



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0063587
(43) 공개일자 2018년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/02 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01) G01N 33/536 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/02 (2013.01)
C07K 16/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0163508

(22) 출원일자 2016년12월02일

심사청구일자 2016년12월02일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

심원보

경상남도 김해시 월산로 112-34, 1001동 1601호
(부곡동, 에스케이뷰아파트)

김정숙

경상남도 김해시 생림면 마사로385번길 43

(74) 대리인

최규환

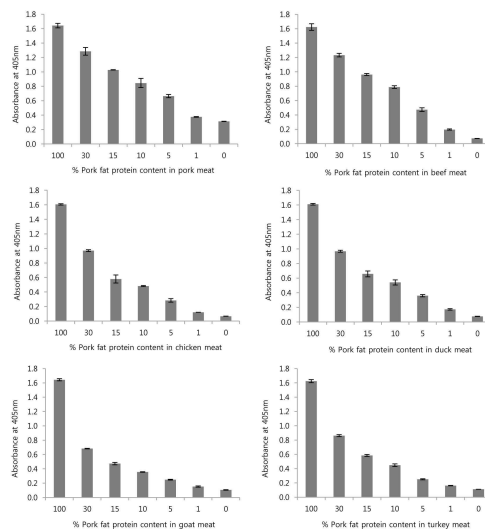
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 식품 내 돈지 분석용 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 식품 내 돈지 분석용 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에서는 돈지 조직 내에 존재하는 열 안정성 수용성 단백질을 항원으로 하여 돈지 열 안정성 수용성 단백질 특이 단일클론항체 및 하이브리도마 세포주를 제조하였으며, 상기 항체를 통한 면역분석법을 통하여 돈지가 함유된 혼합육(축육 및 어육)을 포함한 모든 식품시료의 경우 가열처리를 한 후에도 돈지가 혼입되어 있음을 신속하게 판별할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에서 개발된 단일클론항체는 원료육 뿐만 아니라 열처리 제조가공된 의도적 비표기 축산가공품 및 식품에 혼입되어 있는 돈지를 효과적으로 분석할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 5/12 (2013.01)

G01N 33/536 (2013.01)

G01N 33/6887 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

G01N 2333/78 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 315050-02-2-HD030

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 수출전략기술개발사업

연구과제명 할랄 제품 중 돈육/돈지 신속 면역진단 기법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 중앙대학교

연구기간 2015.08.31 ~ 2017.08.30

명세서

청구범위

청구항 1

돼지 유래 타입 I 콜라겐을 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 마커.

청구항 2

돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항체는 단일클론항체, 다클론항체, 다중특이적 항체, 항체의 단편, 재조합 항체 및 화학적으로 수식된 항체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 단일클론항체는 기탁번호가 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주에 의하여 생산되는 것을 특징으로 하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 조성물.

청구항 5

돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 키트.

청구항 6

돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 검체 시료와 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별방법.

청구항 7

기탁번호가 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주에 의하여 생산되고, 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 단일클론항체.

청구항 8

제7항의 단일클론항체를 생산하는 기탁번호가 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식품 내 돈지 분석용 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식품에 불순물 혼입(adulteration)은 전 세계적으로 공통적으로 문제가 되고 있다. 예를 들어, 값싼 고기가 비싼 고기로 둔갑되고 있다. 가장 빈번하게는, 돼지 고기가 식품 제품에서 다른 고기 타입을 대체하는 용도로 사용되고 있다. 또한, 지육(지방)의 경우 대부분 축산물의 가공과정 중 부산물로 발생되고 있으며, 이를 가공축산물 생산시 중량 및 향미를 증가시키기 위해 혼합하여 사용하고 있는 것이 현실이며 대부분 가공축산물의 생산시 혼합재료를 표기하고 있으나, 일부 비양심적인 사업자에 의해 의도적으로 표기를 누락시키거나 수치를 다르게 표기하는 등의 문제점이 발생하고 있다. 따라서, 식품 제품에서의 동물 중, 특히 돼지 고기 및 돼지 지방(돈지)의 확인은 소비자에게 중요한 이슈가 되고 있다. 식품의 허위 기재는 잠재적으로 회교도식 식품의 존재에 있어서 훨씬 더 중요할 수 있다. 이런 이유로, 날고기와 육류 제품의 원래 종을 확인하기 위한 몇 가지 방법들이 개발되었다.

[0003] 식품 제품에 있어서 불순물 혼입을 감지하기 위해, DNA 분석을 기반으로 한 다수의 방법들이 식품 산업에서 사용되고 있다. 동물 종을 확인하는 방법은 대부분 지질, 단백질 및 DNA를 기초로 한다. DNA는 고온, 압력 및 식품 가공에서 사용되는 화학적 처리와 관련있는 조건 하에서 훨씬 안정적이기 때문에, DNA를 기초로 한 방법이 특히 더 개발되었다. 그러나 DNA를 기초로 한 방법은 시료를 채취하여 이를 다시 실험실로 옮겨 각각의 DNA를 증폭하고 분석을 통해 판별해야 하는 문제점이 있다.

[0004] 현재까지 개발되거나 시판되고 있는 돈지 열 안정성 수용성 단백질 특이 단일클론항체 및 돈지 분석용 신속간이 키트가 전무한 상태로, 열처리 제조가공된 축산가공품 및 식품 내의 돈지 분석에 어려움이 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1318311호에서는 '식품 중의 돼지고기 함량을 확인하는 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1558681호에서는 '혼합육 내의 돼지고기 판별용 돼지 종 특이적인 프라이머 쌍'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 '식품 내 돈지 분석용 마커 및 이의 용도'에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 돈지 조직 내에 존재하는 열 안정성 수용성 단백질을 항원으로 하여 돈지 열 안정성 수용성 단백질 특이 단일클론항체 및 하이브리도마 세포주를 제조하였다. 상기 항체를 통한 면역분석법을 통하여 돈지가 함유된 혼합육(축육 및 어육)을 포함한 모든 식품시료의 경우 가열처리를 한 후에도 돈지가 혼입되어 있음을 신속하게 판별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 돼지 유래 타입 I 콜라겐을 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 마커를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 검체 시료와 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 기탁번호가 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주에 의하여 생산되고, 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 기탁번호가 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에서 개발된 단일클론항체는 원료육뿐만 아니라 열처리 제조가공된 의도적 비표기 축산가공품 및 식품에 혼입되어 있는 돈지를 효과적으로 분석할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 다양한 방법으로 추출한 돈지 단백질의 SDS-PAGE 결과이다. 레인 1: 마커, 레인 2: 비가열 방법으로 추출한 생 돈지, 레인 3: 비가열 방법으로 추출한 조리한 돈지, 레인 4: 열처리에 의해 추출한 생 돈지, 레인 5: 열처리에 의해 추출한 조리한 돈지.

도 2는 돈지에서 추출한 열-안정성 수용성 단백질로 면역한 마우스의 항-혈청 항체가를 간접 ELISA법으로 측정 한 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 (A) Mab 2B8-3, (B) Mab 2B8-9, (C) Mab 2B8-20, (D) Mab 2B8-28, (E) Mab 2B8-31, (F) Mab 2B8-32 및 (G) Mab 2B8-33 항체를 이용하여 지방 및 살코기에서 추출한 열-안정성 단백질에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 레인 M: 마커, 레인 PF: 돈지, 레인 PM: 돼지 고기, 레인 BF: 소 지방, 레인 BM: 소 고

기, CF: 닭 지방, 레인 CM: 닭 고기, DF: 오리 지방, 레인 DM: 오리 고기, GM: 염소 고기, TM: 칠면조 고기.

도 4는 본 발명의 항체(Mab 2B8-31)의 콜라겐 반응 여부 확인을 위한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 5는 본 발명의 항체(Mab 2B8-31)의 돈지 단백질에 대한 항체가를 간접 ELISA법으로 측정한 결과이다.

도 6은 본 발명의 항체(Mab 2B8-31)의 다른 육류에 혼입된 돈지 단백질 함량에 따른 검출 여부를 간접 ELISA법으로 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 돼지 유래 타입 I 콜라겐을 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 마커를 제공한다.
- [0016] 본 발명에서는 돼지 유래 타입 I 콜라겐 단백질이 식품 내에서 검출된다면 돈지가 존재하는 것으로 판정할 수 있다.
- [0017] 상기 마커는 식품내 돈지 혼입 여부를 판별하기 위한 마커 조성물과 동일하게 쓰일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 조성물은 유효성분으로 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하며, 상기 항체를 이용하여 식품 내 돈지 혼입 여부를 판별할 수 있는 것이다.
- [0020] 본 명세서에서, "항체"는 본 발명의 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 마커에 특이적으로 결합하는 것이면 모든 형태의 것을 포함하는 의미이다. 따라서 단일클론항체, 다클론항체, 다중특이적 항체(즉 두 개 이상의 항원 또는 두 개 이상의 에피토프를 인식하는 항체로서 예컨대 이특이적 항체 등을 말함)를 포함하는 것 이외에, 본 발명의 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유하는 항체의 단편, 재조합 항체, 화학적으로 수식된 항체를 포함한다. 여기서 항체의 단편의 예로서는 Fab, F(ab')₂, scFv(중쇄나 경쇄의 Fv를 적당한 링커로 연결시킨 항체), Fv, Fab/c(1개의 Fab와 완전한 Fc를 가지는 항체), 항체를 단백질 절단 효소 예컨대, 파파인, 펩신으로 처리하여 얻어진 항체 단편, 단편에 대한 유전자를 유전자 재조합 방법으로 숙주세포에 도입·발현시켜 얻어지는 항체 단편을 포함하는 의미이다. 상기 항체의 글로불린 유형도 본 발명의 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 마커에 특이적으로 결합하는 것이면 특별히 한정되지 않는데, 그 글로불린 유형은 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD 중 어느 하나일 수 있다.
- [0021] 상기 단일클론항체는 바람직하게는 기탁번호가 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주에 의하여 생산될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 상기 식품이란 식육을 함유하거나, 함유할 것으로 예상되는 모든 식품을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 축수산물의 혼합육을 함유하는 가공식품일 수 있고, 예를 들어 돼지고기, 닭고기, 소고기, 오리고기, 염소고기, 칠면조, 고등어, 꽂치, 우럭, 오징어, 새우 등의 혼합육을 함유하는 가공식품일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0023] 또한, 본 발명은 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별용 키트를 제공한다.
- [0024] 상기 항체는 전술한 바와 같이 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체이면 모든 형태의 항체를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 단일클론항체일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 기탁번호가 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주에 의하여 생산되는 단일클론항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명에 사용하기 위한 키트 시스템은 이에 한정되는 것은 아니나, ELISA 플레이트, 딥-스틱 디바이스, 면역크로마토그래피법 및 방사 분할 면역검정 디바이스, 플로우-쓰로우(flow-through) 디바이스 등을 포함한다.
- [0026] 상기 본 발명의 키트에는 통상적으로 키트에 사용되는 것이라면 이에 한정되지 않지만, 예를 들어 ELISA를 이용한 것이라면 고체상 지지체; 본 발명의 단일클론 항체; 및 항원과의 반응을 위한 효소표지항체 및 효소반응을 나타내는 발색액을 함유하는 효소-연관 면역분석용(ELISA) 반응액을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로 효소표지 항체액은 goat anti-mouse IgG-HRP로 적정농도에서 플레이트 웰당 50 내지 150 μ l가 포함될 수 있으며, 발색액은 테트라메틸벤지딘(Tetramethylbenzidine, TMB)로 이루어지는 균으로부터 선택될 수 있으며, 반응차단용액은

1 N HCl 또는 1 N H₂SO₄으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

- [0027] 또한, 본 발명은 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 항체를 검체 시료와 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 식품 내 돈지 혼입 여부의 판별방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란, 시료 중의 돈지 열 안정성 수용성 단백질인 타입 I 콜라겐과 이를 인지하는 본 발명에 따른 단일클론항체의 결합물을 의미하며, 이러한 항원-항체 복합체는 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 군에서 선택되는 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 그러나 반드시 이들로만 제한되지 않고 다양한 응용과 적용이 가능하다.
- [0029] 본 발명에서는 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러가지 표지체를 사용할 수 있다. 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 방사성 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있으며, 반드시 이들로만 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 검출 표지체로서 사용되는 바람직한 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제 또는 β -락타마제가 있으며, 바람직한 형광물로는 양자점, 플루오레세인, Eu³⁺, Eu³⁺ 킬레이트 또는 크립테이트가 있으며, 바람직한 리간드로는 바이오틴 유도체가 있고, 바람직한 발광물로는 아크리디늄 에스테르 또는 이소루미놀 유도체가 있으며, 바람직한 미소입자로는 콜로이드 금 또는 착색된 라텍스가 있고, 바람직한 방사성 동위원소로는 ⁵⁷Co, ³H, ¹²⁵I 또는 ¹²⁵I-볼톤(Bolton) 헌터(Hunter) 시약이 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0031] 항원-항체 복합체를 검출하는 방법은 바람직하게는 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 효소면역흡착법은 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 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 이차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다.
- [0032] 상기 항체는 검출 표지체를 가질 수 있으며, 검출 표지체를 가지지 않을 경우는 이들 항체를 포획할 수 있고, 검출 표지체를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 기탁번호가 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주에 의하여 생산되고, 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제공한다.
- [0034] 본 발명의 "단일클론항체(monoclonal antibody)"란 당해 분야에 공지된 용어로서 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도의 특이적인 항체를 의미한다. 단일클론항체는 단세포군 항체, 모노클로날 항체 또는 단클론 항체라고 불리기도 한다. 통상적으로, 상이한 에피토프(항원결정기)들에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론항체와는 다르게, 단일클론항체는 항원상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 단일클론항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 또한 하이브리도마 배양에 의해 생산되기 때문에 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 또 다른 장점을 갖는다.
- [0035] 상기한 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 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.
- [0036] 본 발명의 단일클론항체는 한국생명공학연구원에 2016년 10월 07일자로 기탁된 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주로부터 제조된 것이다.
- [0037] 본 발명의 항체는 (1) 돈지에 0.5 M 염화나트륨을 중량비 1:2로 섞는 단계; (2) 상기 염화나트륨과 섞어진 돈지를 끓는 물에서 15분간 반응시켜 돈지에서 열 안정성 수용성 단백질을 추출하는 단계; (3) 상기 추출한 열 안정성 수용성 단백질을 인산염 버퍼에 투석한 후 마우스에 주입하는 단계; (4) 상기 주입된 열 안정성 수용성 단백질에 대하여 마우스에서 항체를 형성시키는 단계; (5) 항체가 형성된 마우스의 비장세포를 이용하여 단일클론항

체 생산용 하이브리도마 세포를 개발하는 단계를 포함하는 돈지 열 안정성 수용성 단백질 특이 단일클론항체의 제조방법을 특징으로 한다.

- [0038] 본 발명에 따른 면역원으로는 돈지에 0.5 M 염화나트륨을 중량비 1:2로 섞어 끓는 물에서 15분간 반응시켜 열 안정성 수용성 단백질을 추출하여 사용하였다.
- [0039] 상기 면역원을 마우스에 주입한 후 높은 항체가를 나타내는 면역된 마우스의 비장세포(spleen cell)를 암세포 일종인 마우스 유래 SP2/0 골수종 세포(myeloma cell)에 융합하여 하이브리도마 세포주를 제조하였다.
- [0040] 본 발명의 단일클론항체는 하이브리도마 세포주 MAb 2B8-31로부터 최종 선정되었으며, 돼지 유래 타입 I 콜라겐에 특이적으로 결합하는 단일클론항체임을 확인하였다. 상기 단일클론항체는 IgG1의 면역글로불린 아이소타입(isotype)이다. 이에 본 발명의 단일클론항체는 2B8-31으로 불리기도 한다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체를 생산하는 기탁번호가 KCTC 13128BP인 하이브리도마 세포주를 제공한다.
- [0042] 본 발명의 하이브리도마 세포주는 한국생명공학연구원에 2016년 10월 07일자로 기탁번호 KCTC 13128BP로 기탁하였으며 PM 2B8-31로 명명하였다.
- [0043] 상기 하이브리도마 세포주는 항체 생산 세포와 마우스 유래 골수종 세포와의 융합에 의해서 형성된 세포이며, 상기 하이브리도마 세포는 본 발명의 항체를 지속적으로 공급할 수 있다.
- [0044] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 재료 및 방법

[0046] 1. 면역원 제조

- [0047] 돈지 조직에서 추출한 열 안정성 수용성 단백질을 면역원으로 사용하였다. 상세하게는, 10 g의 잘게 분쇄한 순수 돈지를 20 ml의 0.5 M NaCl 용액에 첨가하여 끓는 물에서 15분간 반응시킨 후 상온에서 식힌 후 4℃에서 15분간 3,220 xg로 원심분리하여 얻은 상정액은 Whatman No. 1 여과지(filter paper)로 여과하고, 매일 PBS 용액을 바꾸어 가며 3일간 투석하여 단백질을 추출하였다. 상기 투석한 단백질 조추출물을 면역원으로 사용하였다. 조추출물의 단백질 농도는 Quick startTM Bradford protein assay dye(Bio-Rad Laboratories Inc.사, 미국)를 이용하여 측정하였다.

[0048] 2. 돈지 단백질에 대한 단일클론 항체 생산

- [0049] 단백질 조추출물(100 μ g/100 μ l PBS)은 동량(100 μ l)의 완전프로인트보강제(Freund's complete adjuvant)로 유화하여 5마리 BALB/c 암컷 마우스에 유화된 면역원(200 μ l/마우스)을 복강 내 주사하였다. 이후 2주 간격으로 불완전프로인트보강제(Freund's incomplete adjuvant)로 단백질 조추출물을 유화하여 2차, 3차 주사하였다. 3차 주사 후 3일에 미정맥(caudal vein)에서 혈청(serum)을 수집하고 높은 항체가를 ELISA로 확인하였다.
- [0050] 높은 항체가를 나타내는 면역된 마우스의 비장세포(spleen cell)를 암세포 일종인 SP2/0 골수종 세포(myeloma cell)에 융합되었다. 세포 융합의 일반적 과정은 Kohler and Milsten 방법에서 약간 변형하여 수행하였다. 1 ml의 50% PEG 1500 용액에서 비장세포(2×10^8)와 SP2/0 골수종 세포(2×10^7)를 융합하였다. HAT 선별 후, 하이브리도마 세포의 상정액은 항-혈청 역가 결정 방법에서의 간접 ELISA로 분석하였다. ELISA-양성 하이브리도마 세포를 무한대희석법(unlimited dilution)으로 분리하여 돈지 단백질에 특이적인 MAb를 생산하는 하이브리도마 세포 클론을 선별하였다.
- [0051] BALB/c 암컷 마우스는 0.5 ml의 피리스틴(pristine)를 7-10일간 주사한 후 1×10^7 하이브리도마 세포로 주사하였다. 마우스 항체는 복수(ascites)에서 암모늄 설페이트로 정제한 후 PBS 용액(pH 7.4)으로 3일간 희석하고 동결 건조시켜 -20℃에서 보관하였다. Mouse monoclonal antibody isotyping kit (Roche Applied Science, 미국)을 사용하여 항체의 아이소타입을 결정하였다.

[0052] **3. 지방과 살코기 조직 유래 단백질(crude protein)의 준비**

[0053] 로컬 시장에서 구입한 6종의 육류 살코기(돼지, 소, 닭, 오리, 염소, 칠면조) 및 4종의 지방(돼지, 소, 닭, 오리)을 항체의 특이성 및 민감성 확인에 사용하였다. 순수 지방은 살코기와 결합조직을 제거하였고, 살코기도 육안의 지방과 결합조직을 제거하여 사용하였다. 5g의 지방 및 살코기 시료를 10 ml의 0.5 M NaCl 용액에 첨가하여 끓는 물에서 15분간 반응시킨 후 상온에서 식힌 후 4℃에서 15분간 3,220 xg로 원심분리하여 얻은 상정액은 Whatman No. 1 여과지로 여과하고, 상기 여과액을 실험 전까지 냉동 보관하였다. 실험실 혼잡시료는 돈지 추출물(0~30%, v/v)을 다른 육류 살코기 추출물(소, 닭, 오리, 염소, 칠면조)에 섞어 준비하였다.

[0054] **4. 단일클론항체의 특성 분석**

[0055] **4.1. 간접 ELISA 분석**

[0056] 마이크로플레이트 웰(Nunc International, 덴마크)에 50 mM PBS 용액(pH 7.4) 내 5 µg의 단백질을 포함하는 각 지방 및 살코기 추출물 100 µl로 37℃에서 1시간 동안 코팅하였다. 플레이트를 PBST(PBS with 0.05% Tween 20)로 3번 세척하였다. 200 µl의 블로킹 버퍼(1% skim milk in PBS)를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 블로킹한 후 4번 세척하였다. 정제된 항체 100 µl를 각 웰에 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 두었다. 5번 세척한 후 1:5,000으로 희석시킨 HRP(horseradish peroxidase) 촉합 염소 항-마우스 IgG(Thermo Fisher Scientific Inc., 미국)를 각 웰에 100 µl씩 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 두었다. 6회 세척한 다음 기질 용액 (ABTS 용액)(Sigma-Aldrich Co., 미국)을 웰에 100 µl 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0057] **4.2. 웨스턴 블롯**

[0058] SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 Laemmli 방법을 변형하여 수행하였다. 간략하게는, 시료(웰 당 3 µg 단백질) 및 단백질 마커(웰 당 5 µl, prestained broad range protein maker(Bio-Rad, 미국)는 5% stacking gel(pH 6.8)에 로딩하여 12% polyacrylamide separating gel(pH 8.8)에서 분리되었다. 전기영동은 Mini-PROTEAN[®] tetra electrophoresis cell(Bio-Rad)과 PowerPac[™] Basic(Bio-Rad)을 이용하여 150V에서 1.5시간 수행하였다. 전기영동 후 겔은 EZblue[™] gel staining reagent(Sigma-Aldrich Co., 미국)에서 염색한 후 물로 탈색시켰다. 또 다른 겔은 웨스턴 블롯 분석에 사용되었다. Towbin, Staehelin and Gordon 방법으로 항체와 반응하는 면역 구성의 분자량을 측정하였다. 12% separating gel에서 분리한 단백질 밴드는 MiniTrans-Blot unit(Bio-Rad)을 이용하여 100V에서 1시간 동안 나이트로셀룰로스 멤브레인으로 전달하였다. 멤브레인은 블로킹 버퍼(3% skim milk in PBS)로 37℃에서 1시간 동안 블로킹한 후 3번 PBST로 세척하였다. 항체를 생산하는 하이브리도마 세포 배양액(1:4 in 3% skim milk-PBS)에 멤브레인을 37℃에서 1시간 동안 두었다가 4번 세척한 후 1:6,000 희석한 염소 항-마우스-AP 촉합체(goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate)(Bio-Rad)에 반응시켰다. 발광은 AP Conjugate Substrate kit(Bio-Rad)를 첨가하여 10분간 처리하여 시각적으로 관찰하였다.

[0059] 또한, 본 발명의 항체가 콜라겐 반응 여부 확인을 위해 PM 2B8-31 항체와 시판 collagen I+III 항체(Thermo scientific, Prod#PA1-36140)(1:1000 in 3% skim milk-PBS) 각각에 멤브레인을 37℃에서 1시간 동안 두었다가 4번 세척한 후 PM 2B8-31 항체 반응 멤브레인은 1:6,000 희석한 염소 항-마우스-HRP 촉합체(goat anti-mouse IgG-peroxidase conjugate)(Bio-Rad), 시판 collagen + 항체 반응 멤브레인은 염소 항-토끼-HRP 촉합체(goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate)(Bio-Rad)에 반응시켰다. 발광은 ECL(PerkinElmer)을 가하여 이미지 분석 장치를 통해 확인하였다.

[0060] **실시예 1. 면역원으로서의 돈지 조직 내 열 안정성 수용성 단백질(TSSP, thermal stable-soluble protein) 준비**

[0061] 돈지 조직 내 TSSP의 존재는 SDS-PAGE로 확인하였으며, 항원성은 TSSP 면역 후 항-혈청 역가 측정으로 확인하였

다.

[0062] 돈지 추출물의 단백질 프로파일은 SDS-PAGE로 분석하였다. 도 1은 SDS-PAGE에서의 비가열 및 가열 방법으로 추출한 돈지 내 단백질 양상을 보여주고 있다. 조리/열(조리 및 열) 처리하지 않은 돈지 시료의 단백질 프로파일은 조리/열 처리한 돈지 시료의 단백질 프로파일과는 상당한 차이를 보였다. 비가열한 돈지 추출물은 25~100kDa 범위에서 주로 단백질 밴드가 나타났으나, 가열 처리된 시료에서는 100kDa가 넘는 단백질 밴드, 30kDa 가량의 밴드 및 15kDa 미만의 단백질 밴드가 관찰되었다. 다양한 TSSP가 지방 조직 내에 존재하며, 25~100kDa 범위에서의 수용성이며 열에 비안정적인 단백질이 조리/열 처리에 의해 비수용성으로 변성되는 것으로 확인되었다. 5마리의 마우스를 열 처리에 의해 얻은 돈지 추출물을 5마리 마우스에 면역하여 높은 항체가를 나타내는 마우스를 선별하였다(도 2).

[0063] 실시예 2. 돈지 내 TSSP에 대한 단일클론 항체

[0064] 마우스 면역과 세포융합기술에 의해 4종의 융합세포(2B8, 2D11, 3E3, 4E11)가 선별되었고, 무한대희석법에 의해 최종 7종의 하이브리도마 세포주(2B8-3, 2B8-9, 2B8-20, 2B8-28, 2B8-31, 2B8-32, 2B8-33)를 선별하여 ELISA와 웨스턴 블롯으로 확인하였다. ELISA 분석 결과 육류 6종의 고기(돼지, 소, 닭, 오리, 염소, 칠면조 고기), 육류 3종의 지방(소, 닭, 오리 지방) 및 어류 5종(고등어, 꽁치, 우럭, 오징어, 새우)에서 전혀 교차 반응을 나타내지 않았다(표 1). 상기 7종 항체 모두 웨스턴 블롯 결과 돈지 추출물에서 90~150kDa 가량의 단백질을 관찰하였으며, 돼지 살코기에서 약하게 관찰되었다(도 3). 반면 다른 고기 살코기 및 지방에서는 전혀 밴드가 관찰되지 않았다(도 3). 상기 ELISA와 웨스턴 블롯 결과 2B8-31 항체가 가장 높은 항체가 및 특이성을 보이는 것으로 확인하였다.

[0065] 또한, 도 4에 개시된 바와 같이 항체가 반응하는 단백질의 위치를 비교해 볼 때 본 발명의 2B8-31 항체는 콜라겐에 반응하는 항체인 것으로 확인되었다. 현재 알려진 타입 I 콜라겐의 분자량은 115~130kDa이므로 본 발명의 항체에 결합하는 타겟 단백질이 타입 I 콜라겐으로 확인되었다.

표 1

Sample		Mab						
		2B8-3 (IgG1)	2B8-9 (IgG1)	2B8-20 (IgG1)	2B8-28 (IgG1)	2B8-31 (IgG1)	2B8-32 (IgG1)	2B8-33 (IgG1)
Pork	Fat	++	++	++	+	++	++	++
	meat	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	-
Beef	Fat	-	-	-	-	-	-	-
	meat	-	-	-	-	-	-	-
Chicken	Fat	-	-	-	-	-	-	-
	meat	-	-	-	-	-	-	-
Duck	Fat	-	-	-	-	-	-	-
	meat	-	-	-	-	-	-	-
Goat meat		-	-	-	-	-	-	-
Turkey meat		-	-	-	-	-	-	-
Mackerel		-	-	-	-	-	-	-
Mackerel pike		-	-	-	-	-	-	-
Rockfish		-	-	-	-	-	-	-
Squid		-	-	-	-	-	-	-
Shrimp		-	-	-	-	-	-	-

Absorbance readings at 405 nm: <0.199: “-”; 0.2 to 0.499: “+/-”; 0.5 to 0.999: “+”; ≥ 1: “++”

[0066]

[0067] 상기 7종의 하이브리도마 세포의 아이소타입을 확인한 결과 모두 카파 경쇄를 포함하는 IgG1 서브클래스였다(표 1). IgG 면역글로불린은 면역분석방법에서 다루기 쉽고 수행능력이 우수하여 많이 사용되어지므로, 본 발명의 항체가 식품 및 축산 가공품에서의 돈지를 민감하고 특이하게 검출하는데 유용한 바이오-리셉터가 될 수 있을 것이다.

[0068] 실시예 3. 본 발명의 항체의 바이오-리셉터로서의 활용 확인

[0069] 다양한 돈지 추출물 함량(0, 1 5, 10, 15, 30, 100%, v/v)에 따라 2B8-31 항체의 민감도(sensitivity)가 어떠한지를 측정하였다. 그 결과는 도 5에 보여지는 것과 같이 1% 돈지 함량까지 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0070] 또한, 돈지와 다른 육종 고기 추출물의 함량비(pork fat extract/other species meat extract)가 각각 100/0, 30/70, 15/85, 10/90, 5/95, 1/99, 0/100로 이루어진 혼합육에서 간접 ELISA를 수행한 결과 다른 육종 고기에 1%(v/v) 돈지가 포함된 경우에도 검출됨을 확인하였다(도 6). 이들 결과에 따르면, 간접 ELISA의 바이오-리셉터로서 2B8-31 항체가 다른 고기가 혼합된 시료에서도 돈지 단백질을 특이적으로 결합할 수 있음을 알 수 있다.

수탁번호

[0071]

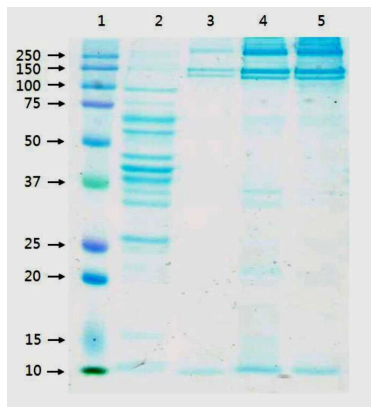
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13128BP

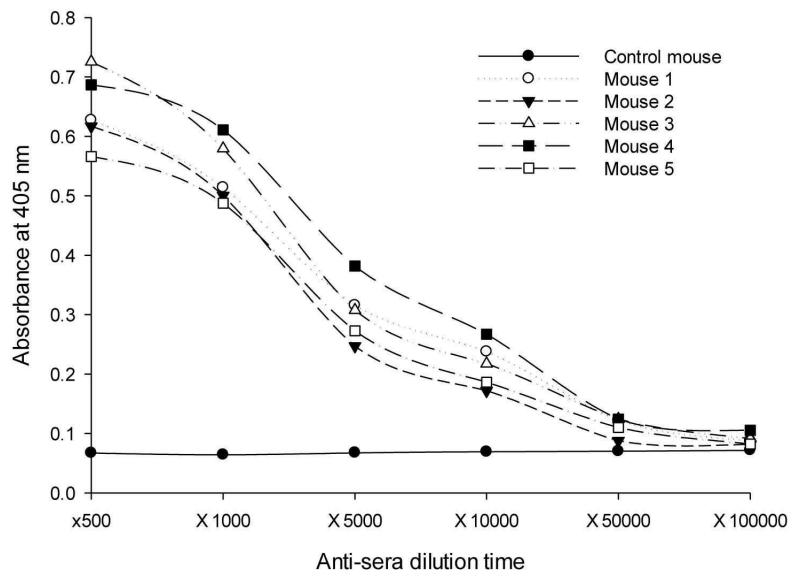
수탁일자 : 20161007

도면

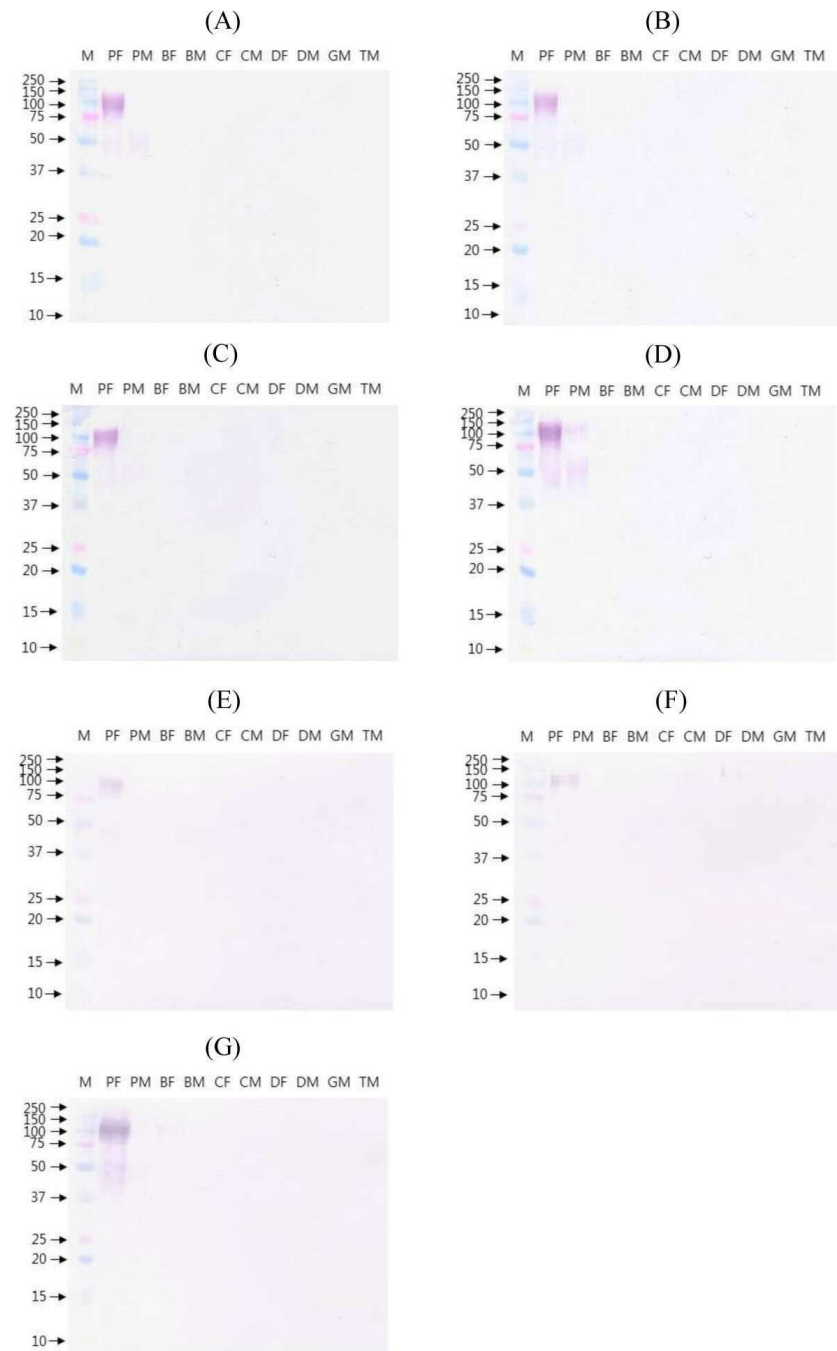
도면1



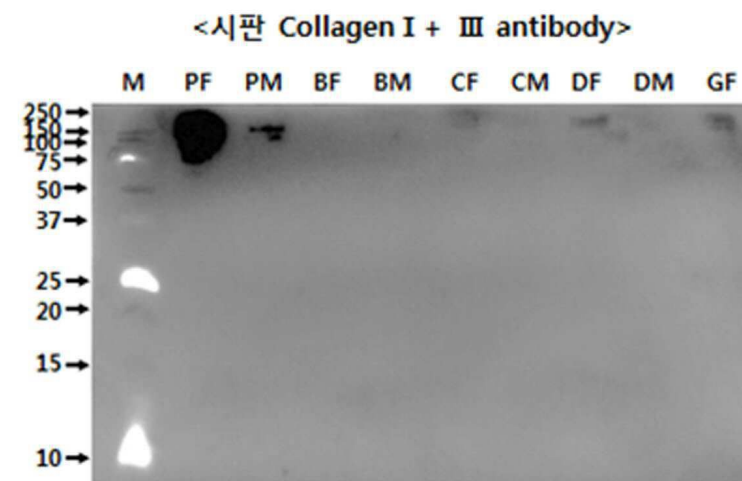
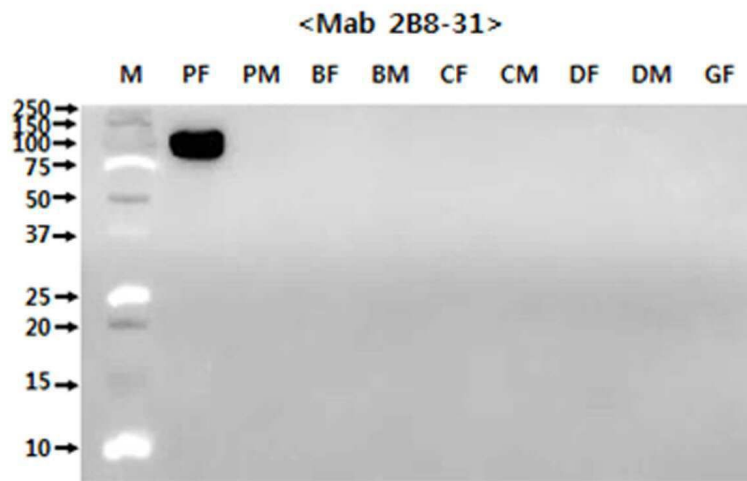
도면2



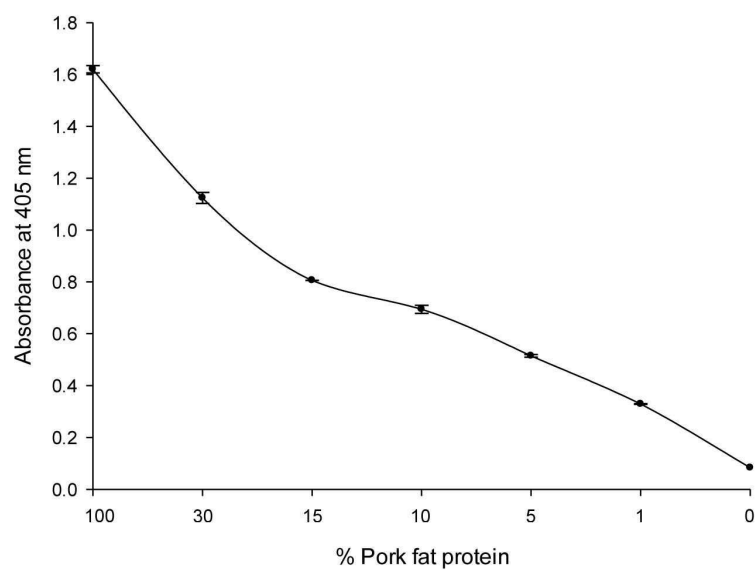
도면3



도면4



도면5



도면6

