기재되는 275 개 아미노산 잔기를 암호화하는 825 bp 크기의 DNA 서열을 포함하는 약 870 bp 크기의 DNA 단편을 전기영동한 후 DNA 용출 키트로 분리하고 상기 DNA 단편과 pT7-7 플라스미드(Roche Applied Sscience) 를 *Nco* I 및 *Hind* Ⅲ 로 각각 이중 절단(double digestion)한 후 접합시켜 상기 벡터 pT7-BCAP로 명명하고 *E. coli* BL21(DE3)를 형질전환하였다. 구체적으로 형질전환용 세포(competent cell) *E. coli* BL21(DE3) 100 ul 에 발현벡터 pT7-BCAP 0.1 내지 0.5 ug 을 첨가하여 얼음에 30 분간 방치한 후 42℃에서 1.5 분간 열 충격을 주고, 1 ml 의 LB 배지를 첨가하여 37℃ 에서 1 시간 동안 배양한 후, 앰피실린(50 ug/ml), IPTG 및 X-gal 이 첨가된 LB 아가 평판 배지에 도말하고 37℃ 에서 16 시간 동안 배양하여 형질전환체를 수득하였다. 형질 전환된 대장균은 앰피실린이 첨가된 LB 액체배지에 접종하여 배양하고, 그 배양액의 일부를 취하여 알칼라인 용해 방법에 따라 플라스미드를 추출하여 클로닝된 부위의 제한효소로 절단하여 유전자가 도입되었는지를 확인하였다(**도 15 참조**).

<실시예 3> 재조합 단백질 발현유도

<실시예 2> 에서 발현벡터 pT7-BCAP 로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 암피실린(50 ug/ul)을 포함하는 LB 배지에 접종하여 37℃ 에서 밤새 배양하여 종균으로 사용하였다. 암피실린을 포함하는 100 ml 의 LB 배지(500 ml 삼각 플라스크)에 상기 종균 1 ml 을 접종한 후, 600 nm 에서 흡광도가 0.6 내지 0.8 에 도달할 때까지 배양하였다. 단백질의 합성을 유도하기 위하여 IPTG 를 1 mM 이 되도록 첨가한 다음, 매 시간별로 배양액 1 ml 씩을 취했다. 이를 SDS-PAGE 시료 처리 용액(0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 M DTT, 2% SDS, 10% 글리세롤 및 0.1% 브로모페놀 블루) 20 ul 에 현탁하여 100℃ 에서 5 분간 가열하여 세포를 파괴한 후 램리 등의 방법(Laemmli, U.K., 1970, *Nature,* 227, 680-685)으로 전기영동시켰다. 전기영동이 끝난 젤은 쿠마시 브릴리언트 블루 알-250 용액(Coomassie brilliant blue R-250)으로 염색하여 pT7-BCAP로 형질전환시킨 *E.coli*에서 생산된 단백질을 확인하였다.

그 결과, ITPG 유도에 의해 시간이 지남에 따라 본 발명의 성숙 프로테아제가 발현됨을 확인하였다(**도 16** 참조).

<실시예 4> 프로모터 포함하는 단백질 분해효소 유전자 삽입용 플라스미드 제작

본 발명에서 분석된 바실러스 클라우지 유래 단백질 분해효소의 프로모터를 포함하는 서열번호 1 의 DNA 서열이 클로닝되어있는 pGEM-Teay 플라스미드와 바실러스 게놈 삽입용 플라스미드 pHPS9(ACTC)를 *EcoRI* 으로 각각 처리하고 전기 영동한 후 DNA 용출 키트로 분리하였다. 이를 접합시킨 후, *E.coli* JM109에 **<실시예 3>** 과 같이 형질전환시켰다. 마커는 암피실린 대신 클로로암페니콜을 사용하였다. 형질전환체로부터 플라스미드를 추출하여 클로닝된 부위의 제한효소로 절단하여 서열번호 1 의 DNA 단편이 도입되었는지를 확인한 후, 서열번호 1 의 DNA 단편이 도입된 상기 형질전환 벡터를 "pHPS-BCAP"로 명명하였다(**도 17** 참조).

<실시예 5> 단백질 분해효소의 활성 측정

단백질 분해효소의 활성을 분석하기 위하여, 세포 배양 상등액을 회수하여 활성을 측정하였다. 구체적으로, 0.1 M 글리신-NaOH 완충용액(pH 11.0)에 최종 농도가 0.5%가 되게 함마스탄 카제인(Hammerstan casein)을 녹인 기질 용액 0.5 ml에 100 ~ 1000 배 희석한 효소 용액 0.1 ml 을 가하여 잘 섞어준 후 60℃ 에서 10 분간 반응시키고 10% 트리클로르 아세트산(TCA) 0.5 ml를 가하여 반응을 중단시켰다. 상기 용액을 얼음에서 10 분간 방치하여 반응하지 않은 단백질을 침전시키고, 원심 분리하여 상등액을 취한 후 275 nm 에서 생성된 티로신 양을 측정하였다. 이 때, 단백질 분해효소 1 유니트(Unit)는 1분 동안에 1 마이크로 그람(ug)의 티로신 생성에 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

<실시예 6> 단백질 분해효소 활성의 최적 조건 분석

<6-1> 단백질 분해효소 활성의 최적 pH

본 발명자들은 상기 **<실시예 2>** 에서 생산한 단백질 분해효소가 최대의 활성을 낼 수 있는 최적 pH 를 알아보고자 하였다. pH 7.0~7.5 범위에서는 0.1 M 인산 나트륨 완충액을, pH 8.0~9.5 범위에서는 0.1 M 트리스-염산 완충액을, pH 10.0~pH 12.0 범위에서는 0.1 M 글리신-NaOH 완충액을 사용하여 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다.

그 결과, 단백질 분해효소는 pH 8.0~12.0 범위에서 활성이 높으며 최적 pH는 11.0 임을 알 수 있었다(**도 1** 참조).

<6-2> 단백질 분해효소 활성의 최적 온도

본 발명자들은 단백질 분해효소가 활성을 나타내는 최적 온도를 알아보았다. 구체적으로, 카제인(0.5%)을 0.1 M 글리신-NaOH 완충용액(pH 11.0)을 사용하여 제조하였으며, 온도 10~70℃ 범위에서 효소 활성을 측정하였다.

그 결과, 단백질 분해효소 활성의 최적 온도는 60~65℃ 임을 알 수 있었다(**도 2** 참조).

<6-3> 단백질 분해효소 활성의 최적 염도

배양 배지(대두박 2%, 밀가루 1%, 물엿 2%, 구연산나트륨 0.5%, 인산칼륨 0.5%, 황산 마그네슘, 0.5 mM, 탄산나트륨 0.6%)에 24 시간 동안 배양한 종균을 2%가 되게 접종하고, 37℃에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 상기 균주를 원심분리한 후, 배양 상등액을 회수하여 배양 상등액에 소금의 농도를 0~20% 되게 첨가한 후 상기 **<실시예 5>**과 동일한 방법으로 효소 활성을 측정하였다. 그 결과, 0.1~10% 농도로 소금을 첨가하였을 때 효소 활성이 증가하였으며, 0.5~로 첨가하여 주는 것이 바람직하였으며, 1% 농도로 소금을 첨가하여 주는 것이 더욱 바람직하였다.

그 결과, 바실러스 클라우지 유래 단백질 분해효소는 고농도의 염(10% 이상)이 존재하여도 효소 활성이 억제되지 않았으며 특히 20% 소금 존재 하에서도 75% 이상의 효소 활성이 유지되어 바실러스 클라우지 유래 단백질 분해효소는 호염성(halophilic) 단백질 분해효소임을 알 수 있어 사업용, 특히 세제 첨가제 및 식품 가공용으로 사용 가능성을 확인할 수 있었다(**도 3** 참조).

<실시예 7> 단백질 분해효소의 안정성 분석

<7-1> 단백질 분해효소의 계면활성제에 대한 안정성

본 발명자들은 상기 **<실시예 6>** 에서 생산한 단백질 분해효소가 계면활성제에 대해 안정성을 갖는지 알아보기 위하여 음이온성 계면활성제로 처리하여 효소의 활성을 알아보았다. 구체적으로 계면활성제로 SDS 를 1%, 5% 또는 10%로 처리하였을 때의 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소는 5%의 SDS 로 3일 동안 처리하여도 그 활성을 거의 잃지 않는, SDS 에 매우 안정한 효소임을 확인하였다(**도 4** 참조).

<7-2> 단백질 분해효소의 산화제에 대한 안정성

본 발명자들은 단백질 분해효소가 산화제에 대해 안정성을 갖는지 알아보기 위하여, 과산화수소수(hydrogen peroxide) 및 소디움 퍼보레이트(sodium perborate)와 같은 산화제로 처리한 후 각 시간별로 남아 있는 효소의 활성을 측정하였다. 구체적으로, 산화제로는 강력한 산화제로 알려진 과산화수소수를 1%, 5% 또는 10%로 처리하였을 때의 단백질 분해효소의 활성을 측정하였으며 소디움 퍼보레이트를 1% 또는 2.5%로 처리하였을 때의 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소는 10%의 과산화수소수 및 2.5%의 소디움 퍼보레이트로 3일 동안 처리하여도 그 활성을 거의 잃지 않는 산화제에 매우 안정한 효소임을 확인하였다(**도 5** 및 **도 6** 참조).

<실시예 8> 단백질 분해효소의 상용 세제에 대한 안정성

본 발명자들은 단백질 분해효소가 산화제에 대해 안정성을 갖는지 알아보기 위하여, 국내에서 시판되고 있는 상용세제에 대한 안정성을 측정하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소는 시판되고 있는 상용 세제를 2.5%로 처리한 후 상온에서 4 주간 방치하여도 효소 활성을 잃지 않는 매우 안정한 효소임을 알 수 있어 세제 첨가제로 사용 가능함을 확인하였다(**도 7** 참조).

<실시예 9> 단백질 분해효소의 세척력 시험

본 발명자들은 바실러스 클라우지 유래 단백질 분해효소가 세제 첨가제로 사용하기 적합한 지를 알아보기 위하여 **<실시예 6>** 에서 생산한 단백질 분해효소를 사용하여 세척력 시험을 하였다. 사용한 오염포는 혈액과 우유로 오염된 국제 기준의 면 시험포(EMPA 116)과 혈액과 우유로 오염된 국제 기준의 혼합 섬유 시험포(EMPA 117)를 사용하여 세척력을 시험하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소는 상용 계면활성제인 LAS(linear alkylbenzene sulfonates)가 15% 존재하는 조건에서 대조군에 비해 높은 세척력을 나타내는 것을 알 수 있어 세제 첨가제로 사용 가능함을 확인하였다(**도 8** 참조).

<실시예 10> 단백질 분해효소의 대두박 분해 시험

<10-1> 대두박 분해 시험

본 발명자들은 바실러스 클라우지 유래 단백질 분해효소가 사료 첨가제로 사용하기 적합한 지를 알아보기 위하여 **<실시예 6>** 에서 생산한 단백질 분해효소를 사용하여 대두박 분해 시험을 하였다. 10%가 되게끔 대두박을 증류수에 가한 후 상온에서 상기 효소를 전체 대두박 부피의 0.5%가 되게 가한 후 교반한 후 SDS-PAGE 법으로 대두박 분해 정도를 측정하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소는 2 시간 내에 대두박을 효율적으로 분해하는 것을 확인하였다(**도 9** 참조).

<10-2> 대두박 분해 시 트립신 억제자 분해 시험

본 발명자들은 바실러스 클라우지 유래 단백질 분해효소가 사료 첨가제로 사용하기 적합한지를 알아보기 위하여 **<실시예 6>** 에서 생산한 단백질 분해효소를 사용하여 대두박 분해 시험을 하였다. 대두박에는 항 영양 인자로 알려진 트립신 억제자(Soybean trypsin inhibitor, SBTI)가 존재하여 대두박을 주 단백질 공급원으로 하였을 때 단백질의 소화율을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 바실러스 클라우지 유래 단백질 분해효소 처리에 의해 대두박 트립신 억제자의 불활성화하여 사료첨가제로 사용될 수 있는지 조사하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소는 2 시간 내에 약 80% 정도의 대두박 트립신 억제자를 불활성화하며 16 시간 처리하였을 때 거의 완벽하게 트립신 억제자를 불활성화 시키는 것을 확인하였다(**도 10** 참조).

발명의 효과

본 발명의 단백질 분해효소는 중금속, 유기용매, 낮은 온도 및 극심한 환원적 환경에서도 활성을 유지하고, 높은 pH, 높은 염농도, SDS와 같은 음이온성 계면활성제, 과산화수소수와 같은 강력한 산화제, 시중에 판매되는 상용세제 존재하여도 매우 안정한 효소이다. 따라서 상기 단백질 분해효소는 의류용 또는 콘택트렌즈용 세제의 성분, 사료, 식품, 직물, 천연가죽

등의 가공 및 유기 폐기물의 처리 등 다양한 산업적 용도로 유용하게 사용될 수 있고 특히 상기 단백질 분해효소의 호염성 특성은 전통 장류 및 젓갈과 같은 고염도 식품의 숙성시, 단 시간에 아미노산을 생성을 가능하게 하므로 상기 분해효소는 식품의 숙성 시간을 단축시키는데 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 분해효소.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 분해효소는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 분해효소.

청구항 3.

제 1항의 단백질 분해효소를 코딩하는 유전자.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 5.

제 3항의 유전자를 포함하는 발현벡터.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 발현벡터는 pT7-BCAP임을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 7.

제 5항의 발현벡터가 도입된 형질전환체.

청구항 8.

제 3항의 유전자를 포함하는 바실러스 게놈 삽입용 발현벡터.

청구항 9.

제 8항에 있어서, 상기 발현벡터는 pHPS-BCAP임을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 10.

제 8항의 발현벡터가 도입된 형질전환체 JM109/pHPS-BCAP (수탁번호:KCTC 10772BP).

청구항 11.

제 1항의 단백질 분해효소를 포함하는 의류용 또는 콘택트렌즈용 세제.

청구항 12.

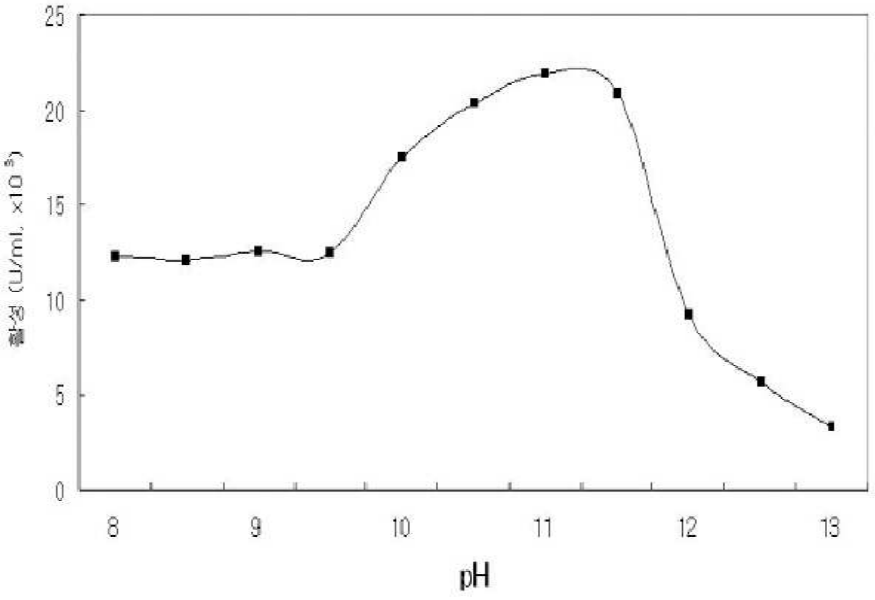
제 1항의 단백질 분해효소를 이용하여 식품, 사료, 직물, 천연 가죽을 가공하는 방법.

청구항 13.

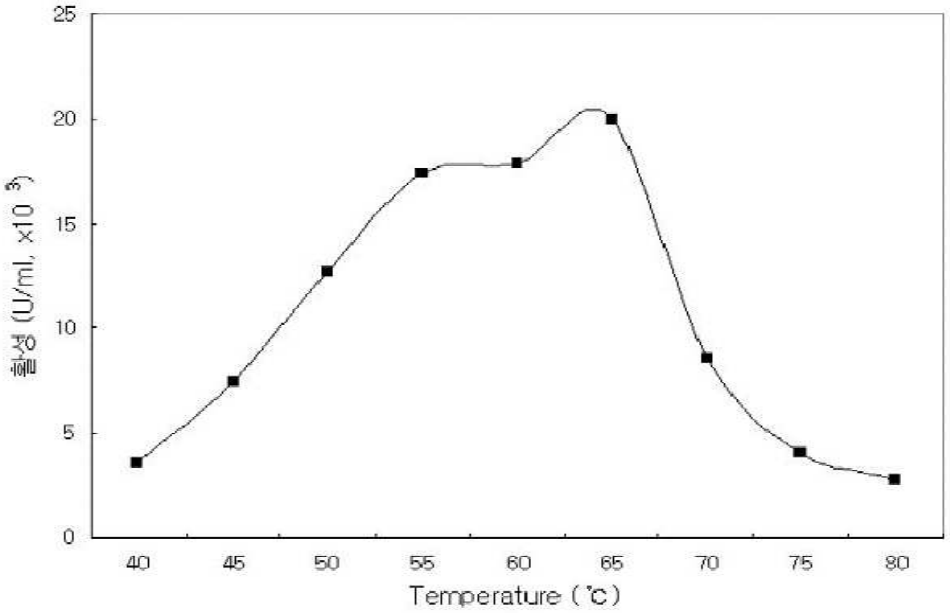
제 1항의 단백질 분해효소를 이용하여 유기 폐기물을 분해하는 방법.

도면

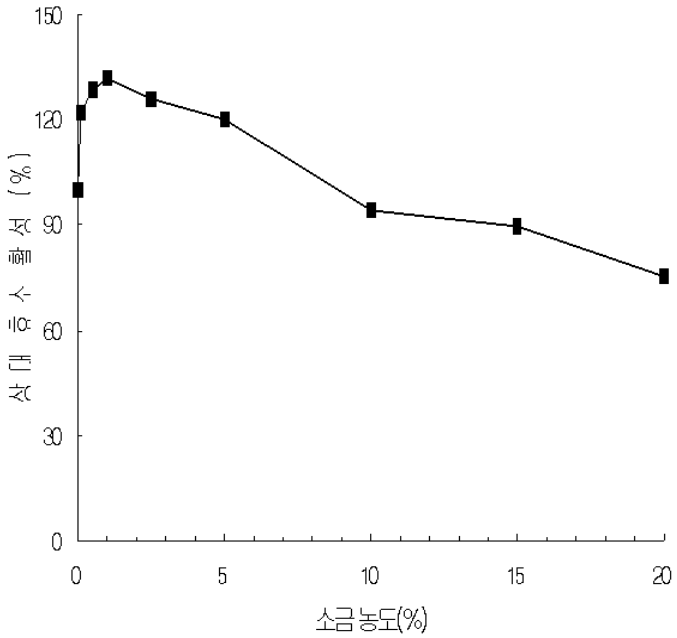
도면1



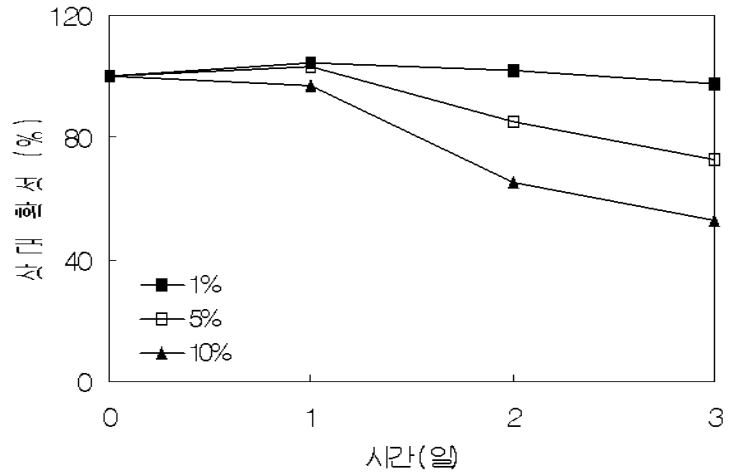
도면2


25
20
15
10
5
0
활성 (U/ml, x10 3)
40
45
50
55
60
65
70
75
80
Temperature (℃)

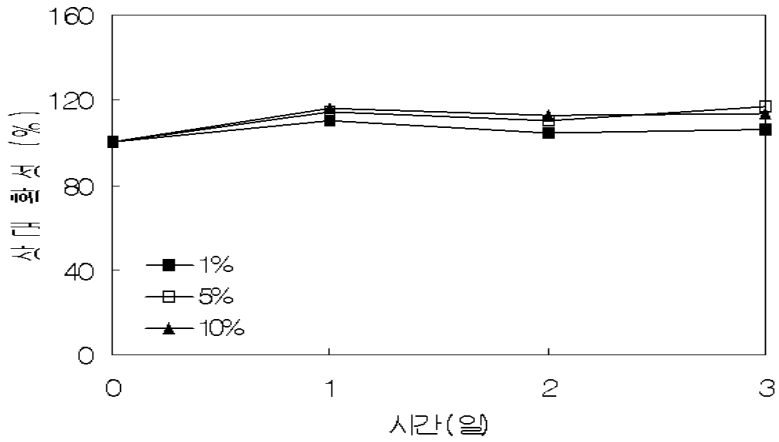
도면3


150
120
90
60
30
0
상대효소활성 (%)
0
5
10
15
20
소금농도(%)

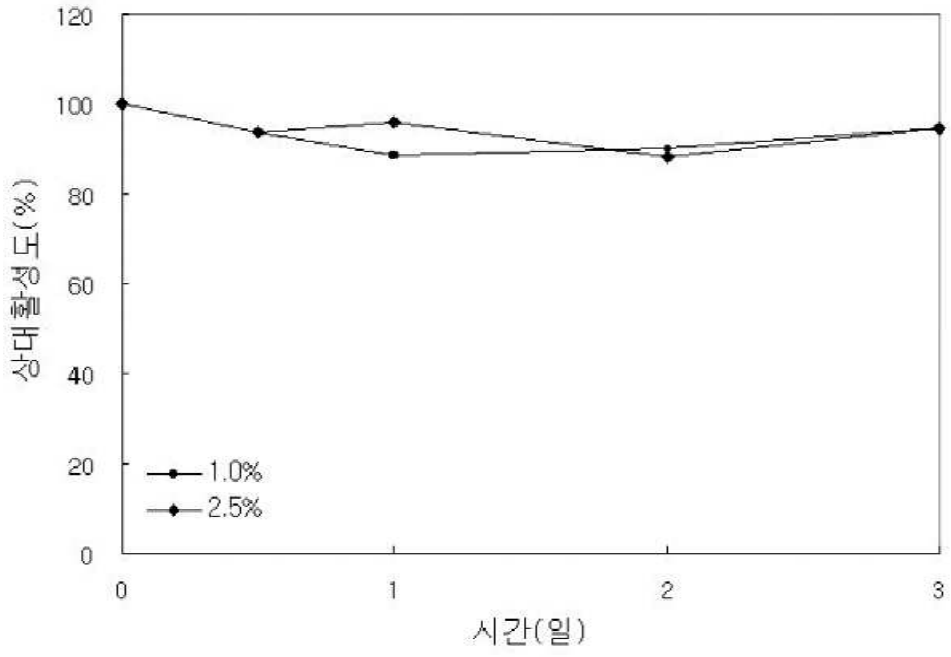
도면4


120
80
40
0
상대 활성 (%)
1%
5%
10%
0
1
2
3
시간(일)

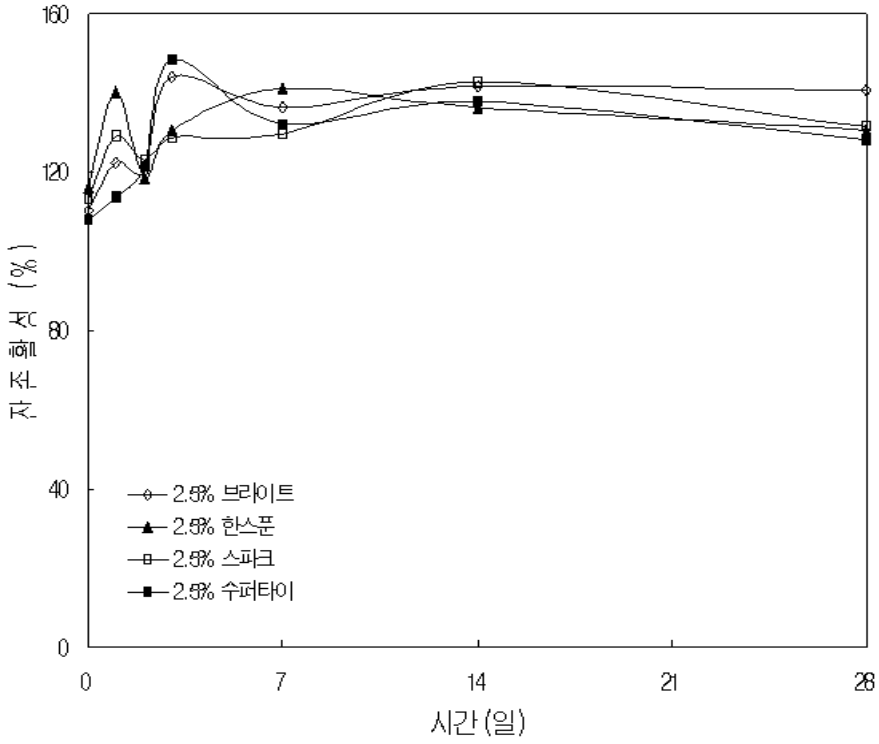
도면5


160
120
80
40
0
상대 활성 (%)
1%
5%
10%
0
1
2
3
시간(일)

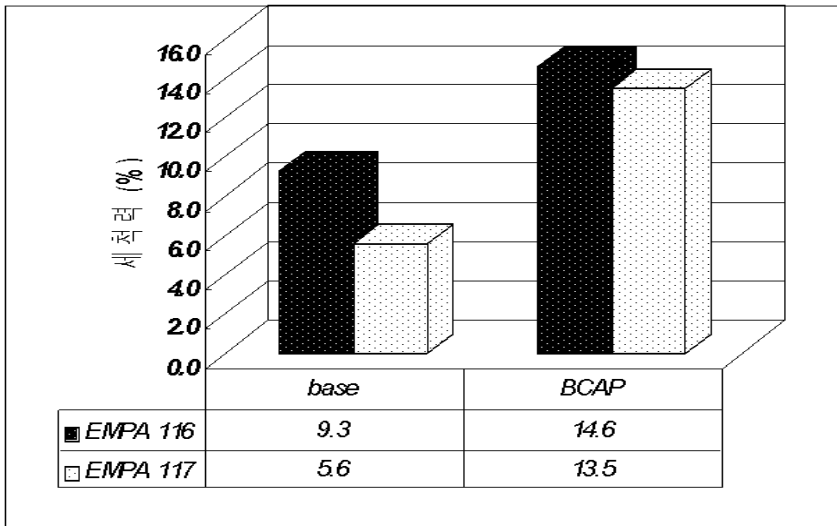
도면6


120
100
80
60
40
20
0
상대활성도(%)
1.0%
2.5%
0
1
2
3
시간(일)

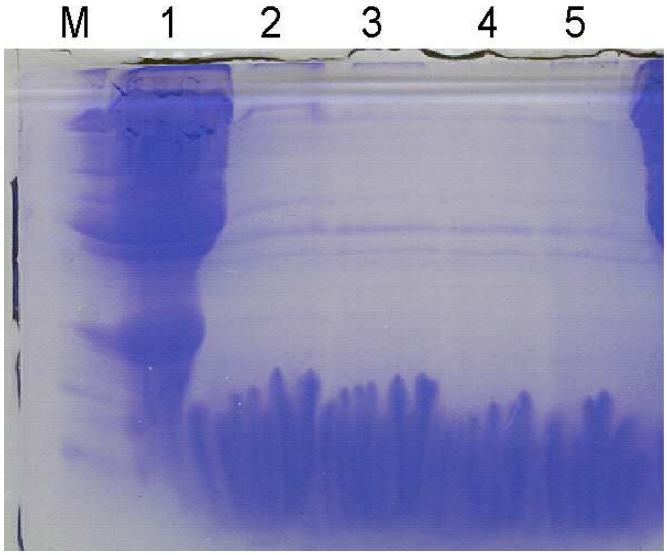
도면7


160
120
80
40
0
자외선 차폐율 (%)
0
7
14
21
28
시간 (일)
2.5% 브라이트
2.5% 한스푼
2.5% 스파크
2.5% 수퍼타이

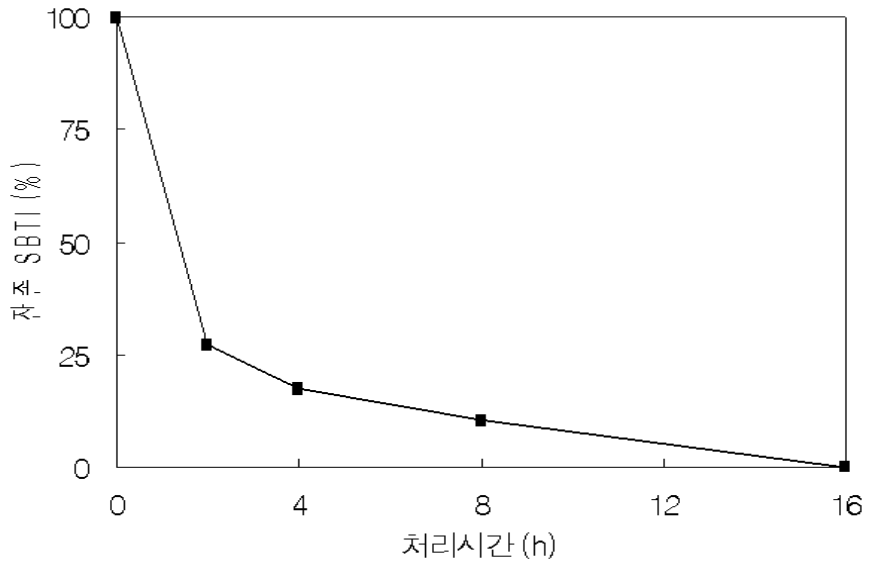
도면8


16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
세균 감소율 (%)
base
BCAP
EMPA 116
9.3
14.6
EMPA 117
5.6
13.5

도면9



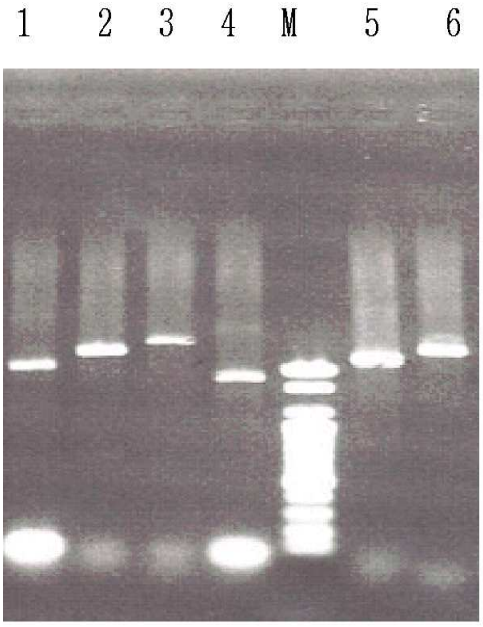
도면10



도면11



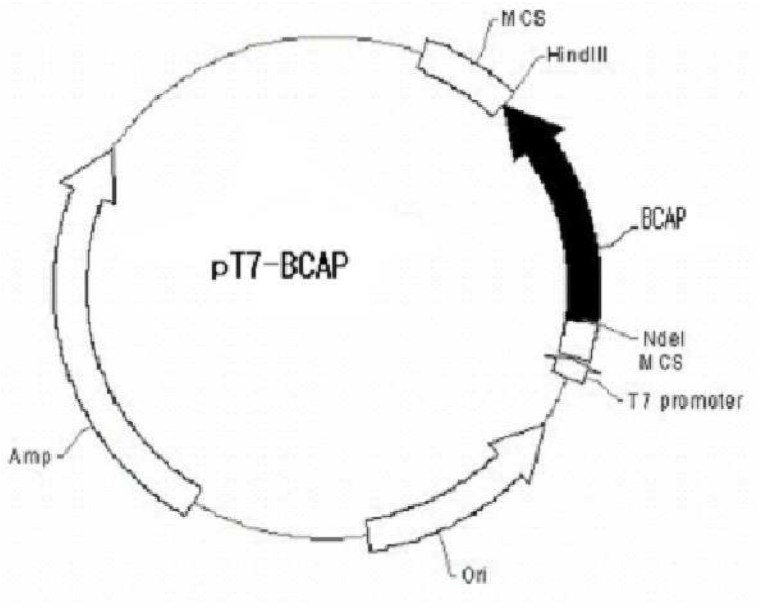
도면12



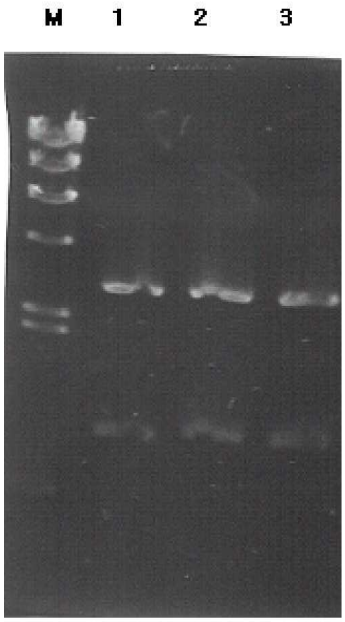
도면13



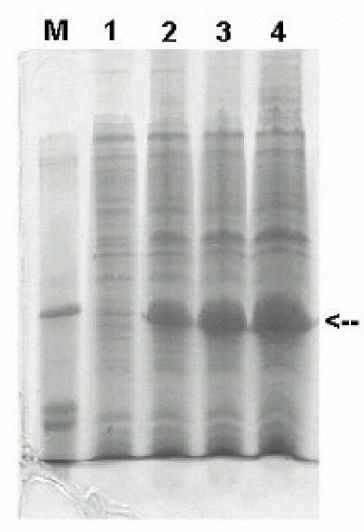
도면14



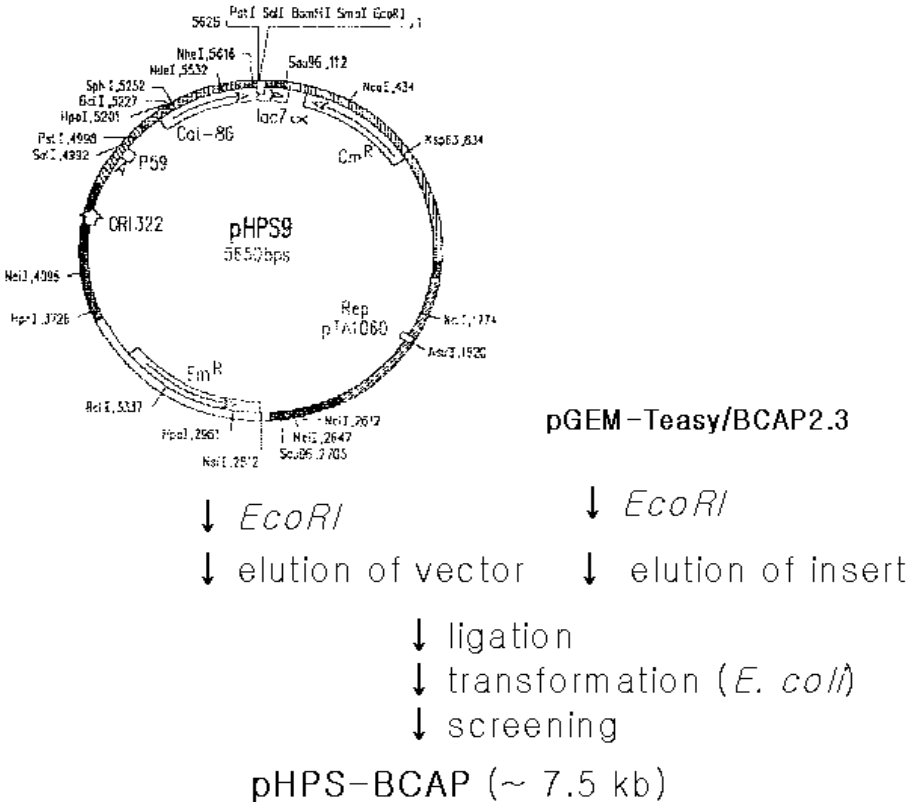
도면15



도면16



도면17



서열목록

<110> INHA UNIVERSITY

<120> Detergent and oxidant-stable haloalkalophilic protease and a gene coding this protease

<130> 4P-12-36

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 2280
<212> DNA
<213> 1

<400> 1
aacgttgaca ttcggcacac tccttttcat ttatatcgta accgaagaac gttcaaaaaa 60

ccaaatcatc aagccgccat tttcacttcg ccggcacatt gagagaataa tggacaaatc 120

cggtatcctc ttcatagccg ttttgctcat acaagcttct tgccttccgg ttgtggtgct 180

cagtctgaag cgttaaacat tttgccccgt tttcccctgc ataatccttt gcggcagaaa 240

gcagccggcc gccggctccc tttgtacgcg catgaggaac gacaaataag tcatttaata 300

tgtagatcct tttcattgac acagaagaaa acgttggata gagctgggta aagcctatga 360

attctccatt ttcttctgct atcaaaataa cagactcgtg attttccaaa cgagctttca 420

aaaaagcctc cgccccttgc aaatcggatg cctgtctata aaattcacga tattggttaa 480

acaacggcgc aatggcggcc gcatctgatg tctttgcttg gcgaatgttc atcttatttc 540

ttcctccctc tcaataattt ttttattcta tccctttttct gtaaagttta tttttcagaa 600

tacttttatc atcatgcttt gaaaaaatat cacgataata tccattgttc tcacggaagc 660

atatacaggt catttgaacg aatttttttcg acaggaattt gcagggactc aggagcattt 720

aacctaaaaa agcatgacat ttcagcataa tgaacattta ctcatgtcta ttttcgttct 780

tttctgtatg aaaatagtta tttcgagtct ctacggaaat agcgagagat gatataccta 840

aatagagata aaatcatctc aaaaaaatgg gtctactaaa atattattcc atctattaca 900

ataaattcac agaatagtct tttaagtaag tctactctga attttttttaa aaggagaggg 960

taaagagtga gaagcaaaaa attgtggatc agcttgttgt ttgcgttaac gttaatcttt 1020

acgatggcgt tcagcaacac gtctgcgcag gctgccggaa aaagcagtac agaaaagaaa 1080

tacattgtcg gatttaagca gacaatgagt gccatgagtt ccgccaagaa aaaggatgtt 1140

atttctgaaa aaggcggaaa ggttcaaaag caatttaagt atgttaacgc ggccgcagca 1200

acattggatg aaaaagctgt aaaagaattg gaaaaagatc cgagcgttgc atatgtggaa 1260

gaagatcata ttgcacatga atatgcgcaa tctgttcctt atggcatttc tcaaattaaa 1320

gcgccggctc ttcactctca aggctacaca ggctctaacg taaaagtagc tgttattgac 1380

agcggaattg actcttctca tcctgactta aacgtcagag gcggagcaag tttcgtacct 1440

tctgaaacaa acccatacca ggacggcagt tctcacggta cgcatgtagc cggtacgatt 1500

gccgctctta ataactcaat cggtgttctg ggcgtagcgc caagcgcatc attatatgca 1560

gtaaaagtgc ttgattcaac aggaagcggc caatatagct ggattattaa cggcattgag 1620

tgggccattt ccaacaatat ggatgttatc aacatgagcc ttggcggacc tactggttct 1680

acagcgctga aaacagtcgt tgacaaagcc gtttccagcg gtatcgtcgt tgctgccgct 1740

gccggaaacg aaggttcgtc cggaagctca agcacagtcg gctaccctgc aaaatatcct 1800

tctactattg cggtaggtgc ggtaaacagc agcaaccaaa gagcttcatt ctcaagcgca 1860

ggttctgagc ttgatgtgat ggctcctggc gtatccatcc aaagcacact tcctggaggc 1920

acttacggtg cttacaacgg cacgtccatg gcgactcctc acgttgccgg agcagcagcg 1980

ttaattcttt ctaagcaccc gacttggaca aacgcgcaag tccgtgatcg tttagaaagc 2040

actgcaacat atcttggaaa ctctttctac tatggaaaag ggttaatcaa cgtacaagca 2100

gctgcacaat aatagtaaaa agaagcaggt tcctccatac ctgcttcttt ttatttgtca 2160

gcatcctgat gttccggcgc attctcttct ttttccgcat gttgaatccg ttccatgatc 2220

gacggatggc tgcctctgaa aatcttcaca agcaccggag gatcaacctg gctcagcccc 2280

2280

<210> 2
<211> 381
<212> PRT
<213> 2

<400> 2
Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
1 5 10 15

Ile Phe Thr Met Ala Leu Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys
20 25 30

Ser Ser Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser
35 40 45

Ala Met Ser Ser Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly

```
     50                  55                  60

Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asn Ala Ala Ala Ala Thr Leu
 65                  70                  75                  80

Asp Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr
                 85                  90                  95

Val Glu Glu Asp His Ile Ala His Glu Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr
            100                 105                 110

Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr Thr
        115                 120                 125

Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser
    130                 135                 140

His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Ser Glu
145                 150                 155                 160

Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His Gly Thr His Val Ala Gly
                165                 170                 175

Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro
            180                 185                 190

Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asp Ser Thr Gly Ser Gly
        195                 200                 205

Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ser Asn Asn
    210                 215                 220

Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Thr Gly Ser Thr Ala
225                 230                 235                 240

Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser Ser Gly Ile Val Val Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly Ser Thr Ser Thr Val Gly
            260                 265                 270

Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala Val Gly Ala Val Asn Ser
        275                 280                 285

Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala Gly Ser Glu Leu Asp Val
    290                 295                 300

Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Gly Thr Tyr
305                 310                 315                 320

Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
                325                 330                 335
```

```
Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr Trp Thr Asn Ala Gln Val
            340                 345                 350

Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Asn Ser Phe Tyr
        355                 360                 365

Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln
    370                 375                 380
```

<210> 3
<211> 275
<212> PRT
<213> 3

<400> 3

```
Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
  1               5                  10                  15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
             20                  25                  30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala
         35                  40                  45

Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His
     50                  55                  60

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
 65                  70                  75                  80

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
                 85                  90                  95

Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
            100                 105                 110

Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
        115                 120                 125

Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser
    130                 135                 140

Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala
                165                 170                 175

Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala
```

```
            180                 185                 190

Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
        195                 200                 205

Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr
    210                 215                 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr
225                 230                 235                 240

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

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
            260                 265                 270

Ala Ala Gln
        275
```

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> primer F2

<400> 4
gaagcacgtt tacatcggtc tggc 24

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Primer F3

<400> 5
ggggctgagc caggttgatc ctcc 24

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> R1

<400> 6
gcatctgatg tctttgcttg gcg 23

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> R2

<400> 7
aacgttgaca ttcggcacac tcc 23

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Primer R3

<400> 8
tggcaaaggc accagccagt cacc 24

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> BCAP-F1

<400> 9
ggggcatatg atatgcgcaa tctgttcctt 30

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> BCAP-R1

<400> 10
ccccaagctt ttattgtgca gctgcttgta cg 32