



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년03월23일
(11) 등록번호 10-0948767
(24) 등록일자 2010년03월12일

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0112354

(22) 출원일자 2008년11월12일

심사청구일자 2009년08월20일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020070048660 A*

WO02101011 A2

KR100886312 B1

KR1020090052521 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국기초과학지원연구원

대전광역시 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자

이지원

대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 106동 701호

김수현

대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 119동 206호

(74) 대리인

이희숙

전체 청구항 수 : 총 19 항

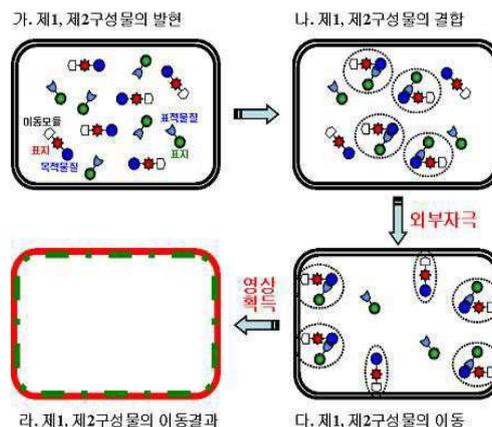
심사관 : 안규정

(54) 생체 고분자 물질의 상호작용 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 새로운 생체 고분자 물질의 상호작용 검출 방법에 관한 것으로서 보다 상세하게는 (a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(pre) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계; 및 (b) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계를 포함하는 목적물질(bait)과 표적물질(pre)의 상호작용을 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 세포내에서 일어나는 물질결합(binding) 및 상호작용(interaction)을 살아있는 세포에서 실시간으로 검출할 수 있는 방법 및 이를 이용한 물질결합 및 상호작용을 변화시키는 물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 기존의 생체물질 상호작용 탐색 방법들이 가지는 부정확성 및 복잡성 등의 단점을 극복하였고, 구성물 모두에 표지를 함으로써 정확도를 더욱 높일 수 있어 종래의 분석기술과 차별화되는 새로운 실시간 무항체 분석 방법을 제공하는 효과가 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 N28048, T28042

부처명 교육과학기술부

연구사업명 자체연구사업, 대형 연구장비를 이용한 막단백질 분석기술 개발사업

연구과제명 세포내 단백질 상호작용 분석용 세포침 개발, 막단백질 in vitro 활성평가기술 개발

주관기관 한국기초과학지원연구원

연구기간 2006년 01월 01일 ~ 2008년 12월 31일, 2007년 01월 01일 ~ 2011년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 목적물질(bait)과 표적물질(preyl)의 상호작용을 검출하는 방법;

(a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(preyl) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계; 및

(b) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기 단계를 포함하는 목적물질(bait)과 표적물질(preyl)의 상호작용을 검출하는 방법;

(a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(preyl) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계;

(b) 신호물질을 처리하는 단계; 및

(c) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 단백질 인산화효소 C 및 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체는 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1표지물질은 GFP(Green Fluorescent Protein), EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein), RFP(Red Fluorescent Protein), mRFP(Monomeric Red Fluorescent Protein), DsRed(Discosoma sp. red fluorescent protein), CFP(Cyan Fluorescent Protein), CGFP(Cyan Green Fluorescent Protein), YFP(Yellow Fluorescent Protein), AzG(Azami Green), HcR(HcRed, Heteractis crista red fluorescent protein) 및 BFP(Blue Fluorescent Protein)로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2표지물질은 GFP(Green Fluorescent Protein), EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein), RFP(Red Fluorescent Protein), mRFP(Monomeric Red Fluorescent Protein), DsRed(Discosoma sp. red fluorescent protein), CFP(Cyan Fluorescent Protein), CGFP(Cyan Green Fluorescent Protein), YFP(Yellow Fluorescent Protein), AzG(Azami Green), HcR(HcRed, Heteractis crista red fluorescent protein) 및 BFP(Blue Fluorescent Protein)로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1구성물은 NLS(nuclear localization signal) 서열 또는 NES(nuclear export signal) 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 NLS 서열은 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 NES 서열은 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2구성물은 NLS(nuclear localization signal) 서열 또는 NES(nuclear export signal) 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

하기 단계를 포함하는 목적물질(bait)과 표적물질(preys)의 상호작용을 검출하는 방법;

(a) (i) 목적물질(bait), EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein) 또는 mRFP(Monomeric Red Fluorescent Protein)인 제1표지물질 및 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(preys) 및 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein), mRFP(Monomeric Red Fluorescent Protein), AzG(Azami Green) 및 HcR(HcRed, Heteractis crispa red fluorescent protein)로 이루어진 군에서 선택된 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계;

(b) 신호물질을 처리하는 단계; 및

(c) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 신호물질의 처리는 PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate, Phorbol ester)를 50nM 내지 5µM의 농도로 처리하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

하기 단계를 포함하는 목적물질과 표적물질간의 상호작용을 변화시키는 물질을 스크리닝하는 방법.

(a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(preys) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계;

(b) 시험물질을 처리하는 단계; 및

(c) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 상호작용의 변화는 상호작용의 저해 또는 증진인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 신호물질을 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

(i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(preys) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물을 포함하는 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 세포는 (i)프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 (ii) 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 표적물질(preys) 및 제2표지물질을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환된 것임을 특징으로 하는 세포.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 세포는 (i) 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 목적물질(bait), EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein) 또는 mRFP(Monomeric Red Fluorescent Protein)인 제1표지물질 및 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 이동모듈을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 (ii) 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 표적물질(pre) 및 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein), mRFP(Monomeric Red Fluorescent Protein), AzG(Azami Green) 및 HcR(HcRed, Heteractis crispa red fluorescent protein)로 이루어진 군에서 선택된 제2표지물질을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 공동 형질전환된 것임을 특징으로 하는 세포.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 CHO-k1 세포, HEK293 세포, HeLa 세포, SH-SY5Y 세포, Swiss 3T3 세포, 3T3-L1 세포, NIH/3T3 세포, L-929 세포, Rat2 세포, RBL-2H3 세포 및 MDCK 세포로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 세포.

청구항 20

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항의 세포를 포함하는 목적물질과 표적물질의 상호작용 검출용 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 새로운 생체 고분자 물질의 상호작용 검출 방법에 관한 것으로서 보다 상세하게는 (a) (i) 목적물질 (bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(pre) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계; 및 (b) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계를 포함하는 목적물질(bait) 과 표적물질(pre)의 상호작용을 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포들의 성장, 분화, 이동, 죽음 등은 단백질-단백질, 단백질-핵산 등의 고분자 물질들간의 상호작용 (interaction)에 의해 이루어진다. 세포 외부의 신호는 세포막의 수용체를 통과하여 세포질내에서 여러 생화학적 반응을 통해 세포의 핵 내로 전달되며, 거기서 특정 유전자들을 발현시킨다. 이러한 외부 신호의 세포내 전달과정은 여러 단계의 단백질간 상호작용에 의해 이루어진다. 예로써 성장조절인자(growth factor)나 사이토카인(cytokine) 등은 세포 표면의 해당 수용체(receptor)에 결합하고 이러한 결합은 수용체가 서로 뭉치도록 (clustering) 유도한다. 이러한 수용체의 리간드에 의한 뭉침은 그 수용체의 세포질내 도메인끼리도 서로 뭉치도록 유도함으로써 세포내 신호전달과정에 관계된 여러 단백질들과의 상호작용을 유발한다. 이 신호전달체계는 단백질 키나제에 의한 단백질의 인산화, 단백질 포스파타제에 의한 탈인산화등을 통해 여러 단계의 신호를 전달할 수 있는 중간체 단백질을 만들면서, 결국 그의 신호를 전사촉진 단백질(transcriptional activator)에 전달한다(Helden, C. H., Cell 80, 213-223(1995)). 활성화된 전사촉진 단백질은 DNA에 결합하고, mRNA 를 합성하는 RNA 중합효소 등 기본적인 전사 조절 단백질들(basal transcriptional apparatus)과 상호작용하여 특정 유전자들을 활성화시킨다. 따라서 이러한 상호작용은 특정 조직, 발생학적 과정 및 외부자극 등에 반응하여 특이적으로 전사가 일어나도록 조절하는 것이다. 이때 외부물질의 침입 또는 내부 활성 단백질의 유전적 변이 등에 의해 특정 단백질간의 상호작용이 변경, 억제, 촉진 등 비정상적으로 일어나게 된 것이 병(disorder)의 원인이라고 할 수 있다. 따라서 이러한 상호작용을 조절할 수 있는 물질은 곧 그에 기인된 병에 대한 치료의 방법을 제공할 수 있으므로 이에 관한 연구가 계속되어 왔다.

[0003] 현재까지 알려진 생체고분자 물질들 간의 상호작용, 특히 결합특성을 분석하기 위한 방법으로 교차결합 (cross-linking), 친화크로마토그래피 (affinity chromatography), 면역침강법 (immunoprecipitation, IP) 등의 전통적인 in vitro 방법들이 사용되고 있으나 이들 방법들은 단백질의 생산과 분리/정제 과정이 요구되며 시험관내의 완충액의 조건과 추출된 단백질의 2차적인 변형 등의 문제점이 있어 생체내에서 일어나는 실제 상호작용과

상이한 정보를 제공할 수 있다는 단점을 가지고 있다.

- [0004] 이러한 in vitro 방법들의 단점을 보완하기 위해 세포내에서 직접 수행하는 이스트 투 하이브리드 (yeast two-hybrid, Y2H), 형광공명에너지전이 (fluorescence resonance energy transfer, FRET), 분할 단백질의 재결합 (bimolecular fluorescence complementation, Bi-FC) 방법들이 개발되어 사용되고 있으나 이들 방법들은 각각 다음과 같은 장점과 단점들을 가지고 있다.
- [0005] Y2H 방법의 경우 면역침강법과 함께 현재 가장 널리 사용되고 있는 방법으로 유전자 라이브러리를 사용하여 대량의 스크리닝을 수행할 수 있다는 장점이 있으나 막단백질이나 전사효소 등과 같은 핵단백질의 탐색이 어렵고 위양성 (false positive)이 높다는 단점을 가지고 있다. 아울러, 이 방법은 단백질간의 상호작용을 조절할 수 있는 물질을 찾는 데에는 사용하는 데에는 적당하지 못한 단점이 있다. 이는 Y2H 방법이 두 단백질간 상호작용이 있으면 리포터유전자로부터 β-갈락토시다제가 발현되어 배지상의 X-gal 화합물을 분해하여 콜로니가 푸른색으로 변하게 되는 방법을 이용하는 데, 후보물질에 의해 푸른색에서 다시 흰색으로 바뀌게 되는 선별방법 자체는 음성선별(negative screening)이기 때문에 실제로 저해 효과가 있는 물질을 간과할 수 있으며, 또한 판단 자체에 모호성이 있다는 단점이 있어 일반적인 약물선별에는 바람직하지 않다.
- [0006] FRET 방법의 경우 정확도는 높으나 형광공명에너지가 전이되기 위한 형광단백질 또는 형광물질의 위치를 결정하기 어려워 실험 성공률이 매우 낮다는 단점이 있고, 분할 단백질의 재결합 방법의 경우 막단백질과 핵단백질 등의 탐색에 사용할 수 있다는 장점이 있으나 FRET 방법과 마찬가지로 상보결합이 일어나기 위한 단백질의 상대적인 위치를 결정하기 어려워 성공률이 낮다는 단점을 가지고 있다.
- [0007] 따라서 상기한 방법들의 단점을 극복하기 위해 상기 방법들 외에 여러 가지 변형된 방법들이 제안되었으나 지금까지 효율적인 생체물질 결합 탐색 방법에 대한 요구가 지속되고 있으며, 특히 목적 단백질과 상호작용을 하는 단백질을 검색할 수 있을 뿐 아니라 선행 방법들보다 더욱 효율적으로 두 단백질간 상호작용을 저해하거나 증진시켜주는 등의 조절물질을 찾을 수 있는 탐색 시스템에 대한 요구가 절실하게 요청되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0008] 이에 본 발명자들은 세포내에서 일어나는 물질결합(binding) 및 상호작용(interaction)을 살아있는 세포에서 실시간으로 검출할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 연구를 거듭한 결과, 외부 신호 또는 내재적으로 세포 내 특정영역으로 이동하는 이동모듈 및 상호작용의 하나의 대상이 되는 목적물질을 가지는 제1구성물 및 상호작용의 다른 대상이 되는 표적물질을 가지는 제2구성물을 이용하되, 상기 제1구성물 및 제2구성물 모두 표지물질을 부착하여 이들의 세포 내 위치를 추적하는 경우 목적물질과 표적물질의 상호작용을 살아있는 세포에서 실시간으로 검출할 수 있음을 알아내어 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 서로 상호작용하는 목적물질과 표적물질을 검출할 수 있는 새로운 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0011] (a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(pre) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계; 및
- [0012] (b) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계를 포함하는 목적물질(bait)과 표적물질(pre)의 상호작용을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0014] (a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(pre) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계;
- [0015] (b) 신호물질을 처리하는 단계; 및

- [0016] (c) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계를 포함하는 목적물질과 표적물질간의 상호작용을 변화시키는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(pre) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물을 포함하는 세포를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 세포를 포함하는 목적물질과 표적물질의 상호작용 검출용 키트를 제공한다.
- [0019] 이하 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명하기로 한다.
- [0020] 본 발명은 세포 내에서 일어나는 생체물질간의 상호작용을 직접적으로, 그리고 실시간으로 분석할 수 있도록 하기 위하여, 외부자극 또는 내재적인 신호전달기작에 의해 발생하는 단백질의 세포내 위치이동을 이용하였다. 즉, 외부자극 또는 내재적인 신호전달기작에 의해 위치가 이동되는 이동모듈에 상호작용의 하나의 대상이 되는 목적물질을 융합하고, 이를 추적할 수 있도록 표지물질을 포함하는 제1구성물을 디자인하였다. 아울러, 목적물질과 상호작용하는 표적물질 및 이를 추적할 수 있도록 또다른 표지물질을 포함하는 제2구성물을 디자인하였으며, 상기 제1구성물 및 제2구성물이 세포내에서 동시에 존재하도록 하여 이들의 상호작용을 세포내에서 직접적, 그리고 실시간으로 분석할 수 있도록 하였다.
- [0021] 따라서, 본 발명은
- [0022] (a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(pre) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계; 및
- [0023] (b) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계를 포함하는 목적물질(bait)과 표적물질(pre)의 상호작용을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명에서 목적물질(bait, molecule of interest) 및 표적물질(pre, target molecule)이란 각각 상호작용이 대상이 되는 물질을 나타낸다. 상기 목적물질 및 표적물질은 각각 단백질, 폴리펩티드, 소 유기 물질(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드일 수 있으며, 바람직하게는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 또한, 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다. 상호작용의 검출 또는 스크리닝을 위해서 목적물질은 실험자가 알고 있는 물질을 나타내며, 표적물질은 미지의 물질을 지칭하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 목적물질과 표적물질을 서로 바꾸어 제1구성물 또는 제2구성물의 일부를 이룰 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 제1표지물질 및 제2표지물질은 당업자가 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 물질을 나타내며, 이의 예로는 형광물질, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사성 동위원소 등을 사용할 수 있다. 형광물로는 이에 제한되지는 않으나, 형광단백질, 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 플루오르신이소티옥시아네이트 등을 사용할 수 있다. 그 중 형광단백질로는 당 업계에 공지된 것을 사용할 수 있으며 예를 들어, GFP(Green Fluorescent Protein); EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein); RFP(Red Fluorescent Protein); mRFP(Monomeric Red Fluorescent Protein); DsRed(Discosoma sp. red fluorescent protein); CFP(Cyan Fluorescent Protein); CGFP(Cyan Green Fluorescent Protein); YFP(Yellow Fluorescent Protein); AzG(Azami Green), HcR(HcRed, Heteractis crispata red fluorescent protein), BFP(Blue Fluorescent Protein) 등이 있다. 리간드로는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 발광물로는 이에 제한되지는 않으나, 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있다. 미소입자로는 이에 제한되지는 않으나, 콜로이드 금, 철, 착색된 라텍스 등이 있고 레독스 분자로는 이에 제한되지는 않으나, 페로센, 루테튬 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논 등이 있다. 방사성 동위원소로는 이에 제한되지는 않으나, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re 등이 있다. 그러나 상기 예시된 것들 외에 표지물질의 탐색에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.
- [0026] 바람직하게는 본 발명의 제1표지물질 및 제2표지물질은 형광 단백질일 수 있다. 더 바람직하게는 본 발명의 제1표지물질 및 제2표지물질은 GFP; EGFP; RFP; mRFP; DsRed(Discosoma sp. red fluorescent protein); CFP(Cyan Fluorescent Protein); CGFP(Cyan Green Fluorescent Protein); YFP(Yellow Fluorescent Protein); AzG(Azami

Green), HcR(Heteractis crispa red fluorescent protein, HcRed) 또는 BFP(Blue Fluorescent Protein)일 수 있다. 이 때, 제1표지물질 및 제2표지물질은 서로 구별되게 하기 위하여 별개의 형광 단백질인 것이 바람직하다. 한층 더 바람직하게는 본 발명의 제1표지물질 및 제2표지물질은 각각 서열번호 9(EGFP), 서열번호 11(mRFP), 서열번호 13(AzG) 또는 서열번호 15(HcR)로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 10(EGFP), 서열번호 12(mRFP), 서열번호 14(AzG) 또는 서열번호 16(HcR)으로 표시되는 염기서열을 가질 수 있다.

[0027] 본 발명에서 이동모듈은 제1구성물을 세포내의 특정 영역으로 이동시키는 기능을 하는 부위이다. 상기에서 세포내의 특정 영역으로의 이동은 외부 신호에 의해 또는 내재적으로 이동할 수 있으며, 세포내 특정 영역은 세포내 구조물로서 세포내에 존재하는 구분되고(separate), 구별되며(discreet), 증명 가능한(identifiable) 요소를 나타낸다. 상기 세포내 특정 영역은 바람직하게는 세포막, 핵막 등의 막 구조물 또는 소포체, 골지체, 미토콘드리아, 리소좀 등의 세포내 소기관 및 그 외 세포내 특정 영역일 수 있다.

[0028] 본 발명의 이동모듈은 상기 세포내 특정 영역에 따라 다양하게 적용될 수 있으나, 바람직하게는 단백질 인산화효소 C(protein kinase C, PKC)일 수 있으며, 당업계에 공지된 cPKC(classical PKC; PKC-alpha, PKC-beta, PKC-gamma), nPKC(novel PKC; PKC-delta, PKC-epsilon, PKC-eta, PKC-theta), aPKC(atypical PKC; PKC-zeta, PKC-lambda/iota)를 비롯하여, 이들의 변이체일 수 있다. 이들은 모두 C1 도메인이라는 부분을 공통적으로 가지고 있으며, C1 도메인에 DAG(diacyl glycerol) 또는 TPA(phorbol ester, PMA)와 결합함으로써 세포막으로의 위치 이동이 유도된다. 본 발명의 이동모듈로 바람직하게는 PKC의 변이체를 사용할 수 있으며, 상기 변이체는 내재적인 신호전달기작으로 인한 교란현상을 최소화하기 위하여 PKC의 내재적인 인산화 활성을 제거한 변이체인 것이 더욱 바람직하다. 더 바람직하게는 본 발명의 이동 모듈은 서열번호 1(PRKCD), 서열번호 3(TMA), 서열번호 5(TMB) 또는 서열번호 7(TMD)로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 2(PRKCD), 서열번호 4(TMA), 서열번호 6(TMB) 또는 서열번호 8(TMD)로 표시되는 염기서열을 가질 수 있다.

[0029] 한편, 예비실험을 통해 단백질 인산화효소 외에 자극에 의해 위치가 이동하는 RasGRP 등 여러 가지 단백질과 C1 도메인들에 대한 이동효율을 분석한 결과 본 발명의 PKC 전체(PRKCD로 표시) 또는 PKC의 변이체(TMD로 표시)를 기본으로 한 돌연변이체들의 이동 효율이 상대적으로 우수한 것으로 나타났다(도 7 참조).

[0030] 한편 본 발명의 제1구성물 또는 제2구성물은 NLS(nuclear localization signal) 또는 NES(nuclear export signal) 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이는 목적물질 또는 탐색물질의 내재적인 특성 또는 실험에 사용되는 세포주에 따라 세포내 분포가 달라지는 것을 제어하기 위해 추가로 포함될 수 있다. NLS를 추가로 포함하는 경우 제1구성물 및 제2구성물이 핵질에 분포하게 할 수 있으며, NES를 추가로 포함하는 경우 제1구성물 및 제2구성물이 세포질에 분포하게 할 수 있다. 이를 통하여 목적물질과 탐색물질의 결합이 일어나는 세포내 장소가 세포질인지 핵질인지를 구분할 수도 있으며, 세포질 또는 핵질에서 결합이 일어나도록 할 수 있다. NLS는 바람직하게는 당업계에 공지된 서열(예를 들어, SV40 T Antigen(PKKKRVK), Yeast histon H2B(GKKRSKV), Human c-myc(PAAKRVKLD), Nucleoplasmin(KRPAATKKAGQAKKKKL), Human IL-5(KKYTDGQKKKCGEERRRVNQ), Human RB(KRSAEGSNPPKPLKCLR), Human p53(KRALPNNTSSSPQPKKKP)) 또는 서열번호 17의 아미노산 서열일 수 있으며, 더 바람직하게는 서열번호 17(GSGDEVGVVEVAKKKSKKEKDK)의 아미노산 서열 또는 이를 암호화하는 서열번호 18(ggctctggtgatgaagt cgaaggagt ggaagaagt agct aagaagaagagtaaaaggaaaaggataaaa)의 염기서열일 수 있다. 아울러, NES는 바람직하게는 당업계에 공지된 서열(예를 들어, Annexin II(VHEILCK--LSLE), mNet(TLWQF--LLH--LLLD), hNet(TLWQF--LLQ--LLLD), MAPKK(ALQKK--LEE--LELD), PKI(ELALK--LAG--LDIN), Rev(LQLPPLER--LTLD), Dsk-1(SLEGAVSEIS--LR), Cyclin B1(YLCQAFSDVI--LA), ANXII(STVHEILCK--LSLE), HIV-1 Rev(LQLPPLER--LTLD), MEK-1(ALQKK--LEE--LELD), PKIalpha (ELALK--LAG--LDIN), IkBa (IQQLGQ--LTLE), RanBP1 (KBAEKLEA--LSVR), INI1(DQRVVIKLNHAVGNISLV)) 또는 서열번호 19의 아미노산 서열일 수 있으며, 더 바람직하게는 서열번호 19(DQRVVIKLNHAVGNISLV)의 아미노산 서열 또는 이를 암호화하는 서열번호 20(gaccagcgcgtcatcatcaagctgaacgccatgtgggaaacatttcctggtg)의 염기서열일 수 있다.

[0031] 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포의 검출은 표지물질에 따라서 당업계에 공지된 통상적인 검출방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어 표지물질이 형광 단백질인 경우 형광 현미경을 사용하여 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출할 수 있다.

[0032] 검출 결과, 세포내에 존재하는 제1구성물과 제2구성물은 초기에는 모두 세포질 또는 핵질에 무작위적으로 분포하며(내재적으로 이동하는 이동모듈의 경우 세포내 해당 특정 영역으로 이동), 이동신호를 받은 제1구성물은 이동모듈에 의해 세포막으로 이동하게 되며, 이 때 목적물질과 결합된 표지물질도 세포막으로 이동하게 된다. 이와는 달리 목적물질과 결합하지 않는 표지물질이라면 원래의 분포가 변하지 않게 된다. 따라서 위와 같은 개념

에 의해 표적물질의 세포막으로의 이동여부는 목적물질과 표적물질의 결합을 반영하게 된다(도 2 및 도 3 참조).

- [0033] 그 결과, 본 발명의 방법은 기본적으로 살아있는 세포 내에서의 생체고분자물질의 직접결합 또는 복합체 결합을 영상분석을 통하여 실시간으로 탐색할 수 있게 하며, 종래의 기술에 비해서 다음과 같은 유리한 점을 가지게 된다.
- [0034] 1) 살아있는 세포 내에서 일어나는 모든 결합분석을 대상으로 할 수 있다.
- [0035] 2) 조직, 개체 수준의 분석이 가능하다.
- [0036] 3) 동물세포 및 효모, 박테리아에서의 적용이 가능하다.
- [0037] 4) 목적물질 및 표적물질에 대한 항원이 불필요하다.
- [0038] 5) 세포 전체를 대상으로 하는 타 방법과 달리 세포내 위치이동 변화를 분석 척도로 사용함으로써 분석의 정확도가 높다.
- [0039] 6) 2차원적 위치변화를 분석함으로써 3차원 분석 불필요하다.
- [0040] 7) 3차원 분석이 불필요함으로써 고가의 공초점현미경을 사용할 필요가 없다.
- [0041] 8) 다양한 세포 소기관별 결합분석 가능하다.
- [0042] 9) 살아있는 세포 내에서 일어나는 결합을 탐색함으로써 *in vitro* 방법과는 달리 외부 환경에 영향을 받지 않는다.
- [0043] 10) 목적물질과 표적물질의 실시간 결합 측정이 가능하다.
- [0044] 11) 단일 목적물질과 복수개의 표적물질들 간의 복합체 결합을 검증 가능하다.
- [0045] 12) all or none 탐색 분석 척도로 위양성 (false positive)을 최소화할 수 있다.
- [0046] 13) 목적물질과 탐색물질의 유전자 및 자극물질만을 사용할 경우 외부 물질의 세포내 유입에 의한 결합특성의 혼란을 원천적으로 배제한다.
- [0047] 14) 이동모듈의 다양한 변형을 통해 단백질결합의 상호보완적 탐색이 가능하다.
- [0048] 15) 영구결합(binding)과 일시적인 결합(transient binding) 및 순간적으로 발생하는 상호작용(interaction)의 검출이 가능하다.
- [0049] 16) 현재까지 개발된 신호전달 저해제의 표적을 특정화할 수 있다.
- [0050] 17) 저해제의 표적 특정화를 통해 저해제의 특성 재평가(drug re-positioning/re-purposing)가 가능하다.
- [0051] 18) 표적물질의 대량 표지 라이브러리를 사용하여 미지의 생체물질에 대한 결합 스크리닝이 가능하다.
- [0052] 19) HCS(High Contents Screening) 시스템과 연계한 고효율 시스템을 구현할 수 있다.
- [0053] 20) 무자극 위치이동 특성을 이용한 분석의 단순화를 할 수 있다.
- [0054] 21) 외부자극의 종류 변경으로 신호전달 경로별 결합 특성을 분석할 수 있다.
- [0055] 22) 제1구성물 및 제2구성물 모두에 표지물질을 사용함으로써 목적물질과 표적물질의 상대적인 정량이 가능하며, 표적물질의 외부자극 또는 내재적인 이동현상에 의한 실험적인 오류를 동시에 확인할 수 있어 위-양성 또는 위-음성 반응을 현저히 감소시켜 준다.
- [0056] 상기한 바와 같이, 본 발명은 외부 신호에 의해서 본 발명의 이동모듈이 세포내 특정 영역으로 이동되도록 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 목적물질(bait)과 표적물질(preyl)의 상호작용을 검출하는 방법은 신호물질을 처리하는 단계를 추가적으로 포함하여,
- [0057] (a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(preyl) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계;
- [0058] (b) 신호물질을 처리하는 단계; 및

- [0059] (c) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계를 포함하는 방법에 의해서 수행될 수 있다.
- [0060] 상기에서 신호물질은 본 발명의 이동모듈의 이동을 유도하는 외부 신호를 발생시키는 물질을 나타낸다. 예를 들어, 본 발명의 이동모듈로 PKC를 사용하는 경우 상기 신호물질은 PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate, Phorbol ester), TPA(12-otetradecanoylphorbol-13-acetate), PDBu(phorbol 12, 13-dibutyrate), ATP(Adenosine triphosphate), tridecanoic acid, arachidonic acid, linoleic acid, DiC8, 130C937 및 PKC 활성화 관련 성장인자(growth factor)들을 비롯한 그 외 PKC 활성화 물질들일 수 있다.
- [0061] 상기에서 PMA의 처리농도는 바람직하게는 50nM 내지 5 μ M일 수 있으며, 더 바람직하게는 1 μ M로 처리할 수 있다. 상기 PMA의 처리농도가 50nM 미만의 경우 PKC를 사용한 이동모듈의 이동이 충분하지 않고, 5 μ M 초과인 경우 화학물질의 과다처리에 의한 비정상적인 현상들(세포사멸, 신호교란 등)이 발생하여 바람직하지 못하다.
- [0062] 또한, 본 발명은
- [0063] (a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(pre) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계;
- [0064] (b) 시험물질을 처리하는 단계; 및
- [0065] (c) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계를 포함하는 목적물질과 표적물질간의 상호작용을 변화시키는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0066] 상기에서 “시험물질(test agent)” 라 함은 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실체물(entity) 또는 이들의 조합을 포함한다. 예컨대, 이에 제한되지는 않으나, 단백질, 폴리펩티드, 소 유기 물질(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함한다. 또한 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다. 다르게 지정되지 않는 한, 제제, 물질 및 화합물은 호환성 있게(interchangeably) 사용할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 방법으로 스크리닝되거나 동정될 수 있는 시험물질은 폴리펩티드, 베타-턴 미메틱(beta-turn mimetics), 다당류, 인지질, 호르몬, 프로스타글란딘, 스테로이드, 방향족 화합물, 헤테로사이클릭 화합물, 벤조디아제핀(benzodiazepines), 올리고머릭 N-치환 글리신(oligomeric N-substituted glycines), 올리고카르바메이트(oligocarbamates), 당류(saccharides), 지방산, 퓨린, 피리미딘 또는 이들의 유도체, 구조적 아날로그 또는 조합을 포함한다. 상기 시험물질은 합성 또는 자연 화합물의 라이브러리를 포함하는 광범위하고 다양한 출처로부터 얻어질 수 있다. 바람직하게는, 상기 시험 물질은 펩타이드, 예컨대, 약 5-30개, 바람직하게는 약 5-20개, 보다 바람직하게는 약 7-15개의 아미노산을 가지는 펩티드일 수 있다. 상기 펩티드는 자연적으로 생성되는 단백질, 랜덤 펩티드 또는 "바이어스화(biased)" 랜덤 펩티드의 절단물일 수 있다.
- [0068] 또한 상기 시험 물질은 "핵산" 일 수 있다. 핵산 시험 제제는 자연적으로 생성되는 핵산, 랜덤 핵산, 또는 "바이어스화" 랜덤 핵산일 수 있다. 예컨대, 원핵 또는 진핵 게놈의 절단물을 위에서 기재한 바와 유사하게 사용될 수 있다.
- [0069] 또한 상기 시험 물질은 소분자(예: 약 1,000 이하의 분자량을 갖는 분자)일 수 있다. 소분자의 조절 제제를 스크리닝하기 위한 방법에는 바람직하게는 고속 분석 어세이(high throughput assay)가 적용될 수 있다.
- [0070] 상기에서 목적물질과 표적물질간의 상호작용의 변화는 상호작용의 저해 또는 증진일 수 있다. 상호작용의 저해는 목적물질과 표적물질간의 결합의 저해를 나타내며, 본 발명의 방법에 있어서는 시험물질을 처리하지 않았을 경우 제1구성물과 제2구성물이 동일 또는 유사하게 이동하는 데에 비해 시험물질을 처리하였을 경우 제2구성물이 이동하지 않는 것(또는 이동하는 빈도, 정도, 강도의 감소)을 통해 판단할 수 있다. 상호작용의 증진은 목적물질과 표적물질간의 결합의 증진을 나타내며, 본 발명의 방법에 있어서는 시험물질을 처리하지 않았을 경우 제2구성물이 이동하지 않는 데에 비해 시험물질을 처리하였을 경우 제2구성물이 제1구성물과 동일 또는 유사하게 이동하는 것(또는 이동하는 빈도, 정도, 강도의 증가)을 통해 판단할 수 있다.
- [0071] 또한, 상기 스크리닝 방법은 신호물질을 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들어,
- [0072] (a) (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(pre) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물;을 포함하는 세포를 제조하는 단계;

- [0073] (b) 신호물질을 처리하는 단계;
- [0074] (c) 시험물질을 처리하는 단계; 및
- [0075] (d) 제1구성물 및 제2구성물의 세포내 분포를 검출하는 단계를 포함하는 방법일 수 있다. 하지만, 신호물질의 처리는 시험물질 처리 전에 수행되어야 하는 것은 아니며, 당업자가 적당히 조절하여 수행될 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명은 (i) 목적물질(bait), 제1표지물질 및 단백질 인산화효소 C(protein kinase C) 또는 이의 C1 도메인을 포함하는 변이체인 이동모듈을 포함하는 제1구성물; 및 (ii) 표적물질(pre) 및 제2표지물질을 포함하는 제2구성물을 포함하는 세포를 제공한다.
- [0077] 상기 세포는 동물, 식물, 효모 및 박테리아의 세포일 수 있으며, 바람직하게는 박테리아 외의 경우 외부로부터 도입되는 제1구성물을 잘 받아들일 수 있고, 세포질과 핵 등의 세포내 소기관의 경계가 뚜렷하게 구별되는 세포가 바람직하다. 더 바람직하게는 CHO-k1(ATCC CCL-61, *Cricetulus griseus*, hamster, Chinese), HEK293(ATCC CRL-1573, *Homo sapiens*, human), HeLa(ATCC CCL-2, *Homo sapiens*, human), SH-SY5Y(ATCC CRL-2266, *Homo sapiens*, human), Swiss 3T3(ATCC CCL-92, *Mus musculus*, mouse), 3T3-L1(ATCC CL-173, *Mus musculus*, mouse), NIH/3T3(ATCC CRL-1658, *Mus musculus*, mouse), L-929(ATCC CCL-1, *Mus musculus*, mouse), Rat2(ATCC CRL-1764, *Rattus norvegicus*, rat), RBL-2H3(ATCC CRL-2256, *Rattus norvegicus*, rat), MDCK(ATCC CCL-34, *Canis familiaris*)일 수 있다. 또한 그 밖에 각종 줄기세포, 각종 조직에서 추출된 세포 및 인위적으로 만들어진 유사 세포막 구조물일 수 있다.
- [0078] 또한, 본 발명은 본 발명의 제1구성물 및 제2구성물을 포함하는 세포를 포함하는 상호작용 검출용 키트를 제공한다.
- [0079] 본 발명의 키트는 상기 제1구성물 및 제2구성물을 포함하는 세포 이외에 표지물질의 검출에 사용되는 당 업계에 공지된 도구 및/또는 시약을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 필요에 따라 각 성분들을 혼합하는데 사용될 튜브, 웰 플레이트, 사용방법을 기재한 지시자료 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0080] 상기 방법들에서 이용될 수 있는 실험과정, 시약 및 반응 조건은 종래 당업계에서 통상적으로 알려져 있는 것들을 이용할 수 있으며, 이는 당업자에게 자명한 일이다.
- [0081] 본 발명에서 제1구성물 및 제2구성물을 포함하는 세포는 당업계에 공지된 분자생물학적 방법을 통해 제조될 수 있다. 이에 제한되지는 않으나, 제1구성물 및 제2구성물을 발현할 수 있는 각각의 발현벡터 또는 제1구성물 및 제2구성물을 모두 발현할 수 있는 발현벡터로 세포를 형질전환한 뒤, 발현벡터에서 제1구성물 및 제2구성물이 발현되도록 하는 방법이 바람직하다. 이를 위하여, 제1구성물의 경우 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 목적물질, 제1표지물질 및 이동모듈을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제작하고, 제2구성물의 경우 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 표적물질 및 제2표지물질을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제작한 뒤, 이를 동시에 또는 순차적으로 하나의 세포에 형질전환시킨 후에 발현벡터에서 제1구성물 및 제2구성물이 발현되도록 하는 방법을 사용할 수 있다. 이 때, 목적물질, 제1표지물질 및 이동물질을 암호화하는 뉴클레오티드에서 본 발명의 효과에 따른 기능을 발휘하는 한, 목적물질, 제1표지물질 및 이동물질의 순서는 무관하며, 이는 표적물질 및 제2표지물질을 암호화하는 뉴클레오티드에서도 같다.
- [0082] 상기 ‘프로모터’란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미하며, ‘작동 가능하게 연결된다(operably linked)’는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 아울러, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 프로모터로는 모든 시간대에 상시적으로 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터(constitutive promoter) 또는 특정한 위치, 시기에 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터(inducible promoter)를 사용할 수 있으며, 그 예로는 CMV 프로모터, SV40 프로모터, CAG 프로모터(Hitoshi Niwa et al., *Gene*, 108:193-199, 1991; Monahan et al., *Gene Therapy*, 7:24-30, 2000), CaMV 35S 프로모터(Odell et al., *Nature* 313:810-812, 1985), Rsyn7 프로모터(미국특허출원 제08/991,601호), 라이스 액틴(rice actin) 프로모터(McElroy et al., *Plant Cell* 2:163-171, 1990), 유비퀴틴 프로모터(Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 12:619-632, 1989), ALS 프로모터(미국 특허출원 제08/409,297) 등이 있다. 이외에도 미국특허 제5,608,149호, 제5,608,144호, 제5,604,121호, 제5,569,597호, 제5,466,785호, 제5,399,680호, 제5,268,463호 및 제5,608,142호 등에 개시된 프로모터들을 모두 사용할 수 있다.

- [0083] 세포로의 각각의 발현벡터의 형질전환은 당업계에 공지된 형질전환방법, 예를 들면, 인산칼슘법, 염화칼슘법, 염화루비듐법, 미세사출법(microprojectile bombardment), 일렉트로포레이션(electroporation), 입자 총 충격 (particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포솜 매개법(liposome-mediated method), 자성나노입자 매개법(magnetic nanoparticle-mediated method) 등에 의해 수행될 수 있다.
- [0084] 한편, 본 발명에서 사용된 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기술은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 다음 문헌에 기재되어 있다(Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989); by Silhavy, T. J., Bannan, M. L. and Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); and by Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, published by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987))
- [0085] 본 발명의 도면은 하기 기재를 참조할 수 있다.
- [0086] 도 1은 본 발명의 기본 구성물 및 분석지표를 나타낸다. 1) 제1구성물은 이동모듈, 제1표지물질 및 목적물질을 포함하며, 제1구성물에 포함되는 목적물질은 단일 또는 복수개의 목적물질을 포함할 수 있다. 2) 제2구성물은 제2표지물질 및 표적물질을 포함하며, 제2구성물에 포함되는 표적물질은 단일 또는 복수개의 목적물질을 포함할 수 있다. 3) 신호(Signal, S)는 이동모듈의 이동을 유도하는 외부 자극(본 발명에서 사용된 PMA(TPA) 또는 이동모듈의 위치변화를 유도하는 성장인자(growth factor)들 및 혈액인자(serum factor)들 등), 내재적인 자극물질(DAG, diacyl-glycerol)), 외부 또는 내재적인 ATP 및 칼슘의 농도변화를 포함한다. 4) 상호작용 분석지표는 외부자극 또는 내재적인 목적 및 표적 물질의 특성에 의한 제1구성물과 제2구성물의 세포내 분포위치, 분포위치의 변화, 각 구성물들의 세포내 이동특성 및 각 구성물 또는 복수개의 제1, 제2구성물에 의한 결합체 동정을 포함한다.
- [0087] 도 2는 본 발명의 결합 및 비결합에 대한 기본 개념도를 나타낸다. 세포내에 발현된 제1구성물과 제2구성물의 목적물질과 표적물질의 분포는 모두 일반적으로 세포질 또는 핵질에 무작위적으로 분포하며, 이동신호를 받은 제1구성물은 이동모듈에 의해 세포막으로 이동하게 되며(목적물질, 적색), 이 때 목적물질과 결합된 표적물질도 세포막으로 이동하게 된다(가; 표적물질, 녹색). 이와는 달리 목적물질과 결합하지 않는 표적물질이라면 원래의 분포가 변하지 않게 된다(나; 표적물질, 녹색). 따라서 위와 같은 개념에 의해 표적물질의 세포막으로의 이동여부는 목적물질과 표적물질의 결합을 반영하게 된다.
- [0088] 도 3은 본 발명의 결합 및 비결합 분석 모식도를 나타낸다. 예를 들어, 제1구성물과 제2구성물이 각각 코딩된 플라스미드 벡터(plasmid vector)를 동시에 세포내로 도입할 경우 세포내에서는 두 구성물이 과발현되어(가 참조) 목적물질과 표적물질의 내재적인 결합특성에 의해 결합이 일어나게 되나 이 상태에서는 도 2와 같이 두 가지 형광표지가 혼재되어 있어 결합여부를 확인할 수 없다(나 참조). 목적물질과 표적물질의 결합이 발생하였는지를 알기 위해 외부자극(1 μ M PMA)을 가하게 되면 이동모듈이 포함된 제1구성물이 세포막으로 이동하게 되며, 이 때 목적물질과 결합된 표적물질도 세포막으로 이동된다(다 참조). 따라서 두 가지 표지형광의 이동여부는 결합의 발생여부를 판단하는 근거로 이용된다. 이 때, 제1구성물 및 제2구성물 모두에 표지물질을 부착하고 이를 추적함으로써, 제1구성물에만 또는 제2구성물에만 표지물질을 부착하는 것에 비해서 실험의 정확성을 높일 수 있다. 즉, 제1구성물에만 표지물질을 부착하는 경우는 표적물질이 목적물질에 결합하였는지 여부를 확인할 수 없고, 제2구성물에만 표지물질을 부착하는 경우는 표적물질이 외부자극 또는 내재적인 변화로 인해 이동성을 가지는 경우 목적물질과 표적물질이 결합하여 이동하였는지 확인할 수 없기 때문이다.
- [0089] 도 4는 본 발명에서 제1구성물(가) 및 제2구성물(나)들의 구성의 일례를 나타낸다. (가) 제1구성물은 기본적으로 이동모듈(TMD, TMA, TMB)과 적색형광단백질(mR; mRFP) 또는 녹색형광단백질(EGFP) 등을 비롯한 사용 가능한 모든 형광단백질과 목적물질(bait)을 위한 멀티클로닝 유전자서열(Bait)을 포함한다. 목적물질 또는 표적물질의 세포내 위치를 변화시킬 필요가 있는 경우 핵질 분포신호(NLS) 또는 세포질 분포신호(NES)를 추가로 포함할 수 있다. (나) 제2구성물은 표적물질의 이동을 확인하기 위한 형광단백질(제1구성물과 구분 가능한 모든 형광단백질)과 표적물질(pre)을 위한 멀티클로닝 유전자서열(Prey)을 포함하며, 형광단백질로는 EGFP, mRFP, AzG, HcR 등을 사용하였으며, 목적과 사용하는 분석장비(현미경 등)에 따라 현재까지 알려진 형광단백질들을 이용하여 구분이 가능한 다양한 조합을 구성할 수 있다.

[0090]

- [0091] 도 5는 제1구성물 벡터 및 제2구성물 벡터의 외부자극에 의한 분포 변화를 나타낸 것이다. 목적물질이 클로닝되지 않은(즉, 목적물질이 없는) 기본 제1구성물(TMD-EGFP-Bait(가, 왼쪽 패널), TMD-mRFP-Bait(가, 오른쪽 패널))과 표적물질이 없는 기본 제2구성물(EGFP-Prey(나, 왼쪽패널), mRFP-Prey(나, 오른쪽 패널))을 CHO-k1 세포주에 과발현 한 후 외부자극(1 μ M PMA)에 의한 두 구성물의 분포 위치를 확인하였다. EGFP 또는 mRFP로 형광표지된 제1구성물은 외부자극에 의해 세포막으로 이동되었으나(가 참조), 이동모듈을 포함하지 않은 제2구성물은 외부자극에 의해 형광의 분포가 변화되지 않았다(나 참조). 따라서 제2구성물은 자체적으로 외부자극에 의해 분포변화가 일어나지 않으므로 제2구성물의 분포변화는 다른 요인(제1구성물)에 의해 일어나는 수동적인 현상을 알 수 있다.
- [0092] 도 6은 PMA 농도별 제1구성물(TMD-mRFP)의 분포 변화를 나타낸 것이다. 이동모듈을 이동특성을 최적화하기 위해 외부자극으로 사용된 PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)의 최적농도를 결정하기 위해 도 5에서 사용된 제1구성물 벡터(pTMD-mRFP-C3)를 사용하였다. 세부 실험방법은 도 5와 동일하게 진행되었으며, PMA의 농도를 1 nM에서 5 μ M까지 각각 처리한 후, 무작위로 선정된 형광을 나타내는 세포를 대상으로 적색형광이 세포막으로 이동된 세포의 수를 비교하였다. 표에 나타난 바와 같이 IC₅₀은 35 nM로 측정되었고 50 nM에서 90% 이상의 이동현상이 관찰되었으며, 100 nM 이상을 처리한 경우 세포막으로 이동된 적색형광의 신호가 증가하는 양상을 보였다. 따라서 본 발명의 실시예는 모두 대부분의 세포가 반응하고 이동량이 충분한 농도인 1 μ M을 사용하여 진행하였다.
- [0093] 도 7은 제1구성물들(TMD-mRFP(오른쪽 패널) 및 TMA-mRFP(왼쪽 패널), TMB-mRFP(중앙 패널))의 이동효율을 비교한 것이다. 제1구성물을 위한 최적의 이동모듈을 결정하기 위해 도 5에서 사용된 제1구성물 벡터(pTMD-mRFP-C3)와 TMD의 단편으로 구성된 pTMA-mRFP-C3(mRFP-C3 벡터에 이동모듈인 TMA를 삽입한 벡터, 실시예 2 참조) 및 pTMB-mRFP-C3 벡터(mRFP-C3 벡터에 이동모듈인 TMB를 삽입한 벡터, 실시예 2 참조)들간의 이동효율을 검사하였다. 세부 실험방법은 도 5와 동일하게 진행되었으며, 세 가지 구성물 모두 외부자극에 의해 분포 위치가 변화되었으며(가 참조), 분포 위치가 변화된 세포의 수는 통계학적인 차이가 없었다. 그러나 세포막으로 이동된 형광의 강도를 측정된 결과(가의 흰색선 및 나 참조) 이동모듈 TMA와 TMB의 세포막 형광도는 유사하였으나 TMD의 경우 세포질(C로 표시)과 세포막(M으로 표시) 부위의 형광도 차이가 상대적으로 뚜렷할 뿐 아니라 세포막 부위의 형광밀도가 TMA와 TMB에 비해 높게 나타났다. 따라서 본 발명의 실시예는 모두 이동특성 및 이동효율이 높은 TMD를 사용하여 진행하였다.
- [0094] 도 8은 본 발명물의 분석 효율을 강화하기 위해 제1구성물의 발현 부위를 세포질로 한정시키는 NES 서열의 유효성을 검증한 것이다. NES 서열의 효과를 확인하기 위해 NES 서열이 포함된 TMD-mRFP-Bait-NES(pTMD-mRFP-C3-NES 벡터) 기본벡터를 제작하고 제2구성물(EGFP-Prey-NES) 기본벡터(pEGFP-C3-NES 벡터)와 함께 동일한 실험방법을 사용하여 HEK-293 세포주에 과발현 시켰다. NES 서열을 포함한 제1구성물은 세포 전체에 고르게 분포하는 제2구성물과는 달리 세포질에서만 주로 관찰되었으며(가 참조), PMA를 3분간 처리한 결과 세포질에 고르게 분포하고 있던 제1구성물은 세포막으로 이동되었으나 NES 서열을 포함하지 않은 제2구성물은 위치의 변화를 보이지 않았다(나 참조). 왼쪽 패널 : 제1구성물, 중앙 패널 : 제2구성물, 오른쪽 패널 : 융합(Merge) 사진.
- [0095] 도 9는 본 발명물의 분석 효율을 강화하기 위해 제1구성물의 발현 부위를 핵질로 한정시키는 NLS 서열의 유효성을 검증한 것이다. NES 서열의 효과를 확인하기 위해 NLS 서열이 포함된 TMD-mRFP-Bait-NLS(pTMD-mRFP-C3-NLS 벡터) 및 EGFP-Prey-NLS(pEGFP-C3-NLS 벡터) 기본벡터를 제작하고 동일한 실험방법을 사용하여 HEK-293 세포주에 과발현 시켰다. NLS 서열을 포함한 제1구성물과 제2구성물은 모두 핵질에서 주로 관찰되었으며(가 참조), PMA를 3분간 처리한 결과 핵질에 고르게 분포하고 있던 제1구성물 및 제2구성물은 모두 제1구성물은 핵막으로 이동되었으나 이동모듈이 없는 제2구성물은 위치의 변화를 보이지 않았다(나 참조). 왼쪽 패널 : 제1구성물, 중앙 패널 : 제2구성물, 오른쪽 패널 : 융합(Merge) 사진.
- [0096] 도 10은 p53 단백질과 SV40T 단백질의 결합을 본 발명의 방법을 이용하여 분석한 것이다. 목적물질 p53 단백질과 표적물질 SV40T 단백질의 결합여부를 검증하기 위해 TMD-mRFP-p53(제1구성물)과 EGFP-SV40T(제2구성물)을 제작하여 CHO-k1 세포에 동일한 실험방법을 사용하여 과발현 시켰다. PMA를 3분간 처리한 결과 세포내에 고르게 분포하고 있던 두 단백질들(가)은 이동모듈 및 p53 단백질을 반영하는 적색형광 뿐 아니라 SV40T 단백질을 반영하는 녹색형광이 세포막으로 이동(나)되었다. 따라서 이들 두 가지 단백질은 세포내에서 결합상태를 유지하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 왼쪽 패널 : 제1구성물, 중앙 패널 : 제2구성물, 오른쪽 패널 : 융합(Merge) 사진.
- [0097] 도 11은 KRS(Lysyl-tRNA synthetase)와 JTV1(p38), Gag 및 라미닌 수용체(Laminin receptor, LR) 간의 결합을

분석한 것이다. KRS 단백질과 결합할 것으로 예측되는 p38, Gag 및 LR의 결합여부를 확인하기 위해, KRS를 제2 구성물로, p38, Gag 및 LR은 제1구성물로 HEK-293 세포주에 동일한 실험방법을 따라 과발현 시킨 후 PMA 처리 전과 후의 세포내 각 형광의 분포를 분석하였다. (가) TMD-mRFP-p38과 AzG-KRS의 경우 외부자극에 의해 모두 세포막으로 강하게 이동하였으나, TMD-mRFP-Gag(나)와 TMD-mRFP-LR(다)의 경우 표지된 녹색형광의 이동현상이 관찰되지 않았다. 따라서 KRS는 세 가지 단백질 중 p38과 결합을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 왼쪽 패널 : 제1 구성물, 중앙 패널 : 제2구성물, 오른쪽 패널 : 융합(Merge) 사진.

[0098] 도 12는 공초점 레이저형광현미경을 이용하여 RelA와 IκB의 결합을 실시간으로 분석한 것이다. 세포내에서 결합체를 이루는 것으로 알려진 RelA와 IκB를 각각 TMD-mRFP-RelA, EGFP-IκB 형태로 제작하여 CHO-k1 세포주에 동일한 실험방법을 따라 과발현 시킨 후, 공초점 레이저형광현미경을 이용하여 10초 간격으로 동영상을 촬영하였다. PMA를 처리하기 전(0 min)에는 두 단백질을 각각 반영하는 형광들이 모두 세포질에 고르게 분포하고 있으나, PMA를 처리한 후 10초 내지 1 분이 경과할 시점부터 형광현미경을 이용하여 두 형광의 세포막으로의 이동을 관찰할 수 있었다. 따라서 두 단백질의 세포내 결합여부 및 살아있는 세포에서의 실시간 분석이 가능함을 확인함으로써 이동자극 외 다양한 자극을 통한 세포신호전달기작 연구에도 유용한 방법을 제공할 수 있음을 확인할 수 있었다. 왼쪽 패널 : 제1구성물, 중앙 패널 : 제2구성물, 오른쪽 패널 : 융합(Merge) 사진.

[0099] 도 13은 3가지 단백질 복합체의 결합을 분석한 것이다. 도 12의 두 가지 단백질(RelA 및 IκB)은 세포내에서 p50이라는 단백질과 함께 NFκB-IκB 복합체를 이루는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 복수개의 단백질 결합을 분석할 수 있는지를 검증하기 위해 추가로 p50 단백질과 또 다른 형광단백질인 HcRed(HcR)를 결합시켜 두 번째 제2구성물 HcR-p50을 제작하였다. 세 가지 구성물들을 HEK-293 세포주에 동일한 실험방법을 따라 과발현시키고 공초점 레이저형광현미경을 이용하여 결합여부를 관찰하였다. 세 가지 단백질을 반영하는 각 형광신호(적색, 녹색 및 청색)는 모두 PMA를 처리하기 전에는 세포질 및 핵질에 고르게 분포하고 있으나(가), PMA를 처리한 경우 (나) 모두 세포막으로 이동되어 분포가 달라지는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 본 발명의 구성물들을 이용하여 최소 3개 이상의 복수개의 단백질들로 구성된 복합체를 동시에 분석할 수 있다는 것을 의미하는 것이다. 왼쪽 첫 번째 패널 : 제1구성물(TMD-mRFP-RelA), 왼쪽 두 번째 패널 : 첫 번째 제2구성물(EGFP-IκB), 왼쪽 세 번째 패널 : 두 번째 제2구성물(HcR-p50), 오른쪽 패널 : 융합(Merge) 사진.

[0100] 도 14는 효모교잡법(Y2H)에 의해 스크리닝된 양성 결합 후보를 검증한 결과이다. 일반적으로 사용되고 있는 결합단백질 스크리닝 방법인 효모교잡법에서 양성으로 판정된 후보 단백질들에 대한 결합여부를 재검증하기 위해 목적물질 OmpA 단백질을 포함한 제1구성물(TMD-mRFP-OmpA)과 표적 후보물질인 EEF1A, FAM14B 및 DDX31을 포함하는 제2구성물들(EGFP-EEF1A, EGFP-FAM14B 및 EGFP-DDX31)을 제작하였다. 목적물질과 각각의 표적 후보물질들의 조합을 HEK-293 세포주에 동일한 실험방법을 따라 과발현시키고 공초점 레이저형광현미경을 이용하여 결합여부를 관찰하였다. PMA 처리 전에는 세포내에 고르게 발현되어 있던 형광들은 PMA 처리에 의해 이동모듈이 포함된 OmpA 단백질은 모두 세포막으로 이동되었으며(적색), 이것과 결합할 것으로 예측된 표적 후보물질들을 반영하는 녹색형광 중 EEF1A(가)와 FAM14B(나)는 세포질에 그대로 남아있었으나 DDX31(다)은 세포막으로 이동되었다. 따라서 효모교잡법에서 발굴된 세 가지 결합 후보물질 중 하나만이 결합한다는 것을 확인할 수 있으며, 이 결과는 효모교잡법의 위양성 문제를 해결할 수 있는 기술로 사용될 수 있음을 보여주는 것이다. 왼쪽 패널 : 제1구성물, 중앙 패널 : 제2구성물, 오른쪽 패널 : 융합(Merge) 사진.

[0101] 도 15는 p53 단백질과 mdm2 단백질의 결합 및 항암제 nutlin3의 결합 저해를 분석한 것이다. 본 발명을 이용하여 신약발굴 기법으로서의 가능성을 검증하기 위해 항암제의 결합저해 실험을 수행하였다. 이를 위해 p53 단백질을 포함하는 제1구성물(TMD-mRFP-p53N)과 mdm2 단백질을 포함하는 제2구성물(AzG-mdm2N)을 제작하였으며, 이 구성물들을 HEK-293 세포주에 동일한 실험방법을 따라 과발현시키고 공초점 레이저형광현미경을 이용하여 결합여부를 관찰하였다. 먼저 p53N과 mdm2N의 결합여부를 검증하기 위해 nutlin3를 처리하지 않은 세포들을 대상으로 PMA의 처리 전과 처리 후를 비교한 결과(가) PMA 처리 전에는 세포질에 고르게 분포하던 두 단백질이 모두 PMA 처리에 의해 세포막으로 이동함으로써 두 단백질이 결합하고 있다는 것을 확인하였다. 다음으로 항암제 nutlin3의 결합저해 효과를 검증하기 위해 20 nM nutlin3를 배양액에 첨가하여 20분간 배양한 후 실시간 실험을 통하여 PMA 처리 전과 처리 후의 형광 분포를 관찰하였다(나). Nutlin3를 전처리 한 세포들의 경우 이동모듈과 p53N으로 구성된 제1구성물(적색)은 세포막으로 이동되었으나 이동모듈이 없는 mdm2N와 형광단백질로만 구성된 제2구성물(녹색)은 세포막으로의 형광이동이 관찰되지 않았다. 따라서 본 발명은 항암제인 nutlin3가 p53과 mdm2의 결합을 저해하는 점을 확인할 수 있었으며, 이를 이용한 결합저해 등 단백질 또는 펩티드 등의 결합에 의해 발생하는 질병에 대한 결합저해제 발굴 기법으로 이용될 수 있음을 보여준다. 왼쪽 패널 : 제1구성물, 중앙 패널 : 제2구성물, 오른쪽 패널 : 융합(Merge) 사진.

[0102] 도 16은 항암제 nutlin3의 결합 억제 농도를 분석한 것이다. 도 15에서의 항암제 결합저해 실험을 통해 검증된 nutlin3의 최적 처리 농도를 분석하기 위해 농도별 결합저해 효과를 분석하였다. nutlin3는 0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 nM 까지 처리하였으며, 실험방법은 도 15 및 도 6의 방법에 따라 수행하였다. nutlin3의 농도에 따른 결합저해 효과는 5 nM부터 뚜렷하게 나타나기 시작하여 10 nM에서는 50% 이상의 세포에서 두 단백질의 결합이 저해된 것으로 나타났으며, 25 nM에서 90% 이상 세포에서 결합이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 시험관내 실험에서 사용하는 500 nM에 비해 매우 적은 농도에서도 결합이 저해됨을 측정함으로써 실제 세포에 효과적인 항암제 등 결합저해제 또는 결합억제제 등의 효과를 정밀하게 검증할 수 있는 방법으로 사용될 수 있음을 보여주는 것이다.

효과

[0103] 따라서, 본 발명은 세포내에서 일어나는 물질결합(binding) 및 상호작용(interaction)을 살아있는 세포에서 실시간으로 검출할 수 있는 방법 및 이를 이용한 상호작용을 변화시키는 물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 현재까지 알려진 시험관내 방법 (in vitro 및 생화학적 방법), 항체결합 방법 (항체침전법), 복합형광단백질 에너지전이(FRET), 분할 단백질의 재결합(Bi-FC) 및 형광간섭 (FCS) 등 기존의 생체물질 상호작용 탐색 방법들이 가지는 부정확성 및 복잡성 등의 단점을 극복하였고, 구성물 모두에 표지를 함으로써 정확도를 더욱 높일 수 있어 종래의 분석기술과 차별화되는 새로운 실시간 무항체 분석 방법을 제공하는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0104] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0105] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0106] <실시예 1>

[0107] 동물세포주 및 형질전환

[0108] <1-1> 동물세포주 및 이의 배양

[0109] 본 발명자들은 CHO-k1(ATCC CCL-61, Cricetulus griseus, hamster, Chinese), HEK293(ATCC CRL-1573, Homo sapiens, human), HeLa(ATCC CCL-2, Homo sapiens, human), SH-SY5Y(ATCC CRL-2266, Homo sapiens, human) 세포주를 사용하였으며, 본 발명에 사용된 동물세포주의 배양조건은 각 세포주의 분양기관인 ATCC(American Type Culture Collection)사의 세포주 배양방법을 이용하였다. 단 CHO-k1은 F-12 배양액을 사용하였으며, HEK293, HeLa, SH-SY5Y 세포주는 DMEM 배양액을 사용하였고, 기타 배양조건은 동일하게 사용하였다. 한편, 각 세포들의 공통적인 배양방법은 다음과 같다.(당업자의 목적에 의해 세부적인 배양 조건은 달라질 수 있다.) 25 mM HEPES, 10% FBS(fetal bovine serum, v/v), 100 units/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin이 들어있는 pH7.4의 배양액(F-12 및 DMEM) 속에서 각 세포주를 37℃로 고정된 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

[0110] <1-2> 세포주의 형질전환

[0111] 본 발명의 실시예에서 사용된 세포내 유전자 도입방법은 일반적으로 사용되는 리포좀-기반 방법 중의 하나인 ExGene 500(Fermentas Life Science)을 사용하였으며, 유전자의 농도 등 유전자 도입을 위한 모든 조건은 제조사의 지침을 따라 수행하였다. 보다 구체적으로 계대배양되고 있는 세포를 커버슬립이 들어있는 12-플레이트로 옮겨 분주를 하고 1일을 배양한 후, 0.9 ml의 신선한 배양액으로 교환하였다. 약 1 µg 정도의 형질전환 시료들을 0.1 ml의 150 mM NaCl 용액에 첨가한 후 완전히 섞고 3.3 µl의 ExGene 시약을 첨가하여 15초 동안 볼텍싱(Vortex)하여 섞어주었다. 이 용액을 상온에서 10분간 놓아둔 후 세포가 자라고 있는 커버슬립이 들어있는 12-플레이트의 각 웰(well)에 첨가하여 18시간 동안 배양을 하여 형질전환되도록 하였다.

[0112] <실시예 2>

[0113] 제1구성물 및 제2구성물의 디자인 및 제작

[0114] <2-1> 제1구성물의 설계 및 제작

[0115] 본 발명에서 제1구성물이란 세포질에서 고르게 발현되어 있는 단백질이 세포막으로 이동할 수 있는 모듈(이동모듈)을 포함하며, 이들 현미경을 이용하여 분석할 수 있는 형광단백질이 표지되어 결합되어 있고 마지막으로 목적물질이 결합될 수 있는 융합서열로 구성된다.

[0116] 본 발명에 사용한 제1구성물(도 4의 가 참조)을 발현하는 벡터는 각각 아래와 같은 주형(template)과 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 이동모듈 부위를 제작하고 이를 pEGFP-C3 벡터(GenBank accession No. U57607; Clontech catalog No. #6082-1, 서열번호 21)와 pmRFP-C3 벡터(mRFP; GenBank accession No. DQ903889, 서열번호 22)의 NheI/AgeI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0117] 이동모듈 중 TMD는 주형으로 pCMV-SPORT6-PRKCD 벡터(GenBank accession No. BC043350; purchased from Openbiosystem (<http://www.openbiosystems.com/>); Catalog No. EHS1001-410108-BC043350)를 사용하고, 서열번호 23(PRKCD-F; 5'-GAAGCTAGCCGCCACCATGGCGCGTTCCTGC-3') 및 서열번호 24(PRKCD-R; 5'-GAAACCGGTGGATCTTCCAGGAGGTGCTCGAATTTGG-3')의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 제조하였다. 또한, TMA 이동모듈은 주형으로 pCMV-SPORT6-PRKCD 벡터를 사용하고, 서열번호 25(TMA-F; 5'-GAAGCTAGCCGCCACCATGAAACAGGCCAAAATCCACTACATC-3') 및 서열번호 26(TMA-R; 5'-GAAACCGGTGGAGTGTCCCGGCTGTTGGCCGC-3')의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 제조하였다. 아울러, TMB 이동모듈은 주형으로 pCMV-SPORT6-PRKCD 벡터를 사용하고, 서열번호 27(TMB-F; 5'-GCAGCTAGCCGCCACCATGCAGAAAGAAGCGTTCAACATCG-3') 및 서열번호 28(TMB-R; 5'-GCAACCGGTGGGCTCAGCCAAAAGCTTCTG-3')의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 제조하였다.

[0118] <2-2> 돌연변이를 포함하는 제1구성물의 설계 및 제작

[0119] 제1구성물에 포함된 이동모듈은 단백질 인산화효소로부터 유래하였으므로 내재적으로 인산화 기능을 가지고 있으며, 이러한 인산화 기능은 이동모듈의 역할 뿐 아니라 내재적인 인산화 기능을 통해 구성물들이 과발현된 세포의 신호전달기작과 단백질 상호작용을 저해 또는 교란시킬 가능성을 가지고 있다. 따라서 본 발명에서는 이동모듈이 가진 인산화 기능을 제거하기 위해 돌연변이를 유도하였다. 본 발명에 사용된 인산화 효소는 인산화 기능에 있어 매우 중요한 위치로 알려진 311번째 아미노산(티로신, tyrosine)을 페닐알라닌(phenylalanine)으로 (Y313F), 378번째 아미노산(리신, lysine)을 아르기닌(arginine)으로 각각 치환하기 위해 중합효소 연쇄반응(PCR) 돌연변이 유도방법을 사용하여 최종적으로 TMD 이동모듈을 제작하였다.

[0120] 이를 위하여 첫 번째 PCR 조건에서 정방향 프라이머(PKCD-F; 5'-GAAGCTAGCCGCCACCATGGCGCGTTCCTGC-3', 서열번호 29)와 변형된 역방향 프라이머(Y313F-R; 5'-GAAACCTGAAATATCCCAAC-3', 서열번호 30)를 이용하여 유전자를 증폭하고, 두 번째 PCR 조건에서 변형된 정방향 프라이머(Y313F-F; 5'-GTTGGGATATTCAGGGTTTC-3', 서열번호 31)와 역방향 프라이머(PKCD-R; 5'-GAAACCGGTGGATCTTCCAGGAGGTGCTCGAATTTGG-3', 서열번호 32)를 이용하여 유전자를 증폭하였다. 첫 번째와 두 번째 PCR에서 얻은 유전자 증폭물을 섞은 후 이것을 주형으로 하여 정방향과 역방향 프라이머들을 이용하여 세 번째 PCR 증폭을 실시하였다. 여기에서 얻어지는 유전자는 염기서열 TAT가 TTT로 치환된 Y313F 돌연변이가 되며, 이것을 주형으로 하여 동일한 실험 과정을 거쳐 AAG가 AGG로 치환된 K378R 돌연변이를 제작하였다. 이 때 사용된 정방향 프라이머(서열번호 29), 역방향 프라이머(서열번호 32), 변형된 정방향 프라이머(K378R-F : 5'-TTTGCCATCAGGGCCCTCAAG-3', 서열번호 33) 및 변형된 역방향 프라이머(K378R-R: 5'-CTTGAGGGCCCTGATGGCAAA-3', 서열번호 34)는 기재된 바와 같다.

[0121] <2-3> 제1구성물에 NLS 및 NES의 부착

[0122] 생체내에 존재하는 단백질들은 고유의 분포특성을 가지고 있어 목적물질과 표적물질의 발현위치가 세포내 소기관들에 위치할 수 있으며, 이 경우 제1구성물과 제2구성물의 위치이동을 감지하지 어려울 수 있다. 따라서 목적물질과 표적물질의 결합을 확인하기 위해 실험이 가능한 세포질 또는 핵질로 분포위치를 제어할 필요가 있으며, 이를 위해 세포질로 분포위치를 유도하기 위한 NES(nuclear exclusion signal)와 핵질로 분포위치를 유도하기 위한 NLS(nuclear localization signal)를 사용하여 목적물질과 표적물질의 세포내 분포위치를 제어할 수 있는 벡터를 제작하였다.

[0123] 또한 이들 위치제어용 벡터는 목적물질과 표적물질의 결합이 세포질에서 일어나는지 또는 핵질에서 일어나지를 알 수 있는 기능을 동시에 제공한다. 즉, 목적물질과 표적물질이 세포질에서 결합된 후 세포질로 이동하는 특성을 가진 경우 NES가 각각 포함된 제1구성물과 제2구성물의 조합에서는 PMA 처리에 의해 제2구성물이 제1구성물과 결합하여 세포막으로 이동할 수 있으나, NLS가 각각 포함된 구성물들의 조합에서는 제1구성물만 핵막으로 이동되고 제2구성물의 이동현상은 나타나지 않게 된다. 반면에 목적물질과 표적물질이 각각 핵질로 이동된 경우에만 결합이 일어나는 특성을 가진 경우 NLS를 포함한 구성물 조합에서는 PMA 처리에 의해 각 구성물들이 모두 핵막으로 이동되지만 NES를 포함한 구성물 조합에서는 제1구성물은 세포막으로의 위치이동이 유도되나 제2구성물은 위치이동이 일어나지 않게 된다.

[0124] NLS가 부착된 제1구성물과 제2구성물은 일반적인 PCR 클로닝 방법을 연속적으로 수행하여 제작하였으며, 사용된 프라이머들은 아래와 같다. pmRFP-C3 벡터를 PCR을 수행하기 위한 주형으로 사용하고 서열번호 35(NLS-F-1 : 5'-AGTAAAAAGGAAAAGGATAAATAGATAACTGATCATAATCAGCC-3') 및 서열번호 36(NLS-R : 5'-GCTGCAATAACAAGTTAACAAC-3')의 프라이머를 이용하여 1차 PCR을 수행하였다. 여기에서 얻어진 PCR 증폭물을 다시 주형으로 사용하고 서열번호 37(NLS-F-2 : 5'-TGGAAGAAGTAGCTAAGAAGAAGAGTAAAAAGGAAAAGGATAAAA-3') 및 서열번호 36(NLS-R)의 프라이머를 사용하여 2차 PCR을 수행하였다. 동일한 방법으로 서열번호 38(NLS-F-3 : 5'-TCCGGTGTGAAGTCGAAGGAGTGAAGAAGTAGCTAAGAAGAA-3') 및 서열번호 36(NLS-R)의 프라이머로 3차 PCR을, 그리고, 서열번호 39(NLS-F-4 : 5'-GCTGGATCCAGGCTCTGGTGTGAAGTCGAAGG-3') 및 서열번호 36(NLS-R)로 4차 PCR을 수행하여 얻어진 최종 유전자 단편을 각 제1구성물 벡터들 또는 각 제2구성물 벡터의 BamHI/HpaI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0125] NES가 부착된 제1구성물과 제2구성물은 NLS의 제작과 동일한 방법을 통하여 제작되었으며, 사용된 프라이머들은 아래와 같다. pmRFP-C3 벡터를 PCR을 수행하기 위한 주형으로 사용하고 서열번호 40(NES-F-1 : 5'-GTGGGAAACATTTCCCTGGTGTAGATAACTGATCATAATCAGCC-3') 및 서열번호 41(NES-R : 5'-GCTGCAATAACAAGTTAACAAC-3')의 프라이머를 사용하여 1차 PCR을 수행하였다. 여기에서 얻어진 PCR 증폭물을 다시 주형으로 사용하고 서열번호 42(NES-F-2 : 5'-GTCATCATCAAGTGAACGCCATGTGGGAAACATTTCCCTGGT-3') 및 서열번호 41(NES-R)의 프라이머를 사용하여 2차 PCR을 수행하였으며, 동일한 방법으로 서열번호 43(NES-F-3 : 5'-GTCGGATCCAGACCAGCGCTCATCATCAAGCTGAACGCC-3') 및 서열번호 41(NES-R)의 프라이머를 이용하여 3차 PCR을 수행하여 얻어진 최종 유전자 단편을 각 제1구성물 벡터 또는 각 제2구성물 벡터의 BamHI/HpaI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0126] <2-4> 제2구성물의 설계 및 제작

[0127] 제2구성물이란 제1구성물에 결합된 목적물질과 결합하는 내재적인 특성을 가진 표적물질의 이동을 분석하기 위한 표지물을 포함한다. 제2구성물은 제1구성물에 포함된 표지와 다른 형광을 이용하였으며, 녹색형광단백질(EGFP, AzG), 적색형광단백질(mRFP) 및 적외선형광단백질(HcR)을 이용하여 제1구성물과 동일한 방법을 통해 제작하였다.

[0128] 이 때, 제2구성물의 제조시 제2표지물질로 EGFP를 사용시 pEGFP-C3 벡터(clontech)를, mRFP 사용시 pmRFP-C3 벡터, AzG를 사용시 pAzG-C3 벡터, HcR 사용시 pHcR-C3 벡터를 사용하였으며, 각 원본 C3 벡터들은 pEGFP-C3 벡터의 EGFP 유전자서열 부위만을 각 AzG, HcR 유전자로 다음과 같이 치환함으로써 제작되었다.

[0129] pAzG-C3 벡터의 경우 pPM-mAG1 벡터(purchased from MBL, catalog No. AM-V0203; Karasawa, S., et al. 2003, J. Biol. Chem. 278, 34167-34171)을 주형으로 사용하고 서열번호 44(AzG-F : 5'-GGCACCGGTCCGCCACCATGGACCCCATGGTGTAGTGTGAT-3') 및 서열번호 45(AzG-R : 5'-GGCAGATCTGACAGCTTGGCCTGACTCGGCAGCAT-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pEGFP-C3 벡터의 EGFP 염기서열과 치환하여 AgeI/NotI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0130] pHcR-C3 벡터의 경우 pHcRed-Tandem-N1(purchased from Avrogen, catalog No. FP204; Gurskaya et al., 2001, FEBS Lett. 507, 16-20.)을 주형으로 사용하고 서열번호 46(HcR-F : 5'-GCCACCGGTCCGCCACCATGGTGTAG-3') 및 서열번호 47(HcR-R : 5'-GCCCGGCCGCTTATCAGTTGGCTTCTCGGGCAGGTC-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pEGFP-C3 벡터의 EGFP 염기서열과 치환하여 AgeI/NotI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0131] <실시예 3>

[0132] 제1구성물 및 제2구성물의 이동특성 확인

[0133] <3-1> 구성물의 발현 확인 및 이동 특성 분석

[0134] 제1구성물과 제2구성물 벡터가 도입된 세포가 자라고 있는 커버슬립(coverslip)을 유체기(perfusion chamber)에 고정시켜 공초점 레이저현미경(칼자이스 LSM510)의 제물대에 장착하고 외부자극 전과 외부자극(1μM PMA(Phorbol ester) 처리) 후의 구성물 벡터들에 대한 영상을 획득하였다.

[0135] 공초점 레이저현미경의 레이저는 488 nm Argon 레이저 (EGFP 또는 AzG), 543 nm HeNe 레이저 (mRFP) 및 561 nm DPSS 레이저 (HcR)를 사용하여 형광표지를 여기(excitation)시키고, 각 형광표지에서 발생하는 형광신호는 band path 필터 BP505-530 (EGFP 또는 AzG), Long path 필터 LP560 또는 BP560-630 (mRFP) 및 Long path 필터 LP650 (HcR)를 사용하였으며, 각 형광들 간의 간섭을 완전히 제거한 후 영상을 획득하였다.

[0136] 그 결과, 도 5에서 보듯이, 공초점 레이저형광현미경을 이용하여 외부 자극 후 이동모듈(TMD)이 포함된 제1구성물 벡터에 의한 녹색 또는 적색 형광은 세포막으로 이동되지만(도 5 가 참조) 이동모듈이 없는 표적물질용 제2구성물 벡터에 의한 녹색 또는 적색 형광은 자극전과 동일하게 세포질에 고루 분포하고 있는 것을 확인할 수 있었다(도 5 나 참조). 따라서 제2구성물 벡터는 외부자극에 반응하지 않으며, 제2구성물의 세포막으로의 이동은 반드시 목적물질과 표적물질의 결합을 전제로 한다는 것을 알 수 있었다.

[0137] <3-2> 제1구성물의 이동과 외부자극물질의 최적 농도 확인

[0138] 제1구성물 중 pTMD-mRFP-C3 벡터를 이용한 외부 자극물질인 PMA(Phorbol ester)의 농도에 따른 이동 효율을 측정하기 위해 CHO-k1 세포에 제1구성물의 발현벡터를 형질전환시켜 과발현 시킨 후 18시간 동안 배양을 하고, 1, 5, 10, 20, 40, 50, 80, 100 nM과 1, 5 μM을 각각 처리하였다. 5분간 PMA를 처리한 후 3.8% 포름알데히드(formaldehyde)로 세포를 고정하여 공초점 현미경(Confocal microscope, Carl Zeiss LSM 510)를 통해 적색형광이 발현된 200개의 세포를 무작위로 선정하고 농도별 적색형광의 세포막 분포세포의 수를 측정하였다

[0139] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 50 nM에서 90% 이상의 세포에서 이동현상이 관찰되었으며, 100 nM 이상을 처리한 경우 세포막으로 이동된 적색형광의 신호가 증가하는 양상을 보였다. 따라서 50nM 내지 5μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하나, 대부분의 세포가 반응하고 이동량이 충분한 농도인 1 μM을 처리하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

[0140] <실시예 4>

[0141] 제1구성물 및 제2구성물을 이용한 세포내 실시간 결합분석

[0142] <4-1> p53 단백질과 SV40 T 항원의 세포내 결합 분석

[0143] 잠재적 발암 유전자로 알려진 p53과 이에 결합하는 것으로 알려진 SV40T 항원 단백질간의 결합은 현재 IP를 이용한 결합동정 시스템으로 상용화된 것이 있다. 이에 본 발명의 기본적인 결합 검출 기능을 검증하기 위해 동일한 단백질들을 대상으로 분석을 실시하였다. p53과 SV40 T 항원에 대한 세포내 결합을 검증하기 위해 p53 단백질이 융합된 제1구성물(TMD-mRFP-p53) 및 SV40 T 항원이 융합된 제2구성물을 다음과 같이 제조하였다.

[0144] 제1구성물 TMD-mRFP-p53은 pGBK-p53-GAL4 벡터(p53; GenBank accession No. AF161020)을 주형으로 사용하고 서열번호 48(p53-F: 5'-GAAGAATTCTGATGCCTGTCACCGAGACCCCTGGG-3') 및 서열번호 49(p53-R: 5'-GAAGGATCCCGTCAGTCTGAGTCAGGCCCACTT-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pTMD-mRFP-C3 벡터(mRFP-C 벡터에 이동모듈인 TMD 서열을 삽입한 벡터, 실시예 2 참조)의 EcoRI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0145] 제2구성물 EGFP-SV40T는 pGADT7-SV40T-GAL4 벡터(SV40T; GenBank accession No. BC014270)을 주형으로 사용하고 서열번호 50(SV40T-F: 5'-GAAGAATTCTGATGGGAAGTGAATGGGAGCAG-3') 및 서열번호 51(SV40T-R: 5'-GAAGGATCCCGTTATGTTTCAGGTTTCAGGGG-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pEGFP-C3 벡터의 EcoRI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0146] 상기 제1구성물(TMD-mRFP-p53)과 제2구성물(EGFP-SV40T)을 상기 실시예 <1-2>에 기재된 방법(ExGene 500)에 따라 CHO-k1 세포에 도입한 다음, 발현되도록 하였다. 18시간의 배양을 거쳐 1 μM PMA를 5분간 처리한 후 두 구성물의 형광분포를 실시예 <3-1>에서와 같이 관찰하였다.

[0147] 그 결과, 도 10에서 보듯이, 이동모듈이 결합된 목적물질 p53 단백질에 대한 적색형광(왼쪽 패널)과 동일하게 표적물질 SV40T가 결합된 녹색형광(가운데 패널)이 PMA 처리시 모두 세포막으로 이동함을 알 수 있었다.. 반면에 SV40T가 결합되지 않은 제2구성물만을 발현시킨 대조군에서는 동일한 실험을 통해 세포막으로 위치가 변하지 않는 것으로 볼 때(결과미도시) 표적물질 SV40T는 목적물질 p53과 세포내에서 결합하고, 이동모듈이 결합된 목적물질의 분포변화에 따라 목적물질의 분포변화가 발생하였으므로 두 단백질은 세포내에서 결합하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0148] <4-2> KRS 단백질과 p38(AIMP2) 단백질의 세포내 결합 분석

[0149] 다기능성 질병 유발 유전자로 알려진 KRS(Lysyl-tRNA synthetase)는 p38/AIMP2 단백질 및 최소한 3개의 다른 ARS(Amioacyl-tRNA synthetase)와 복합체를 이루고 있는 것으로 알려져 있다(J. Cell Science, 2004, 117, 3725-3734, references therein). 따라서, KRS 단백질과 p38 단백질의 세포내 실시간 결합 분석 가능여부, 다양한 동물세포 내에서의 실험 가능성, 형광표지의 다양성 및 목적물질과 표적물질 교환 가능성을 확인하기 위해

KRS와 결합하는 것으로 알려진 p38과 잠재적인 결합단백질로 예측된 Gag, LR을 이용하여 세포내 결합을 분석하였다.

[0150] 이를 위하여, 제1구성물(TMD-mRFP-p38, TMD-mRFP-Gag 또는 TMD-mRFP-LR(Lamin receptor) 및 제2구성물(AzG-KRS)을 다음과 같이 제조하였다. 이 때, 제2구성물을 위한 형광은 EGFP 대신 AzG(Azami Green)을 적용하였다.

[0151] 제1구성물 중 TMD-mRFP-p38은 pGEX-4T1-p38 벡터(p38; GenBank accession No. NM_006303)을 주형으로 사용하고 서열번호 52(p38-F: 5'-GTCCTCGAGATGCCGATGTACCAGGTAAG-3') 및 서열번호 53(p38-R: 5'-GTCGGATCCTTAAAAAGGAGCCAGGTTTC-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pTMD-mRFP-C3 벡터의 XhoI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0152] TMD-mRFP-Gag는 pGEX-4T1-Gag 벡터(Gag; GenBank accession No. NM_002295)를 주형으로 사용하고, 서열번호 54(Gag-F: 5'-GTCGAATTCTGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTA-3') 및 서열번호 55(Gag-R: 5'-GTCGGATCCTTATTGTGACGAGGGTTCGTT-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pTMD-mRFP-C3 벡터의 XhoI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0153] 또한, TMD-mRFP-LR(Lamin receptor)는 pET28a-TEV-LR 벡터(LR; GenBank accession No. NM_002295)을 주형으로 사용하고 서열번호 56(LR-F: 5'-GTCGAATTCTGATGTCGGAGCCCTTGATGT-3') 및 서열번호 57(LR-R: 5'-GTCGGATCCTTAAGACCAGTCAGTGGTGTCTC-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pTMD-mRFP-C3 벡터의 XhoI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0154] 제2구성물인 AzG-KRS의 경우 pET28a(GenBank Accession No. NM_005548)를 주형으로 사용하고, 서열번호 58(KRS-F: 5'-GTCGAATTCTGATGGCGCCGTCAGGCG-3') 및 서열번호 59(KRS-R: 5'-GTCCCGGGTAGACAGAAGTGCCTACTGTTGTG-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pAzG-C3 벡터의 EcoRI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0155] 상기에서 제조한 제1구성물 및 제2구성물을 HEK293 세포주에 형질전환하였고, 배양액을 DMEM으로 한 것을 제외하고는 상기 실시예 <4-1>에서와 같이 하여 형광을 확인하였다.

[0156] 그 결과, 도 11에서와 같이, 제1구성물로 사용된 3가지 단백질들의 세포막 이동현상은 모두 관찰되었으며(왼쪽 패널), 상호결합이 확인된 p38(도 11 가 참조)의 경우 KRS가 결합된 제2구성물이 세포막으로 이동하였으나, 이외의 잠재적인 결합단백질로 예측된 Gag(도 11 나 참조)와 LR(도 11 다 참조)에서는 그러한 이동현상이 관찰되지 않았다(가운데 패널). 따라서 KRS 단백질과는 결합하지만 Gag 또는 LR 단백질과는 결합하지 않는 것을 확인할 수 있었으며, EGFP 대신에 사용된 AzG 형광 단백질의 이용에도 문제가 없음을 확인하였다.

[0157] <4-3> RelA 단백질과 저해단백질 IκB의 세포내 실시간 결합 분석

[0158] TNF-α에 의해 조절되는 NFκB 및 IκB 단백질들의 상호작용은 세포 내에서 다양한 세포신호전달기작에 관여하는 것으로 알려져 있다. 다양한 기작 중 특히 주목되고 있는 것은 생체내에서 발생하는 각종 위해성 신호에 대응하는 염증유발과 밀접한 관련성을 가지고 있다는 것이다. 따라서, NFκB 복합체 중 다기능성 염증관련 유전자인 RelA 단백질과 저해단백질인 IκB의 결합여부를 검증하는 것과 동시에 외부자극 후 세포고정 기법이 아닌 살아있는 세포를 이용한 직접 분석 가능성을 확인하기 위해 실시간 분석 기법(time-laps)을 이용하여 실험을 실시하였다.

[0159] 이를 위하여, 제1구성물(TMD-mRFP-RelA)과 제2구성물(EGFP-IκB)을 다음과 같이 제조하였다.

[0160] 제1구성물 TMD-mRFP-RelA는 pEYFP-RelA 벡터(RelA; GenBank accession No. NM_021975)를 주형으로 사용하고 서열번호 60(RelA-F: 5'-GGACTCGAGATGGACGAAGTTCCTCCCTC-3') 및 서열번호 61(RelA-R: 5'-GAAGGATCCCGTTAGGAGCTGATCTGACTCAGCAGG-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pTMD-mRFP-C3 벡터의 XhoI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0161] 제2구성물 EGFP-IκB는 pcDNA3-IκB 벡터(IκB; GenBank accession No. NM_020529)를 주형으로 사용하고 서열번호 62(IκB-F: 5'-GAAGAATTCTGATGTCCAGGCGCCGAGCG-3') 및 서열번호 63(IκB-R: 5'-GAAGGATCCCGTCATAAACGTCAGACGCTGGCCTCCAA-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pEGFP-C3 벡터의 EcoRI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.

[0162] 상기에서 제조한 제1구성물 및 제2구성물을 CHO-k1 세포주에 형질전환하였고, 이를 상기 실시예 <4-1>에서와 같이 하여 0분, 1분, 2분 및 3분째에 형광을 확인하였다.

- [0163] 그 결과, 도 12에서와 같이, 제1구성물(TMD-mRFP-ReIA)은 0분째에는 세포내에 고르게 분포하다가, 시간이 경과됨에 따라 점차적으로 세포막으로 이동하였으며(왼쪽 패널), 제2구성물(EGFP-IkB)도 역시 0분째에는 세포내에 고르게 분포하다가 시간이 경과함에 따라 제1구성물과 더불어 세포막으로 이동함을 알 수 있었다(가운데 패널). 특히, 구성물들은 PMA 처리 후 약 10초부터 세포막으로 이동하는 현상이 관찰되기 시작하여(결과미도시) 대부분의 세포에서 3분 이내에 이동이 완료되는 것으로 관찰되었으며, 이러한 이동현상은 앞에서 제시한 모든 실시예들과 앞으로 제시되는 모든 실시예들을 통한 실시간 분석에서도 동일하게 관찰되었다(결과미도시).
- [0164] <4-4> 다기능성 염증관련 유전자 NFkB 복합체(ReIA/p50/IkB) 세포내 결합 결합 분석
- [0165] NFkB 복합체는 기본적으로 NFkB(ReIA/p50)와 음성조절자인 IkB 단백질이 복합체를 이루는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 이 복합체를 구성하는 ReIA, p50, IkB 등 3가지 단백질의 결합을 동정할 수 있는지를 검증하였다.
- [0166] 이를 위하여, 제1구성물(TMD-mRFP-ReIA) 및 2종의 제2구성물(EGFP-IkB 및 HcR-p50)을 다음과 같이 제조하였다. 이 때, 형광표지로는 제1구성물에는 mRFP를 사용하였고, 제2구성물에는 EGFP 및 mRFP와 구분할 수 있는 HcR(HcRed)를 사용하였다..
- [0167] 제1구성물(TMD-mRFP-ReIA)과 IkB를 포함하는 제2구성물(EGFP-IkB)은 상기 실시예 <4-3>에서와 동일한 것을 사용하였으며, 또 다른 제2구성물 HcR-p50은 pDMV-SPORT6-NFkB1 벡터(NFkB1; GenBank accession No. BC006231)을 주형으로 사용하고 서열번호 64(p50-F: 5'-GCTGAATCTGTATGGCAGAAGATGATCCATATT-3') 및 서열번호 65(p50-R: 5'-GCTCCGGGGCTTAATGCTTCATCCAGCATTAGA-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pHcR-C3 벡터의 EcoRI/XmaI 위치에 삽입하여 제작하였다.
- [0168] 상기에서 제조한 제1구성물 및 2종의 제2구성물들을 HEK293 세포주에 형질전환하였고, 이를 상기 실시예 <4-1>에서와 같이 하여 형광을 확인하였다.
- [0169] 그 결과, 도 13에서 보듯이, 제1구성물(TMD-mRFP-ReIA, 적색)과 첫 번째 제2구성물(EGFP-IkB, 녹색) 및 두 번째 제2구성물(HcR-p50, 청색)이 모두 동일하게 PMA 자극에 의해 세포막으로 이동한 것을 확인할 수 있었다. 아울러, 이동모듈을 포함하는 제1구성물이 없는 대조군(TMD-mRFP)에서는 PMA 자극에 의해 분포 변화가 나타나지 않음이 확인되었다(결과미도시).
- [0170] 이러한 실험한 결과는 제1구성물을 포함한 세 가지 단백질 복합체의 결합을 검증할 수 있다는 것을 의미할 뿐만 아니라, 제1구성물의 형광표지를 제거하여 일반적으로 사용되는 형광현미경 또는 공초점 레이저형광현미경 등을 사용하여 EGFP, mRFP, HcRed 및 BFP 등 4가지 복합체의 결합여부를 검증할 수 있으며, 현재까지 알려진 다양한 형광단백질 증과 범용화 단계에 진입한 Meta(Carl Zeiss) 또는 Spetral(Leica) 기능을 이용할 경우 제1구성물 외에 최소한 BFP, CFP, GFP, RFP, Far-Red 등 5가지 이상의 단백질 복합체를 동시에 검증할 수 있음을 의미한다.
- [0171] <실시예 5>
- [0172] 효모교잡법에 의해 스크리닝된 후보물질의 검증
- [0173] 효모교잡법(Y2H, yeast two-hybrid)은 현재 살아있는 세포내에서 단백질결합을 스크리닝하는 가장 일반적인 방법으로 사용되고 있을 뿐 아니라 지금까지 알려진 신약표적 스크리닝 방법 중 약 많은 부분을 점유하는 대표적인 방법이다. 그러나 효모교잡법은 높은 위양성(false-positive)과 효모를 사용한다는 단점을 가지고 있어 신약 표적 및 신약후보 검증에 약점을 가지고 있다는 것이 주지의 사실이다. 따라서 본 실험에서는 효모교잡법에 의해서 스크리닝된 후보물질을 검증할 수 있는 방법으로서의 본 발명의 적용성을 분석하였다.
- [0174] 항생제 내성균인 슈퍼박테리아와 관련된 OmpA(GenBank accession No. AY485227) 단백질과 인간 세포내 결합단백질에 대하여 Y2H 방법으로 스크리닝한 결과, 4종의 양성 클론을 확인할 수 있었다. (전체 라이브러리 스크리닝 클론 : 1.188×10^5 클론; 제1차 patch/streak 스크리닝 : 137 클론; 제2차 re-transformation 스크리닝 : 54 클론; 제3차 prey auto-activation test 스크리닝 : 14 클론; 제4차 nucleotide sequencing confirmation : 4 클론)
- [0175] 양성으로 나타난 상기 4종의 클론 중 EEF1A1(GenBank accession No. BC009875), FAM14B(GenBank accession No. BC015423), DDX31(GenBank accession No. AK027002)에 대해서 OmpA 단백질과의 결합여부를 검증하였다. 이를 위하여, 제1구성물(TMD-mRFP-OmpA) 및 제2구성물들(EGFP-EEF1A, EGFP-FAM14B 및 EGFP-DDX31)을 다음과 같이 제

조하였다.

- [0176] 제1구성물 TMD-mRFP-OmpA는 pET28a-OmpA(GenBank Accession No.: AY185227) 벡터를 주형으로 사용하고 서열번호 66(OmpA-F: 5'-GCTGAATTCTGATGAAATTGAGTCGTATTGCAC-3') 및 서열번호 67(OmpA-R: 5'-GCTGGATCCTTATTGAGCTGCTGCAGGAGC-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pTMD-mRFP-C3 벡터의 EcoRI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.
- [0177] 제2구성물들 중 EGFP-EEF1A는 pOTB7-EEF1A(GenBank Accession No. BC009875) 벡터를 주형으로 사용하고 서열번호 68(EEF1A-F: 5'-GCTGAATTCTGATGGGAAAGGAAAAGACTCA-3') 및 서열번호 69(EEF1A-R: 5'-GCTGGATCCCCTATTTAGCCTTCTGAGCTT-3')의 프라이머를, EGFP-FAM14B는 pCMV-SPORT6-FAM14B(GenBank Accession No.: BC015423) 벡터를 주형으로 사용하고 서열번호 70(FAM14B-F: 5'-GTCGAATTCTGATGGGAAAGGAGAGTGGATGG-3') 및 서열번호 71(FAM14B-R: 5'-GTCGGATCCCCTCAGCTGGAAGGGGGTGAAC-3')의 프라이머를, EGFP-DDX31은 pME18S-FL3-DDX31 벡터를 주형으로 사용하고 서열번호 72(DDX31-F: 5'-GTCGAATTCTGATGTTTTCTCCAAAGAAGCAT-3') 및 서열번호 73(DDX31-R: 5'-GTCGGATCCCCTAAACTTTCTGGGAAGTCTTG-3')의 프라이머를 각각 사용하여 PCR 증폭한 후 각 수득물을 pEGFP-C3 벡터의 EcoRI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.
- [0178] 상기에서 제조한 제1구성물 및 제2구성물을 HEK293 세포주에 형질전환하였고, 이를 상기 실시예 <4-1>에서와 같이 하여 형광을 확인하였다.
- [0179] 그 결과, 도 14에서 보듯이, EEF1A1(가)과 FAM14B(나)의 경우 OmpA가 결합된 제1구성물을 따라서 세포막으로 이동하지 못하여 실제로는 OmpA와 결합하지 않음을 알 수 있었고(위-양성), DDX31(다)은 OmpA가 결합된 제1구성물을 따라서 세포막으로 이동하여 OmpA와 결합하는 양성으로 확인되었다. 따라서 본 발명의 방법은 효모교잡법에 비해서 높은 정확성을 가짐을 알 수 알 수 있었으며, 상기 방법에 의한 양성결합을 재검증할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0180] <실시예 6>
- [0181] 실시간 분석을 이용한 항암제 효능 검증
- [0182] 잠재적 발암유전자로 알려진 p53 단백질은 최소한 mdm2 단백질의 결합의 의해 발암이 촉진되는 것으로 알려져 있으며 이를 저해할 수 있는 물질인 nutlin3가 강력한 항암제로 사용될 수 있음이 많은 연구를 통해 확인되었다. 비코아아사의 SPR 기술(surface plasmon resonance technology)을 사용하여 시험관내에서 실시한 결합저해 실험에 의하면 p53과 mdm2의 결합은 최소한 1 마이크로몰라 이상 nutlin3을 사용할 때 90% 이상의 결합저해 효과를 나타냈으며, 약 50% 저해가 일어나는 농도(IC50; median inhibitory concentration)는 90 나노몰라인 것으로 측정되었다(Vassilev, L. T. et. al., 2004, Science 303, 844-848).
- [0183] 본 실험에서는 현재까지 확인할 수 없었던 p53(GenBank accession No. NM_00546)과 mdm2의 상호결합 및 결합저해제 nutlin3의 실시간 결합저해 실험을 살아있는 인간 세포주에서 nutlin3의 작용여부 및 작용농도를 확인하였다. 이를 위하여, 제1구성물(TMD-mRFP-p53N) 및 제2구성물(AzG-mdm2N)을 다음과 같이 제조하였다.
- [0184] 제1구성물 TMD-mRFP-p53N은 pGEX-4T1-p53N 벡터(p53; GenBank accession No. NM_000546)를 주형으로 사용하고 서열번호 74(p53N-F: 5'-GTCGAATTCTCATGGAGGAGCCGAGTCAGAT-3') 및 서열번호 75(p53N-R: 5'-GTCGGATCCTCACACGGGGGAGCAGCCT-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 제1구성물 벡터(pTMD-mRFP-C3 벡터)의 EcoRI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.
- [0185] 제2구성물 EGFP-mdm2N는 pGEX-4T1-mdm2N 벡터(mdm2; GenBank accession No. NM_002392)를 주형으로 사용하고 서열번호 76(mdm2N-F: 5'-GTCGAATTCTGATGTGCAATACCAACATGTCTGTACC-3') 및 서열번호 77(mdm2N-R: 5'-GTCGGATCCTCATACTACCAAGTTCCTGTAGAT-3')의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 수득물을 pAzG-C3 벡터의 EcoRI/BamHI 위치에 삽입하여 제작하였다.
- [0186] 상기에서 제조한 제1구성물 및 제2구성물을 HEK393 세포주에 형질전환하였고, 이를 상기 실시예 <4-1>에서와 같이 하여 형광을 확인하였다. 아울러, nutlin3는 0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 nM 까지 처리하였으며, 이의 확인은 실시예 <3-2>에서와 같이 5분간 nutlin3를 처리한 후 3.8% 포름알데히드(formaldehyde)로 세포를 고정하여 공초점 현미경(Confocal microscope, Carl Zeiss LSM 510)를 통해 적색형광이 발현된 200개의 세포를 무작위로 선정하고 농도별 적색형광의 세포막 분포세포의 수를 측정하였다
- [0187] 그 결과, 도 15에서 보듯이, mdm2(녹색, 가운데 패널)는 외부자극(PMA)에 의해 p53(적색, 왼쪽 패널)과 함께 살아있는 세포에서 세포막으로의 이동하였으나(도 15 가 참조), 저해제 nutlin3를 처리한 경우 그 분포가 변하지

않는 결과를 나타내었다(도 15 나 참조). 이는 nutlin3를 처리하지 않은 경우 mdm2가 p53과 결합하나, nutlin3를 처리하는 경우 mdm2와 p53의 결합이 저해됨을 나타낸다. 이 결과는 본 발명이 살아있는 세포에서 일어나는 단백질 상호작용을 직접 분석할 수 있다는 증거이며 결합과 관련된 신약발굴 기법으로 유용하게 사용될 수 있다는 것을 보여준다.

[0188] 또한 도 16에서 보듯이, 적색형광(제1구성물)이 발현된 200개의 세포를 무작위로 선정하고 농도별 녹색형광(제2구성물)의 세포막 분포세포의 수를 측정한 결과, 살아있는 인간세포주(HEK293)에서의 결합 저해 농도는 제조합 단백질을 이동한 시험관내 실험(Vassilev, L. T. et. al., 2004, Science 303, 844-848)에서 결정된 90% 이상의 결합저해 효과가 나타나는 농도인 1 마이크로몰라와 달리 20 나노몰라(nM)에서 95% 이상의 결합저해 효과가 나타나는 것으로 분석되어 본 발명의 분석 민감도가 기존의 시험관내 실험과 비교해 약 50배 이상의 분석 정밀도를 가진다는 것을 알 수 있었다. 아울러, 이러한 결과는 본 발명이 시험관내 실험을 통한 결합저해 실험에서 나온 결과를 세포 또는 개체를 통한 연구 및 인간을 대상으로 한 임상실험의 위험성을 배제할 수 있는 기술을 제공할 수 있음을 의미한다.

산업이용 가능성

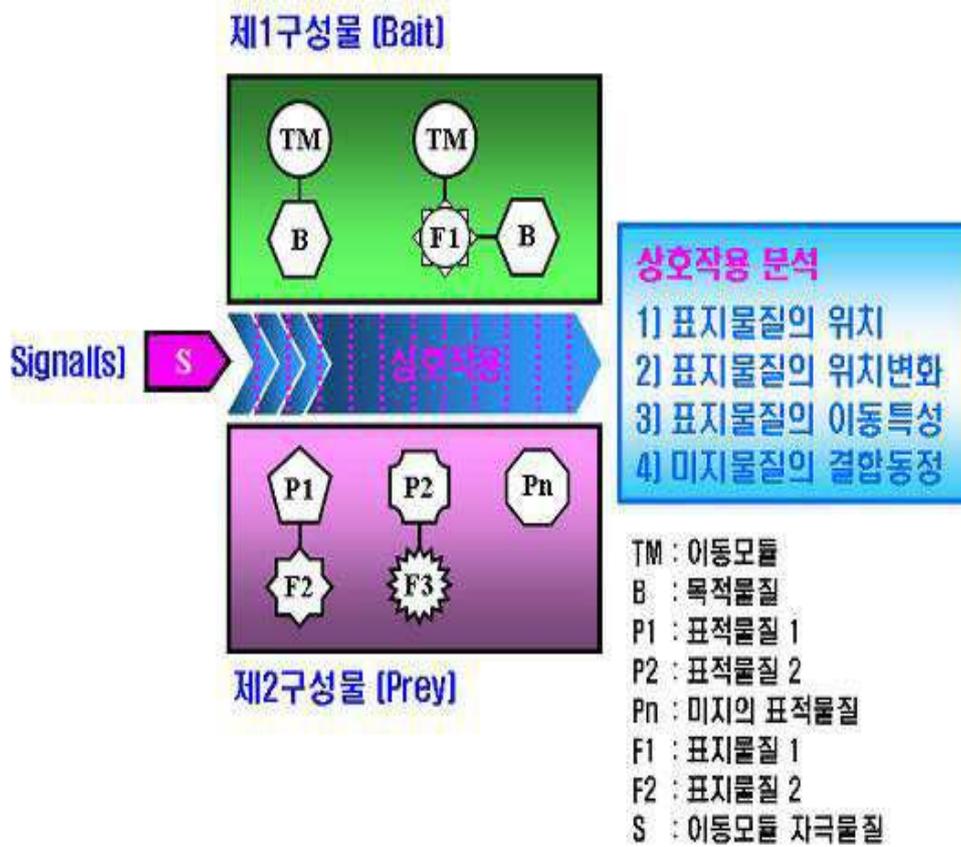
[0189] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 세포내에서 일어나는 물질결합(binding) 및 상호작용(interaction)을 살아있는 세포에서 실시간으로 검출할 수 있는 방법 및 이를 이용한 상호작용을 변화시키는 물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 현재까지 알려진 시험관내 방법 (in vitro 및 생화학적 방법), 항체결합 방법 (항체침전법), 복합 형광단백질 에너지전이 (FRET), 분할 단백질의 재결합 (Bi-FC) 및 형광간섭 (FCS) 등 기존의 생체물질 상호작용 탐색 방법들이 가지는 부정확성 및 복잡성 등의 단점을 극복하였고, 구성물 모두에 표지를 함으로써 정확도를 더욱 높일 수 있을 뿐 아니라 세포 소기관 또는 소기관별 결합여부를 판별할 수 있어 종래의 분석기술과 차별화되는 새로운 실시간 무항체 분석 방법을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0190] 도 1은 본 발명의 기본 구성물 및 분석지표를 나타낸다.
- [0191] 도 2는 본 발명의 결합 및 비결합에 대한 기본 개념도를 나타낸다.
- [0192] 도 3은 본 발명의 결합 및 비결합 분석 모식도를 나타낸다.
- [0193] 도 4는 본 발명에서 제1구성물(가) 및 제2구성물(나)들의 구성의 일례를 나타낸다.
- [0194] 도 5는 제1구성물 벡터 및 제2구성물 벡터의 외부자극에 의한 분포 변화를 나타낸 것이다.
- [0195] 도 6은 PMA 농도별 제1구성물 벡터(pTMD-mRFP-C3 벡터)의 분포 변화를 나타낸 것이다.
- [0196] 도 7은 제1구성물(TMD-mRFP-Bait 및 TMA-mRFP-Bait, TMB-mRFP-Bait) 벡터들의 이동효율 및 분포도를 나타낸다.
- [0197] 도 8는 제1구성물(TMD-mRFP-p53-NES) 및 제2구성물 벡터의 분포도를 나타낸다.
- [0198] 도 9은 제1구성물(TMD-mRFP-p53-NLS) 및 제2구성물 벡터의 분포도를 나타낸다.
- [0199] 도 10은 p53 단백질과 SV40T 단백질의 결합을 본 발명의 방법을 이용하여 분석한 것이다.
- [0200] 도 11은 KRS(Lysyl-tRNA synthetase)와 JTV1(p38), Gag 및 라미닌 수용체(Laminin receptor, LR) 간의 결합을 분석한 것이다.
- [0201] 도 12는 공초점 레이저형광현미경을 이용하여 RelA와 IκB의 결합을 실시간으로 분석한 것이다.
- [0202] 도 13은 3가지 단백질 복합체의 결합을 분석한 것이다.
- [0203] 도 14는 효모교잡법(Y2H)에 의해 스크리닝된 양성 결합 후보를 검증한 결과이다.
- [0204] 도 15는 p53 단백질과 mdm2 단백질의 결합 및 항암제 nutlin3의 결합 저해를 분석한 것이다.
- [0205] 도 16은 항암제 nutlin3의 결합 억제 농도를 분석한 것이다.

도면

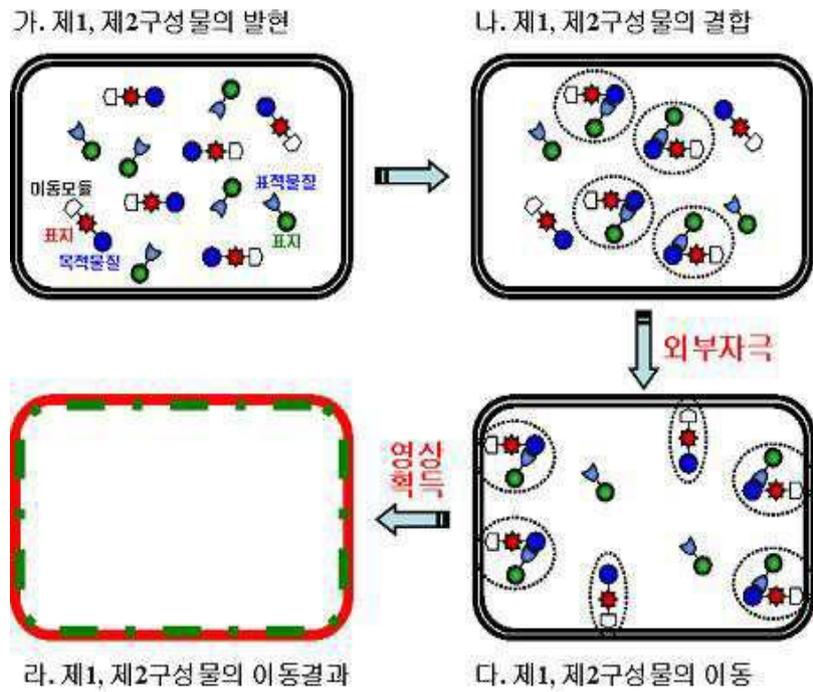
도면1



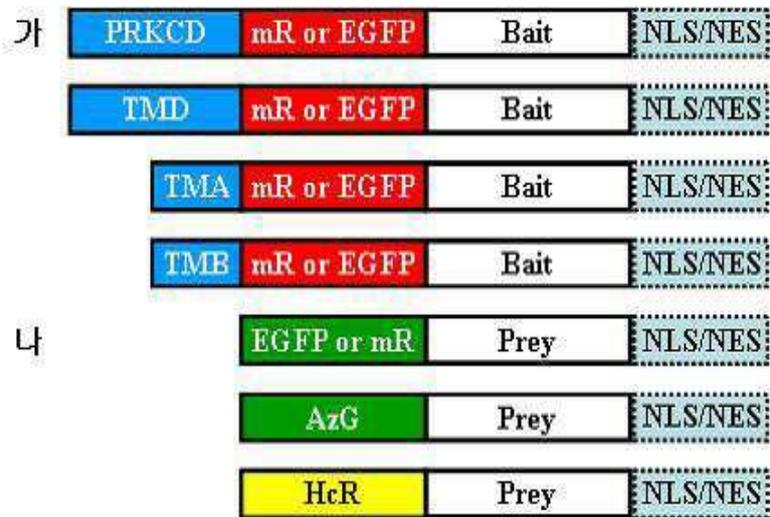
도면2



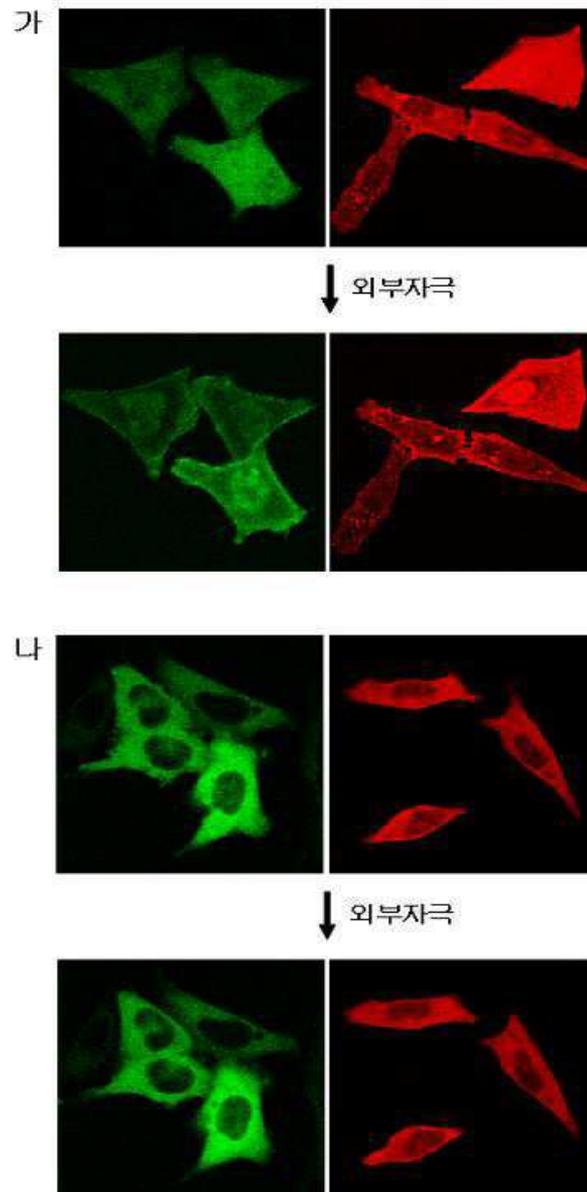
도면3



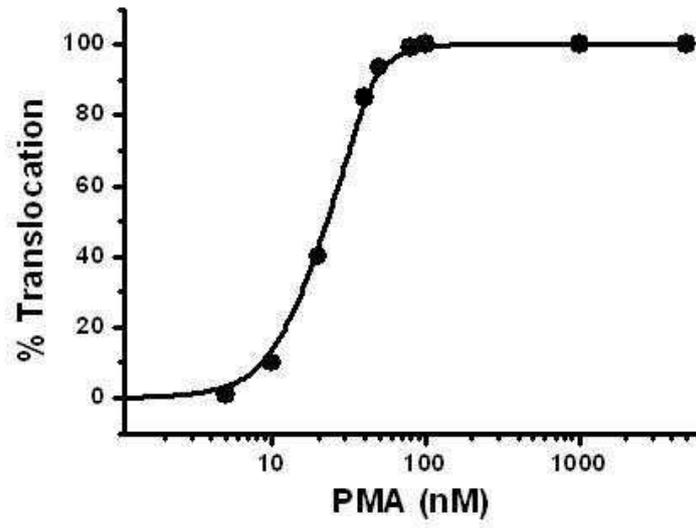
도면4



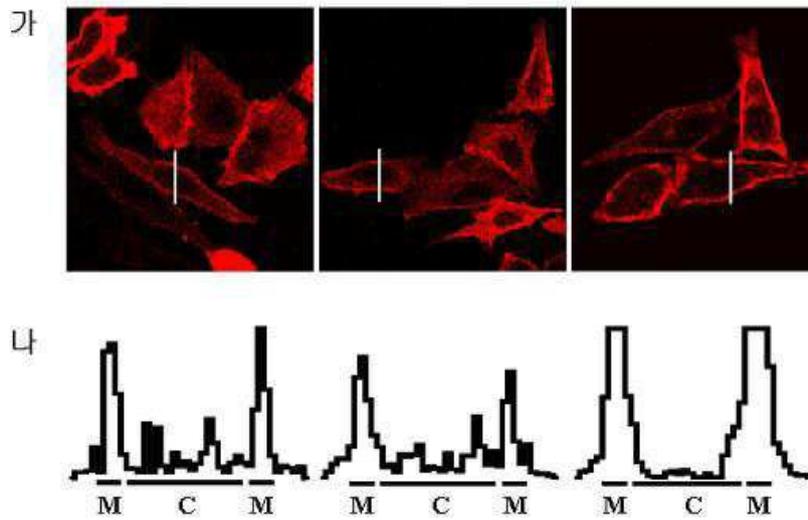
도면5



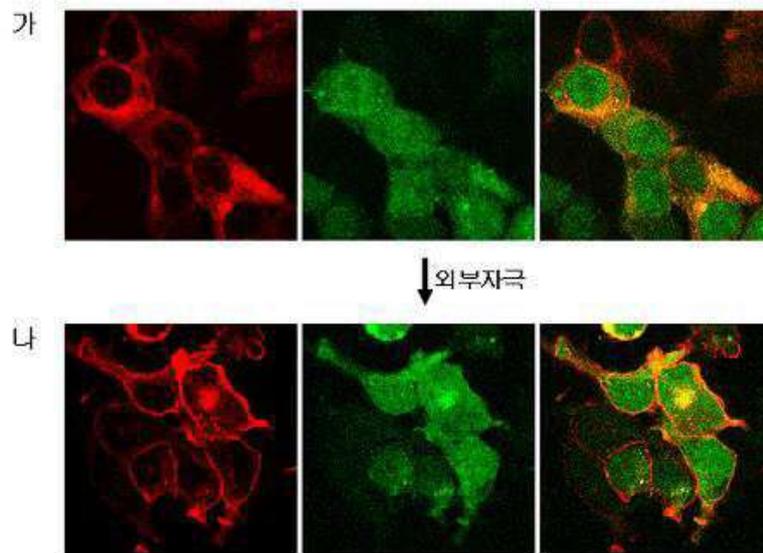
도면6



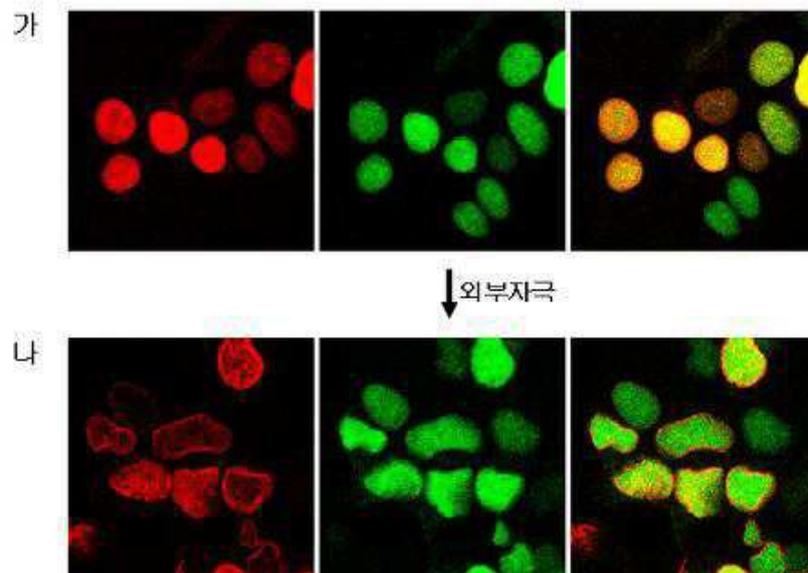
도면7



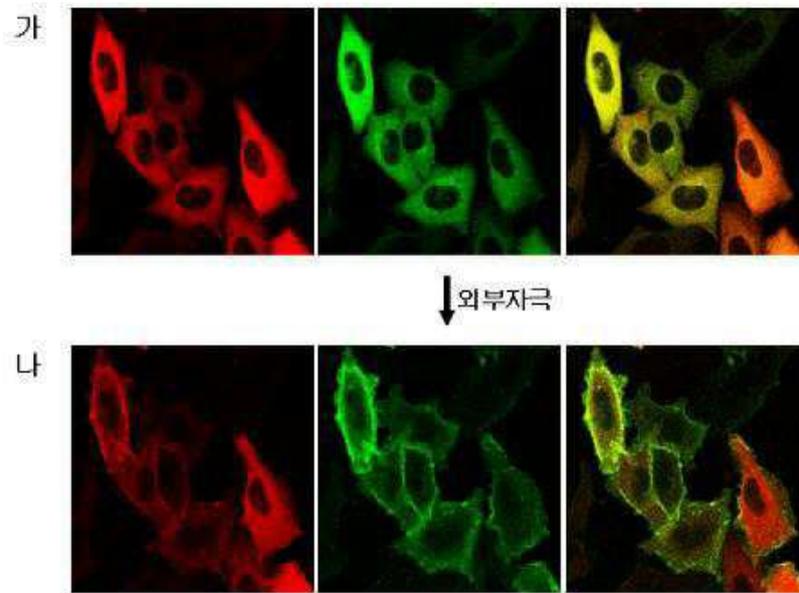
도면8



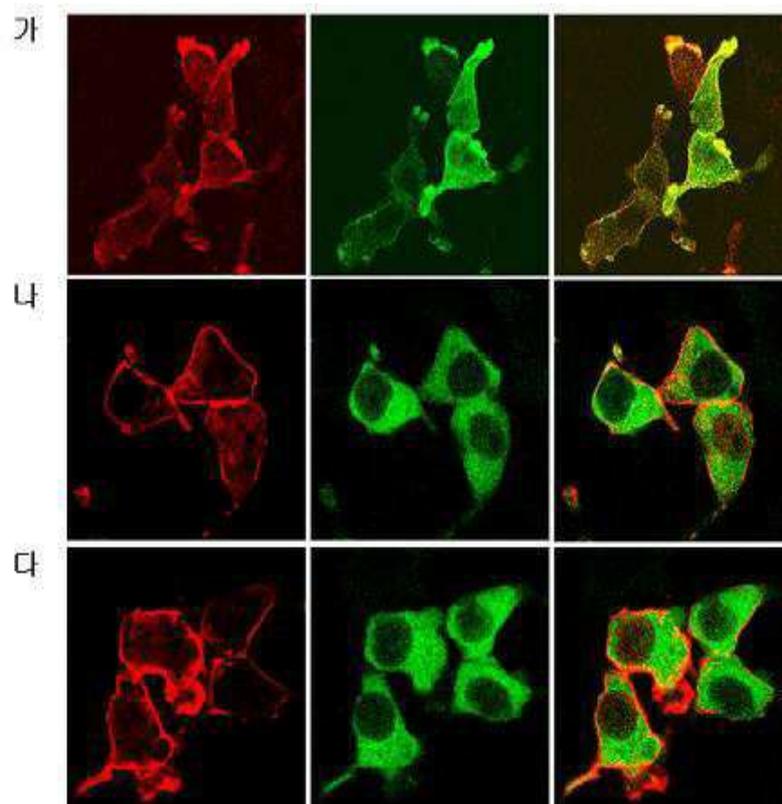
도면9



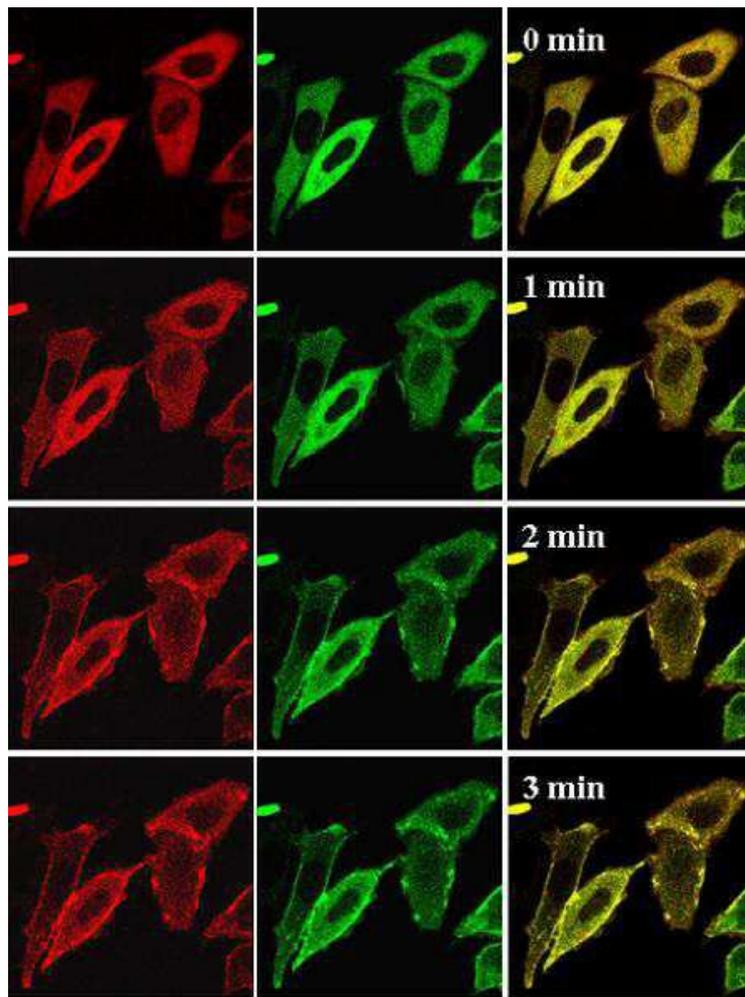
도면10



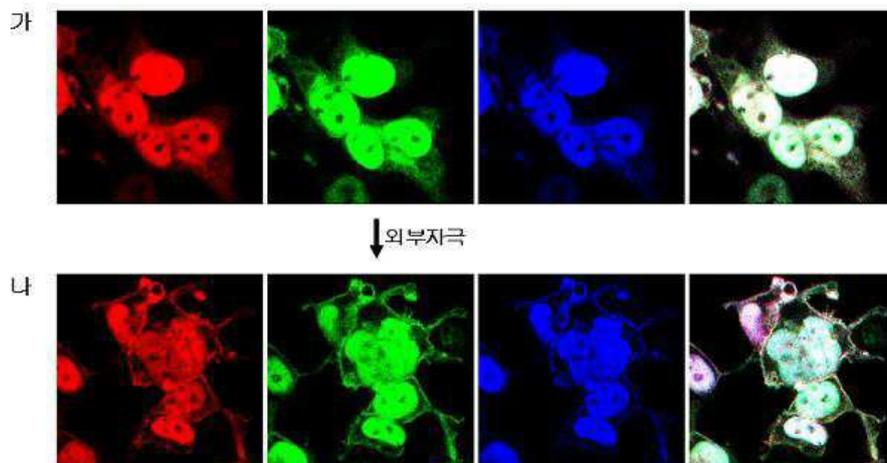
도면11



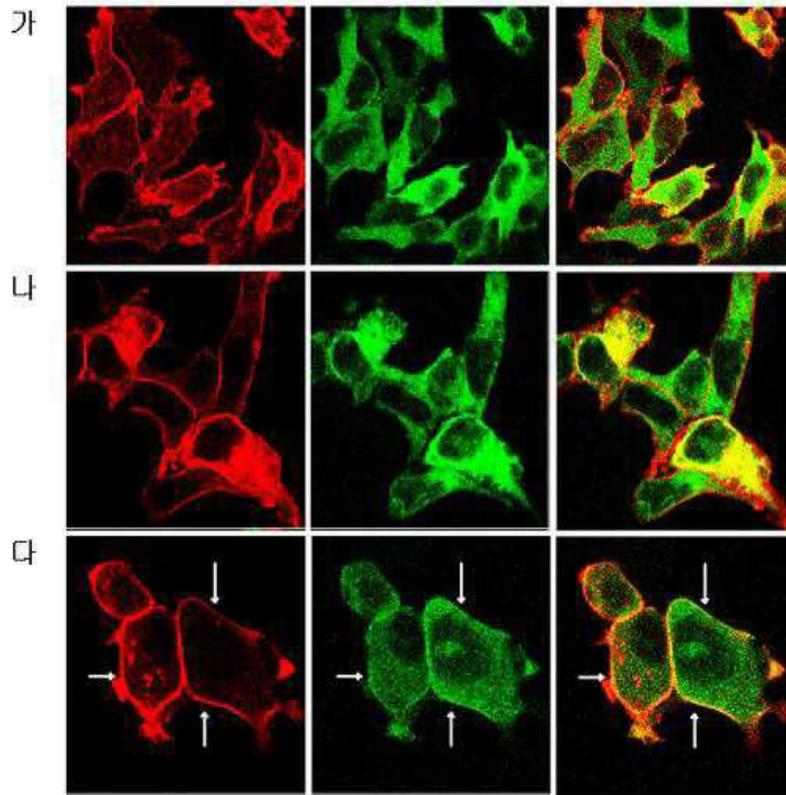
도면12



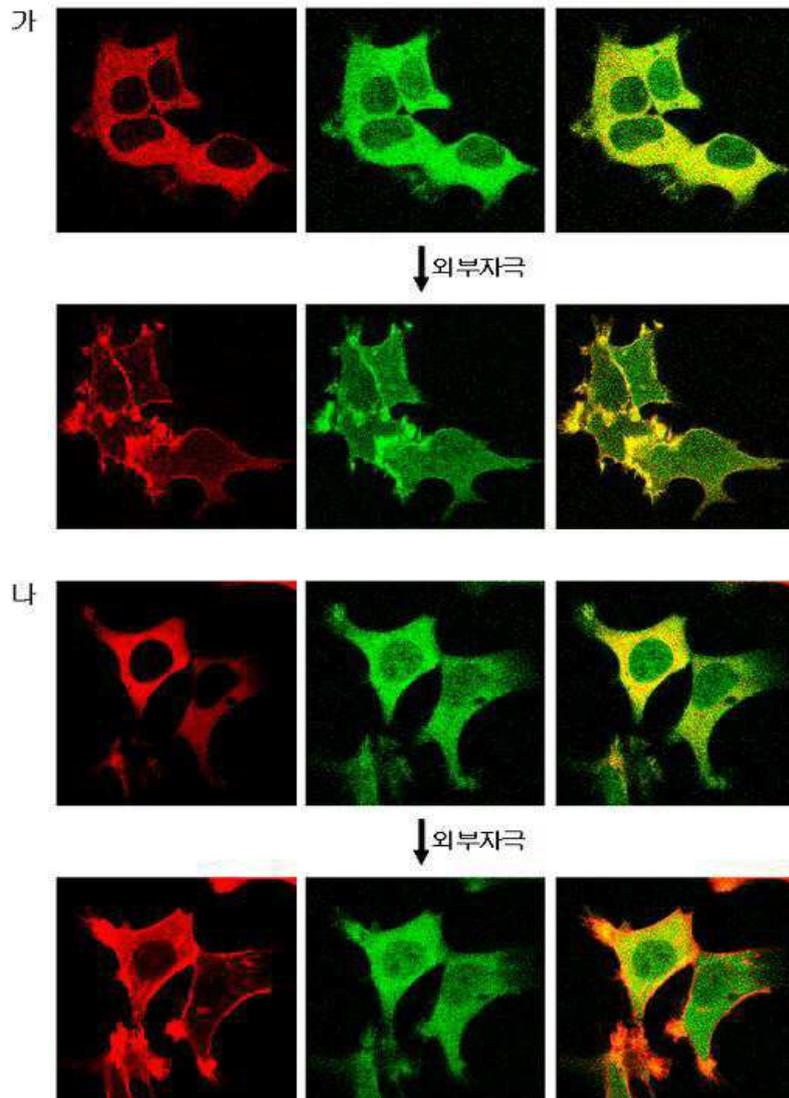
도면13



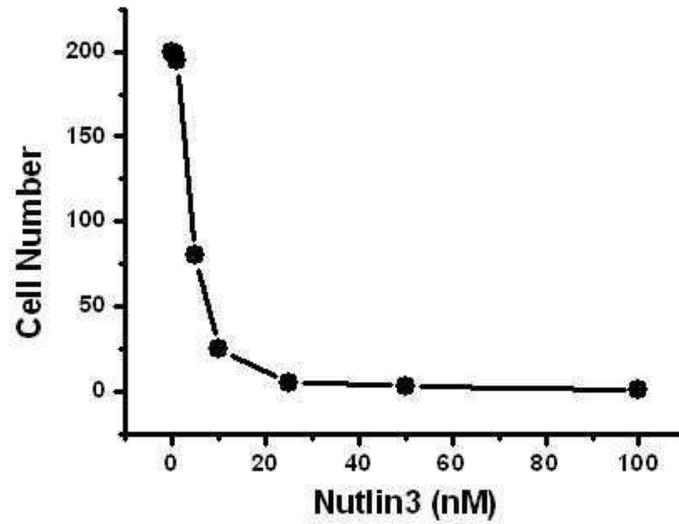
도면14



도면15



도면16



서열목록

<110> Korea basic science institute
 <120> Method for detecting interactions between two and more biological macromolecules

<130> NP08-0119

<160> 77

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 676
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Met Ala Pro Phe Leu Arg Ile Ala Phe Asn Ser Tyr Glu Leu Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asn Gln Pro Phe Cys Ala Val Lys Met
 20 25 30

Lys Glu Ala Leu Ser Thr Glu Arg Gly Lys Thr Leu Val Gln Lys Lys
 35 40 45

Pro Thr Met Tyr Pro Glu Trp Lys Ser Thr Phe Asp Ala His Ile Tyr
 50 55 60

Glu Gly Arg Val Ile Gln Ile Val Leu Met Arg Ala Ala Glu Glu Pro
 65 70 75 80

Val Ser Glu Val Thr Val Gly Val Ser Val Leu Ala Glu Arg Cys Lys
 85 90 95

Lys Asn Asn Gly Lys Ala Glu Phe Trp Leu Asp Leu Gln Pro Gln Ala
 100 105 110

Lys Val Leu Met Ser Val Gln Tyr Phe Leu Glu Asp Val Asp Cys Lys
 115 120 125

Gln Ser Met Arg Ser Glu Asp Glu Ala Lys Phe Pro Thr Met Asn Arg
 130 135 140

Arg Gly Ala Ile Lys Gln Ala Lys Ile His Tyr Ile Lys Asn His Glu
 145 150 155 160

Phe Ile Ala Thr Phe Phe Gly Gln Pro Thr Phe Cys Ser Val Cys Lys
 165 170 175

Asp Phe Val Trp Gly Leu Asn Lys Gln Gly Tyr Lys Cys Arg Gln Cys
 180 185 190

Asn Ala Ala Ile His Lys Lys Cys Ile Asp Lys Ile Ile Gly Arg Cys
 195 200 205

Thr Gly Thr Ala Ala Asn Ser Arg Asp Thr Ile Phe Gln Lys Glu Arg
 210 215 220

Phe Asn Ile Asp Met Pro His Arg Phe Lys Val His Asn Tyr Met Ser
 225 230 235 240

Pro Thr Phe Cys Asp His Cys Gly Ser Leu Leu Trp Gly Leu Val Lys
 245 250 255

Gln Gly Leu Lys Cys Glu Asp Cys Gly Met Asn Val His His Lys Cys
 260 265 270

Arg Glu Lys Val Ala Asn Leu Cys Gly Ile Asn Gln Lys Leu Leu Ala

Asp Tyr Ile Ala Pro Glu Ile Leu Gln Gly Leu Lys Tyr Thr Phe Ser
 515 520 525

Val Asp Trp Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Tyr Glu Met Leu Ile Gly
 530 535 540

Gln Ser Pro Phe His Gly Asp Asp Glu Asp Glu Leu Phe Glu Ser Ile
 545 550 555 560

Arg Val Asp Thr Pro His Tyr Pro Arg Trp Ile Thr Lys Glu Ser Lys
 565 570 575

Asp Ile Leu Glu Lys Leu Phe Glu Arg Glu Pro Thr Lys Arg Leu Gly
 580 585 590

Val Thr Gly Asn Ile Lys Ile His Pro Phe Phe Lys Thr Ile Asn Trp
 595 600 605

Thr Leu Leu Glu Lys Arg Arg Leu Glu Pro Pro Phe Arg Pro Lys Val
 610 615 620

Lys Ser Pro Arg Asp Tyr Ser Asn Phe Asp Gln Glu Phe Leu Asn Glu
 625 630 635 640

Lys Ala Arg Leu Ser Tyr Ser Asp Lys Asn Leu Ile Asp Ser Met Asp
 645 650 655

Gln Ser Ala Phe Ala Gly Phe Ser Phe Val Asn Pro Lys Phe Glu His
 660 665 670

Leu Leu Glu Asp
 675

- <210> 2
- <211> 2028
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 2
 atggcgccgt tctgcgcat cgcttcaac tctatgagc tgggctccct gcaggccgag 60

gacgaggcga accagccctt ctgtgccgtg aagatgaagg aggcgctcag cacagagcgt 120

gggaaaaacac tggcgcagaa gaagccgacc atgtatcctg agtggaaagtc gacgttcgac 180
 gccacatct atgaggggcg cgtcatccag attgtgctaa tgcgggcagc agaggagcca 240
 gtgtctgagg tgaccgtggg tgtgtcggig ctggccgagc gctgcaagaa gaacaatggc 300
 aaggctgagt tctggctgga cctgcagcct caggccaagg tgttgatgic tgttcagtat 360
 ttcctggagg acgtggattg caaacagtct atgcgcagtg aggacgaggc caagttcca 420
 acgatgaacc gccgcggagc catcaaacag gccaaaatcc actacatcaa gaacatgag 480
 tttatcgcca ccttctttgg gcaaccacc tctgttctg tgtgcaaaga ctttgtctgg 540
 ggctcaaca agcaaggcta caaatgcagg caatgtaacg ctgcatcca caagaaatgc 600
 atcgacaaga tcatcggcag atgcactggc accgcggcca acagccggga cactatattc 660
 cagaaagaac gcttcaacat cgacatgccg caccgcttca aggttcacaa ctacatgagc 720
 cccaccttct gtgacctg cggcagcctg cctcggggac tgggaagca gggattaaag 780
 tgtgaagact gcggcatgaa tgtgcacat aatgccggg agaaggtggc caacctctgc 840
 ggcatcaacc agaagctttt ggctgaggcc ttgaaccaag tcaccagag agcctcccgg 900
 agatcagact cagcctctc agagcctggt gggatatatc agggtttcga gaagaagacc 960
 ggagtgtctg gggaggacat gcaagacaac agtgggacct acggcaagat ctgggagggc 1020
 agcagcaagt gcaacatcaa caacttcac tccacaagg tcctgggcaa aggcagcttc 1080
 gggaaggtgc tgcttgaga gctgaaggc agaggagagt actttgcat caagccctc 1140
 aagaagatg tggctctgat cgacacgac gtggagtgca ccatggttga gaagcgggtg 1200
 ctgacacttg ccgcagagaa tccctttctc acccactca tetgcactt ccagaccaag 1260
 gaccacctgt tctttgtgat ggagttctc aacggggggg acctgatgta ccacatccag 1320

gacaaaggcc gctttgaact ctaccgtgcc acgttttatg ccgctgagat aatgtgtgga 1380

ctgcagtttc tacacagcaa gggcatcatt tacagggacc tcaaactgga caatgtgctg 1440

ttggaccggg atggccacat caagattgcc gactttggga tgtgcaaaga gaacatattc 1500

ggggagagcc gggccagcac cttctgcggc acccctgact atatcgcccc tgagatccta 1560

cagggcctga agtacacatt ctctgtggac tgggtgtctt tcggggtcct tctgtacgag 1620

atgctcattg gccagtcacc cttccatggt gatgatgagg atgaactctt cgagtccatc 1680

cggtgtggaca cgccacatta tccccgctgg atcaccaagg agtccaagga catcctggag 1740

aagctctttg aaaggaacc aaccaagagg ctgggagtga cgggaaacat caaaatccac 1800

cccttcttca agaccataaa ctggactctg ctggaaaagc ggaggttggga gccacccttc 1860

aggcccaaag tgaagtcacc cagagactac agtaactttg accaggagtt cctgaacgag 1920

aaggcgcgcc tctcctacag cgacaagaac ctcatcgact ccatggacca gtctgcattc 1980

gctggcttct cctttgtgaa ccccaaattc gagcacctcc tggaagat 2028

<210> 3
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMA

<400> 3
 Met Lys Gln Ala Lys Ile His Tyr Ile Lys Asn His Glu Phe Ile Ala
 1 5 10 15
 Thr Phe Phe Gly Gln Pro Thr Phe Cys Ser Val Cys Lys Asp Phe Val
 20 25 30

Trp Gly Leu Asn Lys Gln Gly Tyr Lys Cys Arg Gln Cys Asn Ala Ala
 35 40 45

Ile His Lys Lys Cys Ile Asp Lys Ile Ile Gly Arg Cys Thr Gly Thr
 50 55 60

Ala Ala Asn Ser Arg Asp Thr
 65 70

<210> 4
 <211> 213
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMA

<400> 4
 atgaaacagg ccaaaatcca ctacatcaag aaccatgagt ttatcgccac cttctttggg 60
 caaccacct tctgttctgt gtgcaaagac tttgtctggg gcctcaacaa gcaaggctac 120
 aaatgcaggc aatgtaacgc tgccatccac aagaaatgca tcgacaagat catcggcaga 180
 tgcaactggca ccgcgcccaa cagccgggac act 213

<210> 5
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMB

<400> 5
 Met Gln Lys Glu Arg Phe Asn Ile Asp Met Pro His Arg Phe Lys Val
 1 5 10 15

His Asn Tyr Met Ser Pro Thr Phe Cys Asp His Cys Gly Ser Leu Leu

20 25 30

Trp Gly Leu Val Lys Gln Gly Leu Lys Cys Glu Asp Cys Gly Met Asn
 35 40 45

Val His His Lys Cys Arg Glu Lys Val Ala Asn Leu Cys Gly Ile Asn
 50 55 60

Gln Lys Leu Leu Ala Glu Ala
 65 70

<210> 6
 <211> 213
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMB

<400> 6
 atgcagaag aacgctcaa catgcacatg cgcaccgct tcaaggttca caactacatg 60
 agccccacct tctgtgacca ctgcggcagc ctgctctggg gactggtgaa gcagggatta 120
 aagtgtgaag actgcggcat gaatgtgcac cataaatgcc gggagaaggt ggccaacctc 180
 tgcggcatca accagaagct tttggctgag gcc 213

<210> 7
 <211> 676
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Protein kinase C mutant, TMD

<400> 7
 Met Ala Pro Phe Leu Arg Ile Ala Phe Asn Ser Tyr Glu Leu Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asn Gln Pro Phe Cys Ala Val Lys Met
 20 25 30

Lys Glu Ala Leu Ser Thr Glu Arg Gly Lys Thr Leu Val Gln Lys Lys
 35 40 45

Pro Thr Met Tyr Pro Glu Trp Lys Ser Thr Phe Asp Ala His Ile Tyr
 50 55 60

Glu Gly Arg Val Ile Gln Ile Val Leu Met Arg Ala Ala Glu Glu Pro
 65 70 75 80

Val Ser Glu Val Thr Val Gly Val Ser Val Leu Ala Glu Arg Cys Lys
 85 90 95

Lys Asn Asn Gly Lys Ala Glu Phe Trp Leu Asp Leu Gln Pro Gln Ala
 100 105 110

Lys Val Leu Met Ser Val Gln Tyr Phe Leu Glu Asp Val Asp Cys Lys
 115 120 125

Gln Ser Met Arg Ser Glu Asp Glu Ala Lys Phe Pro Thr Met Asn Arg
 130 135 140

Arg Gly Ala Ile Lys Gln Ala Lys Ile His Tyr Ile Lys Asn His Glu
 145 150 155 160

Phe Ile Ala Thr Phe Phe Gly Gln Pro Thr Phe Cys Ser Val Cys Lys
 165 170 175

Asp Phe Val Trp Gly Leu Asn Lys Gln Gly Tyr Lys Cys Arg Gln Cys
 180 185 190

Asn Ala Ala Ile His Lys Lys Cys Ile Asp Lys Ile Ile Gly Arg Cys
 195 200 205

Thr Gly Thr Ala Ala Asn Ser Arg Asp Thr Ile Phe Gln Lys Glu Arg
 210 215 220

Phe Asn Ile Asp Met Pro His Arg Phe Lys Val His Asn Tyr Met Ser
 225 230 235 240

Pro Thr Phe Cys Asp His Cys Gly Ser Leu Leu Trp Gly Leu Val Lys
 245 250 255

Gln Gly Leu Lys Cys Glu Asp Cys Gly Met Asn Val His His Lys Cys
 260 265 270

Arg Glu Lys Val Ala Asn Leu Cys Gly Ile Asn Gln Lys Leu Leu Ala
 275 280 285

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

Ala Ser Ser Glu Pro Val Gly Ile Phe Gln Gly Phe Glu Lys Lys Thr
 305 310 315 320

Gly Val Ala Gly Glu Asp Met Gln Asp Asn Ser Gly Thr Tyr Gly Lys
 325 330 335

Ile Trp Glu Gly Ser Ser Lys Cys Asn Ile Asn Asn Phe Ile Phe His
 340 345 350

Lys Val Leu Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Leu Leu Gly Glu Leu
 355 360 365

Lys Gly Arg Gly Glu Tyr Phe Ala Ile Arg Ala Leu Lys Lys Asp Val
 370 375 380

Val Leu Ile Asp Asp Asp Val Glu Cys Thr Met Val Glu Lys Arg Val
 385 390 395 400

Leu Thr Leu Ala Ala Glu Asn Pro Phe Leu Thr His Leu Ile Cys Thr
 405 410 415

Phe Gln Thr Lys Asp His Leu Phe Phe Val Met Glu Phe Leu Asn Gly
 420 425 430

Gly Asp Leu Met Tyr His Ile Gln Asp Lys Gly Arg Phe Glu Leu Tyr
 435 440 445

Arg Ala Thr Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Met Cys Gly Leu Gln Phe Leu
 450 455 460

His Ser Lys Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Asp Asn Val Leu
 465 470 475 480

Leu Asp Arg Asp Gly His Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Met Cys Lys

<220>

<223> Protein kinase C mutant, TMD

<400> 8

atggcgccgt tcctgcgcat cgccttcaac tcctatgagc tgggctcct gcaggccgag	60
gacgaggcga accagccctt ctgtgccgtg aagatgaagg aggcgctcag cacagagcgt	120
gggaaaaac tggtgcagaa gaagccgacc atgtatcctg agtggaaagtc gacgttcgac	180
gcccatctt atgagggcg cgctatccag attgtgctaa tgcgggcagc agaggagcca	240
gtgtctgagg tgaccgtggg tgtgtcggtg ctggccgagc gctgcaagaa gaacaatggc	300
aaggctgagt tctggctgga cctgcagcct caggccaagg tgtgatgtc tgttcagtat	360
ttcctggagg acgtggattg caaacagtct atgcgcagtg aggacgagc caagttccca	420
acgatgaacc gccgcgagc catcaaacag gccaaaatcc actacatcaa gaacatgag	480
tttatcgcca ctttcttgg gcaaccacc tctgttctg tgtgcaaaga ctttgtctgg	540
ggcctcaaca agcaaggcta caaatgcagg caatgtaacg ctgccatcca caagaaatgc	600
atcgacaaga tcatcggcag atgcactggc accgcgcca acagccggga cactatattc	660
cagaaagaac gcttcaacat cgacatgccg caccgttca aggttcacaa ctacatgagc	720
cccaccttct gtgaccactg cggcagcctg ctctggggac tggatgaagca gggattaaag	780
tgtgaagact gcggcatgaa tgtgcacat aaatgccggg agaaggtggc caacctctgc	840
ggcatcaacc agaagctttt ggctgaggcc ttgaaccaag tcaccagag agcctcccgg	900
agatcagact cagcctcctc agagcctgtt gggatatttc agggtttcga gaagaagacc	960
ggagttgctg gggaggacat gcaagacaac agtgggacct acggcaagat ctgggagggc	1020
agcagcaagt gcaacatcaa caacttcac tccacaagg tcctgggcaa aggcagcttc	1080

gggaaaggtgc tgcttgaga gctgaaggc agaggagagt accttgccat caggccctc 1140
 aagaaggatg tggctctgat cgacgacgac gtggagtga ccatggttga gaagcgggtg 1200
 ctgacacttg ccgacagaaa tccctttctc acccacctca tctgcacctt ccagaccaag 1260
 gaccacctgt tctttgat ggagttctc aacggggggg acctgatga ccacatccag 1320
 gacaaaggcc gctttgaact ctaccgtgcc acgttttatg ccgctgagat aatgtgtgga 1380
 ctgcagttc tacacagcaa gggcatcatt tacaggacc tcaaactgga caatgtgctg 1440
 ttggaccggg atggccacat caagattgcc gactttggga tgtgcaaaga gaacatattc 1500
 ggggagagcc gggccagcac cttctgcggc acccctgact atatcgcccc tgagatccta 1560
 caggcctga agtacacatt ctctgtggac tgggtgtctt tcgggtcct tctgtacgag 1620
 atgtcattg gccagtcccc ctccatggt gatgatgagg atgaactctt cgagtccatc 1680
 cgtgtggaca cgccacatta tccccgtgg atcaccaagg agtccaagga catcctggag 1740
 aagctctttg aaaggaacc aaccaagagg ctgggagtga cgggaaacat caaaatccac 1800
 ccttcttca agaccataaa ctggactctg ctggaaaagc ggaggttga gccaccctc 1860
 aggcccaaag tgaagtcacc cagagactac agtaactttg accaggagt cctgaacgag 1920
 aagcgcgcc tctctacag cgacaagaac ctcatcgact ccatggacca gctgcattc 1980
 gctggcttct ccttttgaa ccccaaattc gagcacctcc tggaagat 2028

<210> 9
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGFP

<400> 9

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

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

<211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mRFP

<400> 11
 Met Ala Ser Ser Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val
 1 5 10 15

Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu
 20 25 30

Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val
 35 40 45

Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln
 50 55 60

Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro
 65 70 75 80

Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val
 85 90 95

Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser
 100 105 110

Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn
 115 120 125

Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu
 130 135 140

Ala Ser Thr Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu
 145 150 155 160

Ile Lys Met Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu
 165 170 175

Val Lys Thr Thr Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala
 180 185 190

Tyr Lys Thr Asp Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr
 195 200 205

Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly
 210 215 220

Ala
 225

<210> 12
 <211> 674
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mRFP

<400> 12
 tggcctcctc cgaggacgtc atcaaggagt tcatgcgctt caaggtgctc atggagggct 60

 ccgtgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc tacgagggca 120

 cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcgccccctt gcccttcgcc tgggacatcc 180

 tgtcccctca gttccagtac ggctccaagg cctacgtgaa gcaccccgcc gacatccccg 240

 actacttgaa gctgtccttc cccgagggct tcaagtggga gcgctgatg aacttcgagg 300

 acggcggcgt ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcgag ttcatttaca 360

 aggtgaagct gcgcggcacc aacttcccct ccgacggccc cgtaatgcag aagaagacca 420

 tgggctggga ggctccacc gagcggatgt accccgagga cggcgcctg aaggcgagga 480

 tcaagatgag gctgaagctg aaggacggcg gccactacga cgccgaggtc aagaccacct 540

 acatggccaa gaagcccgtg cagctgcccc ggcctacaa gaccgacatc aagctggaca 600

tcacctccca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgcgcc gagggccgcc 660

actccaccgg cgcc 674

<210> 13
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> AzG

<400> 13
 Met Asp Pro Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Ile Lys Leu
 1 5 10 15

Cys Met Arg Gly Thr Val Asn Gly His Asn Phe Val Ile Glu Gly Glu
 20 25 30

Gly Lys Gly Asn Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Ile Leu Asp Leu Asn Val
 35 40 45

Thr Glu Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Val
 50 55 60

Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Ala Phe Thr Lys Tyr Pro Ala Asp Ile Gln
 65 70 75 80

Asp Tyr Phe Lys Gln Thr Phe Pro Glu Gly Tyr His Trp Glu Arg Ser
 85 90 95

Met Thr Tyr Glu Asp Gln Gly Ile Cys Thr Ala Thr Ser Asn Ile Ser
 100 105 110

Met Arg Gly Asp Cys Phe Phe Tyr Asp Ile Arg Phe Asp Gly Thr Asn
 115 120 125

Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu
 130 135 140

Pro Ser Thr Glu Lys Met Tyr Val Glu Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp
 145 150 155 160

Val Asn Met Arg Leu Leu Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp
 165 170 175

Phe Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Glu Val Arg Leu Pro Asp Ala
 180 185 190

His Lys Ile Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys His Asp Lys Asp Tyr
 195 200 205

Asn Lys Val Lys Leu Tyr Glu Asn Ala Val Ala Arg Tyr Ser Met Leu
 210 215 220

Pro Ser Gln Ala Lys
 225

- <210> 14
- <211> 687
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> AzG

<400> 14
 atggaccca tggtagtgt gattaacca gagatgaaga tcaagctgtg tatgagaggc 60

 actgtaaagc ggcataattt cgtgattgaa ggagaaggaa aaggaaatcc ttacgaggga 120

 acgcagattt tagacctgaa cgtcactgaa ggcgcacctc tgcctttcgc ttacgatatc 180

 ttgacaacag tgttccagta cggcaacagg gcattcacca agtaccaccg agatattcag 240

 gactatttca agcagacttt tctgagggg taccactggg aaagaagcat gacttatgaa 300

 gaccagggca ttgcaccgc cacaagcaac ataagcatga gggcgactg ttttttctat 360

 gacattcgtt ttgatggcac caactttcct cccaatggtc cggttatgca gaagaagact 420

 cttaaattgg agccatccac tgagaaaatg tacgtagagg atggagtgct gaagggtgat 480

gtaaacatgc gcctgttgct tgaaggaggt ggccattatc gatgtgattt caaaactact 540
 taaaaagcaa agaaggaggt ccgtttgccca gacgcgcaca aaattgacca cgcattgag 600
 attttgaagc atgacaaaga ttacaacaag gtcaagctct atgagaatgc cgttgctcgc 660
 tattctatgc tgccgagtca ggccaag 687

<210> 15
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HcR

<400> 15
 Met Val Ser Gly Leu Leu Lys Glu Ser Met Arg Ile Lys Met Tyr Met
 1 5 10 15
 Glu Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Lys Cys Glu Gly Glu Gly Asp
 20 25 30
 Gly Asn Pro Phe Ala Gly Thr Gln Ser Met Arg Ile His Val Thr Glu
 35 40 45
 Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Leu Ala Pro Cys Cys Glu
 50 55 60
 Tyr Gly Ser Arg Thr Phe Val His His Thr Ala Glu Ile Pro Asp Phe
 65 70 75 80
 Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Thr Thr Thr
 85 90 95
 Tyr Glu Asp Gly Gly Ile Leu Thr Ala His Gln Asp Thr Ser Leu Glu
 100 105 110
 Gly Asn Cys Leu Ile Tyr Lys Val Lys Val His Gly Thr Asn Phe Pro
 115 120 125

Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Asn Lys Ser Gly Gly Trp Glu Pro Ser
 130 135 140

Thr Glu Val Val Tyr Pro Glu Asn Gly Val Leu Cys Gly Arg Asn Val
 145 150 155 160

Met Ala Leu Lys Val Gly Asp Arg His Leu Ile Cys His His Tyr Thr
 165 170 175

Ser Tyr Arg Ser Lys Lys Ala Val Arg Ala Leu Thr Met Pro Gly Phe
 180 185 190

His Phe Thr Asp Ile Arg Leu Gln Met Leu Arg Lys Lys Lys Asp Glu
 195 200 205

Tyr Phe Glu Leu Tyr Glu Ala Ser Val Ala Arg Tyr Ser Asp Leu Pro
 210 215 220

Glu Lys Ala Asn
 225

- <210> 16
- <211> 684
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> HcR

<400> 16
 atggtgagcg gcctgctgaa ggagagtatg cgcatacaaga tgtacatgga gggcaccgtg 60

aacggccact acttcaagtg cgagggcgag ggcgacggca accccttcgc cggcaccag 120

agcatgagaa tccacgtgac cgagggcgcc ccctgcct tcgccttcga catcctggcc 180

ccctgtgcg agtacggcag caggaccttc gtcaccaca ccgccgagat ccccgacttc 240

ttcaagcaga gcttccccga gggcttcacc tgggagagaa ccaccaccta cgaggacggc 300

ggcatcctga ccgcccacca ggacaccagc ctggagggca actgcctgat ctacaaggtg 360
 aaggtgcacg gcaccaactt ccccgccgac ggccccgtga tgaagaacaa gagcggcggc 420
 tgggagccca gcaccgaggt ggtgtacccc gagaacggcg tgctgtgctg cgggaacgtg 480
 atggccctga aggtgggcca ccggcacctg atctgccacc actacaccag ctaccggagc 540
 aagaaggccg tgcgcgcctt gaccatgcc ggcttccact tcaccgacat ccggctccag 600
 atgctgcgga agaagaagga cgagtacttc gagctgtacg aggccagcgt ggccccgtac 660
 agcgacctgc ccgagaaggc caac 684

<210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NLS

<400> 17
 Gly Ser Gly Asp Glu Val Glu Gly Val Glu Glu Val Ala Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 Ser Lys Lys Glu Lys Asp Lys
 20

<210> 18
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NLS

<400> 18
 ggctctggtg atgaagtcga aggagtggaa gaagtagcta agaagaagag taaaaaggaa 60

aaggataaa

69

<210> 19
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NES

<400> 19
 Asp Gln Arg Val Ile Ile Lys Leu Asn Ala His Val Gly Asn Ile Ser
 1 5 10 15

Leu Val

<210> 20
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NES

<400> 20
 gaccagcgcg tcatcatcaa gctgaacgcc catgtgggaa acatttcct ggtg

54

<210> 21
 <211> 4727
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pEGFP-C3 vector

<400> 21
 tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttcgc

60

cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggtgaccg cccaacgacc cccgccatt 120

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacccaata gggactttcc attgacgtca 180

atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240

aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcttggcatt atgccagta 300

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360

catggtgatg cggttttggc agtacctaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420

atccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagttg ttttggcacc aaaatcaacg 480

ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 540

acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagcgcta 600

ccggtcgcca ccatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg 660

gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc 720

gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcattctga ccaccgcaa gctgcccgtg 780

ccctggccca cctcgtgac cacctgacc tacggcgtgc agtgettcag ccgctacccc 840

gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgcatgc ccgaaggcta cgtccaggag 900

cgccacctt tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgccgaggt gaagttcgag 960

ggcgacacc tgggaaccg catcgagctg aaggcatcg acttcaagga ggacggcaac 1020

atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac 1080

aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgc acaacatcga ggacggcagc 1140

gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg 1200

cccgacaacc actacctgag caccagctcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc 1260
 gatcacatgg tctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcactctcgg catggacgag 1320
 ctgtacaagt actcagatct cgagctcaag cttcgaattc tgcagtgcac ggtaccgcgg 1380
 gcccgggatc caccgatct agataactga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg 1440
 ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg 1500
 caattgttgt tgtaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca 1560
 tcacaaatth cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac 1620
 tcatcaatgt atcttaacgc gtaaattgta agcgtaataa ttttgtaaa attcgcgtta 1680
 aatthttgtt aaatcagctc atthtttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat 1740
 aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgthttc cagthttgaa caagagtcca 1800
 ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc 1860
 ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tthttgggt cgagtgccg taaagcacta 1920
 aatcggaaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcaacgtg 1980
 gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg 2040
 gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca gggcgctca 2100
 ggtggcactt ttcgggaaa tgtgcgga accctatth gthttthtt ctaatacat 2160
 tcaaatatgt atccgtcat gagacaataa cctgataaa tgcctcaata atattgaaaa 2220
 aggaagagtc ctgaggcga aagaaccagc tgtggaatgt gtgtcagtha ggtgtggaa 2280
 agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcactcaat tagtcagcaa 2340
 ccaggtgtgg aaagtccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcactca 2400

attagtcage aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccac cccgccccta actccgccc 2460
 gtccgccc tctccgccc catggctgac taatTTTTTT tatttatgca gaggccgagg 2520
 ccgctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cTTTTTTTga ggcctaggct 2580
 ttgcaaaga tcgatcaaga gacaggatga ggatcgttc gcatgattga acaagatgga 2640
 ttgcacgag gtctccggc cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa 2700
 cagacaatcg gctgctcga tgcccctgt tccggctgt cagcgcagg gcgcccgtt 2760
 cTTTTgtca agaccgacct gtccgggtcc ctgaatgaac tgcaagacga ggcagcgg 2820
 ctatcgtggc tggccacgac gggcgttct tgcgcagctg tgctcgact gtctactgaa 2880
 gcgggaaggg actggctgct attggcgaa gtgccggggc aggatctct gtcactcac 2940
 ctgtctctg ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggt gcatacgctt 3000
 gatccggcta cctgcccatt cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact 3060
 cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca gggctcgcg 3120
 ccagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg agcatgcccg acggcgagga tctcgtcgtg 3180
 accatggcg atgcctgctt gccgaatac atggtgaaa atggccgctt tctggattc 3240
 atcgactgtg gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggctaccgt 3300
 gatattgctg aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgt tctcgtgct ttacgtatc 3360
 gccgtccc attcgcagcg catgccttc tatgccttc ttgacgagt cttctgagcg 3420
 ggactctggg gttcgaatg accgaccaag cgagcccaa cctgcatca cgagatttcg 3480
 attcaccgc cgccttetat gaaaggttgg gcttcggaat cgtttccgg gacgccggt 3540

ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc tggagttctt cgcccacct agggggaggc 3600
 taactgaaac acggaaggag acaataccgg aaggaaccgg cgctatgacg gcaataaaaa 3660
 gacagaataa aacgcacggg gttgggtcgt ttgttcataa acgcgggggtt cggttccagg 3720
 gctggcactc tgcgatacc ccaccgagac ccattggggg ccaatagcc cgcgtttctt 3780
 cttttcccc accccacccc ccaagtccgg gtgaagccc agggctcgca gccaacgtcg 3840
 gggcggcagg cctgcacata gcctcagggt actcatatat acttagatt gatttaaac 3900
 ttcatTTTTA atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaa 3960
 tccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat 4020
 ctcttgaga tctTTTTT ctgcgctaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc 4080
 taccagcggg ggtttgttg ccggatcaag agctaccaac tcttttccg aaggtaactg 4140
 gcttcagcag agcgcagata ccaataactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc 4200
 acttcaagaa ctctgtagca ccgctacat acctcgtct gctaatectg ttaccagtgg 4260
 ctgctgccag tggcgataag tctgtcttia ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg 4320
 ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa 4380
 cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgttcccc 4440
 aaggagaaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga 4500
 gggagcttcc agggggaac gcctggtatc tttatagtcc tctcgggttt cgccacctct 4560
 gacttgagcg tcgattttg tgatgctcgt cagggggcg gagcctatgg aaaaaccca 4620
 gcaacgggc ctttttacgg ttctggcct tttgctggcc ttttctcac atgttcttc 4680
 ctgcgttate cctgattct gtggataacc gtattaccgc catgcat 4727

<210> 22
 <211> 4685
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pmRFP-C3 vector

<400> 22
 tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60

 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 120

 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacccaata gggactttcc attgacgtca 180

 atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240

 aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 300

 catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360

 catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420

 attccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 480

 ggactttcca aaatgctgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 540

 acggtgggag gtctataataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagcgcta 600

 ccggtcgcca ccatggcctc ctccgaggac gtcacaaagg agttcatgcg cttcaaggtg 660

 cgcattggagg gctccgtgaa cggccacgag ttcgagatcg agggcgaggg cgagggccgc 720

 ccctacgagg gcacccagac cgccaagctg aaggtgacca agggcggccc cctgccttc 780

 gcctgggaca tectgtcccc tcagttccag tacggctcca aggcctacgt gaagcacccc 840

gccgacatcc ccgactactt gaagctgtcc ttccccgagg gcttcaagtg ggagcgcgtg 900

atgaacttcg aggacggcgg cgtggtgacc gtgaccagg actcctcct gcaggacggc 960

gagttcatct acaaggtgaa gctgcgcggc accaacttcc cctccgacgg ccccgtaatg 1020

cagaagaaga ccatgggctg ggaggcctcc accgagcggg tgtaccccgga ggacggcggc 1080

ctgaaggcgg agatcaagat gaggctgaag ctgaaggacg gcgccacta cgacggcggg 1140

gtcaagacca cctacatggc caagaagccc gtgcagctgc ccggcgccta caagaccgac 1200

atcaagctgg acatcacctc ccacaacgag gactacacca tcgtggaaca gtacgagcgc 1260

gccgagggcc gccactccac cggcgccttg tcagatctcg agctcaagct tcgaattctg 1320

cagtcgacgg taccgcgggc ccgggatcca ccgatctag ataactgatc ataactcagcc 1380

ataccacatt tglagaggtt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc 1440

tgaaacataa aatgaatgca attgtgttg ttaacttgtt tattgcagct tataatggtt 1500

acaaataaag caatagcacc acaaatcca caaataaagc attttttca ctgcattcta 1560

gttgtggtt gtccaaactc atcaatgtat cttaacgct aaattgtaag cgtaaatatt 1620

ttgttaaaat tcgcgttaaa ttttgttaa atcagctcat ttttaacca ataggccgaa 1680

atcgcaaaa tccttataa atcaaaagaa tagaccgaga tagggttag tgttgtcca 1740

gtttggaaca agagtccact attaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc 1800

gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa ccatcacctc aatcaagttt tttgggtcgg 1860

aggtgccgta aagcactaaa tcggaacctc aaaggagacc cccgatttag agcttgacgg 1920

ggaaagccgg cgaactggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc gggcgttagg 1980

gcgctggcaa gtgtagcggc cacgctgcgc gtaaccacca caccgcccgc gcttaatgcg 2040

ccgctacagg gcgcgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 2100
 ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 2160
 cttcaataat attgaaaaag gaagagtcct gaggcggaaa gaaccagctg tggaatgtgt 2220
 gtcagttagg gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc 2280
 atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta 2340
 tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gccctaact ccgccatcc 2400
 cggccctaac tccgccagt tccgccatt ctccgccca tggtgacta attttttta 2460
 tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct 2520
 tttttggagg cctaggcttt tgcaaagatc gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc 2580
 atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc 2640
 ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgcctgtt ccggctgca 2700
 gcgcaggggc gcccggttct tttgtcaag accgacctgt ccggtgcct gaatgaactg 2760
 caagacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg 2820
 ctgcagcttg tactgaagc gggaaggac tgctctctat tggcggaagt gccggggcag 2880
 gatctctgt catctcact tgctctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg 2940
 cggcgctgc atacgttga tccgctacc tgccattcg accaccaagc gaaacatgc 3000
 atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttctcg atcaggatga tctggacgaa 3060
 gagcatcagg ggctcgcgc agccgaactg ttcgccagge tcaaggcgag catgcccgc 3120
 ggcgaggatc tcgtctgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat 3180

ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac 3240

atagcgttgg ctaccegtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc 3300

ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt 3360

gacgagttct tcigagcggg actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc 3420

tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg 3480

ttttccggga cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gatttcttcg 3540

cccaccctag ggggaggcta actgaaacac ggaaggagac aataccgga ggaaccgcg 3600

ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa cgcacggtgt tgggtcgttt gttcataaac 3660

gcggggttcg gtcccagggc tggcactctg tcgatacccc accgagacc cattggggcc 3720

aataccccc cgtttcttc ttttcccac cccaccccc aagtccgggt gaaggcccag 3780

ggctcgcage caacgtcggg gcggcaggcc ctgcatagc ctcaggttac tcatatatac 3840

tttagattga ttiaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg 3900

ataatctcat gaccaaaac ccttaacgig agttttcgtt ccaactgagc tcagaccccc 3960

tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaac tgctgcttgc 4020

aaacaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 4080

ttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaactgtc cttctagtgt 4140

agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgctctgc 4200

taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 4260

caagacgata gttaccgat aaggcgcage gtcgggctg aacgggggt tcgtgcacac 4320

agcccagctt ggagcgaacg acctacacc aactgagata cctacagct gagctatgag 4380

aaagcggcac gcttcccgaagg gggagaaaagg cggacaggta tccgtaagc ggcagggtcg 4440

gaacaggaga ggcacagagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 4500

tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgc gatttttgg atgctcgtca ggggggcgga 4560

gcctatggaa aaacccagc aacgggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt 4620

ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcca 4680

tgcatt 4685

<210> 23
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PRKCD-F

<400> 23
 gaagctagcc gccacatgg cgccgttct gc 32

<210> 24
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PRKCD-R

<400> 24
 gaaaccggtg gatcttccag gaggtgctcg aatttgg 37

<210> 25
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMA-F

<400> 25
 gaagctagcc gccacatga aacaggccaa aatccactac atc 43

<210> 26
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMA-R

<400> 26
 gaaaccggtg gagtgtcccg gctgttgcc gc 32

<210> 27
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMB-F

<400> 27
 gcagctagcc gccacatgc agaaagaacg cttcaacatc g 41

<210> 28
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMB-R

<400> 28

gcaaccggtg ggcctcagc caaaagcttc tg 32

<210> 29
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PKCD-F

<400> 29
 gaagctagcc gccacatgg cgccgttct gc 32

<210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Y313F-R

<400> 30
 gaaacctga aatatcccaa c 21

<210> 31
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Y313F-F

<400> 31
 gttggatat ttcagggttt c 21

<210> 32
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> PKCD-R

<400> 32

gaaaccggtg gatcttcag gaggtgctcg aatttg

37

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K378R-F

<400> 33

ttgcatca gggcctcaa g

21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K378R-R

<400> 34

cttgaggcc ctgatgcaa a

21

<210> 35

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NLS-F-1

<400> 35

agtaaaaagg aaaaggataa atagataact gatcataatc agcc 44

<210> 36
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NLS-R

<400> 36
 gctgcaataa acaagttaac aac 23

<210> 37
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NLS-F-2

<400> 37
 tggaagaagt agctaagaag aagagtaaaa aggaaaagga taaa 44

<210> 38
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NLS-F-3

<400> 38
 tccggtgatg aagtcgaagg agtggaaagaa gttagtaaga agaa 44

<210> 39
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NLS-F-4

<400> 39
 gctggatcca ggctctgggtg atgaagtcga agg 33

<210> 40
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NES-F-1

<400> 40
 gtgggaaca tttccctggt gtagataact gatcataatc agcc 44

<210> 41
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NES-R

<400> 41
 gctgcaataa acaagttaac aac 23

<210> 42
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NES-F-2

<400> 42

gtcatcatca agctgaacgc ccatgtggga aacatttccc tggg 44

<210> 43
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NES-F-3

<400> 43
 gtcggatcca gaccagcgg tcatcatcaa gctgaacgcc 40

<210> 44
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> AzG-F

<400> 44
 ggcaccggtc gccacatgg accccatggt gagtgtgat 39

<210> 45
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> AzG-R

<400> 45
 ggcagatctg acagcttggc ctgactcggc agcat 35

<210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HcR-F

<400> 46
 gccaccggtc gccaccatgg tgag 24

<210> 47
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HcR-R

<400> 47
 gccgcggcgg cttatcagtt ggccttctcg ggcaggtc 38

<210> 48
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> p53-F

<400> 48
 gaagaattct gatgcctgtc accgagaccc ctggg 35

<210> 49
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> p53-R

<400> 49

gaaggatccc gtcagtctga gtcaggcccc actt 34

<210> 50
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SV40T-F

<400> 50
 gaagaattct gatgggaact gatgaatggg agcag 35

<210> 51
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SV40T-R

<400> 51
 gaaggatccc gttatgtttc aggttcaggg gg 32

<210> 52
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> p38-F

<400> 52
 gtcctcgaga tgccgatgta ccaggtaaag 30

<210> 53
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> p38-R

<400> 53
 gtcggatcct taaaaaggag ccaggttttc 30

<210> 54
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Gag-F

<400> 54
 gtcgaattct gatgggtgcg agagcgtcag ta 32

<210> 55
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Gag-R

<400> 55
 gtcggatcct tattgtgacg aggggtcgtt 30

<210> 56
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LR-F

<400> 56

gtcgaattct gatgtccgga gcccttgatg t 31

- <210> 57
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> LR-R

<400> 57
gtcggatcct taagaccagt cagtggttgc tc 32

- <210> 58
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> KRS-F

<400> 58
gtcgaattct gatggcggcc gtcaggcg 29

- <210> 59
- <211> 34
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> KRS-R

<400> 59
gtccccgggc tagacagaag tgccaactgt tgtg 34

- <210> 60
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RelA-F

<400> 60
 ggactcgaga tggacgaact gttccccctc 30

<210> 61
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RelA-R

<400> 61
 gaaggatccc gttaggagct gatctgactc agcagg 36

<210> 62
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IκB-F

<400> 62
 gaagaattct gatgttccag gcggccgagc g 31

<210> 63
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IκB-R

<400> 63

gaaggatccc gtcataaacg tcagacgctg gcctccaa 38

<210> 64
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> p50-F

<400> 64
 gctgaattct gatggcagaa gatgatccat att 33

<210> 65
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> p50-R

<400> 65
 gctcccgggc ttaatgcttc atcccagcat taga 34

<210> 66
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> OmpA-F

<400> 66
 gctgaattct gatgaaattg agtcgtattg cac 33

<210> 67
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> OmpA-R

<400> 67
 gctggatcct tattgagctg ctgcaggagc 30

<210> 68
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> EEF1A-F

<400> 68
 gctgaattct gatgggaaag gaaaagactc a 31

<210> 69
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> EEF1A-R

<400> 69
 gctggatccc gctatttagc cttctgagct t 31

<210> 70
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> FAM14B-F

<400> 70

gtcgaattct gatgggaaag gagagtggat gg 32

<210> 71
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> FAM14B-R

<400> 71
 gtcggatccc gtcagctgga agggggtgaa c 31

<210> 72
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DDX31-F

<400> 72
 gtcgaattct gatgttttct ccaaagaagc at 32

<210> 73
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DDX31-R

<400> 73
 gtcggatccc gttaaacttt ctgggaagtc ttg 33

<210> 74
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> p53N-F

<400> 74
 gtcgaattct catggaggag cgcagtcag at 32

<210> 75
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> p53N-R

<400> 75
 gtcggatcct cacacggggg gagcagcct 29

<210> 76
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mdm2N-F

<400> 76
 gtcgaattct gatgtgcaat accaacatgt ctgtacc 37

<210> 77
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mdm2N-R

<400> 77
 gtcggatcct catactacca agttcctgta gat 33

