



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월29일
(11) 등록번호 10-1523576
(24) 등록일자 2015년05월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/563 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0110258
(22) 출원일자 2013년09월13일
심사청구일자 2014년06월03일
(65) 공개번호 10-2015-0030921
(43) 공개일자 2015년03월23일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020010065196 A
식물의 생장과 발달 과정에서 AtCYP78A5와 AtCYP78A7 유전자의 역할 (가톨릭대학교 박사 학위논문 (2012))
애기장대 CYP78A7 유전자의 현사시 형질전환 (국민대학교 석사 학위논문 (2007))
- (73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자
김창기
대전광역시 유성구 과학로 125
남경희
대전광역시 유성구 과학로 125
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 12 항

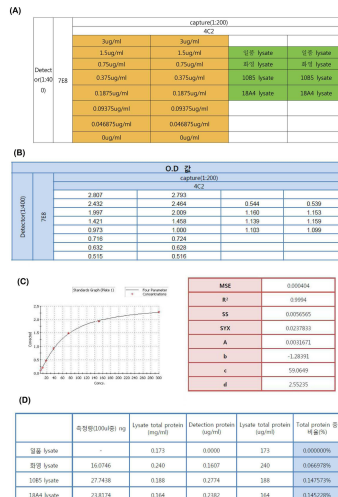
심사관 : 김승오

(54) 발명의 명칭 AtCYP78A7 특이적 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트

(57) 요약

본 발명은 AtCYP78A7 특이적 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트에 관한 것으로, 본 발명의 AtCYP78A7 단백질 진단 키트는 AtCYP78A7 특이적 단클론 항체를 포함하는 것으로, 식물의 여러 대사에 관여하는 시토크롬 P450 CYP78A 유전자의 서브패밀리(subfamilies)의 일종인 애기장대 유래의 AtCYP78A7를 과발현하는 형질전환 작물(GM 작물)을 대상으로 환경 모니터링 또는 아미노산 서열 상동성 분석, 물리화학적 안정성 시험, 알레르기 동물모델시험 및 환자혈청 IgE 결합분석 등을 통한 인체 위해성 평가에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

김호방

서울특별시 관악구 성현로 80 관악드림타운아파트
109동 401호

남기정

대전광역시 유성구 과학로 125

박정호

대전광역시 유성구 과학로 125

백인순

대전광역시 유성구 과학로 125

정순천

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM4211332
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 기초기술연구회
연구사업명 주요사업(연구개발과제)
연구과제명 바이오평가 기반구축 및 지원 사업
기여율 1/10
주관기관 한국생명공학연구원
연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120008747
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
연구사업명 기초연구사업(중견)
연구과제명 환경스트레스 내성 형질전환 식물의 위해성평가 기술개발
기여율 9/10
주관기관 한국생명공학연구원
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호가 KCTC 12473BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 4C2 단클론 항체 및 기탁번호가 KCTC 12472BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 7E8 단클론 항체로 이루어진 군 으로부터 선택된 하나 이상의 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 키트는 4C2 단클론 항체 및 7E8 단클론 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 효소결합 면역 분석법(ELISA) 진단 키트인 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 간접적 효소결합 면역 분석법(ELISA) 진단 키트인 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 간접적 효소결합 면역 분석법(ELISA)은 포획항체(capture antibody)로서 4C2 단클론 항체, 검출항체(detector antibody)로서 7E8 단클론 항체를 이용하는 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 AtCYP78A7 단백질은 AtCYP78A7 과발현 형질전환 식물체로부터 분리한 총 단백질 유래인 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트.

청구항 7

기탁번호가 KCTC 12473BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 4C2 단클론 항체 및 기탁번호가 KCTC 12472BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 7E8 단클론 항체로 이루어진 군 으로부터 선택된 하나 이상의 단클론 항체를 AtCYP78A7 단백질과 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 4C2 단클론 항체 및 7E8 단클론 항체를 모두 이용하는 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 효소결합 면역 분석법(ELISA)으로 검출하는 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 간접적 효소결합 면역 분석법(ELISA)으로 검출하는 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질을 면

역학적으로 검출하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 간접적 효소결합 면역 분석법(ELISA)은 포획항체(capture antibody)로서 4C2 단클론 항체, 검출항체(detector antibody)로서 7E8 단클론 항체를 이용하는 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 AtCYP78A7 단백질은 AtCYP78A7 과발현 형질전환 식물체로부터 분리한 총 단백질 유래인 것을 특징으로 하는 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 AtCYP78A7 특이적 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 4C2 단클론 항체 및 7E8 단클론 항체로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트 및 상기 단클론 항체를 이용하여 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

유전자 변형 식물이란 유전공학기술을 이용하여 특정 생물로부터 유용한 유전자를 취해 이를 기존의 작물에 도입함으로써 그와 동일한 유전자 기능을 발휘하도록 조작된 식물을 의미한다. 유전자 변형 식물은 동식물 및 미생물 등 유전자 변형 생물체를 통칭하는 GMO(Genetically Modified Organisms) 또는 LMO(Living modified organism)에 속하며, 또한 형질 전환 작물(Transgenic Plants)로 통용되기도 한다. 특히 이런 유전자 변형 식물 중 농작물의 유전자 변형은 주로 제초제에 대한 내성, 병해충에 대한 저항력, 생산력의 증가, 긴 유통기간에도 쉽게 상하지 않는 특성을 지니게 하거나, 영양가가 높은 식물을 개발하는 등의 분야에 초점을 맞추어 개발되어 왔으며, 현재까지 여러 GMO 농작물들이 이미 상용화되었거나 준비 중에 있다.

[0003]

한편, 유전자 변형 농산물의 상업화가 급진전되면서 유럽을 중심으로 이의 안전성에 대한 우려가 증가되고 있으며, 안전성 기준 또한 점차 강화되고 있다. 특히, 우리나라는 많은 곡물을 미국에서 수입하고 있으며, 국내 수요량의 90% 정도를 수입에 의존하고 있는 수입종의 경우 GM 종의 수치가 30%가 넘는 것으로 추정되고 있다. 이에 따라, 소비자들의 GM 농산물에 대한 우려가 높아지자 정부는 2001년 3월부터 GM 농산물 구분 표시제를 시행하고 있으며, 또한 2002년 9월부터 바이오 안정성 의정서가 국제적으로 발효됨에 따라 국내에서 수입 및 유통되고 있는 유전자 변형 농산물에 대하여 안정성 심사에 의하여 승인된 농산물과 미승인 농산물의 판별이 요구되고 있다. 또한, 유전자 변형 농산물에 대한 수요의 급증과 더불어 유전자 변형 여부에 대한 확인 및 분석이 요구되는 현실점에 비추어 볼 때, GMO 식물에 대한 신뢰성 있고 효율적인 검사방법의 개발이 필수적으로 요구되고 있다.

[0004]

현재 많이 사용하고 있는 GMO 검사는 유전자 변형 작물에 도입된 유전자에 의해 생산되는 단백질을 특이적으로 인지하는 항체를 이용하여 진단하는 효소면역학적 방법(ELISA)과 PCR법이 있다.

[0005]

한편, 시토크롬 P450은 화학적으로 다른 다양한 종류의 기질에 대하여 효소학적 반응들, 즉, 내인성 및 이종성(xenobiotic) 기질에 대한 산화, 과산화 및 환원 대사를 촉매한다. 식물 P450은 식물 생산물, 예컨대 페닐프로파노이드, 알카로이드, 테르페노이드, 지질, 시아노제닉 글리코시드(cyanogenic glycosides) 및 글루코시놀레이트의 합성을 포함하는, 생화학적 경로에 참여한다. 최근 몇 년 동안, 일부 P450 효소가 식물 내 식물 대사 산물들의 구성에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 시토크롬 P450 CYP78A 유전자의 서브패밀리(subfamilies)의 일종인 CYP78A9를 애기장대에서 과발현시킴으로써 열매 크기가 커지고 모양이 변형된 표현형이 관찰되었다. 야생형의 애기장대 꽃에서 비교적 높게 발현되는 CYP78A9 mRNA는 발달된 난세포의 주병(珠柄, funiculus)에서 관찰되었고, 돌연변이 애기장대 라인에서는 심피벽(carpel wall), 특히 그 내부에서 높게 발현하는 것으로 관찰되었다. 비록 CYP78A 서브패밀리에 속하는 단백질들의 기능이 아직 정확하게 밝혀지지 않았지만 CYP78A 유전자의 전사체는 꽃이나 분열조직(meristem)에서 특이적으로 발현되는 것으로 밝혀졌다. 팔레늄시스의 CYP78A2와 옥수수의 CYP78A1은 화분관과 수꽃대 원기(tassel primordia)에서 각각 특이적으로 발현되었다. 애기장대의 CYP78A5은

영양엽조 또는 재생엽조의 분열조직(vegetative and reproductive shoot meristems)의 표면에서 발견된다.

[0006] 본 발명에서는 식물의 여러 대사에 관여하는 시토크롬 P450 CYP78A 유전자의 서브패밀리(subfamilies)의 일종인 애기장대 유래의 AtCYP78A7 유전자를 과발현하는 형질전환 작물(GM 작물)의 위해성을 평가하는데 유용하게 사용하고자 제작한 AtCYP78A7 특이적 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트에 관한 것이다.

[0007] 한국등록특허 제0834378호에서는 식물의 정단 우성을 강화시키는 시토크롬 P450 유전자가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0834380호에서는 식물의 수분 스트레스 저항성을 증가시키는 시토크롬 P450 유전자가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 AtCYP78A7 특이적 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 식물의 여러 대사에 관여하는 시토크롬 P450 CYP78A 유전자의 서브패밀리(subfamilies)의 일종인 애기장대 유래의 AtCYP78A7 유전자를 과발현하는 형질전환 작물(GM 작물)의 위해성을 평가하는데 유용하게 사용하고자 AtCYP78A7 특이적 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트를 제조함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 기탁번호가 KCTC 12473BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 4C2 단클론 항체 및 기탁번호가 KCTC 12472BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 7E8 단클론 항체로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 기탁번호가 KCTC 12473BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 4C2 단클론 항체 및 기탁번호가 KCTC 12472BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 7E8 단클론 항체로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 단클론 항체를 AtCYP78A7 단백질과 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 AtCYP78A7 특이적 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트를 이용하여 식물의 여러 대사에 관여하는 시토크롬 P450 CYP78A 유전자의 서브패밀리(subfamilies)의 일종인 애기장대 유래의 AtCYP78A7 유전자를 과발현하는 형질전환 작물(GM 작물)을 대상으로 환경 모니터링 또는 아미노산 서열 상동성 분석, 물리화학적 안정성 시험, 알레르기 동물모델시험 및 환자혈청 IgE 결합분석 등을 통한 인체 위해성 평가에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 대장균 BL21에서 발현된 재조합 GST-AtCYP78A7 단백질의 쿠마시 염색을 나타낸다.

도 2는 면역된 마우스 혈액을 대상으로 ELISA 시험을 수행한 결과이다.

도 3은 AtCYP78A7 과발현 식물체를 대상으로 IP (Immunoprecipitation) 분석을 수행한 결과이다(A, 화염버; B, AtCYP78A7 과발현 버 18A-4).

도 4는 본 발명의 단클론 항체(#4C2, #6A7, #7E8, #11H6)의 정제 결과이다. A, 항-AtCYP78A7 #4C2, #6A7의 정제 결과(레인 1, #4C2 0.5µg; 2, #4C2 1µg; 3, #4C2 2µg; 4, 마커; 5, BGG 0.5µg; 6, BGG 1µg; 7, #6A7 0.5µg; 8, #6A7 1µg; 9, #6A7 2µg); B, 항-AtCYP78A7 #7E8, #11H6의 정제 결과(레인 1, #7E8 0.5µg; 2, #7E8 1µg; 3, #7E8 2µg; 4, BGG 0.5µg; 5, BGG 1µg; 6, 마커; 7, #11H6 0.5µg; 8, #11H6 1µg; 9, #11H6 2µg). 화살표는 50kDa 및 25kDa인 항체 크기를 각각 나타낸다.

도 5는 각 시료의 용해물(lysate)에 존재하는 총 단백질 중 검출 단백질의 비율을 나타낸다. (A)는 표준물질 농

도 및 각 식물 추출액을 나타내며, (B)는 ELISA를 실시했을 때의 O.D. 값으로, (A)의 주황색으로 표시된 부분의 표준물질로 사용된 단백질을 희석하여 실험한 결과와 연두색으로 표시된 부분의 각 식물 추출액으로 실험한 결과임. (C)는 표준물질에 대한 O.D.값을 근거로 표준 곡선을 그린 결과이고, 이 표준 곡선의 R^2 값이 0.999로 신뢰성이 있는 그래프임을 확인하였음. (D)는 표준 곡선의 각 식물에 포함된 AtCYP78A7의 양을 계산한 후 식물 단백질 중 AtCYP78A7의 비율을 백분율로 나타낸 것임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기탁번호가 KCTC 12473BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래의 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 4C2 단클론 항체 및 기탁번호가 KCTC 12472BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래의 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 7E8 단클론 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단클론 항체를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래의 항원 AtCYP78A7은 서열번호 1의 염기 서열을 가지는 AtCYP78A7 단백질 코딩 유전자에 의해 코딩된다.
- [0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 AtCYP78A7 단백질 진단 키트는 바람직하게는 4C2 단클론 항체 및 7E8 단클론 항체를 모두 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 명세서에서 사용된 용어 '단클론 항체'란 당해 분야에 공지된 용어로서 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도의 특이적인 항체를 의미한다. 통상적으로, 상이한 에피토프(항원결정기)들에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다 클론 항체와는 다르게, 단클론 항체는 항원상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 단클론 항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 또한 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 또 다른 장점을 갖는다.
- [0017] 상기한 하이브리도마가 생산하는 단클론 항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토 그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액으로부터 분리될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 4C2 단클론 항체는 한국생명공학연구원에 2013년 8월 13일자로 기탁된 KCTC 12473BP인 융합세포로부터 제조되며, 7E8 단클론 항체는 한국생명공학연구원에 2013년 8월 13일자로 기탁된 KCTC 12472BP인 융합세포로부터 제조될 수 있다.
- [0019] 항원을 검출하는데 단클론 항체를 사용하는 경우의 잇점은 단일 에피토프를 인지함으로써 특정한 상호작용을 갖는다는 것이다.
- [0020] 단클론 항체의 결합 친화성은 예를 들어 문헌[Munson et al., Anal Biochem., 107:220, 1980]]의 스캐차드(Scatchard) 분석법에 의해 결정할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 AtCYP78A7 단백질 진단 키트는 바람직하게는 효소결합 면역 분석법(ELISA)으로 검출할 수 있는 키트일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 간접적 효소결합 면역 분석법(ELISA)으로 검출할 수 있는 키트일 수 있으며, 가장 바람직하게는 포획항체(capture antibody)로서 4C2 단클론 항체, 검출항체(detector antibody)로서 7E8 단클론 항체를 이용할 수 있는 간접적 효소결합 면역 분석법(ELISA)으로 검출할 수 있는 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 AtCYP78A7 단백질 진단 키트에서, 상기 AtCYP78A7 단백질은 AtCYP78A7 과발현 형질전환 식물체로부터 분리한 총 단백질 유래인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 또한, 본 발명은 기탁번호가 KCTC 12473BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 4C2 단클론 항체 및 기탁번호가 KCTC 12472BP인 융합세포주에 의해 생산되고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항원 AtCYP78A7에 특이적으로 결합하는 7E8 단클론 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단클론 항체를 AtCYP78A7 단백질과 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법은 바람직하게는 4C2 단클론

항체 및 7E8 단클론 항체를 모두 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0025] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법은 바람직하게는 효소결합 면역 분석법(ELISA)으로 검출할 수 있는 방법일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 간접적 효소결합 면역 분석법(ELISA)으로 검출할 수 있는 방법일 수 있으며, 가장 바람직하게는 포획항체(capture antibody)로서 4C2 단클론 항체, 검출항체(detector antibody)로서 7E8 단클론 항체를 이용할 수 있는 간접적 효소결합 면역 분석법(ELISA)으로 검출할 수 있는 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법에서, 상기 AtCYP78A7 단백질은 AtCYP78A7 과발현 형질전환 식물체로부터 분리한 총 단백질 유래인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"란 시료 중의 AtCYP78A7 단백질 항원과 이를 인지하는 본 발명에 따른 단클론 항체의 결합물을 의미하며, 이러한 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 그러나 반드시 이들로만 제한되지 않고 다양한 응용과 적용이 가능하다.
- [0028] 본 발명에서는 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러 가지 표지체를 사용할 수 있다. 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 방사성 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있으며, 반드시 이들로만 국한되지는 않는다.
- [0029] 검출 표지체로서 사용되는 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스레디쉬 퍼옥시다제, β -라타마제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하며, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르, 이소루미닐 유도체 등을 포함하며, 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H , ^{125}I , ^{125}I -볼톤(Bolton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함한다.
- [0030] 바람직하게는, 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있다. 효소면역흡착법(ELISA)에는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다.
- [0031] 본 발명에서는 바람직하게는 간접적 ELISA를 사용하는 것이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 단클론 항체는 검출 표지를 가질 수 있으며, 검출표지를 가지지 않을 경우는 이들 단클론 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.
- [0032] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] **실험방법**

[0034] **1. AtCYP78A7 재조합 단백질 제조**

[0035] **대장균(*E. coli*)에서 GST 융합 단백질 발현**

[0036] 개발자로부터 제공받은 AtCYP78A7 DNA를 pGEX-4T-1 벡터와 접합하여 pGEX-4T-1-AtCYP78A7 구조물(construct)을 합성한 후, 클로닝된 플라스미드를 대장균 BL-21(DE3)RIPL에 형질전환시켰다. 형질전환된 콜로니를 액체배지에 배양한 후 600_{nm} 흡광도가 0.6이 되면 1 mM IPTG를 처리하여 5시간 동안 배양함으로써 GST 융합 단백질의 발현을 유도하였다.

[0037]

GST 융합 단백질 정제

[0038]

발현을 유도하여 얻은 세포를 초음파처리(sonication)하여 세포를 분쇄한 후 GST 친화성 칼럼을 사용하여 GST-융합 단백질을 분리 정제하였다. 분리 정제된 단백질은 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분리하였으며, 분리된 단백질들은 쿠마시 염색으로 확인하였다.

[0039]

2. 단클론 항체 생산

[0040]

재조합한 GST-AtCYP78A7 단백질을 항원으로 사용하여 항체를 생산하였다. 항원을 마우스(BALD/c)에 어쥬번트(sigma)와 혼합하여 주사하고 마우스의 혈액을 채취하여 항체 생성여부를 ELISA 법으로 확인하였다. 2회 면역 후 항체의 역가(1:5000)가 적정하게 증가하여 면역된 마우스에서 비장을 떼어내어 B 림프구를 분리한 다음, 배양한 골수종 세포(sp2/0)와 융합시켰다. 융합된 세포를 히포잔틴(hypoxanthin), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)이 첨가되어 있는 HAT 배지에서 배양한 후 골수종과 B 림프구만이 융합된 융합 세포(hybridoma)를 선택적으로 선별하여 배양하였다. 얻어진 융합 세포 중에서 항원과 반응하는 항체를 생산하는 세포를 ELISA법을 이용하여 확인하였다. 이때 ELISA 양성반응인 세포를 한계희석법을 이용하여 양성세포와 음성세포를 분리하는 과정(cloning)을 반복한 후 항원에 반응하는 항체를 생산하는 융합세포(hybridoma)를 생산하였다.

[0041]

3. ELISA 키트 제작

[0042]

정제된 항체를 이용하여 비오티화(biotinylation) 및 페어링 테스트(pairing test)를 한 후 포획항체(capture antibody)와 검출항체(detector antibody)를 선정하였으며, GST-AtCYP78A7 정제 단백질을 기준(standard)으로 일품버, 화영버, AtCYP78A7 과발현 베틀(10B-5, 18A-4)의 용해물(lysate)을 검출 항원으로 사용하여 분석을 진행하였다.

[0043]

실시에 1. GST-AtCYP78A7 단백질의 발현 및 정제

[0044]

GST-AtCYP78A7 단백질을 배양한 후 네이티브 조건(native condition)에서 GST 친화성 정제를 진행한 결과를 도 1A에 나타내었다. GST-AtCYP78A7 단백질은 ~86.3kDa 크기였으며, 전체적으로 발현되는 타겟 단백질의 양은 많지 않았다. 대량 배양 조건 하에서는 25kDa 부근에 GST로 생각되는 단백질이 함께 발현되었으며, 전체적인 순도는 높게 관찰되었다. 통과액(Flowthrough)에 타겟 단백질이 남아 있을 가능성이 있어 한 번 더 정제하였으며, 용출액(elution fraction)은 모두 풀링(pooling)하여 농축하였다. 그 후 분리 정제된 단백질을 정량한 후 12% SDS-PAGE로 분리하여 쿠마시 염색법으로 GST-AtCYP78A7 단백질임을 확인하였다(도 1B).

[0045]

실시에 2. 단클론 항체 생산 결과

[0046]

면역

[0047]

재조합한 GST-AtCYP78A7 단백질을 이용하여 마우스 면역을 실시한 후 혈청을 분리하여 ELISA 테스트를 수행한 결과, 항체 역가는 1:10,000 정도이며 GST 대조구 단백질과의 교차반응은 매우 약한 것으로 관찰되었다(도 2).

[0048]

융합

[0049]

융합을 진행한 후 융합된 세포들이 GST-AtCYP78A7 단백질에 반응하는 항체를 분비하는지 확인하기 위하여 ELISA 테스트를 실시하였고, 그 결과 GST-AtCYP78A7 단백질과 반응하는 19개의 클론을 확인하였다(표 1).

표 1

[0050]

융합된 세포들의 ELISA 테스트 결과

Clone No.	GST-AtCYP78A7
2E11	1.595
4C2	0.423

6A7	1.326
6A9	0.376
6B2	1.751
6B10	1.874
6C6	1.469
6D10	1.007
6E1	0.319
7B3	0.844
7E8	1.524
8A1	2.081
8B11	0.848
8B12	2.504
9A10	0.255
9G2	1.028
9G5	0.280
11E1	2.202
11H6	1.502

[0051] 면역침강 분석(Immunoprecipitation test)

[0052] 6개의 양성 클론을 대상으로 IP 분석을 수행한 후 12% SDS-PAGE에 로딩하여 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과, 화영버의 용해물에서는 나타나지 않았던 2개의 밴드가 50 kDa 주위에 관찰되어 목적 밴드(target band)로 생각되며, AtCYP78A7 과발현 버인 18A-4의 용해물에서는 4개의 클론(#4C2, 6A7, 7E8, 11H6)에서 IP 반응이 확인되었다(도 3).

[0053] 클로닝(Cloning)

[0054] IP 반응이 있는 4개의 클론(#4C2, 6A7, 7E8, 11H6)에 대한 클로닝을 실시하였다 (표 2). 표 2의 왼쪽 제일 위의 웰을 아래쪽으로 1/2 희석한 후 전체 8 웰을 오른쪽으로 1/2 희석하여 오른쪽 제일 아래쪽 웰에 세포가 가장 적게 들어가도록 클로닝을 진행한 후 ELISA를 진행하여 ELISA 결과가 양성인 웰 중에서 세포수가 가장 적거나 하나만 있는 웰을 선별하여 클로닝을 진행하였으며 세포가 들어있는 모든 웰에서 ELISA 결과가 양성일 때 단일클론이 완성된 것으로 보고 클로닝을 종료하였다.

표 2

[0055] IP 반응이 있는 4개의 클론(#4C2, 6A7, 7E8, 11H6)의 클로닝 결과

4C2												
	0.882	0.994	1.097	1.095	1.106	1.007	0.954	0.940	0.069	0.063	0.244	0.089
	1.059	1.012	1.139	1.086	1.085	1.029	0.727	0.138	0.047	0.400	0.333	0.245
	1.146	1.076	1.071	1.083	1.072	0.374	0.177	0.997	0.050	0.057	0.052	0.216
	1.218	1.111	1.048	1.076	0.683	0.046	0.046	0.792	0.045	0.048	0.049	0.144
	1.204	1.079	1.053	0.946	0.889	0.701	0.046	0.798	0.047	0.049	0.045	0.060
	1.278	1.173	1.152	1.010	0.903	0.054	0.048	0.045	0.053	0.054	0.051	0.069
	1.167	1.151	0.990	0.704	0.125	0.047	0.045	0.047	0.057	0.047	0.053	0.078
	0.979	1.082	0.600	0.080	0.063	0.075	0.066	0.072	0.071	0.080	0.073	0.099
6A7												
	1.375	1.237	1.288	1.242	1.243	1.315	1.300	1.557	1.639	1.764	0.104	0.132
	1.272	1.229	1.246	1.193	1.178	1.223	1.259	1.384	0.133	1.616	1.481	0.117
	1.206	1.065	1.084	1.066	1.125	1.108	1.179	1.419	0.300	0.188	0.124	0.123
	1.095	1.107	1.099	1.102	1.129	1.125	1.273	1.162	0.085	0.127	0.078	0.101
	1.101	1.009	1.051	1.049	1.146	1.019	0.508	1.188	1.252	0.241	0.091	0.093
	1.039	0.968	0.967	0.986	1.030	1.101	1.225	0.065	0.986	0.208	0.074	0.098
	1.000	0.948	0.977	0.322	1.158	0.151	0.125	0.078	0.122	0.120	0.094	0.095
	1.075	1.140	1.107	1.218	1.264	0.073	0.086	0.078	0.123	0.272	0.109	0.111

7E8												
	1.351	1.229	1.279	1.447	1.556	1.591	0.136	0.068	0.273	0.062	0.063	0.080
	1.191	1.101	1.160	1.466	1.271	1.494	0.054	0.052	0.052	0.050	0.050	0.063
	1.169	1.086	1.184	1.373	1.381	0.057	0.054	0.050	0.051	0.050	0.049	0.064
	1.292	1.270	1.212	1.435	1.411	1.330	0.056	0.050	0.052	0.052	0.049	0.060
	1.208	1.157	0.069	1.213	1.262	0.051	0.048	0.050	0.051	0.048	0.047	0.056
	1.190	1.361	1.224	0.053	0.053	0.050	0.051	0.053	0.054	0.047	0.050	0.056
	1.514	1.339	0.058	1.363	0.054	0.052	0.052	0.051	0.050	0.046	0.052	0.065
	1.611	1.457	0.072	0.066	0.065	0.066	0.064	0.063	0.066	0.061	0.069	0.085
11H6												
	1.630	1.580	1.530	1.746	1.493	1.870	2.009	2.083	0.164	0.115	0.122	0.117
	1.552	1.505	1.438	1.539	1.436	1.841	1.963	0.084	1.974	0.072	0.082	0.109
	1.537	1.438	1.442	1.520	1.722	1.823	0.135	1.814	0.090	0.091	0.078	0.093
	1.484	1.411	1.481	1.564	1.586	1.786	1.781	0.099	0.063	0.062	0.065	0.090
	1.421	1.375	1.397	1.575	1.806	1.793	1.713	0.121	0.062	0.062	0.065	0.084
	1.333	1.301	1.424	1.630	1.660	0.062	0.064	0.056	0.060	0.051	0.058	0.079
	1.446	1.389	1.513	1.577	1.557	0.064	0.059	0.056	0.055	0.049	0.062	0.086
	1.661	1.604	1.781	1.635	0.074	0.076	0.073	0.072	0.068	0.079	0.089	0.098

[0056] 항체 생산

[0057] 재조합한 GST-AtCYP78A7 단백질을 항원으로 사용하여 4종의 단클론 항체를 개발하였으며, 개발된 항체의 항원과의 반응을 간접적 ELISA로 확인하였다(표 3). 또한 각 클론에 대한 이소타입(isotype)을 확인한 결과 항-AtCYP78A7 #4C2, #6A7, #7E8, #11H6는 각각 IgG2a, IgG1, IgG2b, IgG2b 이었다(표 4).

표 3

[0058] 개발된 단클론 항체의 항원과의 결합성 확인을 위한 ELISA 테스트

Clone No.	O.D
4C2	1.331
6A7	0.973
7E8	1.847
11H6	1.468

표 4

[0059] 개발된 단클론 항체의 이소타입 분석

	4C2	6A7	7E8	11H6
IgG1	0.074	0.848	0.066	0.074
IgG2a	0.800	0.158	0.182	0.203
IgG2b	0.062	0.069	1.041	0.986
IgG3	0.063	0.114	0.147	0.158
IgGM	0.056	0.164	0.216	0.209
IgGA	0.056	0.054	0.061	0.069

[0060] 항체 정제

[0061] 마우스 복수(Mouse Ascites)을 각 10 mL씩 IgG 정제하여 12% SDS-PAGE로 확인한 결과를 도 4에 나타내었다. 항체 크기는 50 kDa, 25 kDa 이었으며, 항-AtCYP78A7 #4C2, #6A7, #7E8, #11H6의 농도는 각각 5.8, 3.4, 4.5, 4.0 mg/mL이었다.

[0062] 실시예 3. ELISA 키트 제작

[0063] 항체 접합 분석 (비오티ن)

[0064] 정제된 각각의 항체 4 mg을 이용하여 비오티인 접합(biotin conjugation)을 시킨 후, AtCYP78A7 mAb(6A7), mAb(4C2), mAb(11H6), mAb(7E8) 항체에 비오티인이 접합되었음을 확인하였다(표 5 및 표 6).

표 5

[0065] 항-마우스-HRP의 비오티인 접합 테스트 결과(O.D 측정값)

	mAb 4C2	4C2- Biotin	mAb 6A7	6A7- Biotin	mAb 7E8	7E8- Biotin	mAb 11H6	11H6- Biotin
200 ng	2.206	2.115	2.265	2.258	2.411	2.327	2.316	2.246
100 ng	2.114	2.009	2.033	2.014	2.252	2.293	2.304	2.240
50 ng	1.931	1.823	1.761	1.777	2.109	2.121	2.258	2.173

표 6

[0066] 아비딘-HRP (1:5000)의 비오티인 접합 테스트 결과(O.D 측정값)

	mAb 4C2	4C2- Biotin	mAb 6A7	6A7- Biotin	mAb 7E8	7E8- Biotin	mAb 11H6	11H6- Biotin
200 ng	0.038	2.696	0.039	2.746	0.035	2.709	0.037	2.647
100 ng	0.036	2.688	0.034	2.713	0.034	2.670	0.034	2.670
50 ng	0.041	2.671	0.035	2.676	0.033	2.624	0.037	2.674

[0067] 항체 페어링 테스트(Antibody paring test)

[0068] GST-AtCYP78A7(0.1 µg/mL)을 항원으로 이용한 페어링 테스트 결과 이탤릭체로 표시된 항체 5쌍을 사용하는 것이 좋은 결과를 보였으며 그 중에서도 검출항체 mAb 7E8-Biotin와 포획항체 mAb 6A7, mAb 4C2, mAb 11H6가 좋은 결과를 보였으며 (표 7), AtCYP78A7 과발현 벼 시료의 용해물(AtCYP78A7)에 대한 실험 결과, 검출항체(detector antibody)로는 AtCYP78A7 mAb (7E8), 포획항체(capture antibody)로는 AtCYP78A7 mAb (4C2)이 가장 좋은 조합으로 선정되었다(표 8).

표 7

[0069] GST-AtCYP78A7(0.1 µg/mL)을 항원으로 이용한 항체 페어링 테스트 결과 (O.D 측정값)

		Capture Ab					
		pAb #1	pAb #2	mAb 6A7	mAb 4C2	mAb 11H6	mAb 7E8
Detector Ab	pAb #1-Biotin	0.113	1.007	1.103	1.030	1.106	1.014
	pAb #2-Biotin	0.139	1.829	1.958	1.852	1.882	1.746
	mAb 6A7-Biotin	0.213	1.632	1.721	1.614	1.726	1.505
	mAb 4C2-Biotin	0.111	1.499	1.614	1.502	1.471	1.416
	mAb 11H6-Biotin	0.366	1.839	1.927	1.852	1.786	1.731
	mAb 7E8-Biotin	0.778	2.038	2.070	1.966	1.986	1.914

표 8

[0070] 벼 시료의 용해물을 항원으로 이용한 항체 페어링 테스트 결과 (O.D 측정값)

Capture Ab	mAb 4C2		mAb 6A7		mAb 11H6	
Detector Ab	pAb #2 -Biotin	mAb 7E8 -Biotin	pAb #2 -Biotin	mAb 7E8 -Biotin	pAb #2 -Biotin	mAb 7E8 -Biotin

Ag	일품 (1.604)	일품 (0.664)	일품 (1.869)	일품 (0.959)	일품 (1.863)	일품 (1.211)
	화영 (0.408)	화영 (0.677)	화영 (0.542)	화영 (0.899)	화영 (0.740)	화영 (0.845)
	10B-5 (0.857)	10B-5 (0.989)	10B-5 (1.022)	10B-5 (1.138)	10B-5 (1.079)	10B-5 (1.040)
	18A-4 (1.135)	18A-4 (1.252)	18A-4 (1.196)	18A-4 (1.456)	18A-4 (0.928)	18A-4 (1.188)

실시예 4. 본 발명의 항체를 이용하여 벼 시료에서 목적 단백질의 분석

측정된 O.D 값을 기준으로 4 파라미터 피트(four-parameter fit) 방식을 이용하여 기준곡선과 농도를 계산한 후, 각 측정값을 총 단백질에서의 비율로 환산하여 각 시료의 용해물에 존재하는 검출 단백질 양을 확인하였다 (도 5). 벼 샘플의 측정 결과 음성 대조구인 일품벼의 용해물은 측정치가 낮아 확연히 구분되나, 화영벼의 용해물은 일정비율로 검출되는 단백질이 있는 것으로 확인되었다. 그러나 양성 대조구인 AtCYP78A7 벼(10B-5, 18A-4)에 비해서는 낮은 비율로 검출되었다. 전체 단백질 대비 측정된 단백질의 비율은 일품벼의 경우 측정치가 0.008% 이하로 나왔으며, 화영벼는 0.05-0.06%의 비율로 검출되었다. 반면 AtCYP78A7 벼(10B-5, 18A-4)는 0.12-0.21%의 비율로 검출되었다. 이상의 결과로 일품벼와 화영벼는 검출 단백질 비율이 0.1% 미만으로 음성, AtCYP78A7 벼(10B-5, 18A-4)는 0.1% 이상으로 양성으로 확인되었다.

수탁번호

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12473BP

수탁일자 : 20130813

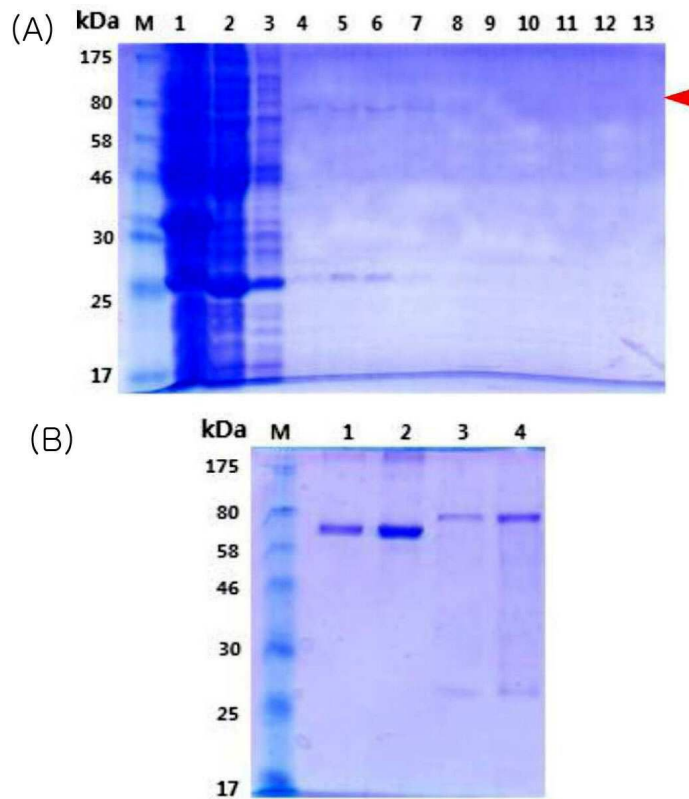
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12472BP

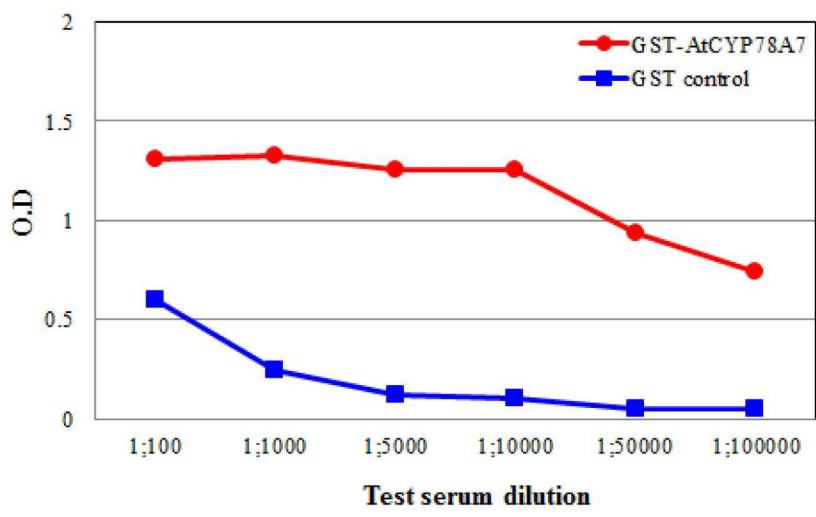
수탁일자 : 20130813

도면

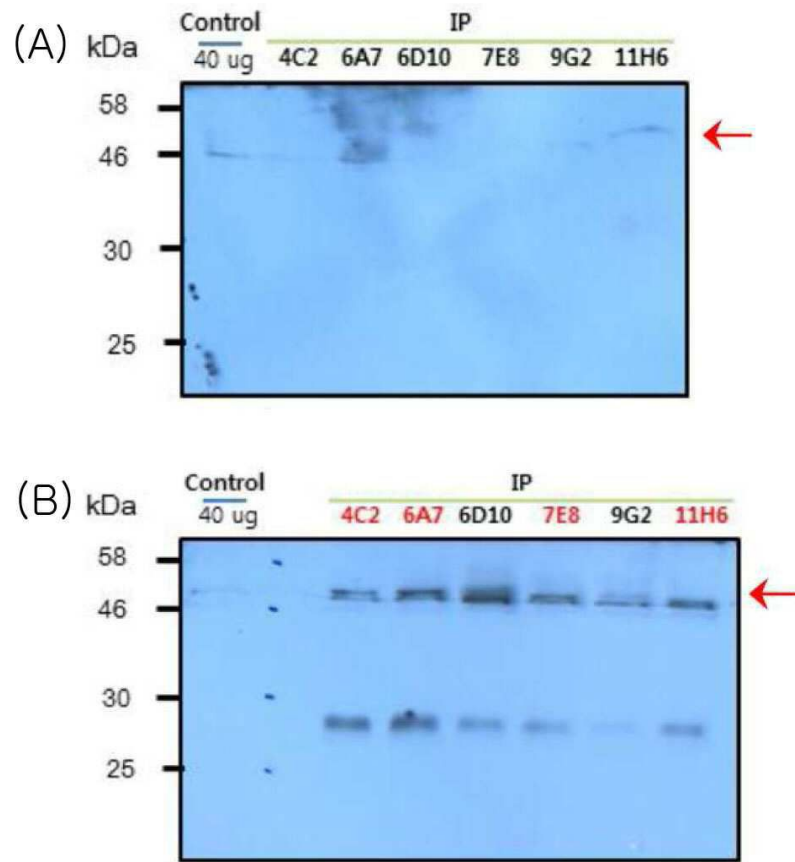
도면1



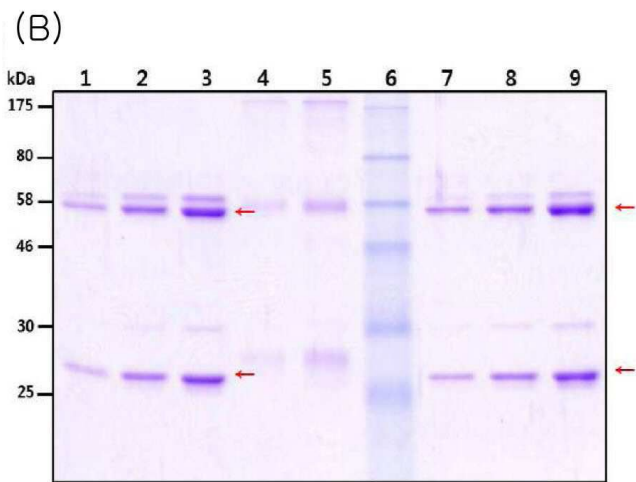
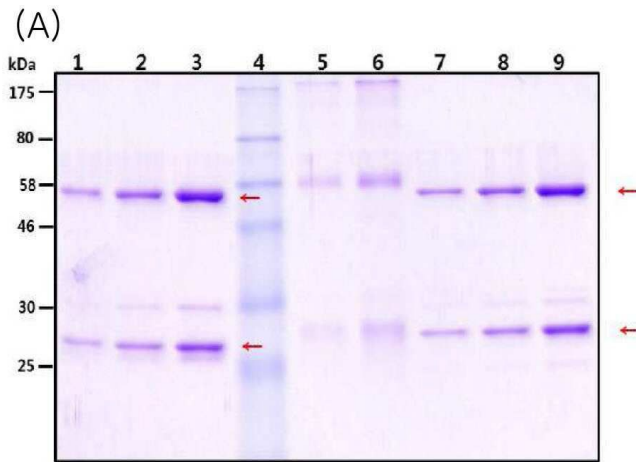
도면2



도면3



도면4



도면5

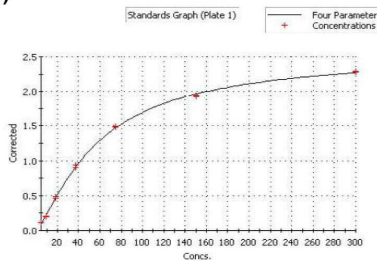
(A)

		capture(1:200)			
		4C2			
Detector(1:400)	7E8	3ug/ml	3ug/ml		
		1.5ug/ml	1.5ug/ml	일품 lysate	일품 lysate
		0.75ug/ml	0.75ug/ml	화영 lysate	화영 lysate
		0.375ug/ml	0.375ug/ml	10B5 lysate	10B5 lysate
		0.1875ug/ml	0.1875ug/ml	18A4 lysate	18A4 lysate
		0.09375ug/ml	0.09375ug/ml		
		0.046875ug/ml	0.046875ug/ml		
		0ug/ml	0ug/ml		

(B)

		O.D 값			
		capture(1:200)			
Detector(1:400)	7E8	4C2			
		2.807	2.793		
		2.432	2.464	0.544	0.539
		1.997	2.009	1.160	1.153
		1.421	1.458	1.139	1.159
		0.973	1.000	1.103	1.099
		0.716	0.724		
		0.632	0.628		
	0.515	0.516			

(C)



MSE	0.000404
R ²	0.9994
SS	0.0056565
SYX	0.0237833
A	0.0031671
b	-1.28391
c	59.0649
d	2.55235

(D)

	측정량(100ul중) ng	Lysate total protein (mg/ml)	Detection protein (ug/ml)	Lysate total protein (ug/ml)	Total protein 중 비율(%)
일품 lysate	-	0.173	0.0000	173	0.000000%
화영 lysate	16.0746	0.240	0.1607	240	0.066978%
10B5 lysate	27.7438	0.188	0.2774	188	0.147573%
18A4 lysate	23.8174	0.164	0.2382	164	0.145228%

서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Kit for diagnosing AtCYP78A7 protein including AtCYP78A7-specific monoclonal antibody
- <130> PN13249
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 1731

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

catcaaccca aaataatgga gttgatgaat ttggcttcaa aagaacaag ctattggatg 60
 attgcactgc ctgccggttt tggatcccaa aacctacatg atgtttccac ctaggctat 120
 ctattccttg ccgtcgtttt tctctctata gtcacgtggg ctctcgccgg aggcggtggt 180

gtcgttggga agaacggccg taaccggttg ggtcgtgtcg cgatccctgg tcctcgtggc 240
 ataccagtat tcggcagttt tttcactctc agccgaggct tggctcatcg gacgttagca 300
 gccatggctt ggagccgagc caaactgagc attatggctt ttagccttgg ttcaacgccg 360
 gttatcgtgg cttctgaacc aaacatagct cgtgagattc tgatgtgcc tcaactcgcg 420
 gaccggccgg ttaagcagtc tgctaagagc ctcatgttca gccagccat aggtttcgcc 480
 ccaaacggga cttactggcg catgttaaga aggatcgcac cgactcacct atttgcctct 540
 cggcgtatct tagcacacga agctgggccc cagctagact gcgctgaaat ggtgaaagct 600

gtgtcagttg agcaaacgg cgctggatca gtcgttttaa ggaaacactt acaactagcc 660
 gccttgaaca acatcatggg aagtgttttt gggagaagat acgatcctct ggctcagaaa 720
 gaggatcttg atgagcttac atcaatggtt agggaagggt tcgagctttt gggtcctttt 780
 aattggctcg attatcttcc atggctcggc tatttctacg actcaattcg tttaaaccaa 840
 cgttgctcag atctcgtccc tcgaattaga accctcgtca agaaaatcat cgacgaacat 900
 cgagttagta actctgagaa gaaaagagac attggagatt ttgttgatgt cttattgtct 960
 ttagacggtg atgagaaact tcaagaagat gacatgatcg ccgttttatg ggagatgatt 1020

tttcgagggc cagatacaac ggcgttatta acggagtggc ccatggccga gctagtactg 1080
 aaccctaacg tgcaaaccaa gttacgagac gagattttaa ctgctgtggg cgacggcgcc 1140
 gacggagacg tggcagatgc tgacctggca aaactcccgt acctaaacgc agtggatgag 1200
 gaaactctaa ggctgcatcc tcctggacca ctgctttcat gggtcgtct ttcacgtca 1260
 gacgtccagc tcagcaatgg catggtgatt ccaaaggaa ctacagcgat ggtcaacatg 1320
 tgggctataa cccacgacca gactgtatgg tccgaccgc taaagttga cccggagaga 1380
 ttactggga atgctgacat ggatattcgt ggtggggatc taaggcttgc accgtttgga 1440

gccgtagga gagtgtgtcc ggggaagaac atggggctag ctactgtgac tcggtgggtg 1500
 gctgagttgg tacgacggtt cgagtgggtt caggatcaga ccgagccagt tgatcttgg 1560
 gaggtcttga agctttcttg tgagatggag catccgttac gtgccgttgt aacggaaata 1620

ttttaagtca aaaaagggct aagtagggtt ttgatttttg tcaacgtttt ggttacttat 1680

aatttttaat ttaacgtttt tttgttgcg agaggtatga attgcagaat g 1731

<210> 2

<211> 536

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Glu Leu Met Asn Leu Ala Ser Lys Glu Thr Ser Tyr Trp Met Ile

1 5 10 15
Ala Leu Pro Ala Gly Phe Gly Ser Gln Asn Leu His Asp Val Ser Thr

20 25 30
Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Ala Val Val Phe Leu Ser Ile Val Thr Trp

35 40 45
Ala Leu Ala Gly Gly Gly Gly Val Ala Trp Lys Asn Gly Arg Asn Arg

50 55 60
Leu Gly Arg Val Ala Ile Pro Gly Pro Arg Gly Ile Pro Val Phe Gly

65 70 75 80

Ser Leu Phe Thr Leu Ser Arg Gly Leu Ala His Arg Thr Leu Ala Ala
85 90 95

Met Ala Trp Ser Arg Ala Asn Thr Glu Ile Met Ala Phe Ser Leu Gly
100 105 110

Ser Thr Pro Val Ile Val Ala Ser Glu Pro Asn Ile Ala Arg Glu Ile
115 120 125

Leu Met Ser Pro His Phe Ala Asp Arg Pro Val Lys Gln Ser Ala Lys
130 135 140

Ser Leu Met Phe Ser Arg Ala Ile Gly Phe Ala Pro Asn Gly Thr Tyr

145 150 155 160
Trp Arg Met Leu Arg Arg Ile Ala Ser Thr His Leu Phe Ala Pro Arg

165 170 175
Arg Ile Leu Ala His Glu Ala Gly Arg Gln Leu Asp Cys Ala Glu Met

180 185 190
Val Lys Ala Val Ser Val Glu Gln Asn Gly Ala Gly Ser Val Val Leu

195	200	205	
Arg Lys His Leu Gln Leu Ala Ala Leu Asn Asn Ile Met Gly Ser Val			
210	215	220	
Phe Gly Arg Arg Tyr Asp Pro Leu Ala Gln Lys Glu Asp Leu Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Ser Met Val Arg Glu Gly Phe Glu Leu Leu Gly Ala Phe Asn			
	245	250	255
Trp Ser Asp Tyr Leu Pro Trp Leu Gly Tyr Phe Tyr Asp Ser Ile Arg			
	260	265	270
Leu Asn Gln Arg Cys Ser Asp Leu Val Pro Arg Ile Arg Thr Leu Val			
	275	280	285
Lys Lys Ile Ile Asp Glu His Arg Val Ser Asn Ser Glu Lys Lys Arg			
290	295	300	
Asp Ile Gly Asp Phe Val Asp Val Leu Leu Ser Leu Asp Gly Asp Glu			
305	310	315	320
Lys Leu Gln Glu Asp Asp Met Ile Ala Val Leu Trp Glu Met Ile Phe			
	325	330	335
Arg Gly Thr Asp Thr Thr Ala Leu Leu Thr Glu Trp Thr Met Ala Glu			
	340	345	350
Leu Val Leu Asn Pro Asn Val Gln Thr Lys Leu Arg Asp Glu Ile Leu			
	355	360	365
Thr Ala Val Gly Asp Gly Ala Asp Gly Asp Val Ala Asp Ala Asp Leu			
370	375	380	
Ala Lys Leu Pro Tyr Leu Asn Ala Val Val Lys Glu Thr Leu Arg Leu			
385	390	395	400
His Pro Pro Gly Pro Leu Leu Ser Trp Ala Arg Leu Ser Thr Ser Asp			
	405	410	415
Val Gln Leu Ser Asn Gly Met Val Ile Pro Lys Gly Thr Thr Ala Met			
	420	425	430
Val Asn Met Trp Ala Ile Thr His Asp Gln Thr Val Trp Ser Asp Pro			
435	440	445	

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

 Asp Leu Gly Glu Val Leu Lys Leu Ser Cys Glu Met Glu His Pro Leu
 515 520 525
 Arg Ala Val Val Thr Glu Ile Phe
 530 535