

Saccharomyces cerevisiae에서 한국산 겨우살이 유래 lectin A 및 B 유전자의 발현

최윤혁 · 김종배 · 양웅석¹ · Shi Wen-Tao² · 황철원*

한동대학교 생명공학연구소, ¹(주) 미슬 바이오텍, ²하얼빈의과대학 의유전학연구소

Received August 16, 2004 / Accepted September 24, 2004

Expression of Recombinant Korean Mistletoe(KM) Lectin and B genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Yoon-Hyeok Choi, Jong-Bae Kim, Woong-Suk Yang¹, Shi Wen-Tao² and Cher-Won Hwang*. Institute of Bioscience and Technology, Handong Global University, Pohang, 791-708, Korea, ¹Mistle Biotech co., Ltd. Handong Global University Technology Business Incubator, 791-708, Korea, ²Lab. of Medical Genetics, Harbin Medical Univ., Harbin, China 150086 – A study for expression of Korean Mistletoe (KM) lectin gene (A,B) in *Saccharomyces cerevisiae* was done using transforming system of yeast. In order to overexpress the genes efficiently in yeast, two lectin genes (A,B) were re-cloned and modified including Kozak translation initiation sequence using PCR amplification. The constructed plasmids containing modified lectin A and B genes were transformed to *S. cerevisiae* INVSc (*MATa, his3 Δ1, leu2, trp1-289, ura3-52*). The transformed cells were identified by DNA sequencing with ABI3700 system and induced with 2% of galactose for recombinant KM lectin (rKM lectin) protein. The rKM lectin A and B proteins were determined about 29kDa size of protein by SDS-PAGE and western blotting analysis. The expressed recombinant lectin was determined 1.24~1.75 μg per 1 mg of cytosolic soluble protein by sandwich ELISA method. Moreover the lectin genes were expressed as maximum level at 36 h after galactose induction and lectin A gene was repressed after 48 h.

Key words – Korean Mistletoe(KM), recombinant lectin, recombinant yeast, RIP

겨우살이(Mistletoe)는 참나무, 소나무 등 여러 가지 나무를 숙주로 하여 생산하는 반 기생식물로써 유럽과 동양의 여러 나라에서 항암, 항고혈압 등의 민간요법으로 사용되어 왔다[2,8,10]. 겨우살이에 함유된 성분들 중 ML I, II, III라 불리는 lectin 들은 면역활성을 가지는 중요한 성분으로 알려져 있다[5]. 겨우살이의 lectin 성분은 heterodimer로 구성되어 있으며 활성을 가진 A-chain과 기질 결합부분인 B-chain으로 되어 있고[5] 두 chain은 disulfide결합으로 형성되어 있다[15]. 이러한 lectin은 암세포에 대한 cytotoxicity를 가지는 type II의 ribosome-inactivating protein (RIP II)로 분류되고 있다[1].

이러한 lectin의 A, B chain 유전자를 식용가능한 미생물인 *Saccharomyces cerevisiae* 내에서 발현시켜 산업적으로 이용하는 것은 의미가 있다. 특히 lectin이 결합하는 당쇄는 *S. cerevisiae*의 세포벽에 풍부한 manan-oligosaccharide로서 효모에서의 발현은 이들 lectin의 기능을 증가 시킬 것으로 기대 된다.

이런 유전자의 미생물 내에서 발현은 여러 가지 방법이 개발되어 있으며 현재 사용되고 있다.[3,4,12] 특히 효모는 같은 진핵세포 유전자의 세포내 발현에 많이 이용되고 있으며 [9] 유전학적으로도 많이 연구되어 이종 단백질의 생산에 많이 이용되고 있다[7].

본 연구는 이러한 효모의 특성을 이용하여 이미 알려진

한국산 겨우살이 lectin (KML) A, B chain의 유전자를[16] PCR법으로 *S. cerevisiae*에서 발현하기에 적합하도록 re-cloning 하였으며 이렇게 재구성된 lectin A, B chain을 함유하는 재조합 plasmid를 각각 *S. cerevisiae*에 형질전환하여 SDS-PAGE, immunoblotting 및 RT-PCR 방법으로 세포내 발현을 확인하였음을 보고 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

효모 형질전환용 plasmid로서 pYES2 (*URA3, GAL1 P ::CYC1 T, Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA*)를 사용하였으며 *E. coli* XL1-Blue MRF' ($\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacqZdDM15 Tn10 (Tetr)]$), Stratagene, La Jolla, CA)과 *S. cerevisiae* INVSc (*MATa, his3 Δ1, leu2, trp1-289, ura 3-52, Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA*)를 형질전환용 및 단백질 발현용 host로 사용하였다. 효모의 transformation 은 LiAc/SS-DNA/PEG [5]의 방법을 사용하였다. 형질 전환 후 유전자 유도발현을 위해 galactose 20 g/L의 양을 첨가한 SC-minimal 배지를 사용하였다. *E. coli*는 LB 배지에서 선행연구[18]에서와 같은 방법으로 배양하였다.

유전자 재조합 plasmid의 구축

겨우살이 cDNA는 김 등[16]의 방법에 의해 합성하였으며, 효율적으로 목적단백질을 발현시키기 위해 Kozak trans-

*Corresponding author

Tel : +82-54-260-1304, Fax : +82-54-261-4603

E-mail : chowon@han.ac.kr

lation initiation sequence [11] 및 *EcoRI*, *XbaI*의 제한효소 site를 포함한 합성 oligonucleotide를 primer로 이용(Table 1), 겨우살이 cDNA를 templates로 하여 PCR 증폭으로 lectin A, B 유전자를 효모 발현 vector인 pYES2의 *EcoRI*, *XbaI* site에 삽입시켜 한국산 겨우살이 유래 lectin gene 을 포함하는 재조합 plasmid를 구축하였다.

단백질 발현

구축된 유전자 발현 vector를 효모에 형질전환 후 형질전환 균주를 선발하여 vector의 GAL-1 promotor의 유도발현을 위해 galactose 배지에서 각각 12, 24, 36, 48, 60 시간으로 30°C에서 shaking하여 배양하였다. 배양 후 균을 증류수로 3회 세척한 후 SDS-PAGE에 의한 유전자 산물을 확인하였다.

Lectin A1 및 B1유전자 산물의 확인

유전자 산물의 발현을 확인하기 위하여 immunoblotting, ELISA 분석을 실시하였다. 먼저 선발된 형질 전환 균주를 산세척한 glass bead로 파쇄한 후 얻어진 cell lysates로 BCA분석을 통해 세포내 가용성 단백질을 정량한 후 SDS-PAGE, immunoblotting 및 ELISA분석에 의해 유전자 산물을 확인하였다.

Immunoblotting 분석에서는 이미 확보된[19] anti KM lectin rabbit sera 의 polyclonal (3000배 희석) 항체를 사용하였으며 2차항체로는 alkaline phosphatase conjugate-goat anti-rabbit IgG (Sigma, St. Louis, MO)를, 이에 반응하는 기질로서 nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP, Sigma, St. Louis, MO) 사용하여 목적 단백질 band를 확인하였다. 또한, recombinant KM lectin의 단백질 발현을 정량하기 위하여 ELISA 분석을 실시하였다.

겨우살이 lectin에 대한 polyclonal rabbit sera를 3000배

희석한 후 이를 96-well plate에 4°C에서 overnight coating한 다음 0.05% Tween-20을 함유하는 PBS-T buffer로 3회 세척하였다. 각 well당 200 µl의 block solution (5% skim milk, PBS-T)을 가한 후 37°C에서 2시간 동안 blocking한 후 3회 세척을 반복한 다음 효모로부터 추출된 단백질 및 positive control 로써 겨우살이 lectin을 0.1~2000 ng/ml의 농도 범위로 PBS buffer에 serial dilution하여 37°C에서 1시간 동안 binding시켰다. 3회 세척 반복 후 HRP가 라벨 된 겨우살이의 단일 클론 항체를 detector로써 5000배 희석하여 각 well당 100 µl 씩 분주한 후 1시간 동안 binding시킨 다음, 3회 세척 후 100 µl의 TMB (Calbiochem co. Cambridge, MA)를 각 well에 첨가하여 실온, 암실에서 30분간 반응 시켰다. 50 µl의 10% H₂SO₄를 첨가하여 반응을 종료시킨 후 492 nm에서 그 흡광도를 측정 하였다 (ELx800, microplate reader, Biotek, Winooski, VT).

RT-PCR에 의한 발현 RNA 확인

재조합 겨우살이 lectin 유전자 발현을 확인하기 위해 RT-PCR 및 dot-hybridization을 수행했다. 0시간부터 72시간까지 12시간 간격으로 유도배양 한 재조합효모로부터 total RNA를 추출한 후 이를 oligo(dT)-Primer와 M-MLV 역전사효소 (Invitrogen, USA)를 사용하여 역전사시켜 cDNA를 합성하였으며, 이를 주형으로 하여 lectin 유전자에 대한 primer로 PCR하였다. 또한 추출한 재조합효모 total RNA를 Hybond(+) nylon membrane (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 위에 10 ng 씩 spotting한 다음 이를 UV cross-linker (Spectroline, Westbury, NY, USA) 에서 10분간 고정시켰다. Biotin-dCTP를 사용하여 한국산 겨우살이 lectin A, B 유전자를 PCR증폭함으로써 biotin이 라벨 된 lectin유전자를 제작, 이를 lectin RNA의 발현 여부를 확인하는 검출 probe로 사용하는 dot hybridization을 수행하였다.

Table 1. Used primer for this study.

Primer	Sequence (5' → 3')	
Cloning primers		
KoLA1f	ccg gga att cag cAT Ggg ata cga gag gct aag a	sense, lectin A1
KoLA1r	ccg gtc tag aca gag gaa gat ggc c	antisense, lectin A1
KoLB1f	ccg gga att cag cAT Gga cga tgt aac ctg	sense, lectin B1
KoLB1r	ccg gtc tag act ggc acg ggaagc ca	antisense, lectin B1
Sequencing primers		
seqAα	gca aaa agt agg att ggt	antisense, lectin A1
seqAβ	gat ttg tgt tgg tgg aac	sense, lectin A1
seqAγ	tca ttc aga tga tct ccg	sense, lectin A1
seqBα	tat atg gtt acc tcg cga	antisense, lectin B1
seqBβ	aga agg gat gga acc att	sense, lectin B1
seqBγ	ttt gta cgg gga tgg ttc	sense, lectin B1

Bold regions mean restriction enzyme sites and italic letters are Kozak translation initiation site. Also, the capital letters are first methionine site for translation.

결과 및 고찰

Recombinant yeast 용 Plasmid구축

KM Lectin A, B 유전자를 증폭하기 위하여 두 쌍의 sense primer (KoLA1f/KoLB1f)와 antisense primer (KoLA1r/KoLB1r)를 제작한 후 한국산 겨우살이로부터 추출한 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 통해 약 0.8 kb 크기의 lectin A, B 유전자를 증폭하였다. 유전자의 발현을 위해 각각의 sense primer 내에 Kozak translation initiation sequence를 삽입하였으며, 효모용 발현 벡터 pYES2의 *EcoRI*/ *XbaI* site에 pYES2에 클로닝하였다 (Fig. 1).

이를 통해 구축된 재조합 plasmid는 ABI3700 system을 통해 염기서열 분석을 함으로서 ORF 및 염기서열상 이상이 없는 재조합 plasmid인 pYexkA1 (*lecA* 포함)과 pYexkB1 (*lecB* 포함)을 확인할 수 있었다 (Fig. 2, 3).

각각의 재조합 plasmid 내에 존재하는 lectin A, B는 pYES2 system 이 가지고 있는 GAL1 promotor를 이용하여 galactose에 의한 유도발현이 이루어진다.

***lecA* 및 *lecB* 유전자의 단백질 발현**

위에서 언급한 plasmid를 uracil이 제한된 SC-minimal (합성배지) 를 이용하여 효모에 형질 전환 후 균체 단백질(72 시간 배양 후)을 SDS-PAGE하여 본 결과를 Fig. 4에 나타내

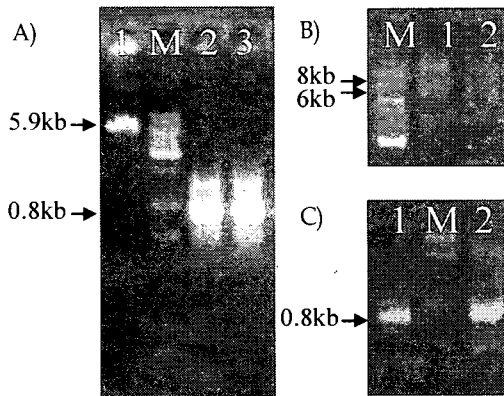


Fig. 1. Recombinant KM lectin plasmid construction. A) Lane 1, pYES2 vector plasmid digested with *EcoRI*; lane M, molecular marker; lane 2, amplified *lecA* gene; lane 3, amplified *lecB* gene. B) Identification of recombinants including *lecA* and *lecB* genes. Recombinant plasmids were digested with *EcoRI*. Lane M, molecular marker; lane 1, recombinant plasmid pYexkA1; lane 2, recombinant plasmid pYexkB1. C) Identification of inserts by PCR. PCRs were performed by using recombinant DNA as PCR template. Lane 1, amplified recombinant *lecA* gene; lane M, molecular marker; lane 2, amplified recombinant *lecB* gene.

었다. 그림에서와 같이 SDS-PAGE (A) 상에서는 발현 단백질의 차이가 나타나지 않으나 western blot (B)에서는 galactose로 유도된 균체(B의 No. 3, 6)에서 약 29 kDa 가량의 크기를 갖는 예상 단백질을 검출할 수가 있었다.

재조합 효모 내 lectin 발현을 정량적으로 분석하기 위해 한국산 겨우살이 lectin에 대한 monoclonal antibody를 이용한 ELISA 분석의 결과, 재조합 lectin의 발현을 확인하였고 이를 rKM lectin A1 (recombinant Korean mistletoe lectin A1) 및 rKM lectin B1 으로 명명하였다. 하지만 발현되는 양은 기대와 달리 소량으로서 각각 48시간 유도배양된 효모의 가용성 단백질 1mg 당 rKM lectin A1의 경우 1.24 μ g, rKM lectin B1의 경우 1.75 μ g으로 낮게 검출되었다.

RT-PCR 에 의한 *lecA*, B 발현의 전사 단계에서 확인

상기의 결과에 의해 *lecA* 및 B의 효모 내 고발현은 어려운 것으로 예측되어 그 원인에 대해 고찰한 결과 세포내 고발현은 translation 단계에서 제어가 될 가능성이 제기된다. 이는 lectin 이 진핵세포상의 28S rRNA의 특정 adenine을 분해하여 ribosome 상에서 단백질의 합성을 불활성화시키는 type2의 RIP로 분류되고 있음에서 유추할 수 있었다[14]. 이의 확인을 위해 시간별로 galactose 유도시킨 균체로부터 RNA를 추출한 후 이를 RT-PCR 하였으며 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 5에서 보듯이 A, B 모두 36시간 배양까지는 전사 산물이 보이나 *lecA* gene의 경우 그 이후 시간에는 산물이 나타나지 않았으며 *lecB* gene 또한 60시간 배양 이후 전사산물이 관찰 되지 않았다. 위의 결과를 바탕으로 *lecA* 유전자의 경우 초기 전사된 mRNA로부터 발현된 lectin A chain에 의해 rRNA가 제어를 받은 것으로 추측할 수 있으며, 이는 Pulse-Field 실험 등에 의한 보다 세밀한 실험결과가 요구된다. 위의 RT-PCR의 전사 단계상 결과는 다음 dot-hybridization (Fig. 6)의 결과와도 일치함을 알 수 있다.

즉 *lecA* 유전자의 전사 산물은 36시간 뒤에는 나타나지 않으므로 재조합 효모 내에서의 lectin A chain *lecA*의 발현은 RNA 단계에서 유도시간에 따라 제어됨을 고찰 할 수가 있었다.

이상의 결과로부터 본 논문은 식물 유래 이종 단백질인 겨우살이 lectin의 효모 내 발현을 기대하며 실험 하였다. 효모를 이용한 식물유래 이종단백질의 발현의 예로서 합성 thau-matin 유전자가 이미 보고 되었으나[13] 이들의 활성은 확인 되지 않았다. 또한 곰팡이를 이용한 식물 protein의 발현[17]에서는 곰팡이의 N-terminal site에 식물 유전자를 fusion시켜 activity를 확인 하였다.

본 연구는 식물(한국산 겨우살이)의 lectin유전자를 각기 효모에 형질 전환 함으로서 lectin의 각 chain이 효모 내에서 발현됨을 확인 하였으나 각각 chain의 발현은 유도 시간에

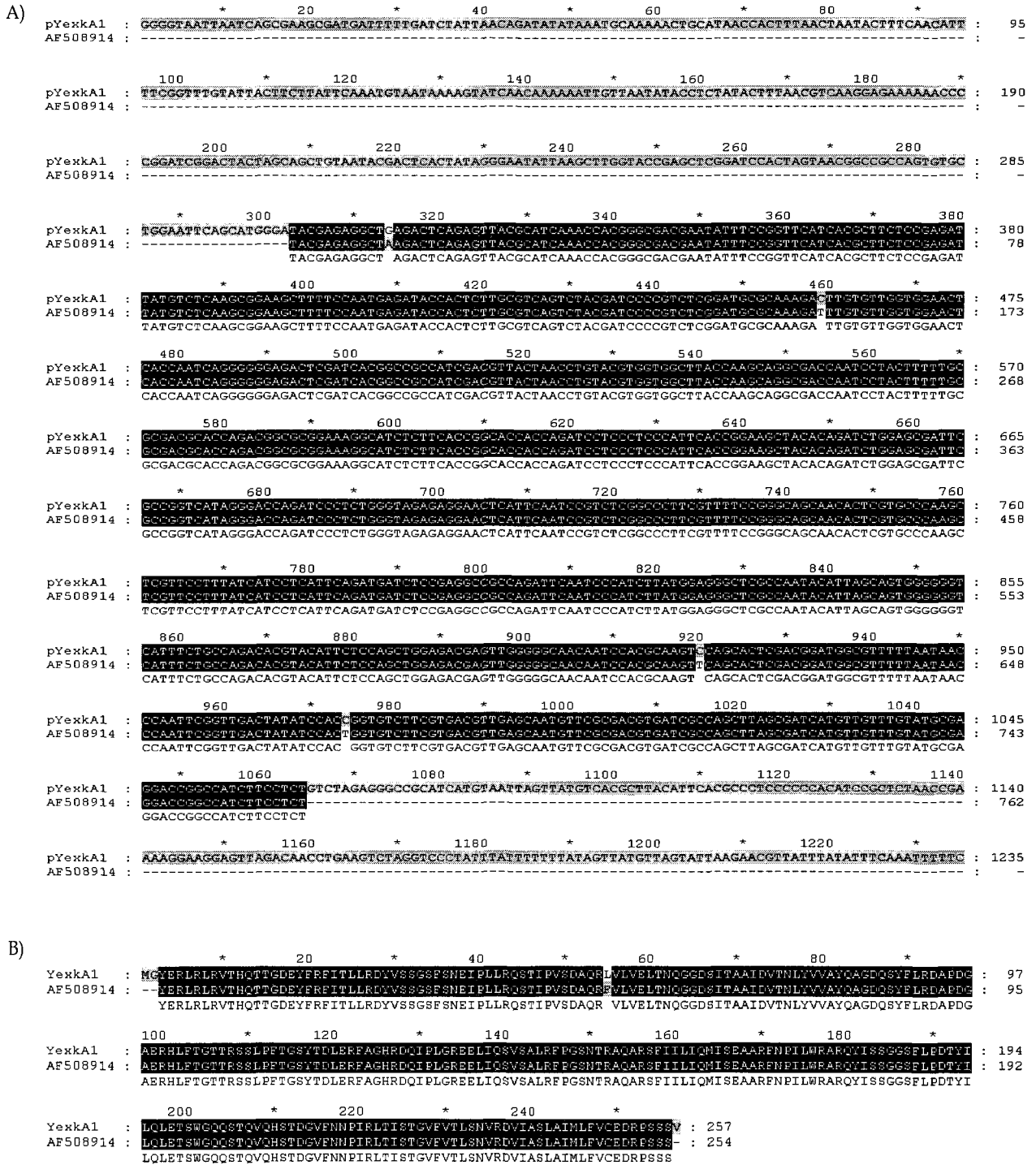


Fig. 2. Comparisons between recombinant lectin A and neutral KM lectin. Nucleotide (A) and amino acid (B) sequences were aligned with KM lectin A1 (GenBank acc. No. AF508914) by clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). The front and rear parts (gray-colored) of DNA sequence are vector (pYES2) regions.

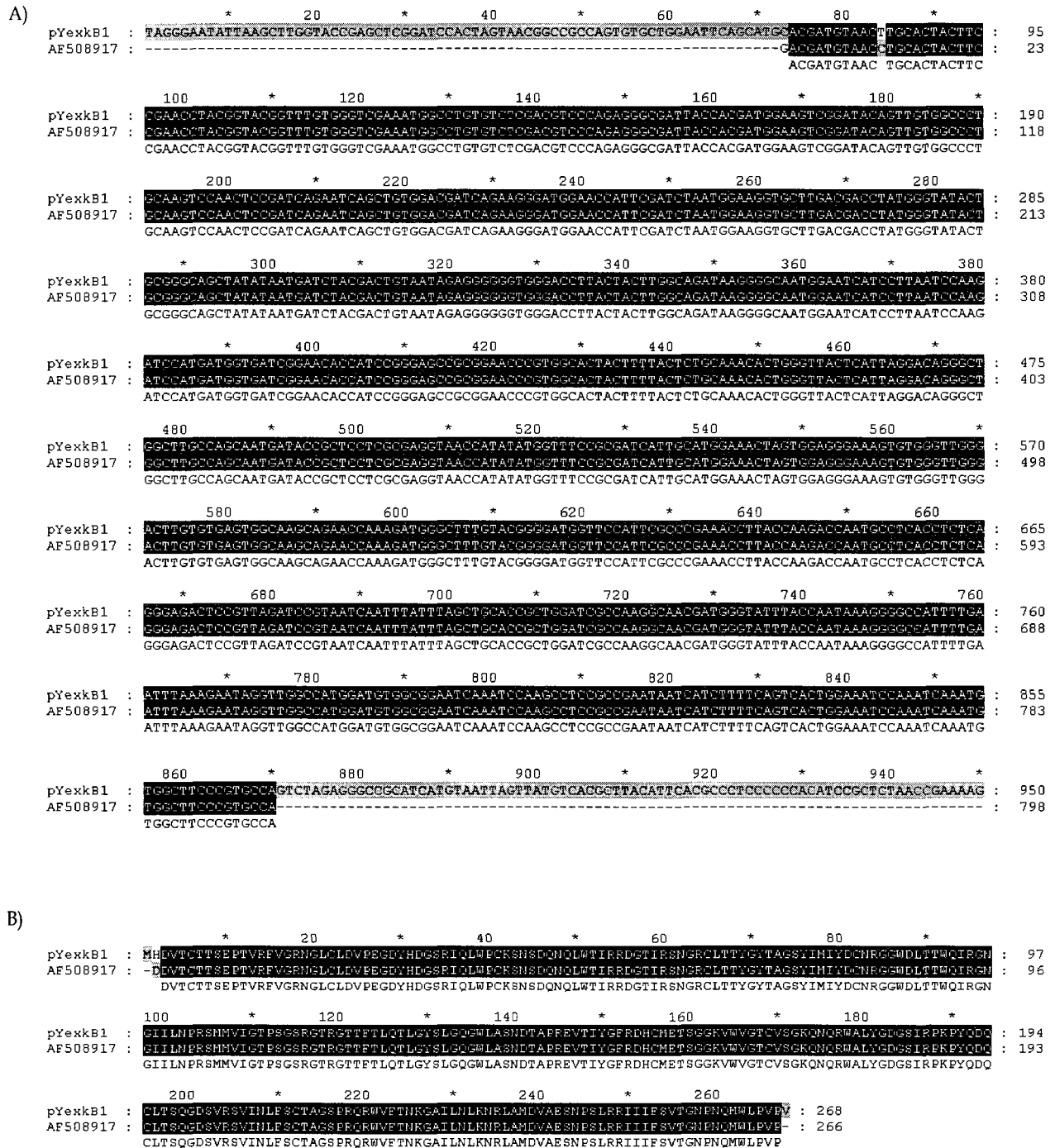


Fig. 3. Comparisons between recombinant lectin B and neutral KM lectin Nucleotide (A) and amino acid (B) sequences were aligned with KM lectin B1 (GenBank acc. No. AF508917) by clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). The front and rear parts (gray-colored) of DNA sequence are vector (pYES2) regions.

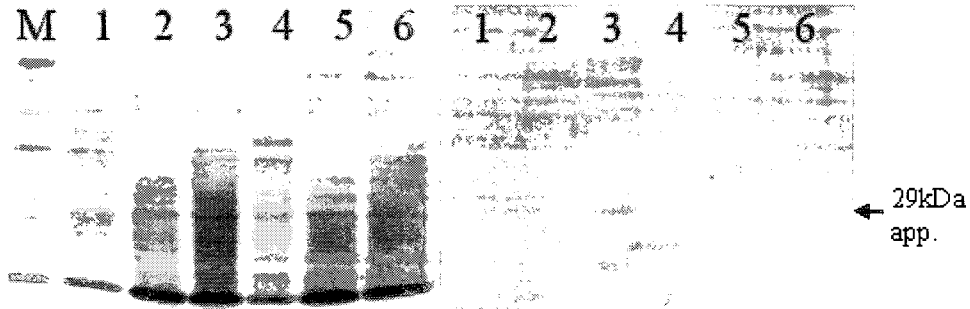


Fig. 4. SDS-PAGE analysis and its western blotting.

SDS - PAGE analysis was performed with 12 % polyacrylamide gels to analyze the expressed rKM lectin A1 and B1. On Western blot analysis, the transferred membrane was incubated with anti-KM lectin rabbit sera (polyclonal, ×3000 diluted) for 2 h at 37°C. The immunoreactive protein bands were detected with goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase and were similar with predicted KM lectin size. Lane M, molecular weight marker; lane 1, 4, yeast/pYES2; lane 2, non-induced yeast/pYexkA1; lane 3, induced yeast/pYexkA1; lane 5, non-induced yeast/pYexkB1; lane 6, induced yeast/pYexkB1.

Table 2. Quantitative analysis of KM lectin by ELISA

sample	ELISA results lectin conc. (ng/ml)	BCA results protein conc. (µg/ml)	lectin per protein (µg/mg)
No-induced YexkA1	0	180	0
Induced YexkA1	2038.2	1650	1.24
No-induced YexkB1	0	250	0
Induced YexkB1	2915.5	1670	1.75

Each of transformants was induced with 2% of galactose for 48 h.



Fig. 5. RT-PCR of rKM lectin yeast transformant.

Lane 1, YexkA1 24 h induction; 2, YexkB1 24 h induction; 3, YexkA1 36 h induction; 4, YexkB1 36 h induction; 5, YexkA1 48 h induction; 6, YexkB1 48 h induction; 7, YexkA1 60 h induction; 8, YexkB1 60 h induction; 9, YexkA1 72 h induction; 10, YexkB1 72 h induction; M, 100 bp ladder; 11, INVSc only with *lecA* primer; 12, pYES2 only with *lecA* primer; 13, INVSc only with *lecB* primer; 14, pYES2 only with *lecB* primer; 15, YexkA1 non-induction; 16, YexkB1 non-induction.

의해 제어됨을 RNA단계에서 확인 할 수 있었으며 최적 발현 시간은 36시간임을 확인하였다.

Lectin이 cytotoxicity를 가진 RIPⅡ로 분류됨에 따라 lectin의 활성 부분인 A 유전자의 변형을 가하여 A, B chain의 fusion에 의한 효모 내 발현을 유도하여 산업적 이용을 모색할 예정이다.

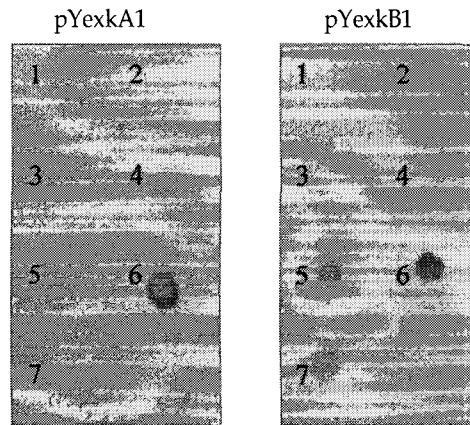


Fig. 6. Expression of rKM lectin A and B mRNA.

10ng of total RNA was loaded on each spot. The host and host/pYES2 strains were cultivated for 24 h. The expression of rKM lectin A1 was stopped after 36 h induction. In case of B1, the expression was not stopped during induction times. Spot 1, host only; spot 2, host/pYES2; spot 3, Non-induced recombinant yeast; spot 4, 12 h induced recombinant; spot 5, 24 h induced recombinant; spot 6, 36 h induced recombinant; spot 7, 48 h induced recombinant.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 지역기술개발 용역사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다 (경북0101)

요 약

본 연구는 한국산 겨우살이 lectin 유전자 (A 및 B chain) 을 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*) 에 형질 전환시키는 시스템을 사용한 것으로, 효모내 효과적인 lectin 유전자 발현을 위하여 유전자 상에 Kozak translation initiation sequence를 PCR을 이용 삽입, 변형시켜 재 클로닝 하였다. 변형된 lectin A 및 B 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드는 *S. cerevisiae* INVSc (*MATa, his3 Δ1, leu2, trp1-289, ura3-52*) 에 형질전환되었다. 형질전환된 효모는 ABI 3700 system을 이용한 DNA 염기서열 분석을 통해 확인되었고 재조합 한국산겨우살이 lectin 발현을 위해 2% galactose를 사용하여 유도발현되었다. 재조합 lectin A 및 B 단백질은 SDS-PAGE 및 western blotting 분석을 수행한 결과 약 29kDa 크기로 확인되었다. 재조합 lectin은 세포내 가용성 단백질 1mg 중 1.24~1.75 μg 수준으로 발현되어짐을 ELISA 분석을 통해 확인하였다. 한편 lectin 유전자는 galactose 유도발현 후 36시간이 되었을때 발현량이 최대가 되었으며 lectin A 유전자의 경우 48 시간 이후에는 발현이 억제되었다.

참 고 문 헌

1. Agapov I. I., A. G. Tonevitsky, A. T. Shamshiev, E. Pohl, P. Pohl, R. A. Palmer and M. P. Kirpichnikov, 1997. The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding. *FEBS Letters*, **402**(1), 91-93.
2. Bussing A., K. Suzart and K. Schweizer, 1997. Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts. *Anti-Cancer Drugs*, **8**(Suppl. 1), 9-14.
3. Eck J., M. Langer, B. Mockel, K. Witthon, H. Zinke, and H. Lentzen, 1999. Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains. *Eur J Biochem.*, **265**(2), 788-797.
4. Elsasser-Beile U., M. Voss, R. Schuhle, and U. Wetterauer, 2000. Biological effects of natural and recombinant mistletoe lectin and an aqueous mistletoe extract on human monocytes and lymphocytes in vitro. *J Clin Lab Anal.*, **14**(6), 255-259.
5. Franz H., P. Ziska and A. Kindt, 1981. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochem. J.* **195**, 481-484
6. Gietz R. D. and R. H. Shiestl, 1995. Transforming yeast with DNA. *Meth. Mol. Cell. Biol.*, **5**, 255-269.
7. Gong Z. Z., E. Yamagishi, M. Yamazaki, and K. Saito, 1999. A constitutively expressed Myc-like gene involved in anthocyanin biosynthesis from *Perilla frutescens*: molec-

- ular characterization, heterologous expression in transgenic plants and transactivation in yeast cells. *Plant Mol Biol.*, **41**(1), 33-44.
8. Hajto T., K. Hostanska, K. Frei, G. Rordorf and H. J. Gabius, 1990. Increased secretion of tumor necrosis factor- α , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to β -Galactoside-specific galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.*, **50**, 3322-3326
9. Kearns M. A., D. E. Monks, M. Fang, M. P. Rivas, P. D. Courtney, J. Chen, G. D. Prestwich, A. B. Theibert, R. E. Dewey, and V. A. Bankaitis. 1998. Novel developmentally regulated phosphoinositide binding proteins from soybean whose expression bypasses the requirement for an essential phosphatidylinositol transfer protein in yeast. *EMBO J.*, **17**(14), 4004-4017.
10. Khwaja T. A., J. C. Varven, S. Pentecost and H. Pande, 1980. Isolation of biologically active alkaloids from Korean mistletoe *Viscum album coloratum*. *Experientia*, **36**, 599-600.
11. Kozak, M., 1997. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.*, **16**, 2482-2492.
12. Kourmanova A. G., O. J. Soudarkina, S. Olsnes, and J. V. Kozlov, 2004. Cloning and characterization of the genes encoding toxic lectins in mistletoe (*Viscum album* L.). *Eur J Biochem.*, **271**(12), 2350-2360.
13. Lee J. H., J. L. Weickmann, R. K. Koduri, P. Ghosh-Dastidar, K. Saito, L. C. Blair, T. Date, J. S. Lai, S. M. Hollenberg, and R. L. Kendall, 1988. Expression of synthetic thaumatin genes in yeast. *Biochemistry*, **27**(14), 5101-5107.
14. Niwa, H., A. G. Tonevitsky, I. I. Agapov, S. Seward, U. Pfuller, and R. A. Palmer, 2003. Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2739-2749.
15. Olsnes S., F. Stirpe, K. Sandvig and A. Pihl, 1982. Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *J. Biol. Chem.* **257**, 13263-13270
16. Park C. H., D. W. Lee, T. B. Kang, K. H. Lee, T. J. Yoon, J. B. Kim, M. S. Do, S. K. Song, 2001. cDNA cloning and sequence analysis of the lectin genes of the Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*). *Mol. Cells.* **31**;12(2), 215-220.
17. Rasmussen-Wilson S. J., J. S. Palas, V. J. Wolf, C. S. Taft, and C. P. Selitrennikoff, 1997. Expression of a plant protein by *Neurospora crassa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(9), 3488-3493.
18. Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *A Laboratory Manual* (second edition), Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring.
19. Yoon T. J., Y. C. Yoo, T. B. Kang, H. Erk, S. H. Kim, K. S. Kim, I. Azuma and J. B. Kim, 2001. Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*). *International Immunopharmacology*, **1**(5), 881-889.