

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 39/012
A61K 39/395
C07K 1/22
C07K 14/455
C12N 15/30

(45) 공고일자 1999년02월 18일
(11) 등록번호 특0165115
(24) 등록일자 1998년09월 16일

(21) 출원번호	특1990-004201	(65) 공개번호	특1990-013983
(22) 출원일자	1990년03월27일	(43) 공개일자	1990년10월22일
(30) 우선권주장	89.303032.0 1989년03월28일 유럽(EU)		
(73) 특허권자	약조 엔. 브이 에프. 쥐. 엠. 헤르만스; 에이. 쥐. 제이. 비어미렌 네덜란드왕국 비 엠 아르넌 6824 벨페르 베그 76		
(72) 발명자	아르노 베르위렌 네덜란드왕국 코르헨데르 벨드 34 에이치 에이치 취크 5431 레인 디 케마 네덜란드왕국 펜손 네르스트라세 6 엠 엘 오 에스 에스 5345 로레인 엘리자베드 클라크 영국 롱세르트 플레이스 콤노르(옥스포드 오 엑스 2 9 큐 티)9 파이오나 마가렛트 톰 레이 영국 베트만 스트리트 56 캠브리지(캠브리지셔 씨 비 21 에 아) 나영환, 도두형		
(74) 대리인	나영환, 도두형		

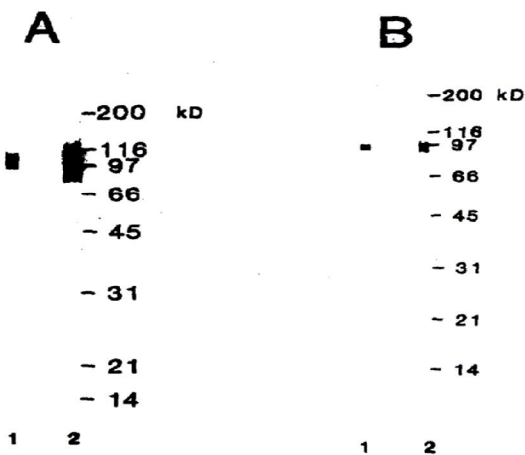
심사관 : 조명선

(54) 곡시등증 백신

요약

내용없음.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

곡시등증 백신

[도면의 간단한 설명]

제1도는 모노클로날 항체로 탐침된 에이메리아 테넬라 포자소체(sporozoite) 및 2세대 분열 소체(merozoite)의 웨스턴 블롯(western blot)이다.

제2도는 여러 포자 생식 단계에서의 Etp100(화살표)의 형질 발현을 나타내기 위한 고도로 면역된 영계

혈청으로 탐침된 여러 단계의 SDS-PAGE 분리 물질에 대한 웨스턴 블롯이다.

제3도는 이.테넬라 스포로시스트(sporocyst) Etp100(화살표)의 면역 친화성 정제를 나타낸 도면이다.

제4도는 EtHL6 항원에 상응하는 천연 단백질을 규명하는 도면이다.

제5도는 EtHL6 항원에 상응하는 이종으로부터의 천연 폴리펩타이드의 검출을 나타낸 도면이다.

제6도는 이.테넬라 게놈 DNA(Etg100)의 뉴클레오티드 서열을 나타내고 있다.

제7도는 EtHL6와 EtHL6-관련 게놈 및 cDNA 서열의 개략적 배열을 나타내고 있다.

제8도는 Etp100의 예상되는 아미노산 서열과 그 함유물의 통계적 분석을 나타내고 있다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 에이메리아종의 면역학적 특성을 지닌 단백질 및 이것의 단편, 이들을 암호하는 DNA 서열, 이 DNA 서열을 함유하는 재조합 벡터 및 숙주 유기체, 뿐만 아니라 상기 단백질 또는 이 단백질의 단편, 또는 이들을 암호하는 DNA를 함유하는 백신에 관한 것이다.

콕시듐증은 아피콤플렉사 아문이며 에이메리아 속의 세포내 기생충인 원충류에 의해 야기되는 질환이다. 상기 기생충은 숙주의 소화 기관과 위장관의 일부를 형성하는 세포 내에서 증식한다.

집약 생산의 증가에 따라, 양계업에 있어서 상기 기생충에 의해 발생하는 손해는 최근 수십년 동안 크게 증가하였다. 네델란드의 양계 농장주는 매년 입는 손실이 수백만 길더에 이르며, 1986년에는 손해가 약 13백만 길더였다. 같은 해에 미국에서는 항콕시듐제를 사용했음에도 불구하고, 미국 달러로 3억달러의 손실을 보았다.

영계의 콕시듐즈의 병원체는 9가지 종으로 나눌 수 있다. 즉, 에이메리아 아세르볼리나(*Eimeria acervulina*), 이.맥시마(*E. maxima*), 이.테넬라(*E. tenella*), 이.네카트릭스(*E. necatrix*), 이.브루네티(*E. brunetti*), 이.미티스(*E. mitis*), 이.프레콕스(*E. praecox*), 이.미바티(*E. mivati*) 및 이.하가니(*E. hageni*). 그러나, 일부 사람들은 마지막 두 가지 종의 존재는 의심하고 있다. 상기 모든 종들은 단지 영계만이 숙주이며 높은 조직 특이성을 나타내고 있다. 그러나, 상기 종들의 생활환은 유사하다.

이들의 영계에 대한 병원성 작용은 상이하며, 영계의 종류에 따라 다르다; 따라서 구이용 영계는 음식물의 소화에 중요한 역할을 하는 소장에 대부분 기생하는 이.아세르볼리나 또는 이.맥시마와 같은 기생충에 의해 큰 손상을 받는다.

생활환동안, 에이메리아 기생충은 수많은 단계를 통해 진행된다. 감염 단계(포자 형성 낭포체(oocyst))는 영계의 입을 거쳐서 위로 들어가며, 이 곳에서 분쇄 작용의 결과로 포자의 벽이 파열된다. 낭포체가 함유하는 4개의 스포로시스트가 방출되어 십이지장으로 들어가고, 따라서 담즙 및 소화 효소에 노출된다. 결과적으로, 스포로시스트 벽에 구멍이 형성되고 스포로시스트내에 존재하는 포자 소체가 방출된다. 상기의 포자 소체는 이동성이 있으며 적당한 숙주 세포(예, 상피 세포)를 찾아 투과하여 생식을 한다. 종에 따라, 첫 번째 생식 단계는 20내지 48시간 동안 지속되며 수십 내지 수백의 분열 소체가 형성되어, 다시 각각 새 숙주 세포에 투과하여 생식을 한다. 상기 무성 생식 사이클의 2내지 5회 이후, 종에 따라, 세포내의 분열 소체는 유성 형태, 즉 자웅의 생식 모세포로 성장한다. 유성 생식자에 의한 자성 생식자의 수정 후에, 접합자가 형성되어 그 주위에 포낭벽을 생성한다. 이 낭포체는 숙주 세포를 벗어나서 배설물로 나온다. 영계 외부의 온도와 습도가 상당히 높고, 그와 동시에, 공기 중에 충분한 산소가 있는 경우, 낭포체는 감염 단계로 포자를 형성할 수 있다.

따라서, 영계로부터 영계로 기생충이 전달되는데 있어서, 중간 숙주는 필요치 않다. 그러므로, 허용되는 표면적의 점유도가 높아짐에 따라 영계 농장에서의 감염력은 급격히 증가하는 것으로 추고된다.

기생충은 여러 가지 방법으로 퇴치할 수 있다.

우수한 관리와 더불어, 콕시듐증은 종종 사료나 음료수와 함께 혼합한 항콕시듐제를 사용함으로써 억제할 수 있다. 그러나, 상기의 약물은 부분적으로 기생충이 고도의 유전 능력으로 여러가지 구제 약물에 대한 내성을 갖게 되었기 때문에, 최근 몇년내에는 유효성이 감소하고 있다. 또한, 수많은 상기 약물들은 소비시에 문제를 야기할 수 있는 고기에 잔류할 수도 있다.

따라서, 면역 예방이 훨씬 더 우수한 구제 방법을 구성할 것이다. 충분히 심한 감염을 거쳐서 생존한 영계는 이후에 동일한 유형의 에이메리아와의 접촉에 대해 내성을 가질 수 있다고 알려져 있다. 에이메리아에 대한 내성은 또한 소량의 낭포체나 약화된 (비-병원성) 균주의 낭포체로 몇 차례 영계를 감염시킴으로써 유도할 수 있다. 그러나, 특히 수많은 구이용 영계에 대한 조절 투여는 이 경우에 있어서 사실상 극복할 수 없는 문제점이다. 따라서 불활성화된 백신이 가능성 있는 해결책으로 나타났다.

불활성화된 백신은, 가능하게는 보조제와 함께, 기생충으로부터 유래되는 항원으로 구성될 수 있다.

기생충으로부터 분리된 항원의 사용 대신, 대안책으로서 재조합 DNA 기법의 보조하에 제조한 생성물을 사용하는 것이 가능하며, 이 기법은 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다.

또한 항원이나 그것의 일부를 합성하여 생산하는 것이 가능하며, 예컨대, 보조제의 존재하에 담체 단백질에 결합되어 있는, 면역적으로 인지 가능한 촉진 형태로 영계에 투여하는 것이 가능하다.

또한, 백신 접종은 항원을 암호하는 유전자가 병입되어 있는, 박테리아, 또는 비루스와 같이 살아 있는 숙주 유기체를 투여함으로써 수행할 수 있다. 이 유기체는 영계의 면역 시스템을 적당하게 촉진할 수 있도록 적당히 장기간 동안 항원 합성이 가능하다.

본 발명에 의하면 단백질(Etp100) 또는 그것의 단편을 콕시둠증으로부터 가금류를 면역시키는데 사용할 수 있다.

상기 단백질 Etp100은 이.테넬라의 추출물을 모노클로날 항체 E. TEN. 11P-2를 함유한 컬럼 기질에 적용하고, 추출물의 흡착 분획과 미흡착된 분획을 분리한 후 공지된 방법을 사용하여 컬럼 기질로부터 흡착된 분획을 해리시키는 단계에 의해 이.테넬라의 추출물로부터 분리해 낼 수 있다.

이러한 면역-크로마토그래피 방법에 의해 수득된 단백질 물질은 선택적으로 천연적으로 유래된 생성물의 정제법으로서 공지된 방법으로 더 정제할 수 있다.

이.테넬라로부터 수득한 단백질 Etp100의 특성 규명 결과 하기의 특성이 밝혀졌다:

- a. SDS-PAGE 에서의 약 100 kD의 분자량;
- b. 비-환원성 조건하에서는 모노클로날 항체 E. TEN. 11P-2에 결합하지만, 환원성 조건하에서는 결합하지 않음;
- c. 포자형성된 낭포체, 스포로시스트, 포자소체, 제1 및 제2세대 번식체 및 제2세대 분열 소체에서 형성됨.

이 100 kD 단백질은 다양한 제공원으로부터 수득한 이.테넬라의 분열소체 뿐만 아니라 포자소체로부터 적절하게 분리할 수 있다.

또한 Etp100에 상응하는 단백질은 이.멕시코와 이.아세르볼리나와 같은 기타 에이메리아종으로부터 분리할 수 있다. 이러한 상응하는 단백질은 상기 이.테넬라의 100 kD 단백질의 단편에 대하여 마우스 항혈청을 유발시키고, 이 항혈청의 항체를 사용하여 제5도에 나타난 바대로 이.멕시코와 이.아세르볼리나 포자소체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석하므로써 동정한다. 이 방법으로 검출될 수 있는 단백질의 분자량은 이.테넬라의 Etp10과 유사한 것으로 밝혀졌다. 동일한 항혈청은 상기 이.멕시코와 이.아세르볼리나 단백질을 면역-크로마토그래피 분리하는데 사용할 수 있다.

상기 이.테넬라 단백질 또는 이의 폴리펩타이드 단편을 암호하는 DNA 서열은 이.테넬라 mRNA로부터 유래된 상보적 DNA(cDNA) 뿐만 아니라 게놈 DNA로부터 유래되며, 이하에 실시예로 요약하였다. 이 DNA 서열 및 이의 아서열에 의해 암호되는 에이메리아 하원성을 갖는 폴리펩타이드와 함께 상기 DNA 서열(뿐만 아니라 이의 아서열)도 본 발명의 일부를 형성한다.

제공된 아미노산을 위해 몇 가지 상이한 코돈(3개의 뉴클레오티드 염기)이 DNA 내에서 암호할 수 있다는 것이 공지되어 있다. 예컨대, 글루탐산의 코돈은 GAT 또는 GAA 등이다. 제6도 내지 제8도의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 (E도는 이것의 폴리펩타이드 단편)는 유사한 선택적인 코돈 조성을 갖는 DNA로 이루어질 수 있음이 명백하다.

부가하여, 콕시둠증에 대해 가금류를 면역시키는데 사용할 수 있는 상기 폴리펩타이드의 단편도 본 발명의 일부를 형성한다. 공지되거나 공지되지 않은 아미노산 서열내에 존재하는 상기의 유용한 폴리펩타이드 단편(일명, 에피토프)을 검출하는 다양한 방법이 알려져 있다. 공지된 아미노산 서열을 기초로 하여, 이러한 에피토프는 국제 공개 번호 W084/03564호와 W086/06487호에 기술되어 있는 선별법을 보조로 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다.

또한, 상기한 아미노산 서열을 갖는 상기 폴리펩타이드의 많은 영역들은 현재 공지된 에피토프와의 구조적 일치성과 이론적인 면을 근거로 에피토프로 지칭할 수 있다. 이들 영역들은 홉과 우즈(Hopp and Woods ; PNAS USA 78:3824-3828:1981)에 의한 친수성 기준 및 추오와 파스만 (Chou and Fasman ; Advances in Enzymology 47:45-148:1987)에 의한 2차 구조의 면을 조합한 것을 근거로 하여 결정한다.

하기의 영역들은 항체에 대한 가능성 있는 에피토프를 포함하며(참고, 제8도); 아미노산 번호는 약 270-300 및 약 495-525이다.

따라서, ISPQKPGSPPTCEAPRGRSCQPPLTR 과 PVDEVVGDWEDWQCQCGGKRTNRGPS 의 아미노산 서열과 이들 서열을 포함하는 폴리펩타이드로 본 발명의 일부를 구성한다.

필요할 수 있는 T-세포의 에피토프도 이와 유사하게 베르조프스키의 양쪽 친화성 기준(Science 235:1059-62:1987)을 보조로 사용하여 이론적 근거하에 유도될 수 있다.

본 발명에 따른 콕시둠증 감염에 대한 면역화를 위해, 예컨대, 항-이디오타입(idiotype) 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 사용하는 것이 가능하다. 이러한 항-이디오타입 항체는 본 발명에 의한 폴리펩타이드에 대해 유발되는 항체의 이디오타입에 대하여 유발된다. 상기에 지적한 본 발명의 폴리펩타이드의 면역원성등가물은 특히 이런 종류의 항-이디오타입 항체를 의미하는 것으로 이해된다.

본 발명에 따라, 콕시둠증에 대해 가금류를 면역시키기 위하여, 본 폴리펩타이드, 이것의 단편, 또는 면역원성 등가물을 영계에 투여하거나, 또는 대안적으로 재조합 DNA나 RNA 기법을 이용하는 유전자 조작에 의해 본 폴리펩타이드, 또는 이것의 면역원성 부 또는 이의 등가물을 인 시추(in situ)로 생성하는 능력을 획득한 미생물을 투여하는 것이 가능하다.

서브유닛 백신은 상기 전자의 경우에 종종 사용되는 용어이며, 벡터 백신은 대개 후자의 경우에 사용된다.

본 발명자들도 또한 본 명세서에서 이 명칭을 사용할 것이다.

본 발명에 의한 서브유닛 백신은 일반적으로 정제 형태의 폴리펩타이드를 임의적으로 약학적 허용성 부형제의 존재하에 포함한다.

이러한 사용을 위한 폴리펩타이드는 펩타이드 합성이나, 재조합 DNA 기법, 에이메리아로부터의 분리와

같은 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다.

이 폴리펩타이드는 임의적으로 미관련 단백질에 공유 결합 될 수 있으며, 이것은 예컨대, 융합 생성물의 정제에 유리하거나 성숙 단백질로의 프로세싱에 도움이 될 수 있다. 그 예는 β -갈락토시다제, 단백질 A, 프로키모신, 혈액 응고 인자 Xa 등이 있다.

필요하다면, 상기 폴리펩타이드는 생체내 또는 시험관내에서 글리코실화, 아마이드화, 카르복실화, 아실화 또는 인산화 반응 작용에 의해 변형될 수도 있다.

면역원성을 증가시키기 위하여, 상기의 폴리펩타이드들은 담체에 결합되거나 연결될 수 있으며, 및/또는 보조제 성질을 갖는 화합물과 혼합될 수도 있다. 또한 상기 폴리펩타이드에 기초한 백신은 안정화제, 완충액 등과 같은, 백신내에 일반적으로 사용되는 다른 화합물을 포함할 수 있다.

백터 백신에 있어서, 본 발명의 폴리펩타이드 생성물은, 면역화될 개체에 그 자체가 투여되고 그 개체내에서 잠시 동안 유지되거나 증식하기도 하는 유전자 조작된 유기체에 의해 제조된다. 이런 목적에 사용하기 위한 숙주로서 여러 가지 유기체가 사용될 수 있는데, 그 예는 에스케리치아 콜리(*Escherichia coli*), 바실러스(*Bacillus*), 또는 살모넬라(*Salmonella*)와 같은 박테리아, 또는 우두 또는 전염성 상피종 바이러스 등의 바이러스가 있다. 이러한 유형의 숙주 유기체를 사용함으로써 폴리펩타이드는 그 자체가 표면 항원으로서 형질 발현될 수 있다. 이러한 점에서, 에스케리치아 콜리의 OMP 단백질이나 선모 단백질과 상기 폴리펩타이드를 융합하거나 또는 유기체에 의해 인지되는 시그널 서열 및 앵커 서열을 합성하여 제공하는 것도 가능하다. 또한, 상기 면역원성 폴리펩타이드는 바람직하다면 보다 큰 실체물의 일부으로서 면역화될 동물 내부로 방출될 수도 있다. 상기의 모든 경우에, 여러 가지 병원체 및/또는 제시된 병원체의 각종 항원에 대한 보호를 유발하는 하나 이상의 면역원성 생성물을 형질 발현하는 것이 가능하다.

[실시예 1]

[하이브리도마의 제조]

[기생균 및 그의 분획의 제조]

이.테넬라(*E.tenella*) 기생균을 증식시키고, 롱(Long) 등이 발표한 방법들 (Fol. Vet. Lat. 6:201-217;1976)에 따라 낭포체(oocyst)를 분리했다. 위셔 앤드 로즈(Wisher Rose : Parasitology 88:515-519;1984)가 발표한 바에 따라, 그리고 추가로 라센(Larsen) 등이 발표한 나일론 울 정제 방법(J. Parasitol. 70:597-601;1984)을 사용하여 포자소체를 분리 및 정제했다. 스토티쉬 및 왕(Stotish Wang : J. Parasitol. 61:700-703;1975)의 방법을 이용하여, 감염시키고 96 시간 경과 후에 영계의 맹장으로 부터 제2세대 분열소체를 분리한 다음, 연속 70% 퍼콜(Percoll) 농도 구배로 원심 분리하여 추가 정제했다.

[면역화 및 세포 융합]

Balb/c 마우스에게 0.5ml PBS(인산염 완충 식염수)중의 10^6 이.테넬라 포자소체를 복강내 투여하여 면역화한 후, 융합시키기 4일전에 동일한 투여량과 동일한 투여 경로로 보조 주사(booster)했다. 1차 면역화한 지 6주 후 무균 상태로 지라를 분리하고, 그 세포를 괴앨러(Kohler)와 밀스타인(Milstein)이 발표한 바(Nature 256:495-7;1975)에 따라 골수종 세포주 P3X63 Ag 8.6.53과 융합 시킨 후, 표준 프로토콜에 따라 배양했다.

[하이브리도마의 선별]

면역형광 분석법(IFA)을 이용하여 포자소체 항원을 인지하는 하이브리도마들을 선별했다. 포자소체를 PBS($1-3 \times 10^6/ml$)중에 현탁시키고, 3 μl 부피를 취하여 10 웰의 유리 슬라이드(셀라인)상에 떨어뜨린 후, 실온에서 밤새 건조시키고, 건조 상태로 $-70^\circ C$ 에서 보관했다.

아세톤 중에서 슬라이드를 해동 및 고정시키고, 하이브리도마 상층액 25 μl 를 각각의 웰위에 떨어뜨린 후, $37^\circ C$ 에서 30분간 배양했다. 슬라이드를 PBS로 행구고 5분 동안 3회 PBS로 세정했다.

표지된 토끼-항-마우스 FITC(노르딕:플루오로-이소티오시아네이트)를 결합체로서 1:100 내지 1:200의 희석율로 사용하고, 대비염색을 위해0.05% 에반스블루(Evans Blue) 존재하에 $37^\circ C$ 에서 30분간 배양했다. 세정 및 세척 후 슬라이드위에 0.1 μl 트리스-HCl:pH 9.0; 75% 글리세롤을 올려 놓고, 라이츠 오르토룩스(Leitz Ortholux) 형광 현미경하에서 분석했다. 이 분석에서 양성인 것으로 나타난 하이브리도마들을 다시 한계 희석법을 이용하여 추가 클로닝하고 다시 분석한 후, 액체 질소중에서 보관하거나 또는 프리스탄(Pristane)-초회 항원 자극을 받은 Balb/c 마우스에게 직접 복수를 생성시켰다. (마우스 1 마리당 2.5×10^6 하이브리도마 세포를 복강내 주사). 이들 양성 하이브리도마들 중에서 유용한 항체들을 생산하는 2개의 클론을 선별했다. 이들 단일 클로 항체들을 각각 E. TEN. 11P-2 및 E. TEN. 10Y-2로 나타냈으며, 이들은 IFA를 이용했을 때, 이 테넬라 포자소체 뿐만 아니라 제2세대 분열소체를 인지했다. 이들의 형광 패턴은 서로 유사하였으며, 두 가지 단일 클론 항체들은 모두 소체(zoite)의 전반부에 존재하는 물질, 추론컨대 세포질 단백질과 결합하였다.

[샘플 기탁]

이들 E. TEN. 11P-2 및 E. TEN. 10Y-2 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주들의 샘플은 1989년 2월 2일자로 영국, 포르톤 다운(Porton Down)에 소재하는 유럽 동물 세포 배양물 수집소(European Collection of Animal Cell Cultures)에 각각 기탁 번호 제89020202호 및 제89020201호로 기탁되었다.

[실시예 2]

[단일클론 항체 E. TEN. 11P-2 및 E. TEN. 10Y-2의 특성 규명]

A. 방법

베르메울렌(Vermeulen)등이 발표한 SDS-PAGE/면역 블롯팅 기술(J Exp. Med. 162:1460-76;1985)을 이용하여 MoAb E. TEN 11P-2 및 E. TEN. 10Y-2의 표적 항원들의 특성을 조사하였다. 간략히 설명하면, 새로 탈양 되고 나일론 울 정제된 포자소체 2×10^7 개를 DTT 또는 β -메르캅토에탄올과 같은 환원제를 가하지 않고 라에믈리(Laemmli) 시료 완충제(Nature 227:680-4;1970)중에 가용화시켰다. 5분간 끓이고 18000×g로 3분간 원심 분리한 후, 상층액을 분리하여, 글리세롤을 20%까지 가한 후, 4% 스택킹(stack) 겔을 함유하는 7-18% 아크릴아미드 농도 구배 겔(또는 12%의 균일한 겔)위에 로딩했다.

전기 영동 분리 후, 단백질을 0.01 몰/ℓ 트리스; 0.079 몰/ℓ 글리신; pH 8.3에서 니트로셀룰로오스(0.45 μm ; 셀라이헤드 앤드 쉘)위에 10 V/cm에서 1시간 동안 블롯팅했다.

면역-검출하기 위한 목적으로 니트로셀룰로오스 스트립을 PBS 중의 0.2% 탈지분유(NFMP)로 30분 동안 전처리하고, PBS ; 0.05% Tween-20 ; 0.1% NFMP로 10배 희석된 하이브리도마 상층액과 함께 실온에서 90분간 배양하고, 충분히 세정한 다음, 알칼리 포스파타제로 표지한 항-마우스 Ig 와 함께 배양했다. 100 mmol/ℓ 트리스/HCl ; pH9.5 ; 100 mmol/ℓ NaCl ; 5 mmol/ℓ MgCl₂ 중의 니트로 블루 테트라졸륨(0.33 mg/ml) 및 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴포스페이트 p-톨루이딘염(0.17 mg/ml)을 사용하여 결합된 Ig 결합체를 가시화했다.

B. 결과

단일 클론 항체 E. TEN. 11p-2 및 E. TEN 10Y-2 는 웨스턴 블롯상에서 95-110 kD의 밴드를 나타내는 한 원되지 않은 이.테넬라 포자소체-분열소체 단백질들과 반응하였다(제1도). 바이오-레드 SDS-PAGE 분자량 마커들을 참조 물질로 사용하였다. ELISA에서 특이적 항혈청을 사용하여 E. TEN. 11P-2/E. TEN. 10Y-2의 특성을 규명한 결과 IgG 1 이소타입인 것으로 나타났다.

[실시에 3]

[기생균 분화동안 Moab E. TEN. 11P-2와 반응하는 항원의 형질 발현]

A. 방법

비교할만한 양의 포자형성된 낭포체, 정제한 스포로시스트 및 정제한 포자소체를 가진 라인들을 함유하는 웨스턴 블롯을 준비했다. 실시에 3A에 기술한 방법에 따라 단일 클론 항체 뿐만 아니라 영계의 초면역 혈청을 사용하여 웨스턴 블롯을 탐침했다.

2×10^4 개의 생존력 있는 이.테넬라 낭포체를 4일 이내에 2회 경구 투여하고, 이어서 4일 간격으로 10^4 개를 4회 경구 투여하여 9마리의 영계(생후 7주된 것)에서 초면역 영계 혈청을 생성시켰다. 최종 투여하고 1 주 후에 영계들로부터 채혈했다. 혈청을 모은 후, 실시에 1에 기술한 면역-형광 분석법으로 항-포자소체 역가를 분석한 결과, 1:1280 으로 나타났다.

B. 결과

MoAb E. TEN. 11P-2 및 E. TEN. 10Y-2의 표적 단백질인 95-110 kD 단백질이 포자형성된 낭포체내에 이미 존재하고 있었으며, 또한 그들이 스포로시스트 및 포자소체 단계에서 형질 발현되는 것으로 나타났다. 95-110 kD 단백질들이 영계의 초면역 혈청에 의해 우선적으로 인지되었다(제2도).

[실시에 4]

[이.테넬라 단백질의 면역-크로마토그래피 정제]

[면역친화성 컬럼의 준비]

실온에서 50% 포화도의 (NH₄)₂SO₄를 사용하여 복수액으로부터 E. TEN. 11P-2로 부터의 IgG를 침전시켰다. 상기 물질을 미니퓨즈 T(Heraeus Christ)내에서 2500 rpm으로 30분간 회전시켰다. 펠릿을 50% (NH₄)₂SO₄로 2회 세정하고, 원래 부피의 1/2배 되는 0.2몰/ℓ NaHCO₃ 중에 재현탁시킨 후, 제조원의 지시에 따라 세파덱스 G25(파마시아 PD 10 컬럼)에서 탈염 처리하고, CNBr-활성화 세파로스(파마시아)에 4℃에서 밤새 커플링시켰다. 최종 커플링 비는 겔 1ml 당 6.7mg IgG이었다.

E. TEN. 10Y-2 에 대하여서는, 제조원의 지시에 따라 단백질 a-세파로스(파마시아)를 사용하여 복수액으로부터 IgG를 농축 및 정제했다. 중화 및 탈염 처리 후, 전술한 바대로 커플링을 실시하여 E. TEN. 10Y-2 컬럼의 최종 커플링 비가 4.8 mg/ml 겔이 되도록 하였다.

IgG-커플링된 세파로스 5-7ml를 적당한 컬럼에 붓고, 러닝(running) 완충액(25 mmol/ℓ 트리스/HCl ; pH 8.0 ; 0.5 몰/ℓ NaCl ; 0.1% NP40)으로 평형화시켰다.

[Etp100 의 면역-친화성 정제]

-70℃에서 펠릿 상태로 냉동시킨 이.테넬라 스포로시스트 320×10^6 을 녹여서 3ml의 25 mmol/ℓ 트리스/HCl ; pH 8.0 ; 1 mmol/ℓ EDTA ; 1 mmol/ℓ PMSF 중에 현탁시켰다.

3g 유리 비이드(직경-0.3 mm) 존재하에 볼텍스하여 포낭들을 파쇄시켰다. 용액에 0.1%까지 노니데트(Nonidet) P40(NP40)을 가하고, 0℃에서 1시간 동안 배양했다. 용해되지 않은 물질을 4℃에서 2000 rpm 으로 15분간, 이어서 3000 rpm 으로 1시간동안 회전시켜서 원심 분리했다. 상층액을 면역-컬럼

에 가하기 전에 0.22 μm 필터를 통해 통과시켰다.

이. 테넬라 스포로시스트 추출물 5 ml를 E. TEN. 11P-2 및 E. TEN. 10Y-2 컬럼에 유속 0.15 ml/분의 재순환 시스템으로 주변 온도에서 밤새 결합시켰다.

± 20 회 순환 후, 결합되지 않은 분획을 수거하여 다시 분석했다. 컬럼을 0.5 ml/분의 유속에서 세척액 4(0.1 몰/l 아세테이트; 0.5 몰/l NaCl ; 0.1% NP40 ; pH 4.0) 및 세척액 8(0.1 몰/l 트리스/HCl ; 0.5 몰/l NaCl ; 0.1% NP40 ; pH 8.0)로 교대로 3회 이상 세정했다.

러닝 완충액을 사용하여 2배의 베드(bed) 용량으로 세정한 후, 4 ml 의 0.1 몰/l 탄산염/중탄산염 ; pH 10.6 ; 0.1% NP 40을 사용하여 알칼리 용출을 실시했다.

분획들을 1 몰/l 트리스 pH 8.0 으로 중화시키고, 컬럼을 러닝 완충액으로 다시 평형시켰다. 이어서, 0.1 몰/l 글리신/HCl ; 0.15 몰/l NaCl ; 0.1% NP 40 ; pH 2.6 으로 용출시키고, 산성 분획들을 1 몰/l 트리스 ; pH 8.0 으로 중화시켰다.

모든 분획에 대하여 비환원 조건하의 SDS-PAGE에서, 그리고 다중 클론 토끼 항-포자소체 혈청을 탐침 항체로 이용하는 웨스턴 블롯에서 분석했다(제3도).

상기 2개의 컬럼들로부터 산성 조건들을 이용하여 주분획을 용출시켰다. E. TEN. 11P-2 컬럼으로부터 용출된 물질은 E. TEN 10Y-2 MoAb 와 양성 반응을 나타냈다(제시되지는 않음).

[실시에 5]

[이. 테넬라의 cDNA 라이브러리 제조 및 면역학적 선별]

A. RNA의 분리

RNA를 분리하기 위하여 완전 포자 형성된 낭포체를 10 mmol/l 트리스 아세테이트(pH 7.6) ; 75 mmol/l 소듐 아세테이트 ; 1% SDS ; 2 mmol/l EDTA ; 0.2 mg/ml의 프로테이나제 K와 10 mmol/l 바나딜 리보뉴클레오사이드 복합체를 포함하는 완충제 2.8 ml에 취했다. 낭포체를 13g l의 유리 비드(\varnothing 0.5mm) 존재 하에 60초(최대) 동안 볼텍스함으로써 파쇄시켰다. 5ml의 페놀을 전체 추출물에 첨가하고, 이 혼합물을 60 초 동안 더 볼텍스했다. 원심 분리후, 수성층을 피펫으로 분리해 내고 다시 동량의 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25:24:1) 혼합물로 추출하였다. 2.5배 부피의 에탄올을 첨가하여 RNA를 침전시키고 생성된 침전물을 Tris 10 mmol/l ; EDTA 0.1 mmol/l pH 7.6을 함유하는 완충액 800 μl 중에 용해시킨 후, 생성물을 동량의 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25:24:1)로 2회 및 클로로포름/이소아밀 알코올(24:1)로 2회 더 추출한 다음, 에탄올로 침전시켰다. 폴리 A⁺-RNA를 올리고(dT)-셀룰로오즈 크로마토그래피(마니아티스 등, 동일 문헌 참조)로 분리하였다. 약 100 μg 의 폴리 A⁺-RNA를 5x10⁸ 낭포체로부터 분리하였다.

B. cDNA 합성

폴리 A⁺-RNA를 MMLV 역전사 효소를 이용하여 cDNA로 전환시켰다. 이러한 목적을 위하여 25 μg 의 폴리 A⁺-RNA를 90 μl 의 물중에 용해시키고, 10 mmol/l 로 수산화 메틸 수은을 첨가하여 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 변성시킨 후, β -메르캡토 에탄올을 45 mmol/l 로 첨가하고 이 혼합물을 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 동안 더 배양했다. 효소 반응은 4 μg 의 올리고(dT)₁₅, 150 U RNasin^(R), 20 mmol/l 의 Tris (pH7.6), 30 mmol/l KCl, 4 mmol/l 디티오프레이톨(DTT), 2 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l 의 각 dNTP 와 3000 U 의 MMLV 역전사 효소를 함유한 완충액 190 μl 중에서 수행하였다. 이 반응을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양한 후 10 μl 의 0.5 mmol/l EDTA를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 동량의 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25:24:1)로 추출한 후, 2 mmol/l 암모늄 아세테이트와 2.5배 부피의 에탄올을 첨가함으로써 RNA/DNA 하이브리드를 침전시켰다. 효소 DNA-폴리머라제 I 와 RNase H가 함께 작용하여 두 번째 가닥이 합성되었다. 펠릿을 20 mmol/l Tris (pH 7.6), 5 mmol/l MgCl₂, 100 mmol/l (NH₄)₂SO₄, 0.6 mmol/l γ β -NAD, 16 U RNase H, 200 U DNA-폴리머라제 I 과 20 U DNA-리가아제(이.콜리)를 함유한 960 μl 의 완충액 중에 용해 시켰다. 배양 시간은 12 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 및, 이어서, 22 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간이며, 그 후 동량의 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25:24:1)을 첨가하고 에탄올로 침전시켜 반응을 중단시켰다.

상술한 목적에 적당한 벡터에 cDNA를 클로닝하기 이전에, 먼저 변형시켰다. cDNA(5 μg)를 30 mmol/l 소듐 아세테이트(pH 5.6), 50 mmol/l NaCl, 1 mmol/l ZnSO₄ 및 21 U 멍빈(Mung Bean) 뉴클레아제를 함유한 완충액 100 μl 중에 용해시켰다. 30분 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양한 후, EDTA 10 mmol/l 과 Tris 25 mmol/l 을 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25:24:1)로 추출한 후, 혼합물을 세파덱스 G50 컬럼에서 탈염시켰다.

하기의 내용물을 용축액(125 μl)에 첨가하였다: Tris pH 7.6, 50mM/l ; EDTA 2.5mmol/l ; DTT 5 mmol/l ; S'-아데노실메티오닌 0.5 μM 과 100 U EcoRI-메틸라제, 30분 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양한 후, 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 분 동안 가열함으로써 반응을 중지시키고, 이어서 Tris-HCl 100 mmol/l , MgCl₂ 100 mmol/l 와 NaCl 500 mmol/l (pH7.5)을 함유한 용액 1/10 부피를 첨가하고, 그와 동시에, 각 dNTP 1 mmol/l 와 12.5 U 클레노우 DNA 폴리머라제를 첨가하였다. 22 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분 동안 배양한 후 동량의 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올 (25:24:1)을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 350 μl 의 H₂O 와 50 μl 의 3 mmol/l 소듐 아세테이트(pH 5.6)을 500 μl 이 이소프로판올과 함께 첨가하여 수성상내에 존재하는 핵산을 침전시켰다. 100 μl H₂O 중에 용해시킨 후, 펠릿을 세파덱스 G50에서 탈염시키고 그 용출물을 에탄올로 침전시켰다.

상기 펠릿을 24 μl H₂O 중에 용해시킨 후, 2 μg EcoRI 링커, Tris-HCl(pH8.0) 30mmol/l MgCl₂ 10mmol/l , 디티오프레이톨 10mmol/l , ATP 1mmol/l , 젤라틴 0.1mg/ml, 및 10U T4 DNA 리가아제를 첨가하게 50 μl

중에서 걸찰시켰다. 4°C에서 16시간 동안 배양한 후 가열처리(70°C에서 15분간)하여 반응을 중단시키고, 이어서 100mmol/l Tris-HCl (pH7.6), 50mmol/l NaCl, 10mmol/l MgCl₂, 2.5mmol/l DTT 및 500U EcoRI 을 함유하는 완충액 210μl 중에서 제한 엔도뉴클레아제 EcoRI 로 절단시켰다. 37°C에서 90분간 배양한 후, 동량의 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25:24:1)로 추출하여 반응을 중단시켰다. 수성상내에 존재 하는 핵산은 소듐 아세테이트(pH5.6) 300mM/l 를 가한 후, 2.5배 부피의 에탄올로 침전시키고, 바이오겔 A15m 컬럼을 이용하여 cDNA와 링커를 분리했다. 에탄올로 cDNA를 침전시킨 후, 침전물을 트리스-HCl들을 파지 λgt 11, 뿐만 아니라 파지 λgt 10 내에 흰(Huynh) 등이 디엔에이 클로닝 테크닉스(DNA cloning techniques : A Practical Approach, 1984)에 발표한 바에 따라 클로닝시켰다.

C. MoAb E. TEN. 11P-2를 이용한 λgt 11 cDNA 라이브러리의 선별

λgt 11 cDNA 클론으로 감염시킨 이.콜리 Y1090 에 의해 생산된 단백질들을 앞서 기술한 바대로(Huynh 등, 동일 문헌) 니트로셀룰로오스 필터위에 고정시켰다. MoAb E. TEN. 11P-2를 이용하여 cDNA 라이브러 리를 면역-선별한 결과, 약 2 x 10⁵ 파지 클론 중 약 1클론이 양성 반응을 나타냈다. 단일 클론 항체들을 단백질 A 세파로스^(R)로 정제한 후, 1배 부피의 트리스 완충액(10mmol/l 트리스-HCl ; 150mmol/l NaCl ; pH8.0) + 0.05% 트윈 20 및 10% FCS로 희석하였다. 필터와 함께 25°C에서 2시간동안 배양했다. 필터를 상술한 트리스 완충액 + 0.05% 트윈 20 50ml로 10분간 4회 세정했다. 이어서 염소-항-마우스 하체 결합 체 및 알칼린 포스파타제(상술한 트리스 완충액 + 0.05% Tween 20 및 10% FCS로 1:7500 희석한 것)와 함께 제2항체 배양을 37°C에서 30분간 실시한 후, 제1의 항체 배양시 기술한 바와 같이 필터를 세정했다. 100mmol/l 트리스-HCl ; 100mmol/l NaCl ; 10mmol/l MgCl₂ ; pH9.6 (0.33g/l 니트로블루 테트라졸륨 및 0.17g/l 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트 함유)중에서 실온 하에 30분간 배양한 후 결합된 알칼린 포스파타제를 검출하였다.

면역-분석에서 양성을 나타낸 클론 1개를 플라크 정제하고, 이 클론을 Et 100으로 나타냈다(제7도 참조).

[실시에 6]

[이. 테넬라의 게놈 라이브러리 제조 및 면역학적 선별]

A. 방법

이.콜리 균주

이.콜리 Y1088(supE, supF, strA, metB, trpR, hsdR, hsdM, tonA21, ΔlacU169(proC::Tn5), (pMC9)), Y1089(ΔlacU169, proA⁺, Δlon, araD139, strA, hfla150(chr::Tn10), (pMC9)) 및 Y1090(ΔlacU169, proA⁺, Δlon, araD139, strA, supF(trpC22::Tn10(pMC9)))를 미합중국 모식균 배양 수집소 (American Type Culture Collection)로부터 입수하였다.

[DNA의 분리]

클라크등에 의한 Mol. Biochem. Parasitol., 22:9-87; 1987에 기재된 바에 따라 이.테넬라 염색체 DNA, 영계 DNA 및 이.콜리 DNA를 분리하였다.

[게놈 라이브러리의 작제]

이.테넬라 DNA를 EcoRI(Bethesda Research Laboratories)로 부분 절단시키고, 이를 T4 DNA 리가제(Boehringer Mannheim)를 사용하여, EcoRI 절단되고 송아지 장내 포스파타제 (calf intestinal phosphatase) (Boehringer Mannheim)로 처리된 λamp3 과 40°C에서 16시간 동안 결합시켰다. 1μg DNA에 대한 최종 걸찰 부피는 10μl 이고 벡터:삽입체 비율은 4:1이었다. λamp3 은 캠프등(P.N.A.S. USA 80:3787; 1983)에 의해 λgt 11로부터 개발된 것이다. 파지를 시험관내에서 팍키징하고(Maniatis 등, Cold Spring Harbor Laboratory, 'Molecular Cloning : A Laboratory Manual' 1982), 이.콜리 균주 Y1088과 함께 배양하고, X-gal(5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-β-D-갈락토피라노시드) 및 IPTG (이소프로 필-β-D-갈락토피라노시드) (Bachem) 존재 하에서 평판 배양하였다. 이러한 라이브러리를 증폭시키고(Maniatis 등, 상기 동서적 참조), 선별하기 전에 역가 측정하였다.

[게놈 라이브러리의 면역학적 선별 및 항혈청 제조]

클라크등 (상기 동 서적 참조)에 따른 방법으로 수행하였다.

B. 결과

제조항 박테리오파지 EtHL6 은 이.테넬라 DNA의 722 염기쌍 EcoRI제한 단편을 포함한다. 제7도 참조. EtHL6 에 의해 생성된 프라크는 영계의 면역 혈청으로 게놈 DNA 라이브러리를 선별한 후 항체-양성임을 확인했다.

[실시에 7]

[EtHL6 융합 단백질의 특성 규명]

A. 방법

[항체의 친화성 선별]

EtHL6 스탁(stock)으로부터의 박테리오파지(1 x 10⁴)를 9cm 디쉬의 이.콜리 균주 Y1090 상에 도말하고 42 °C에서 3시간 항은 배양하였다. IPTG로 미리 처리한 필터의 각 면을 상기 평판의 표면과 37°C에서 2시간

접촉시켰다. 필터를 영계의 면역 혈청(이.콜 리가 예비흡착되고, 1% BSA를 함유하는 PBS(pH7.0)로 1:20 희석물로 희석됨)과 함께 실온에서 1시간 항온 배양하였다. 세척 후 결합된 항체를 5ml 의 0.2mol/l 글리신(pH2.8)으로 10분간 용출시킨 다음 2mol/l 트리스(80 μ l); 10 x PBS(500 μ l); 2mg/ml 클로람페니콜(50 μ l) 및 0.25g BSA를 함유하는 용액 650 μ l 로 중화시켰다. 선별된 항체를 더 이상 희석하지 않고 사용하여 포자 소체 및 분열 소체 단백질의 웨스턴 블롯을 탐침하였다.

[융합 단백질]

이.콜리 균주 Y1089를 실시예 6B에 기술된 파지로 용원화하고, 1ml의 대수기 배양물에서 용균물을 제조하였다(Coppel 등, Nature 306:751-756:1983).

[폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)]

세척된 포자 소체 펠렛 또는 용해된 파지 용균물을 5분 동안 끓이면서 2%(w/v) 소듐 도데실 설페이트; 6mol/l 우레아; 5%(v/v) 2-메르캅토에탄올; 0.49mol/l 트리스-HCl, pH6.7에 용해시켰다. 미소 원심분리기에서 5분간 회전시킨 후 0.1%(w/v) 브로모페놀 블루를 함유하는 50%(v/v) 글리세롤을 상층액에 첨가하였다. 겔은 3.6%(w/v) 아크릴아미드 이격(spacer)겔, Ph6.7 및 6-14%(w/v) 아크릴아미드 구배 분리 겔, pH8.9(16 x 0.1cm)로 구성된 불연속 겔이다. 50-70V(정전압)에서 16시간 전기영동을 수행하고, 단백질에 대한 밴드를 0.2%(w/v) PAGE 블루 83(BDH 화학물질)을 함유한 35%(v/v) 메탄올, 10%(v/v) 아세트산으로 염색하였다.

[폴리펩타이드의 면역-블롯팅]

SDS-PAGE 후 평판겔을 30분간 25mmol/l 트리스; 192mmol/l 글리신 pH8.3; 20%(v/v) 메탄올(전이 완충액) 500ml로 형성화하였다. 겔내의 폴리펩타이드를 트랜스블롯(Transblot) 전이 셀(Bio-Rad Laboratories)에서 니트로셀룰로오스지(Schleicher Schull, BA85, 0.45 μ m)로 전기영동적으로 전이하였다(Towbin 등, PNAS 76 : 4350-4354; 1979). 전이 완충액을 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 16-22시간 동안 30V 정전압으로 전기 영동을 수행하였다. 전이 후, 포자 소체 샘플을 포함하는 니트로셀룰로오스지를 3%(w/v) 송아지 혈청 알부민(BSA ; Sigma A4503)함유 PBS pH7.0에서 차단시켰다. 전이된 마커 단백질을 함유하는 니트로셀룰로오스지를 인디안 잉크로 염색하였다. 블롯을 영계의 면역 또는 정상 혈청(1%(w/v) BSA; PBS; pH7.0; 0.05%(v/v) Tween 20 내의 1:200 희석물)과 실온에서 1시간 반응시켰다. 블롯을 PBS; pH7.0; 0.05% Tween 20으로 매번 5분 동안 5회 세정한 다음, 실온에서 1시간 동안 친화성-정제된 토끼 항-영계 IgG(H + L)-퍼옥시다제 결합체(Zymed Laboratories Inc.: 1%(w/v) BSA; PBS; pH7.0; 0.05% Tween 20 내의 1:200 희석물)와 항온 배양했다. 블롯을 전술한 바와 같이 5회 더 세척하였다. 니트로셀룰로오스를 0.5mg/ml 디아미노-벤지딘; 50mmol/l 트리스-HCl pH7.4; 200mmol/l NaCl 및 0.03%(v/v) H₂O₂ 중에서 반응시켜 퍼옥시다제 결합체의 결합을 검출하였다. PBS pH7.0, 0.05% Tween 20으로 블롯을 세척하여 반응을 중지시켰다.

B. 결과

EtHL6 에 의해 생성된 β -갈락토시다제 융합 단백질의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석은 융합 단백질이 면역 혈청 및 마우스 항- β -갈락토시다제 혈청과 반응함을 확인했다. 에이메리아 DNA 에 의해 암호된 폴리펩타이드의 크기는 35.5kD(두번 판독한 것의 평균값, 데이터 미제시)로 측정되었다.

EtHL6 항원에 상응하는 천연의 단백질은 EtHL6 융합 단백질을 함유하는 폴리아크릴아미드 겔을 마우스나 토끼에게 주사하여 유발되거나 영계의 면역 혈청으로부터 친화성 정제된 항체를 사용하여 확인되었다. 이러한 항체는 이.테넬라의 포자 소체 및 제2세대 분열 소체로부터 분리된 단백질의 웨스턴 블롯상의 110.0 \pm 1.0kD(평균값 \pm S.E.M., n=12)인 폴리펩타이드 이중체와 강하게 반응했다(제4도 단일 화살표). 94.0 \pm 1.0kD(n=5)의 제3포자 소체 폴리펩타이드와의 약한 반응은 제4도에 명백히 나타나 있다(이중 화살표). 유사 폴리펩타이드가 분열 소체에서도 확인되었다.

EtHL6 융합 단백질에 대한 마우스 항 혈청은 또한 이.맥시마와 이.아세르볼리나 포자 소체의 단백질의 웨스턴 블롯상의 소그룹의 폴리펩타이드와 반응했다(제5도). 이들 폴리펩타이드의 분자량은 이.테넬라 단백질의 웨스턴 블롯상의 단백질들과 비슷한 바, 이.맥시마에 대해서는 108 내지 92kD, 이.아세르볼리나에 대해서는 102 내지 94kD의 범위였다.

[실시예 8]

[EtHL6 관련 DNA 서열의 특성규명]

A. 방법

[DNA 분석]

파지 스타크를 제조하고 평판 용균물로부터 DNA를 추출하였다. 프라스미드와 코스미드 DNA를 표준 방법(Maniatis 등, 상기 동서적 참조)을 사용하여 정제했다. 이 DNA를 50 μ g/ml RNase 존재하에 제한 효소로 절단시킨 후, 40mmol/l 트리스-HCl, 20mmol/l 소듐 아세테이트, 0.1mmol/l EDTA(pH8.3) [TAE 완충액]에서 아가로스 겔상에서 DNA를 분리하였다.

[DNA 하이브리드화]

게놈, 파지, 코스미드 및 플라스미드 DNA의 제한 효소 분해물을 1% 아가로즈 겔상에서 분리하고 써던 방법(J. Mol. Biol. 98 : 503-517; 1975)에 따라 25mmol/l 포스페이트 완충액(pH6.5)에서 진스크린(New England Nuclear)에 전이시켰다. 제조원(Amersham)의 지시사항에 따라 닉 트랜슬레이션 키트(nick translation kit)로 ³²P-표지화한 DNA 프로브와의 하이브리드화를 1 x 덴하르트(Denhardt's)용액, 0.1%(w/v) SDS 및 4 x 구연산나트륨 염수(SSC)중에서 16시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 실시하였다. 클로니 하이브

리드화는 그룬스타인 및 호그니스의 방법(P.N.A.S. USA 72:3961-3965; 1975)에 따라 수행하였다.

클론 EtHL6의 DNA 삽입물을 40mmol/l Tris-HCl, 20mmol/l 소듐 아세테이트, 0.1mmol/l EDTA; pH8.3에서 1% 아가로즈겔로부터 전기 용출법(Maniatis 등, 상기 동서적 참조)으로 정제하였다.

듀플 강화 스크린과 후지 RX X-선 필름을 사용하여 -70°C에서 방사선 자동 사진을 촬영하였다.

[이. 테벨라 게놈 DNA의 코스미드 라이브러리의 작제 및 선별]

이. 테벨라 게놈 DNA를 MboI을 이용하여 부분 절단하고, Bam HI으로 절단된 코스미드 pHc79와 결합시키고, Maniatis 등(상기 동서적 참조)에 따라 팩키징시켰다. Nick-해독된 정제된 EtHL6 삽입체로 탐침함으로써 비증폭된 라이브러리로부터 약 500 콜로니를 선별하였다. 코스미드 클론 7.46(이 삽입체를 Etc 100으로 명함-참조. 제7도)을 여러 가지 제한 효소를 절단하였으며, 아가로즈 겔상에서 단편물을 분리하고, 니트로셀룰로오즈상에 써던 블로팅하였으며, 다시 EtHL6 관련 서열을 포함한 제한 효소 단편을 확인하기 위해 탐침하였다.

[λgt 10 중의 이.테벨라 cDNA 라이브러리의 선별]

λgt 10 중의 포자형성된 이.테벨라 낭포체 mRNA의 cDNA 클론을 상기한 바대로 Nick-해독된 정제 EtHL6 삽입체로 탐침함으로써 선별하였다. 21개의 양성 파지가 발견되었다. 그 중 하나(cDNA 10-이 삽입체를 Etc 100으로 명함-참조. 제7도)를 선택하여 더 연구하였다.

[클론의 서열 분석]

EtHL6와 EtHL6 관련 클론(코스미드 Etc 100과 Etc 100)의 삽입체를 서열 분석 이전에 M13mp, pUC13 또는 pAT153 유래의 벡터로 서브 클로닝시켰다. 서열분석 반응은 디데옥시 방법(뱅크어 앤드 베럴, Techniques in the Life Sciences (Biochemistry) 85:Techniques in Nucl. Acids Bioch. 1-34; 1983)에 따라 실시하였다.

B. 결과

EtHL6으로부터 수득한 DNA를 물리적 방법으로 지도화(mapping)한 결과 EcoRI 삽입체의 크기가 약 700bp이며, 하나의 Hind III 부위를 포함하는 것으로 나타났다. 튜클레오티드 서열분석에 의해 삽입체의 정확한 크기가 722bp 인 것으로 입증되었고, 삽입체의 한쪽 말단에 근접한 Hind III의 존재가 확인되었다. 리딩 프레임(reading frame)은 융합 단백질을 생성시키는 λamp3 벡터중에 존재한 EcoRI 클로닝 부위의 공지된 리딩 프레임을 참고로 하여 확인되었다. 확인된 유일한 큰 오픈 리딩 프레임(open reading frame)(ORF)은 β-갈락토시다제 유전자에 대하여 삽입체의 말단 부위에 Hind III 부위가 존재하는 배향이었다. EtHL6 박테리오파지 DNA의 제한 효소 지도화는 상기 배향이 활성 배향임을 입증하였다.

EtHL6 단편이 전체 유전자를 포함하지 않기 때문에, 부분적으로 절단된 이.테벨라 게놈 DNA의 코스미드 라이브러리를 선별하여 재조합 코스미드 7.46을 분리하였다. 이 코스미드의 각종 제한 효소 분해물을 써던 블로팅한 결과 상기 탐침에 하이브리드화된 약 3kb 및 1.3kb의 2개의 Hind III 단편이 나타났다.

또한, 1.3kb Hind III 단편에 대해 3'에 위치하는 1.7kb Hind III 단편이 추가로 확인 되었다. 3kd Hind III(H3), 1.3kb Hind III(H3A), 1.35 EcoRI(E5) 및 1.7kb Hind III(C4) 단편을 pUC13에 서브클로닝 하였고 이들의 뉴클레오티드 서열이 결정되어 2359에서 3080 까지의 EtHL6 단편을 지닌 5,990bp의 인접 게놈 서열을 얻었다. 이 뉴클레오티드 서열을 제6도에 나타낸다.

게놈 서열 분석에 부가하여, λgt 10 라이브러리의 한 cDNA 클론인, EtHL6 삽입체에 하이브리드시켜서 확인한 cDNA 10의 서열을 결정하였다. 삽입체는 3,402bp 길이이고, 게놈 서열상의 688 위치에서부터 4,993 위치까지이며, 게놈 서열에서 확인된 3개의 간섭 비-암호 영역(인트론)이 삽입되어 있다. 게놈 서열에 부합하는 이 cDNA 클론으로부터 수득한 서열 데이터는 제6도에 제시하였다. Etc 100의 3' 말단에 Etc 100의 폴리 A 꼬리를 나타내는 A(17)의 부가 서열이 존재한다.

[EtHL6-관련 서열의 정렬]

제7도는 EtHL6, Etc100, Etc100 및 Et100을 정렬시켜 놓은 것이다.

Etc100 말단의 위치는 예상되는 아미노산 서열과 게놈 인트론과 함께 제6도에 제시하였다. Etc100은 그 길이 전체가 암호되지는 않는 것으로 나타났다. 5' 말단에는 튜클레오티드 9-11에 하나의 종결 코돈(TAG, 제6도의 게놈 서열의 뉴클레오티드 696-698)이 있으며, 튜클레오티드 78-80에 첫 번째 가능한 개시 코돈(ATG, 제6도의 게놈 서열의 뉴클레오티드 765-767)을 가지며 인 프레임 종결 코돈(TAA)이 후속되는 뉴클레오티드 2213(제6도는 게놈 서열의 뉴클레오티드 3804)까지 연속되는 예상 암호 서열이 동일한 판독 프레임으로 직접적으로 뒤따른다. 이 다음에는 3'-말단 앞까지 1,189bp의 비-암호 서열이 위치한다. 상기 오픈 판독 프레임에 의해 예상되는 폴리펩타이드는 712 아미노산 길이이며, 계산된 분자량은 74.8kD 이다. 예상되는 아미노산 서열은 서열 조성의 표와 함께 제8도에 나타내었다. 이 서열을 흡 및 우즈(상기 동 문헌 참조)와 추오 및 파스만(상기 동 문헌 참조)의 연산 방식을 사용하여 가능한 항체 결합 에피토프에 대해 분석하였으며 그 결과 에피토프 영역은 270-300과 495-525였다.

[실시에 9]

[Et100을 형질 발현하는 전염성 상피종 바이러스 재조합체의 작제]

A) 플라스미드 작제

3' 말단의 362 뉴클레오티드를 제외한 모든 Etc100을 포함하는 플라스미드 p1019를 1μg을 제한 효소 BamHI 및 HindIII로 절단했다. Etc100 BamHI/HindIII 단편은 5' 비암호 서열의 업스트림에 pUC13 폴리링커의 BamHI-EcoRI 부분과 예상되는 오픈 판독 프레임을 포함하고 3'비암호 영역내의 HindIII 부위에서

끝난다(제6c도의 위치 4309-4314). 이 제한 효소 절단물을 10유니트의 T4-DNA 폴리머라제 및 10유니트의 이.콜리 DNA 폴리머라제(큰 단편물)로 말단-수복한 후 전염성 상피종 바이러스 재조합 플라스미드내에 존재하는 평활 말단의 삽입부위로 클로닝했다. Etc100 삽입부를 지닌 플라스미드를 함유하는 박테리아 콜로니는 ³²P-표지된 Etc100 으로 탐침함으로써 확인되었고 삽입체의 배향은 미니-프렘된 DNA의 제한 효소 절단으로 결정되었다. 전염성 상피종 바이러스에서 형질 발현을 위해 정확한 배향으로 상기 삽입체를 함유하는 플라스미드를 확인했다. Etc100 으로 예상되는 오픈 판독 프레임내의 단지 한 부위(제6도상의 뉴클레오타이드 788-802)에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 Etc100 서열과 플라스미드 DNA로부터의 전염성 상피종 바이러스 재조합 플라스미드의 연결부를 서열 결정하는 프라이머로서 사용했다. 이 서열 결정으로 Etc100 BamHI/HindIII 단편이 벡터의 전염성 상피종 바이러스 전사 프로모터와 정확한 배향으로 이웃하고 있음을 확인했다.

B) 전염성 상피종 바이러스의 재조합체

플라스미드를 사용하여 전염성 상피종 바이러스인 균주 FP9 로 감염된 CEFS (영계 태내 섬유아세포)를 표준 인산 칼슘법으로 형질 감염시켰다. 재조합 바이러스들을 분리하고 3회 프라크 정제했다. 전염성 상피종 바이러스 E10 이라 명명되는 하나의 재조합 바이러스를 사용하여 연구를 거듭했다. 25cm² 플라스크에 하나의 플라스크로부터 얻은 바이러스를 접종하고 수득한 바이러스를 -20℃에서 분할 저장함으로써 E10의 주보관주를 수득했다. 부보관주는 주보관주 세포당 0.1의 플라크 형성 단위 (p.f.u.)를 20개의 125cm² 플라스크에 접종함으로써 수득했다. 모든 보관주를 표준법을 사용하여 CEFS에 플라크를 형성시킴으로써 역가를 측정했다.

C) 전염성 상피종 바이러스 E10 에 의한 Et100 의 형질 발현

25cm² 또는 125cm² 플라스크에서 CEFS의 계대 생장된 단층을 세포당 0.1 p.f.u. 의 전염성 상피종 바이러스 E10으로 감염시켰다. 감염된 세포를 pH7.0의 인산염 완충식염수내로 긁어냄으로써 감염 후 다양한 시간대에 수거하고 동일 용량의 2 x 렘리 완충액(Laemmli buffer)을 첨가하여 용균시켰다. 용균물(대략 10⁶ 감염 세포의 등가물)을 5분 동안 끓인 후 10% 폴리아크릴아미드 겔상의 로딩하고 100V에서 방해 영동했다. 모 전염성 상피종 바이러스로 감염된 세포로부터 수득한 동량의 용균물을 나란히 로딩했다. 표준법을 사용하여 겔을 니트로셀룰로오스상에 전기 블롯팅시켰고 니트로셀룰로오스막을 이.테빌라에 대한 항혈청으로 탐침했다. E10으로 부터의 용균물 중에서 크기 약 100kD의 폴리펩타이드는 토끼 항-포자소체와 회복기인 영계의 항-혈청에 의해 인지되었다. 이 폴리펩타이드는 모 전염성 상피종 바이러스로 감염된 세포로부터 수득한 용균물 중에서는 발견되지 않았다. 100kD 폴리펩타이드 0.1 p.f.u. 의 감염 다중성으로 감염시킨 후 2일째에 검출되었고 7일까지 지속되었으며, 이 때 상기 단층들이 바이러스 세포 변성 효과에 의해 완전히 파괴되었다. 폴리펩타이드는 환원 및 비환원 겔 둘 다에서 검출되었다.

D) 전염성 상피종 바이러스 E10을 형질 발현하는 Et100을 이용한 백신 접종

1) 3주된 영계(Light Sussex)에게 500μl의 199 조직 배지에 구성된 모 전염성 상피종 바이러스(I군) 또는 재조합 전염성 상피종 바이러스 E10(II군) 3 x 10⁷ p.f.u.를 정맥내 접종했다. 제3군은 199 배지만으로 접종했다(III군). 5주때 모든 영계들에게 2차로 동일한 주사를 놓고 10일 후 모든 영계로부터 채혈을 했다. 포자형성된 낭포체를 분쇄시킨 전염성 상피종 바이러스와 에이메리아 테빌라에 대한 ELISA 역가를 결정했다. 두 바이러스 접종군들중 90% 이상의 영계는 전염성 상피종 바이러스에 대한 항체를 갖고 있었으며 1/64,000 이상의 역가를 보인 반면 대조군의 영계의 역가는 매우 낮았다. 에이메리아 테빌라에 대한 역가는 현저하게 상승하지는 않았지만 1/1000 희석시 광학 밀도 판독값은 E10 군에서 약간 상승했다(하기에 참조)

[표 1]

1/1000 희석율의 항혈청의 ELISA 판독값

군	항-FPV(평균)	항-E.t(평균)
I	0.844	0.126
II	0.855	0.161
III	0.016	0.070

10마리 영계의 각 군으로부터의 항혈청을 모아서, 전기 영동으로 분리시킨, 에이메리아 테빌라 포자 소체 또는 2세대 분열 소체로부터의 단백질의 웨스턴 블롯을 탐침하는데 사용했다. 1/1000 혈청 희석율에서, 재조합 E10을 접종한 영계로부터 수득하여 모은 항혈청은 포자 소체와 분열 소체 둘 다에서 Et100 폴리펩타이드를 식별한 반면 기타 군으로부터의 혈청은 식별하지 못했다.

2) 1주된 영계에게 50 μ l의 199 조직 배지에 구성된 모 전염성 상피종 바이러스 또는 재조합 전염성 상피종 바이러스 E10 의 3 x 10 p.f.u.를 날개-웜의 난자법에 의해 접종했다. 제3군의 영계에게는 199 배지만을 접종했다. 4주 때, 모든 영계에게 2차 접종을 실시했고, 이 때에는 50 μ l의 199 배지의 3 x 10 p.f.u.의 적당한 바이러스를 접종했다. 4주 후부터 모든 영계에게서 매주 간격으로 채혈을 실시했으며, 그 혈청을 이용하여 에이메리아 테넬라 포자 소체 및 2세대 분열 소체로부터 전기 영동으로 분리한 단백질의 웨스턴 블롯을 탐침했다. 4주 때에는 어떤 반응성도 관찰되지 않았으나 1주 후(2차 접종 1주 후)까지 E10을 주입 받은 영계는 포자 소체와 분열 소체로부터의 Et100을 특이적으로 식별했다. 첨부한 도면은 본 발명을 더욱 상세히 설명하고 있다.

제1도는 단일클론성 항체로 탐침된 에이메리아 테넬라 포자 소체 및 2세대 분열 소체의 웨스턴 블롯(blot)으로서,

A. E. TEN 10Y-2 (1레인), E. TEN 11P-2 (2레인)로 탐침된 포자 소체 블롯이며,

B. E. TEN 10Y-2 (1레인), E. TEN 11P-2 (2레인)로 탐침된 분열 소체 블롯이다.

제2도는 고도로 면역된 영계 혈청으로 탐침된 여러 단계의 SDS-PAGE 분리 물질을 웨스턴 블롯한 것으로서, 여러 포자 형성 단계에서 Etp100(화살표)의 형질 발현을 나타내고 있다.

1레인 : 포자형성된 낭포체

2레인 : 스포로시스트

3레인 : 포자 소체

제3도는 E. TEN 11P-2 또는 E. TEN 10Y-2 단일클론성 항체를 사용하여 이. 테넬라 스포로시스트로부터 수득한 Etp100(화살표)의 면역 친화성 정제를 나타내고 있다.

A. 글리신/HCl(pH 2.6)-용출 분획물 및 출발물질의 은-염색시킨 SDS-PAGE로서,

1레인 : E. TEN 10Y-2 컬럼으로부터 용출된 것이고,

2레인 : E. TEN 11P-2 컬럼으로부터 용출된 것이며,

3레인 : 출발물질이다.

B. 토끼의 다클론성 항-포자 소체 혈청으로 탐침된 pH2.6 완충액-용출 분획물 및 출발물질의 웨스턴 블롯으로서,

1레인 : 출발물질이고,

2레인 : E. TEN 11P-2 컬럼으로부터 용출된 것이며,

3레인 : E. TEN 10Y-2 컬럼으로부터 용출된 것이다.

제4도는 EtHL6 항원에 상응하는 천연 단백질을 규명한 것이다.

패널 A. 재조합 박테리오파지 EtHL6(레인 1,5)과 λ amp3(음성반응 대조군; 레인 2,6)에 의해 생성된 플라크로부터의 단백질로 선택된 항체, 면역된 영계 혈청(레인 3,7) 및 정상 영계 혈청(레인 4,8)을 사용하여 이.테넬라 포자 소체(Spz)와 분열 소체(Mz) 단백질로부터의 환원된 단백질의 웨스턴 블롯을 탐침했다.

패널 B. EtHL6 융합 단백질에 대해 유발된 항혈청을 나타낸 것이다.

마우스 항-EtHL6 융합 단백질 (레인 1,7), 토끼 항-EtHL6 융합 단백질(레인 2,8), SDS-PAGE 겔상에서 EtHL6 융합 단백질과 동일한 영역에서 이동하는, λ amp3 용원물에 의해 생성된 단백질에 대하여 유발된 토끼 항혈청(레인 5), 정상 영계 혈청(레인 6) 및 이.테넬라 포자 소체에 대하여 토끼내에 유발된 항혈청(레인 11)을 이. 테넬라 포자 소체(Spz) 및/또는 분열 소체(Mz) 단백질로부터의 환원된 단백질의 웨스턴 블롯을 탐침하는데 사용했다.

단일 화살표()는 110 및 102kD의 폴리펩타이드 이중체의 위치를 나타내며, 이중 화살표 ()는 94kD의 제3의 폴리펩타이드의 위치를 나타낸다(추가 상세한 것은 명세서 참조). 분자량 마커는 미오신(200kD); 포스포릴라제(92kD); 소혈청 알부민(BSA)(67kD); 오브알부민(45kD); 탄산탈수 효소(28kD) 및 미오글로빈(19kD)이다.

제5도는 EtHL6 항원에 상응하는 이중의 천연 폴리펩타이드의 검출을 나타내고 있다.

EtHL6 융합 단백질(레인 1,3 및 5)과 SDS-PAGE 겔상에서 EtHL6 융합 단백질과 동일한 영역으로 이동하는, λ amp3 용원물에 의해 생성된 단백질(음성 반응 대조군, 레인 2,4 및 6)에 대하여 유발되는 마우스 항혈청을 이. 테넬라(레인 1과 2), 이. 맥시마(레인 3과 4) 및 이. 아세르볼리나(레인5,6)의 포자 소체로부터 얻은 환원된 단백질의 웨스턴 블롯과 반응시켰다. 준자량 마커의 위치를 제시하였다.

제6도는 뉴클레오티드 1에서 5990까지인 이. 테넬라 게놈 DNA(Etg100)의 뉴클레오티드 서열을 나타내고 있다. EtHL6로부터의 게놈 삽입체는 뉴클레오티드 2359 내지 3080에 상응한다. 나타난 해독된 아미노산 서열은 Etc100으로부터 예측된 것이다. 3개의 게놈 인트론(intron)은 점선으로 나타냈으며 Etc100의 5'와 3' 말단은 짚은 점으로 나타냈다.

제7도는 EtHL6과 EtHL6-관련 게놈 및 cDNA 서열을 개략적으로 정렬시킨 것이다. 5'와 3' 말단은 짚은 점으로 나타냈으며, 3개의 게놈 인트론은 점선 영역들로 나타내었다.

제8도는 Etp100의 예상되는 아미노산 서열과 그 함량의 통계적 분석을 나타낸 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

a) 모노클로날 항체 Et 11P-2를 포함하는 컬럼 기질에 에이메리아 테넬라(Eimeria tenella)의 추출물을 면역-흡착시키는 단계와, b) 추출물의 미흡착 분획과 흡착 분획을 분리하는 단계와, c) 컬럼 기질에서 흡착 분획을 해리시키는 단계로 구성되는 분리 방법에 의해 수득할 수 있는 에이메리아 테넬라의 면역학적 성질을 갖는 100 ± 10kD 분자량의 단백질, 또는 콕시듐증에 대해 가금류를 면역시킬 수 있는 상기 단백질의 폴리펩타이드 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 제8도에 제시된 아미노산 서열을 특징으로 하는 폴리펩타이드 또는 그것의 단편.

청구항 3

제6도에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 콕시듐증에 대해 가금류를 면역시킬 수 있는 폴리펩타이드를 암호하는 상기 서열의 아서열(subsequence).

청구항 4

제4항에 있어서, 제6도에 제시된 암호 뉴클레오티드 서열을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 5

제4항 또는 제6항의 폴리뉴클레오티드 서열을 형질 발현시킬 수 있는 조절 서열과 관련하여 위치한 상기 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 재조합 벡터.

청구항 6

제7항의 벡터로 형질 감염된 숙주 유기체.

청구항 7

제1항 또는 제3항의 단백질 또는 폴리펩타이드 단편과 면역 반응성이 있는 항체 또는 항혈청.

청구항 8

a) 제10항의 항혈청을 포함하는 컬럼 기질에 에이메리아 종의 추출물을 면역-흡착시키는 단계와, b) 추출물의 미흡착 분획과 흡착 분획을 분리하는 단계와, c) 컬럼 기질에서 흡착 분획을 해리시키는 단계로 구성되는 분리 방법에 의해 수득할 수 있는 에이메리아 종의 면역학적 성질을 갖는 단백질 또는 그것의 폴리펩타이드 단편.

청구항 9

제1항 또는 제3항에 의한 단백질 또는 폴리펩타이드 단편을 포함하는, 에이메리아 감염에 대하여 예방 활성을 갖는 백신.

청구항 10

제1항 또는 제3항에 있어서, 아미노산 서열 I SPQKPGSPPCPTCEAPRGR SCAEQPGLTR 또는 PVDEVVGDWEDWGQCSEQCQGGKRTNRGPS를 갖는 폴리펩타이드.

청구항 11

제4항 또는 제6항에 의한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 에이메리아 감염에 대하여 예방 활성을 갖는 백신.

청구항 12

제7항의 재조합 벡터를 포함하는, 에이메리아 감염에 대하여 예방 활성을 갖는 백신.

청구항 13

제8항의 숙주 유기체를 포함하는, 에이메리아 감염에 대하여 예방 활성을 갖는 백신.

청구항 14

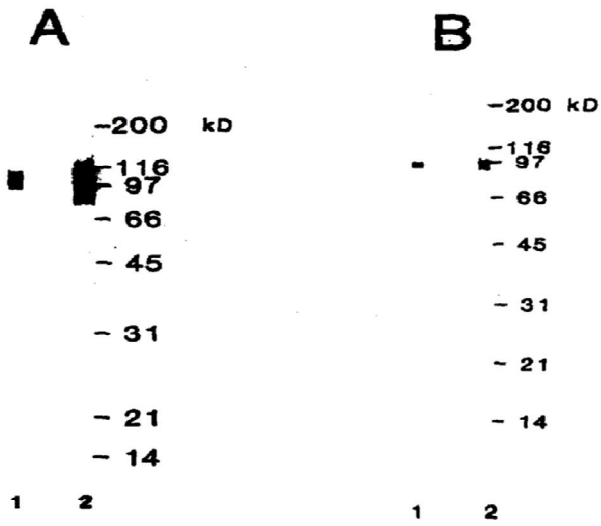
제10항의 항체를 포함하는, 에이메리아 감염에 대하여 예방 활성을 갖는 백신.

청구항 15

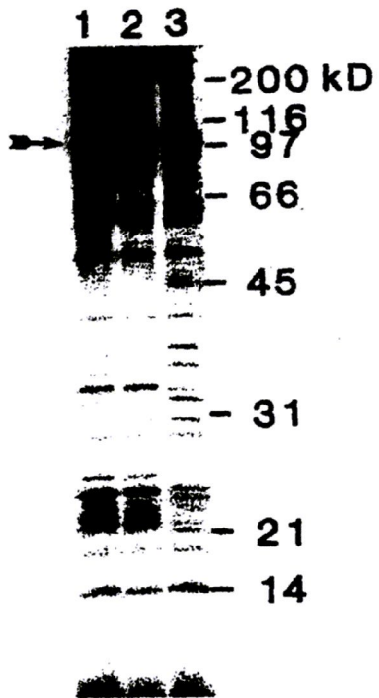
제11항에 의한 단백질 또는 그것의 폴리펩타이드 단편을 포함하는, 에이메리아 감염에 대하여 예방 활성을 갖는 백신.

도면

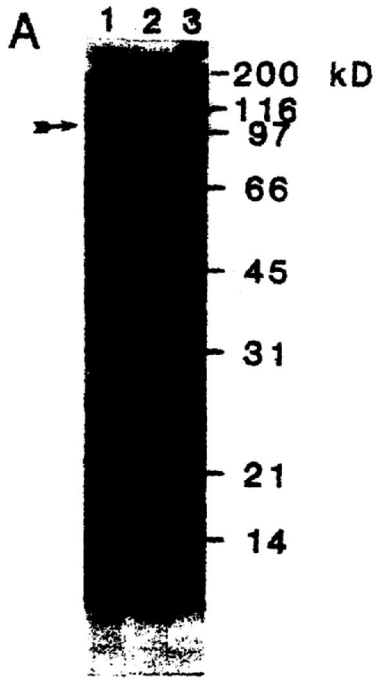
도면1



도면2



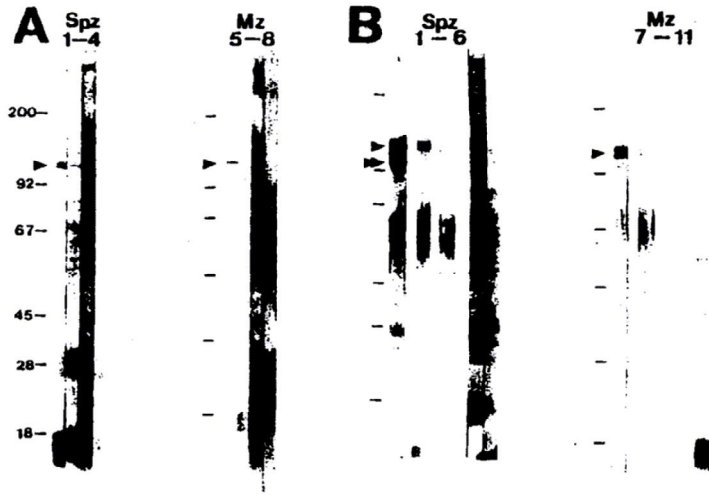
도면3a



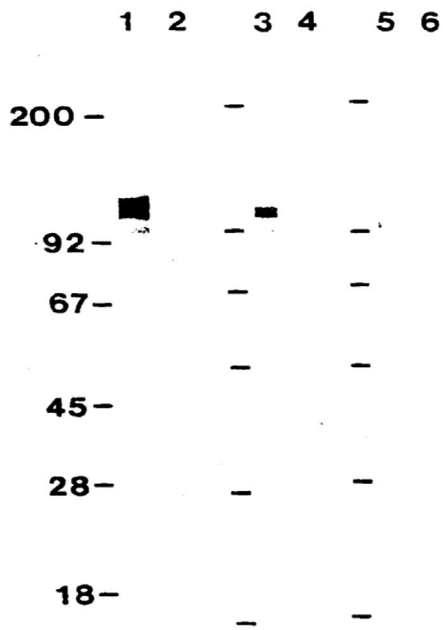
도면3b



도면4



도면5



도면6a

```

1  AAGCTTANGCAGACTACAGTGAAGCCGTATACACATGATGACTTTGCGGAGGCTTG
61  CTAAACAAAGAGTTGCGTGTGATTCATCATATACAGCTCATACDAGCGTCCA
121  GATATGAAACATTCGGCACTCAACTTACAAACAACTTTTGAAGCATTTGGAAACAGA
181  ACTAATTTGGCTCTCGAAGGATCTGAATGCGAAGCAACATACATATTTCTGTGTGGAA
241  TGGACATATGACACAGCGCAGAGACCGCTCACTTTAAAGCATTTGATGGAAACTTTGC
301  TTTTCCATGCTAATGGCAAAAGCAAGTTGGATTAAGCTTCTCAATCTAGCTAGCG
361  ATATTTCTACACTATGAGAGCCGATACGCTGTGTGAGGCGGAGGAGCTCTCACTGGT
421  GCTTCAGCTGAAAAATATATGACATGGCTTGGCGGGGAGTGGAGGGTGTCTGTAT
481  GCTGTGTGATTAAGCCACAGGAATGCTTAAATGAGGCTGAGGAAGCAATDCAAT
541  ATGCTGATTTGCTGACTTGCAGATGCGGGGACTAGCCAGCTCATTTGCGGGGAG
601  CGCGGATAGCCATGACAGGACCTTTGGCGAGCATGCACTTCAATGCTTCCACAGTA
661  GAATTCGGTTAGGTTTCAAAACATATTTTGTGTAGGTCATTTTCTAATCTCTATT
721  CTTCATCTTTTACCCAGTTGCGCTTTCATGATCATTTCCGCAATGGCGCCCTCTCTC
M A P L P
R R R L A P C R A L S L L V G L L A A S
781  GCGGAGGCTAGCGCCCTGACGGCAATATCATTTGCTGTGTCTCTGCGCCAGTT
F A F S S L Q P (
841  TTGCTTTTCTTCTTACAGCCAGTTGCTCATTCATGGTTATATGGCAATGGCTCGG
-----
901  TTGCAAGTTTGTGGCATTTGCTCTATTCGCACTGAGAGTGGTTCTGGCCATGGCGAC
-----
961  AGTGGTTTGGCCCTGCTTCTGATCATGCTGCTCAGAGACTCTTAGCATTTGCAAG
-----
1021  ATAGGGTCAATGTTAGTTCAGCAGTGTACCTGGGTGTTTTAAATTTGGTAAAGGGTCCAG
-----
1081  AGGTTTGGCTTCATTTGGCCAGCATGGGTTGGCTCGGGTCTCTGGTAAAGGTAGG
(INTRON 1)
1141  CAGCTTGTCTCTTGTGGCTTTGCTTGGGTGAGAGTTCGATTAGCGGAAATTTTGC
-----
1201  CGCGCAGGCTTGAAGGCAATTAAGCTTGGGTGATGTAGGCTCTTGAAGTGAATTT
-----
1261  GCGCTTGTGTGTTTGGTTGGCTAGGTTGGTGTACAGTGTCACTTGGCGTTCATTTGCTG
-----
1321  GCTTCTTATGTAAGCGGTTGACTTAGCAGGCTTCAATGGCACTTGGGATTTGTAT
---]G A T T S S G Q D Q V C T S L L D V M
1381  TONGGCGCACTAGCAGCTTGGCGGATCAGGTGTGACAGGCTCTTGGATGCTCATG
L V V D E S G S I G T S N F R K V R Q F
1441  TTGTAGTGTAGTGGCTCCATTTGGCACTGCACTTCCAGAGGTTGGCGAGTTC
I E D F V N S M P I S P E D V R V G L L
1501  ATGGAGACTTGGTAATTCATGGGATTTCTCCAGAGGAGTTCGTGTGGGTTATTC

```

도면6b

```

T F A T R S K V R W N L S D P K A T N P
1561  ACTTTGCAAGCCCTTCCAAAGTTGGTGCAGACTGAGTGTGCGAGGCTACAAAATGCT
S L A I S A A R S L S Y S T G V T Y T H
1621  TCCTTGGCTATATCAGCAGCTAGATCTTAAGCTATTTCAACAGGGCTCAGCTACAGCCAT
Y G L Q D A K K L L Y D T N A C A R N N
1681  TAGGTTCTTCAAGATGGAGAGGCTGCTTCCAGCAACCAATCTGAGGCTAGAAATDAG
V P K L V L V M T D G A S N L P S Q T R
1741  GTAGCCAAAGTTGCTTTTGTGTCAGCTGAGCGGCAAGCAATCTCCGCTCTCAAAGGAGA
S S A A A L R D A G A I V V V L G V G S
1801  TCTTCTGCTGAGGCTTGGTGTGACAGGAGCAATGAGTGTGCTTGGAGTGGCTCA
G V N S S E C R S I A G C S T S N C P R
1861  GGAGTCAATTCAGTGTGAGGAGTATTTGCTGGCTTCTGACTTCAAATTTGGCGAGG
Y L Q S N W S N V T Q Q V N G I K A A
1921  TACTTCCAGTCAAACTGTTCAAGGCTCAGCGAGGCTCAATGGTATCTCAAGGCTGCA
C K D L A K D A V C S E W S E Y G P C V
1981  TCCAAAGATCTGGCAAGGATGGGTTGTGTCGGAATGGAGGCAATGAGGCTTGTGTG
G E C G K E G V Q T S T R V E I S P Q X
2041  GGGGAATGTGGCAAGAGGCTTCCAGCAGGCACTGAGTCCAGATATCTCCCGAGAG
P G S P P C P T C E A P R G R S C A E O
2101  CGGGGTCAGCTCTTGGCGGACATGTGAGGCAAGGAGGGGAGGTTCTGTGGCGAGCG
P P G L T R T Q P C T N P V C K T D A H
2161  CCTCCCGACTTACTGGAGCGGCGCTGCAAGATGCGAAATGGATGCTCAT
C G E F G A W S E W S T T C G T A T R K
2221  TCGGGGAGTTTGGGCAATGCTTCAAGTGGAGCACTAGTGGCGAAGCGGAGGAGAA
R Q R E G Y N S P P A A G G G L S C M E
2281  AGGCAAGGAGGCTACAGCAGTCCAGCTCCAGCGGCTGTTGGCTTTCTTGCATGAA
Q N P P K H E F E V E T V Q K S P C P V
2341  CAAAATCGGCAAGTGAATTCAGGTTGAAAGGCTTCAAAAATCGGCTTGGCAGTT
Q Q Q P G P W S E W T E C S A T C G G G
2401  CAGCAAGCCGAGCGCTGACTGAAATGGAGGAGTCTCAGCAAGCTTGGAGGAGGT
T K H R E R E G L P Q E G E L Y G G Q T
2461  ACTTAGCATTCGGAGGAGGAGGTTTGGCAGAGGAGGCGACTTGGCGGGGACAGACT
L E Q Q G I A V R E T A S C S E N P C P
2521  TTGGACAGAGGAGCTTGGTGTGAGGCAACTGCTTGTGCAAGCGCAAGCGGTTGGCT
I D A T C G E W T E Y S A C S R T C G G
2581  ATGAGCGAAGTTGGGAAATGGAGGATGAGTGGCTTCCAGCACTTGGGAGGCT
G T Q E R K R E P W L D N A Q H G G R T
2641  GTTGGCAGAGGAGGAGGAGGAGGCTTGGTGTGATATGCGCAAGCGGGGCGGCGCC
C M E Q Y P D G P I S V R E C N T Q P C
2701  TGCATGAAAGGATCTGATGGGCAATATGCTGGGAGTGCAGCAAGCGAGCGGCTG
P V D E V V G D W E D W G Q C S E Q C G
2761  CCTTGTGGAGAGTGTGCTGATTTGGAGAGCTGGGGCAATGGAGCGAAGCTTGGT
G G K R T R N R G P S E Q E A M F G G K
2821  GGGCGAGGCGACTGTGATCGGGGCAAGCAAGCAAGGCGCATTTGGAGGCGAG

```


도면6c

T V A Q Q N A E L P E G E K I E V V Q E
 2881 ACAGTTGCTCACACAGAGCGGAGCTCCCTCGAGGGAGAGATTGAGGTGGTTACGGAA
 E G C N E V P C [-----
 2941 GAAGGATCGAATGAGTTCCATGCGGTGAGCTAGTGTACTTTCGAAAGCGAAGAACTGTG

 3001 GACTGGGTGTGTAGCCCTGTACAGACTTTCGATCGAATATACCTGTTTCGCGCTTGT
 ----- (INTRON 2)
 3061 CCGCTAGTCTGTGGGAATTCGACAGCTTAGTAGGGCTTCTCTGCTACCTTCAGACTTT

 3121 AGGGGAAAGTGTATATTAAGGCGGTATAGCTCAGCGGGGCAATTTGTTCGGGTT
 ----- [G P C T L P F S E N T E C E S G S
 3181 TTCGGCCACAGGACTTGCAGCTCCCTTCAGTATGAGGGGAATGCGATGTGTCT

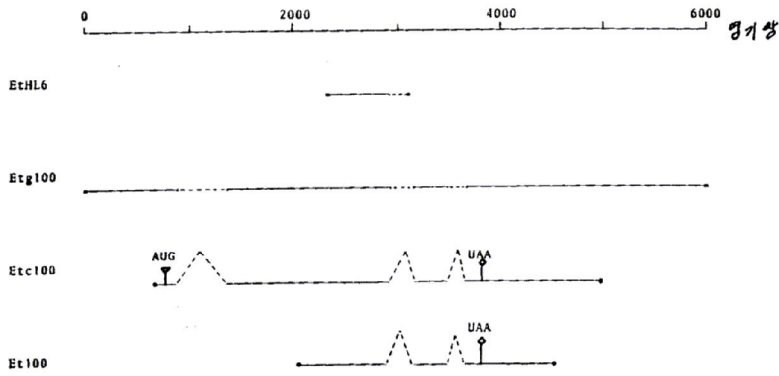
 3241 G H R T R E S A V A F D Y T D R N C S G
 CCGGCAATGAAACCGGAAATCCGAGGTAGCATTTGATTAACCTGACAGAAATGTCCAGTG
 D T H E V Q S C E E Y C S Q N A G G G A
 3301 GTGACACACAGAGGTACAAAGCTGTGGGAATACTGTTCGCAAAAATGCTGGAGGGGTG
 G G D G G A G G G T G G S G E E E G K E
 3361 CTGAGGGATGCGGGCCAGAGGAGGACTGGAGCTCTCGAGGGGAGCGAAGG
 E S S G F P T A A V A G G V A G G V L A
 3421 AGAATGAGTGGATTTCCACTCCAGCTGTGGCGGTGGGTGGCTGGGGGATCCTCCB
 I A A G A C A F Y G L [-----
 3481 CCTTCTCGGGGCTGGAGGTTTTATGCAATTTGTAAGTTTTTTTAAAGCGAGCTGGCC
 ----- (INTRON 3)
 3541 TCTTAGGGTTAAGACTGTTTTCGTGTGATCCTCTTGTGGCTTCTGCTAGCTTCT

 3601 CAGCTGATCGAATGTAGGAGGCTGATGAGTGTGGCGTCAAAATATCTGTGTGTG
 -----] S G G S A A A A T E A G R E V H
 3661 TCTGTACAGAGTGTGTGGAGCGGCTGCTCCCACTGAGCGGCTGCTGAGTGTGTG
 T E A G T S N A A E V E K E S L I S A G
 3721 ACAGAGCTGTTACATCCATGCTGCTGAGGTAGAAAGGAGAGCTCATCAGTCCAGT
 E Q S E H W A S *
 3781 GAACTATGAGATGCTGGGCTCCAAATGGAAAGCTCCCGCGCGGGTTTGAAGG
 3841 TGGGATCTGTGATCTGTGAGGAATTAATTAACATCCAGCTCTTGCCTCCCG
 3901 TGGCAATCAATTAAGCAAGCTCTCGGGCAGGCTTCTTGAACAGACAGCGAATG
 3961 TCCACTGGGAGAGCTATATTTCCAGTGTGTGTTCAAACAGAGAGCCACCGG
 4021 TCAATGTATGTAGGTTGGGGGCTCTTCCCTATTTATCCATTTCTCCGGCTT
 4081 CATCTTCCGCTTCTCTGTGTGGCGGATTTGGGTGTATGTGCTGGCGKAT
 4141 GAAAGAGATGGGTTATTTCCAGGCTGCCAGGCAATGATAGGTTGGATACACTC
 4201 ATTTGTAGAGGCAAGCCAGCGGGCAGCTTACCTCTGTGTGTCAATGGGCACTG
 4261 GTCTGTCAATGTTGTCTCTTTCAGGGGGGGTATGGCCAGAGAGCTTCCGCA
 4321 TCCACACACATCGAAGCAAAATAGGGAGCTTCTCTCAAAATTTGGTAGGCT

도면6d

4381 GATTGTAGTAGGCTCCCTTTCGAGATGAAATGACCGGGAGCACCTGAATGAACTGA
 4441 CTCTCAAGGAGGGATTCAGAAATAGGCTACACCTTCTCACTTTTTCAGGTCCAGC
 4501 TAAAGGAGACTTTTCTTAGTAAAGGATAGGCAATGGGAGCAAGGAACAGTGTTCGTG
 4561 TTGCATTTGAGCGGGGAGGTGTGGGTCTCAGAAATAGTCTGGAGTGGGAGAGCAT
 4621 TAAGGAGCCAGAGGCTTTTATGCTGGGTAGAAATCAATGTTTCTGGCATGTATCTT
 4681 CGTGGACTTTTGTCTGTATATCTACTTAAAGTGAAGTGAATGGTGGAGGCATTA
 4741 AAGTAATTTGCTTTCCGCTGAGGCAAAATTTTCTGCTCTGAGGGGTGTGAGCTCTC
 4801 TTTTTCGGCTCGTGGGCTGAGGACTGGAAATTAAGGAAACAAAGAGTGGATCAATCCA
 4861 AAACAGTGGACTGCGCCACTTGGCGAGCAGGAGGGCTTAAAGCATGAAGTCTCTCTG
 4921 TCTTTGAGAGGCTAGGTTGGGTTTTTCTTCAACTCACCAATAGCTTCTCTAAATTT
 4981 CGTGGAAATAGGGCATTTGTGGAACGTAATCGAGAGGCGAGTGAAGATATAGGCTGA
 5041 TGCAGGATGGCGAAGAGTTGCTTAATCCAGCAGACTGCTCAGTCCAGGTTCCGTGA
 5101 GTAAAGGCGAGGCTCTGTGAGTAAAGGTCAGTTTATCTTCCAGAGATGGCTGGAGC
 5161 GAACAGGCAAAATGTTGTGAGCAGGAACGGATGCCACTCTCTCCGCGAGGTACTTT
 5221 CCGTGTGGGTGAAGCATAGAAACAATGGGAGGGGCTTGTACAATTTTGGATGAGAA
 5281 GGTGACTCTTTCCGCGAGCTTACTTAGTGTGGGGAAATTCGAGGAGTCCAACTAG
 5341 AGGTCCGTCAGGTTTGTGTAGAGTTCCCGAGATCAAGACAGAAATCTCTCCGAGG
 5401 TGGCTATCCAGCAGAGTAACATCTCTGCTTTGTGTAGAAATTCGAGCAGAGGTTCA
 5461 GGGTGGGTCTGATTAAGCCACAAATAGAGGCTCCGAGGGGGCACTCTTTTCCATCT
 5521 TCCAGTTGAAACTGTACTCTGCTTGGCTGGCGAGGGGGCAATGCTTATTAATTAAG
 5581 ATGAGGAGACTGTGAGCATTAATAAAAGCGGGTAAAGGAGGAGGCGCAAGCACT
 5641 CTCCGAGCCCGGAGGGCAGGCCAGACTACTGTGTCCCGCCAGAAATTTCTGCAATTTGT
 5701 GCTTACTGTGAAAGTGTGTGGATTCGAGTTTCTTCCACAGGCTTGCATCTCAC
 5761 TGTCCAGCTCCAGGAGCAACAGTGGCTGGCTGGTGGGTGGCTTTTTCAGTCCAA
 5821 ATCCGAGATGATGTACTCTAAACTCDAATTTCCCGCAATTCGCAATGAAATGACC
 5881 CDAAAATTTAGTGTGCTTGGGAAAGAAATGGCTAGGAGGGAGCGCCATGGCTCCA
 5941 ATCTCGGTGAGCACTGTAGGAGGTCCCGGTTGGGGGGCCAAAGCTT

도면7



도면8

```

10      20      30      40      50      60
MAPLPRRLA PCRALSLLVG LLAASFAPSS LQPGATTSSG QDQVCTSLLO VMLVVDSEGS
70      80      90     100     110     120
IGTSNFRKVR QFIEDFVNSM PISPEQVRVG LITFATRSKV RNWLSQPKAT NPSLAISAAR
130     140     150     160     170     180
SLSYSTGVTV THYGLQDARK LLYDTNAGAR NNVPKLVLM TDGASNLFSQ TRSSAAALRD
190     200     210     220     230     240
AGAIVVVLGV GSGVNSSECR SIAGCSTSNK PRYLQSNWNS VTQQVNGIHK AACKDLAKDA
250     260     270     280     290     300
VCSEWSEYGP CVGECGKRGV QTSTRVEISP QKPGSEPCPT CEAPRGRSCA EQPPGLTRTQ
310     320     330     340     350     360
PCTMPVCKTD AHCGEFGAWS EMSTTCGTAT RKRQREGINS PFANGGGLSC HEONPPKHEF
370     380     390     400     410     420
EVETVQKSPC PVOQQPGPMS EMTECSATCG GGTKHRESREG LPQEGELYGG QTLEQQGIIV
430     440     450     460     470     480
RETASCSENP CPIDATCGEW TEYSACSRTC GGGTQERKRE PHLDNAHQHG RTCMEQYPDG
490     500     510     520     530     540
FISVRECNTP PCFVQEVVGD WEDWGCSEQ CGGKRRTRNR GPSKQEAHFG GKTYAQQAAB
550     560     570     580     590     600
LPEGEKIEVV QEEGCNEVPC GPCTLPFSEW TECECSGHR TRESAVAFDY TDRMCSGDTH
610     620     630     640     650     660
EVQSCIEYCS ONAGGGAGGD GGAGGGTGGG GEEEGKEESS GFPTAAVAGG VAGGYLAIAA
670     680     690     700     710     720
GAGAFYGLSG GSAAAATEAG AEVWTEAGTS NAAEVEKESL ISAGEQSEHW AS
    
```

아미노산 함량의 통계적 분석

A	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	B	Z	H
N	38.	68.	50.	44.	67.	86.	23.	23.	64.	36.	0.	0.	7.
%	5.3	9.6	7.0	6.2	9.4	12.1	3.2	3.2	9.0	5.1	0.0	0.0	1.0
#	3919.	5921.	5055.	4273.	4762.	4907.	624.	2647.	8263.	4613.	0.	0.	960.
A	R	K	N	I	L	V	F	Y	W	-	X	?	
N	36.	23.	11.	16.	36.	45.	13.	13.	13.	0.	0.	0.	0.
%	5.1	3.2	1.5	2.2	5.1	6.3	1.8	1.8	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0
#	5623.	2948.	1443.	1811.	4074.	4461.	1913.	2121.	2421.	0.	0.	0.	0.

총분자량 = 74778.