



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년03월17일
(11) 등록번호 10-0947742
(24) 등록일자 2010년03월08일

(51) Int. Cl.
C07K 14/435 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0119138
(22) 출원일자 2009년12월03일
심사청구일자 2009년12월03일
(30) 우선권주장
1020090032425 2009년04월14일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR100803094 B1
KR1020060067768 A

(73) 특허권자
한국해양연구원
경기 안산시 상록구 사동 1270번지
(72) 발명자
강도형
경기도 안산시 상록구 사1동 1512 푸르지오 대우
6차 620동 1801호
최광식
제주특별자치도 제주시 일도2동 대유대림아파트
302동 306호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
권형중, 김문재, 이종승

전체 청구항 수 : 총 11 항

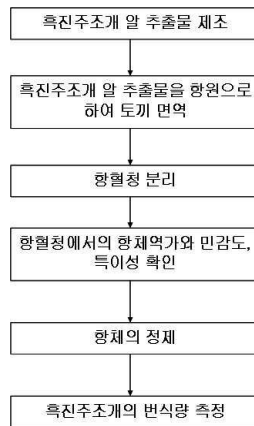
심사관 : 신원혜

(54) 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법

(57) 요약

본 발명은 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질, 이에 특이적인 항체 및 상기 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 따르면 손쉽고 정확하게 흑진주조개의 번식량을 정량화할 수 있으며, 이를 통해 흑진주 조개의 생활사 연구의 중요한 정보제공 및 효율적 관리가 가능하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자
정희도
제주특별자치도 제주시 삼양1동 326-4

박홍식
서울특별시 동대문구 답십리3동 태양아파트 25동
907호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PM54400
부처명 국토해양부
연구사업명
연구과제명 남태평양 흑진주생산 최적화를 위한 항체개발 기술
주관기관
연구기간

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

청구항 2

서열번호 2로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

청구항 3

서열번호 3으로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

청구항 4

서열번호 4로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

청구항 5

서열번호 5로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

청구항 6

서열번호 6으로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

청구항 7

서열번호 7로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

청구항 8

서열번호 8로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 단백질에 특이적인 항체.

청구항 10

(i) 제9항의 항체를 이용한 항원-항체 반응으로 흑진주 조개의 알 단백질 양을 정량하는 단계; 및

(ii) 단계 (i)에서 정량한 흑진주 조개의 알 단백질 양과 실제 양의 표준곡선을 통하여 실제 흑진주 조개의 알 단백질 양을 추정하는 단계를 포함하는,

흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

항원-항체 반응은 항체면역효소측정법(ELISA)임을 특징으로 하는, 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

본 발명은 흑진주 조개 알 추출물 항원 단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 인도 태평양 산호 지역에 걸쳐 서식하는 흑진주 조개(*Pinctada margaritifera*)는 다른 종(species)들보다 크기가 무척 커서 더 큰 진주를 생산할 수 있다. 이에 따라, 흑진주 조개의 양식을 통한 흑진주의 생산은 남태평양 도서 국가에서 가장 중요한 산업 중 하나로 자리잡고 있으며, 흑진주 조개의 연평균 생산량은 6 M/T(Metric ton, 미화 175,000,000)에 달한다. 이러한 흑진주 생산량의 증가는 흑진주 조개 모패의 수요를 급격히 증가시켰으며, 흑진주 조개 자원량을 감소시켰다.
- [0003] 남태평양 추크 라군 (Chuuk Lagoon)의 진주양식 산업에서 흑진주 생산을 위한 모패의 안정적 공급이 가장 시급한 일 중 하나이다. 현재 추크 라군에서의 흑진주 조개의 양식방법은 자연산 흑진주 조개로부터 방출된 부유 치패를 채묘하는 자연 채묘 방식이 주로 사용되었으나, 양식 산업을 위한 충분한 양의 치패 확보에 어려움을 겪고 있는 실정이다. 이에 따라, 인공 종묘생산을 도입하여 흑진주 조개 치패를 안정적으로 공급함으로써 치패 생산의 필요성이 높게 인식되었으나, 흑진주 조개의 생활사 및 번식생리 등에 관한 기초연구 부족으로 흑진주 조개의 인공종묘생산은 아직까지 성공적으로 이루어지지 않고 있다. 또한, 열대지역에 분포하는 이매패류의 번식에 관한 연구는 온대지역의 이매패류에 비하여 매우 빈약하기 때문에, 열대 이매패류의 번식 전략이나 생리에 관한 정보가 절대적으로 부족한 실정이다.
- [0004] 따라서, 성공적인 흑진주 조개 자원관리를 위해서는 우량종묘의 생산을 위한 모패의 번식생리학적 연구가 반드시 선행되어야 하며, 이는 모패의 연중 생식주기 파악 및 산란시기 예측과 같은 정성적인 연구 및 모패로부터 생산되는 알과 정자의 정량적 측정, 즉, 포란수(reproductive effort 또는 fecundity) 측정 등의 연구가 포함된다. 특히, 포란수 측정에 관한 연구는 측정 방법상의 어려움 때문에 정성적인 연구에 비하여 그 연구가 매우 저조한 실정이다. 이는 다른 동물과 달리 대부분의 이매패류는 알을 포함하는 생식소(ovary)가 물리적으로 분리되지 않고, 외투막 및 소화맹낭에 포함되어 있으며, 이매패류의 포란수가 수백만 또는 수천만 개에 이르기 때문이다.
- [0005] 이에 의하여, 본 발명자들은 이매패류의 일종인 흑진주 조개(*Pinctada margaritifera*)의 알 단백질에 대하여 특이적으로 반응하는 항체를 제조하고, 흑진주 조개 번식량을 정량적으로 측정하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질에 특이적인 항체를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0009] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아미노산 서열 [X-Y-Pro-Phe-Arg-Glu-Z-Lys-Asp-Arg]으로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질을 제공한다:
- [0010] 상기 아미노산 서열에서,
- [0011] X는 Phe 또는 Asp이고;
- [0012] Y는 Lys 또는 Ile이고;
- [0013] Z는 Glu 또는 Ser이다.
- [0014] (상기 아미노산 서열에서, Pro는 프롤린; Phe는 페닐알라닌; Arg은 아르기닌; Glu는 글루탐산; Lys는 라이신; Asp는 아스파르트산; Ile는 아이소류신; Ser는 세린의 아미노산 약자이다.)
- [0016] 상기 아미노산 서열을 구체적으로 표시하면 서열번호 1 내지 8로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질을 제공할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항원 단백질에 특이적인 항체를 제공한다.

- [0018] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은
- [0019] (i) 상기 항체를 이용한 항원-항체 반응으로 흑진주 조개의 알 단백질 양을 정량하는 단계; 및
- [0020] (ii) 단계 (i)에서 정량한 흑진주 조개의 알 단백질 양과 실제 양의 표준곡선을 통하여 실제 흑진주 조개의 알 단백질 양을 추정하는 단계를 포함하는,
- [0021] 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법을 제공한다.
- [0022] 상기 항원-항체 반응은, 이것에 한정하는 것은 아니지만, 항체면역효소측정법(ELISA)을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 흑진주 조개 번식량을 예측하는 방법은 흑진주 조개 알의 성숙에 관여하는 특이적인 알 단백질을 본 발명의 항체를 이용한 항체면역효소측정법으로 정량분석하여, 특이적인 알 단백질 총량을 간접적으로 획득할 수 있다. 간접적으로 획득한 특이적인 알 단백질 총량을 실제 양-간접적인 양 표준곡선을 통하여 실제 알 단백질 양을 추정하고, 한 개체가 가지고 있는 알 단백질 양으로부터 알의 수(포란수)를 예측할 수 있다.

효 과

- [0023] 본 발명에 따른 흑진주 조개의 번식량 측정방법은 항원-항체의 특이적인 반응원리를 이용하여 손쉽고 정확하게 흑진주 조개의 번식량을 정량화할 수 있는 장점을 지닌다. 또한, 본 발명에 따른 방법은 흑진주를 생산하는 흑진주 조개의 효율적 관리 및 생활사 연구에 중요한 정보를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명의 구성요소와 기술적 특징을 다음의 실시예들을 통하여 보다 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0025] **실시예**

[0026] **실시예 1: 흑진주 조개 알 추출물의 제조**

[0027] **1-1: 알의 분리**

- [0028] 흑진주 조개의 성숙기인 4월경에 흑진주 조개 30개체를 마이크로네시아 연방 축주의 연승수하식 양식장에서 채집하였다. 본 발명에서 사용된 암컷 모패는 12개체로서, 크기 범위는 105.3 내지 155.7 mm였다.

- [0029] 우선, 흑진주 조개의 폐각을 제거한 후, 생식소 조직의 일부를 취해서 광학 현미경으로 암/수를 구분하였다. 성숙한 암컷의 난소 부위를 절개하여 페트리 디쉬(Petri dish)에 올려놓고, 면도 칼날을 이용하여 난소 위를 바둑판무늬로 잘게 갈집을 낸 다음, 부드러운 봉으로 압박하여 알을 추출하였다. 상기 분리된 알을 0.02 mM 암모니아 수용액(ammonium hydroxide) 및 해수 일정량(0.45 μm 여과 및 멸균처리됨)과 혼합하고, 망목의 크기가 100 μm인 체로 거대 불순물을 걸러주었다. 알과 여과 해수 혼합액은 다시 망목의 크기가 40 μm인 체로 알 이외의 미세 불순물을 제거한 후, 저속으로 원심분리(1000 R.P.M., 10 min.)하여 상등액 내의 잔여 불순물을 제거하였다. 후속하여, 정제된 흑진주 조개 알을 -75°C에서 냉동시키고, 동결건조기를 이용하여 동결건조하였다.

[0030] **1-2: 흑진주 조개 알의 생화학 조성 분석**

[0031] **(1) 총 탄수화물 함량 분석**

- [0032] 총 탄수화물 함량 분석은 페놀-황산 법(Phenol - Sulfuric acid method, Taylor (1955))을 이용하였다. 동결건조된 흑진주 조개 알 분말에 PBS를 넣어 초음파 파쇄기로 균질화 한 다음 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이후 상등액에 페놀과 황산용액을 첨가하여 발색 시킨 뒤, 분광학기(spectrophotometer)를 이용하여 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 무수 텍스트로스 (Dextrose anhydrous)를 50 내지 1000 μg/ml 농도로 희석하여 표준액으로 이용하였고, 텍스트로스 표준액 탄수화물 농도와 흡광도와의 상관식에 따라 시료의 총 탄수화물 함량 (mg/g Tissue Dry Weight, TDW)을 구하였다.

[0033] **(2) 총 단백질 함량 분석**

- [0034] 총 단백질 함량 분석은 동결건조된 흑진주 조개 알 분말에 0.1M 수산화나트륨(NaOH)를 넣어 37°C에서 2시간 인큐베이션해 준 다음 원심분리하여 상등액을 취한 뒤, BCA 단백질 어세이 키트(protein assay kit, Pierce, 23227)와 분광학기를 사용하여 562nm 파장에서 흡광도를 측정하고, 흡광도와의 상관식에 따라 BSA (bovine

serum albumin) 표준액의 단백질 농도 (50 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 시료의 총 단백질 함량 (mg/g TDW)을 나타내었다.

[0035] (3) 총 지방 함량 분석

[0036] 총 지방 함량 분석은 동결건조된 흑진주 조개 알 분말에 클로로포름 및 메탄올의 혼합액을 넣어 시료의 총 지방을 추출하였다. 후속하여, 0.9% 염화나트륨(NaCl)을 첨가하고, 클로로포름 층과 메탄올-물 층의 두 층으로 나눈 다음 위쪽의 메탄올-물이 혼합된 층을 버리고, 지방이 녹아있는 클로로포름 층을 취하였다. 상기 지방을 함유한 클로로포름 층을 알루미늄 디쉬에 붓고, 건조기에서 하루 동안 건조하여 클로로포름을 제거하였다. 이후 디쉬의 무게를 빼주어 지방의 양(mg/g TDW)을 측정하였다.

[0037] 따라서, 흑진주 조개 알의 생화학 조성분 분석 결과는 하기 [표 1]에서 보는 바와 같이, 총 단백질은 40 내지 51%, 총 탄수화물은 4 내지 10%, 총 지방은 20 내지 22%의 범위를 나타내었다.

표 1

	단백질	탄수화물	지방
함량 (%)	45.5	7	21.5

[0039] 실시예 2: 흑진주 알 추출물의 항원 단백질의 아미노산 서열 분석

[0040] 실시예 1-1에서 분리한 흑진주 알 추출물을 분석한 도 3 및 도 4의 항원 단백질 중 흑진주 알에 특이적인 단백질의 아미노산 서열을 분석하였다. 그 결과, 23kD 단백질의 아미노산 서열을 확인하였으며 이는 아래 표 2와 같다. 다만, 단백질의 아미노산 서열 분석 방법은 당업계에 자명한 것이다.

표 2

서열번호	아미노산 서열
서열번호 1	Phe Lys Pro Phe Arg Glu Glu Lys Asp Arg
서열번호 2	Asp Lys Pro Phe Arg Glu Glu Lys Asp Arg
서열번호 3	Phe Ile Pro Phe Arg Glu Glu Lys Asp Arg
서열번호 4	Asp Ile Pro Phe Arg Glu Glu Lys Asp Arg
서열번호 5	Phe Lys Pro Phe Arg Glu Ser Lys Asp Arg
서열번호 6	Asp Lys Pro Phe Arg Glu Ser Lys Asp Arg
서열번호 7	Phe Ile Pro Phe Arg Glu Ser Lys Asp Arg
서열번호 8	Asp Ile Pro Phe Arg Glu Ser Lys Asp Arg

[0042] 분석되지 않은 다른 크기의 단백질은 대부분 N-말단 쪽에 methylation, glycosylation, alkylation, acetylation 등의 modification이 있기 때문으로 판단된다.

[0043] 실시예 3: 항체의 제조

[0044] 실시예 1-1에 따라 동결건조된 흑진주 조개 알 분말에 PBS를 넣어 초음파 파쇄기로 균질화하고, 원심분리하여 상등액을 취하여 흑진주 조개 알 단백질 추출물 농도가 0.5 mg/ml가 되도록 희석하였다. 상기 흑진주 조개 알 단백질 추출물 0.5 ml와 이와 동일량의 프론드 컴플리트 애드주반트(FCA; Freund's Complete Adjuvant)를 혼합하여 토끼의 등 피하에 4 ~ 5군데로 나누어 주사하였다. 이때, 대조군은 첫 주사 이전 토끼의 귀동맥에서 혈액을 채취하여 사용하였다. 첫 주사 2주 후, 동일한 항원 단백질과 프론드 인컴플리트 애드주반트(FIA; Freund's Incomplete Adjuvant)를 혼합하여 총 4차례 주사하였다.

[0045] 한편, 항체의 제작과정은 표 2에 나타낸 바와 같다. 항체가 제작되는 동안 토끼의 귀동맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다.

표 3

기간	처리방법	혈청 채취
0 주	첫 접종	
2 주	1차 추가 면역	○

4 주	2차 추가 면역	○
5 주	3차 추가 면역주사	
7 주	4차 추가 면역	
8 주		○
9 주		○
13 주		○

[0047] **실시에 4: 항체의 효과 검증 및 정제**

[0048] **4-1: 혈구응집 시험(Heammagglutination test)**

[0049] 혈청 내 항체의 존재 유무 및 항체의 역가를 알아보기 위해 혈구응집반응실험을 실시하였다. 실험에 사용된 혈액은 사람의 혈액에서 분리한 적혈구를 이용하였다. EDTA 또는 헤파린(Heparin)이 처리된 튜브에 혈액(Human)을 3ml 정도 채혈한 다음 PBS로 3회 세척하고, 원심분리하여 적혈구(RBC, Red blood cells)를 분리시켰다. 상기 분리된 적혈구가 1%가 되도록 PBS에 부유시키고, 1% RBC에 포르말린을 첨가하여 적혈구를 안정화 시켰으며, 이후 포르말린이 처리된 1% RBC와 0.05 mg/ml 탄닌산(tannic acid)을 1:1로 섞어주어 적혈구를 코팅시켰다. 후속하여, 상기 코팅된 적혈구에 항원인 흑진주 조개 알 단백질 추출물을 동일량 첨가하고, 10분간 상온에서 인큐베이션한 후, [표 3]에서 나타난 혈청 채취 시기에 채취된 혈청을 100배 희석하였고, 56℃에서 30분간 열처리하여 보체 (complement)를 비활성화시켰다. 96-웰 플레이트(well plate)에 혈청을 2배수 희석하고, 2배수 희석된 96- 웰 플레이트에 미리 코팅처리 된 적혈구를 10 μ l씩 분주한 다음 3시간 후 응집반응을 관찰하였다. 그 결과는 도2에서 나타난 바와 같다.

[0050] 도 2에서, 상기 대조군으로 사용된 항원단백질의 주사 전 채취한 혈청과 주사 2주 후의 혈청에서는 항체-항원 응집반응이 없어 적혈구가 바닥에 모이는 점의 형태로 나타났고, 4주 후부터는 항체-항원 응집반응이 일어나 96-웰 플레이트 바닥에 고루 퍼지는 형태로 항체 역가가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이때, 96-웰 플레이트 바닥에 완전히 퍼진 형태만을 반응이 일어난 것으로 간주하였다. 한편, 8주 후에는 항체 역가가 1:1600으로 희석하였을 때까지 반응을 보이는 민감도가 나타내었다.

[0051] **4-2: 면역흡착 교차반응(Immunosorbent cross-reaction) 제거 및 IgG 분리**

[0052] 알 이외의 조직 세포와의 교차반응은 번식량을 측정하는데 과대평가의 요인으로 작용하는데, 흑진주 조개의 경우 연중산란 습성을 갖고 있어 알을 포함하지 않는 미분화(indifferent) 단계의 개체를 사용할 수 없으므로 수컷의 개체를 이용한 수컷 개체 추출물이 결합된 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 면역 흡착제로 교차반응을 제거 하였다.

[0053] 동결건조된 수컷 개체 5g을 50ml PBS에 녹이고, 초음파 파쇄기를 이용해 균질화시켰다. 이후, 4500rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이렇게 수득된 수컷 개체 추출물에 2M 나트륨-아세테이트 완충용액(pH 5.0) 10ml를 혼합하였고, 25% 글루타르알데히드를 4ml를 천천히 가하여, 3시간 동안 반응시켰다. 후속하여, 글루타르알데히드와 결합되지 않은 잔여 단백질을 제거하기 위해 PBS로 세척 한 후, 0.2M 글리신 완충용액(Glycine buffer, pH 2.8) 200ml를 넣어 용출시켰고, 1M K₂HPO₄ 100ml로 pH를 조절한 후 100ml의 1M 에탄올아민(ethanolamine)을 섞어주었으며, 하룻밤 동안 반응시켜 면역흡착제 준비를 하였다. 상기 준비된 면역흡착체와 2배 희석된 동일량의 혈청을 상온에서 3시간 동안 반응 시켜주었고, 3000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음, NaOH를 이용하여 pH 6정도로 조정하였다.

[0054] 후속하여, 상기 교차반응이 제거된 혈청에서 면역글로불린G(이하, IgG)를 분리해 내기 위하여, 100% 포화된 황산암모늄을 희석하여 40%가 되게 한 황산암모늄((NH₄)₂SO₄) 용액과 4℃에서 6시간 동안 반응시켜, IgG를 침전시키고, 원심분리(4000rpm, 30분)하여 IgG를 수득하였다. 여기에 처음 교차반응 제거 전에 취한 혈청량의 50%정도의 PBS를 넣어 재부유시킨 후 투석관(dialysis tubing)을 이용하여 하루 동안 투석하여 IgG분리를 마쳤다. 분리된 IgG는 분석 전까지 냉동 보관하였다.

[0055] **4-3: 웨스턴 블롯(Western blot)**

[0056] **4-3-1. 다른 조직과의 교차 반응성 확인**

[0057] 흑진주 조개 알 단백질이 갖는 분자의 특성을 알아보기 위하여, SDS-불연속전기영동(PAGE) 방법을 수행하였고, 본 발명에 따른 항체가 알 단백질의 어느 부분에 특이적인지, 또한 다른 조직과의 교차 반응이 있는지 알아보기

위하여 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 하였으며, 교차반응 제거 전과 제거 후를 웨스턴 블롯팅을 이용한 비교를 통하여 교차반응 제거가 잘 이루어 졌는지 확인하였다.

[0058] 흑진주 조개의 알과 기타 조직(발, 아가미, 외투막, 근육), 소화맹낭, 수컷 생식소의 동결건조 분말에 PBS를 넣어 초음파 파쇄기로 균질화 한 다음 원심분리 해 각각의 상등액을 취하여 단백질 농도가 2 μ g/ml가 되게 희석하여 주었다. 이렇게 수득된 각각의 추출물을 10 μ l씩 분주하여 SDS-PAGE를 수행한 후, PVDF 막(PIERCE, 88114)에 이식(transfer)하였다.

[0059] 이후, 이식된 막을 5% 스킴 밀크(skim milke)로 1시간 동안 블로킹(blocking) 시킨 후, 상기 실시예 3-2의 교차반응 제거 후에 1차 항체로 개발한 본 발명의 흑진주 조개 알 단백질에 특이적인 항체(교차반응 제거 전에는 개발 중인 토끼 혈청 사용)를 1:1000으로 5% 스킴 밀크(skim milke)에 희석하여(교차반응 제거 전에는 1:5000으로 희석). 2시간 동안 반응시켰고, 워싱한 후 워싱버퍼(washing buffer)에 2차 항체(goat anti-Rabbit IgG HRP, KOMA)를 1:3000으로 희석하여 1 시간 동안 반응시켰다. 워싱 후, 페록시다아제(peroxidase) 및 루미날(luminal)을 1:1로 섞어 막(membrane)에 뿌린 후, 1 내지 2분 정도로 반응시켰고, 암실에서 ECL반응을 30초 간격으로 3분간 촬영하였다.

[0060] 한편, 도 3의 A 및 B는 교차반응 제거 전/후의 사진을 나타낸 것이다. 도 3의 A에서는 알 단백질 이외의 기타 조직들과 교차반응을 나타낸 반면, B에서는 알 단백질을 제외한 기타 조직들과의 교차반응이 사라짐을 확인하였다.

[0061] 4-3-2. 다른 종과의 교차 반응성 확인

[0062] 본 발명에 따른 항체가 다른 이패류(bivalve) 종의 알 단백질과 교차 반응이 있는지 알아보기 위하여 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 수행하였다.

[0063] 흑진주 조개(*Pinctada margaritifera*)의 알 추출물과 다른 종(*C. gigas*; *C. ariakensis*; *S. kegaki*; *M. edulis*; *R. pilippinarum*)의 알 추출물을 10 μ l씩 분주하여 SDS-PAGE를 수행한 후, 상기 3-3-1과 같은 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 항체는 흑진주 조개(*Pinctada margaritifera*)의 알 단백질 외에 다른 이패류 종의 알 단백질과는 교차 반응하지 않음을 확인하였다.

[0064] 특히, 실시예 2에서 아미노산 서열을 분석한 23kD의 흑진주 조개 알 단백질은 현재까지 연구된 다른 이패류(bivalve) 종의 알 단백질과 비교 분석한 결과 흑진주 조개 알에 특이적으로 존재하는 것으로 분석되었다(표 4 참조).

표 4

[0065]

종	분자량(kDa)	비고
<i>P. margaritifera</i>	Native PAGE : 420	본 발명
	Non-reducing condition : 270, 140, 95, 50, 37, 24	
	Reducing condition : 270, 150, 100, 47, 44, 23*	
<i>C. gigas</i>	105, 85, 66, 64, 60, 45, 41	Suzuki et al. 1992
<i>C. ariakensis</i>	150, 120, 95, 90, 82, 55	Kim et al. In preparation
<i>C. ariakensis</i>	Non-reducing condition : 260, 240, 90, 85, 53, 48, 42, 32	Mausumi and Choi. In preparation
	Reducing condition : 70, 73, 48, 45, 35, 30	
<i>C. virginica</i>	76, 56, 50, 48, 18, 17	Lee and Heffernan 1991
<i>P. yessoensis</i>	270, 60, 30	Osada et al. 1992
<i>S. purpuratus</i>	Non-reducing condition : 163, 95	Park et al. 2003
	Reducing condition : 247, 200, 99, 91, 54, 47	
<i>M. mercenaria</i>	98, 87, 68, 60, 56, 36, 19	Lee and Heffernan 1991
<i>R. pilippinarum</i>	Non-reducing condition : 475, 84, 40	Park and Choi 2004
	Reducing condition : 330, 96, 64, 50, 31	

[0066] * 본 발명의 실시예 2에서 아미노산 서열을 분석한 23kD의 흑진주 조개 알 단백질.

[0067] **4-4: 항체면역효소측정법(ELISA; Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

[0068] 흑진주 조개 알 단백질에 특이적인 항체의 민감도를 확인하기 위하여, 알 이외의 비 특정 세포와의 교차반응 여부를 간접(indirect) ELISA로 확인하였다. 항원 단백질로 흑진주 조개 알 단백질을 PBS-T(0.05% 트리톤 X-100을 함유하는 PBS)으로 희석하여 사용하였고, 대조군으로 수컷 개체의 조직 추출물을 사용하였다. 교차반응 제거 전에는 알 단백질의 농도를 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 수컷 개체 조직 추출물 22.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 2배수 희석하였고, 교차반응 제거 후에는 알 단백질 농도를 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 수컷 개체 조직 추출물 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 2배수 희석하여 항원 단백질로 사용하였다. 상기 희석된 항원 단백질을 폴리스티렌 96-웰 ELISA 마이크로플레이트(Polystyrene 96-well ELISA microplate)에 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 씩 넣은 후, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤동안 반응시키고, 마이크로플레이트 자동세척기(microplate autowasher)를 이용하여 PBS-T로 세척하였다. 후속하여, 0.1% BSA(in PBS-T)를 150 μl 넣고 1시간 동안 블로킹(blocking)하였고, 동일한 방법으로 세척하였다. 상기 실시예 4-2의 교차반응 제거 후에 1차 항체로 개발한 본 발명의 흑진주 조개 알 단백질에 특이적인 6.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 항체(교차반응 제거 전에는 12.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 혈청 사용)를 100 μl 를 넣고, 1시간 반응시키고 세척 후, 2차 항체(Goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-conjugated) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 100 μl 넣고, 1시간 반응시켰다. p-니트로페닐포스페이트(pNPP, p-nitrophenylphosphate)를 발색시약으로 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. ELISA 분석 결과 교차반응 제거 전에는 0.14 ~ 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 알 단백질 측정이 가능하고, 음성 대조군(negative control)에서는 2.8 내지 22.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 교차반응이 아주 약하게 반응함을 알 수 있었다. 교차반응 제거 후에는 0.07 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 흑진주 조개 알 단백질 측정이 가능하고, 음성 대조군에서는 반응을 보이지 않음을 알 수 있었다(도 5).

[0069] **4-5: 면역형광 염색(Immunofluorescence staining)**

[0070] 본 발명의 항체가 알에 특이적으로 반응하는지를 면역형광법을 이용하여 조직슬라이드상에서 교차반응 제거 전 및 후를 비교하여 관찰하였다. 조직슬라이드는 자일렌(xylene)을 이용하여 파라핀을 제거하였고, 알코올 탈수과정을 거쳐 PBS-T로 치환하였다. 5% BSA로 1시간 동안 블로킹시킨 후, PBS-T로 3차례 세척 하였다. 1차 항체로서, 상기 실시예 4-2의 교차반응 제거 후의 1mg/ml 농도 항체(교차반응 제거 전에는 1.2mg/ml 농도의 혈청)를 조직슬라이드에 조직을 덮을 정도로 뿌려 1차 항체로써 1시간동안 반응시켰다. 이후, PBS-T로 세척해 준 다음 2차 항체(fluorescein isothiocyanate- conjugated goat antibody to rabbit IgG)를 블로킹 완충용액에 1:4000으로 희석하여 조직슬라이드에 조직을 덮을 정도로 뿌려 1시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 세척한 후 50% 글리세롤(glycerol)로 마운팅(mounting)하였다. 따라서, 광학현미경 하에서 사진을 찍고, 같은 사진을 형광현미경 하에서 관찰 하였다.

[0071] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구의 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1은 본 발명의 전체 과정도이다.

[0073] 도 2는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 혈구응집시험의 결과 사진이다.

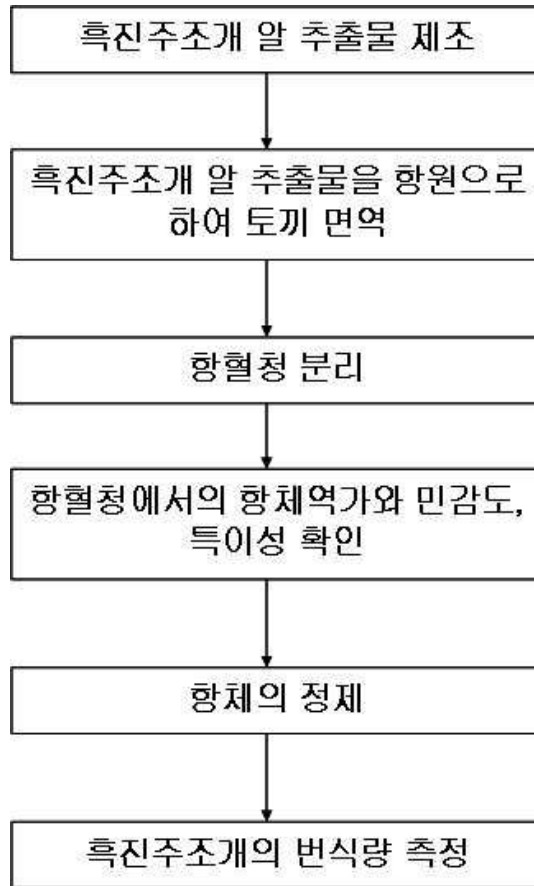
[0074] 도 3은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 웨스턴 블롯의 결과 사진이다(A: 교차반응 제거 전, B: 교차반응 제거 후, 1: 알 단백질, 2: 분자량 마커, 3: 체조직 추출물(somatic tissue extract), 4: 소화샘 추출물(digestive gland extract), 5: 정소추출물(male gonad extract)).

[0075] 도 4는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 웨스턴 블롯의 결과 사진이다(A: 비환원 조건, B: 환원 조건, 1: 분자량 마커, 2: *P. margaritifera*의 알 추출물, 3: *C. gigas*의 알 추출물, 4: *C. ariakensis*의 알 추출물, 5: *S. kegaki*의 알 추출물, 6: *M. edulis*의 알 추출물, 7: *R. pilippinarum*의 알 추출물)

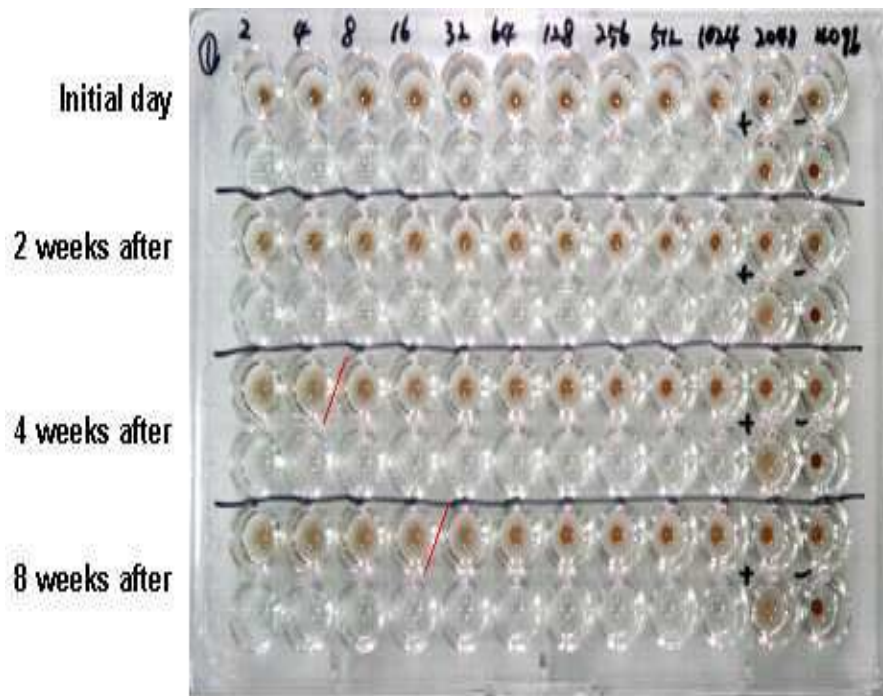
[0076] 도 5는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 ELISA 분석 결과 그래프이다(A: 교차반응 제거 전, B: 교차반응 제거 후, 파란색 선: 알 추출물과의 반응식, 분홍색 선: 체조직 추출물과의 반응식).

도면

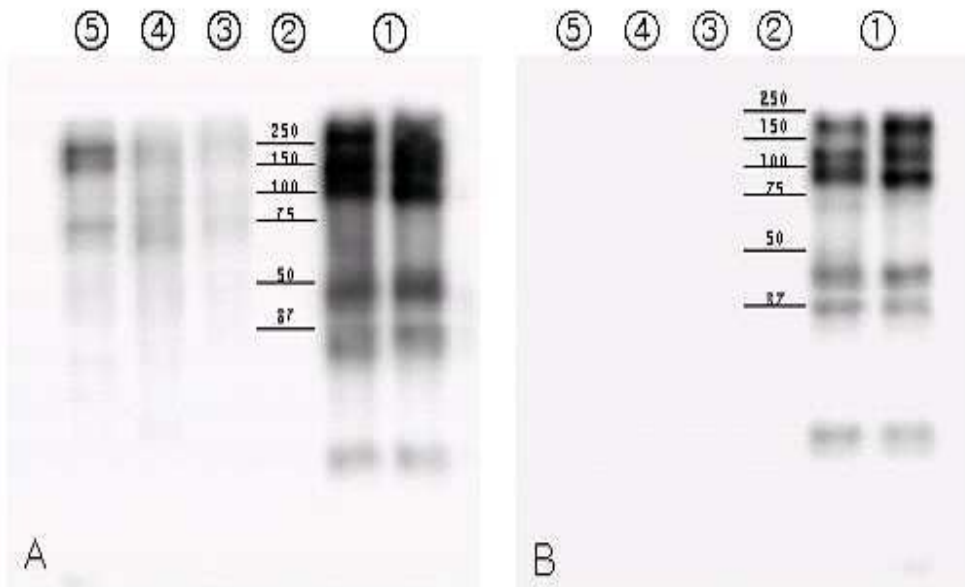
도면1



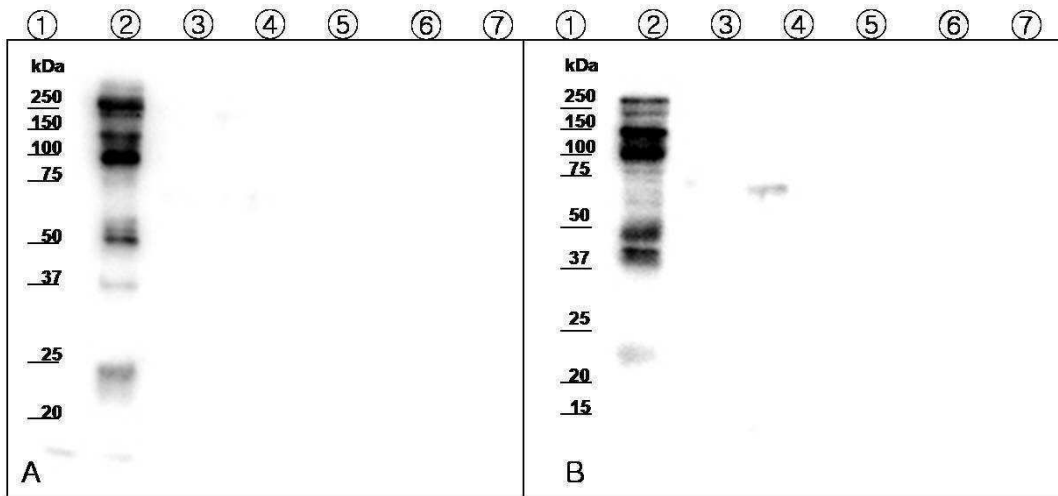
도면2



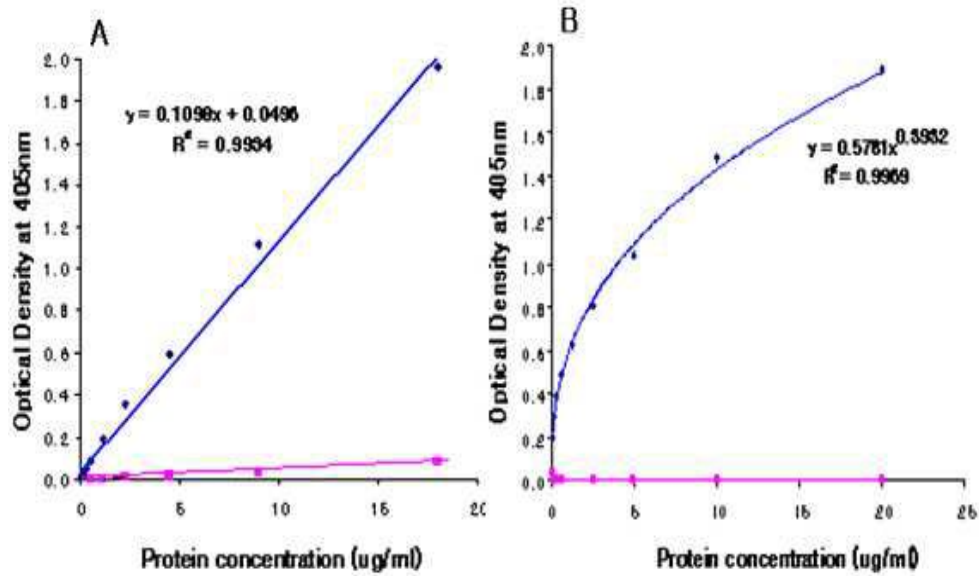
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> KOREA OCEAN RESEARCH DEVELOPMENT INSTITUE
- <120> A METHOD ON QUANTITATIVE ASSESSMENT ON THE REPRODUCTIVE EFFORT OF BLACK-LIP PEARL OYSTER USING EGG EXTRACT-SPECIFIC ANTIBODY
- <130> NPDC37235.01
- <150> KR10-2009-0032425
- <151> 2009-04-14

<160> 8

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Pinctada margaritifera

<400> 1

Phe Lys Pro Phe Arg Glu Glu Lys Asp Arg
 1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Pinctada margaritifera

<400> 2

Asp Lys Pro Phe Arg Glu Glu Lys Asp Arg
 1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Pinctada margaritifera

<400> 3

Phe Ile Pro Phe Arg Glu Glu Lys Asp Arg
 1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Pinctada margaritifera

<400> 4

Asp Ile Pro Phe Arg Glu Glu Lys Asp Arg
 1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Pinctada margaritifera

<400> 5

Phe Lys Pro Phe Arg Glu Ser Lys Asp Arg
 1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Pinctada margaritifera

<400> 6

Asp Lys Pro Phe Arg Glu Ser Lys Asp Arg
 1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Pinctada margaritifera

<400> 7

Phe Ile Pro Phe Arg Glu Ser Lys Asp Arg
 1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Pinctada margaritifera

<400> 8

Asp Ile Pro Phe Arg Glu Ser Lys Asp Arg
 1 5 10