(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 4 월 4 일 (04.04.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/066249 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 16/16 (2006.01) *C07K 16/06* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/009412

(22) 국제출원일: 2018 년 8 월 16 일 (16.08.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0127916 2017 년 9 월 29 일 (29.09.2017) KR

(71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY**) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: 김외연 (**KIM, Woe-yeon**); 52849 경상남도 진주시 내동면 순환로 425-61, 110동 1402호, Gyeongsangnam-do (KR). 차준영 (**CHA, Joon-Yung**); 51372 경상남도 창원시 의창구 반계로 104-9, 201동 1002호, Gyeongsangnam-do (KR).

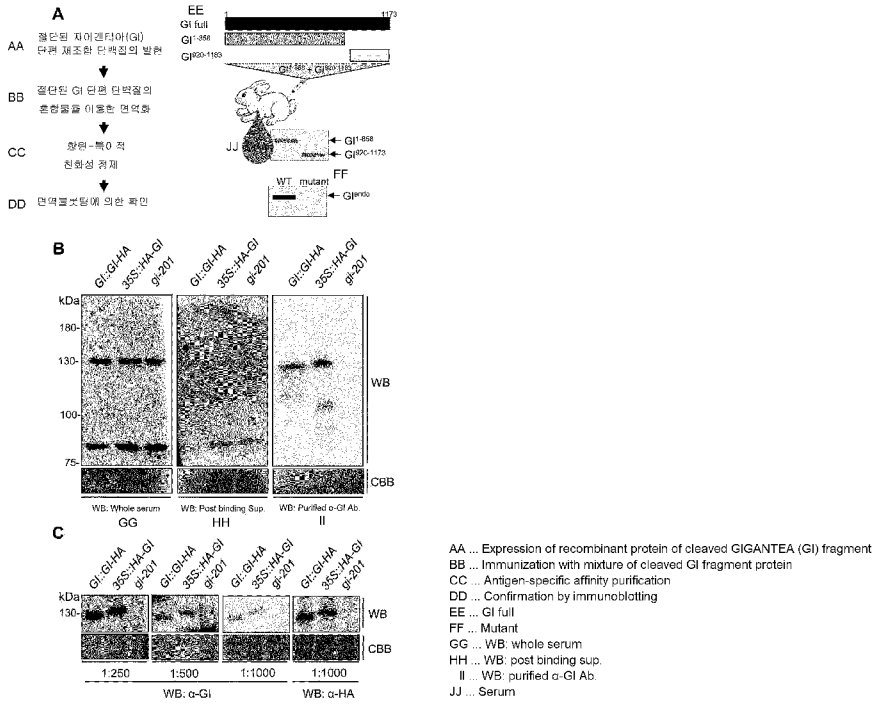
(74) 대리인: 최규환 (**CHOI, Kyu Whan**); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

WO 2019/066249 A1

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING POLYCLONAL ANTIBODY AGAINST GIGANTEA PROTEIN OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

(54) **발명의 명칭:** 애기장대 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method of producing a polyclonal antibody against GIGANTEA protein, which comprises producing a cleaved peptide having an amino terminal of the GIGANTEA protein and a cleaved peptide having a carboxy terminal of the GIGANTEA protein in *E. coli*, and then mixing and injecting the produced recombinant cleaved peptides of GIGANTEA into a rabbit to produce a polyclonal antibody against the GIGANTEA protein; and a composition and a kit for detecting GIGANTEA protein comprising as an active ingredient a polyclonal antibody produced by the method.

(57) **요약서:** 본 발명은 자이겐티아 단백질의 아미노 말단과 카복시 말단의 절단체 펩티드를 대장균에서 각각 생산한 후, 생산된 재조합 자이겐티아 절단체 펩티드를 토끼에 혼합주사하여 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 다클론 항체를 유효성분으로 포함하는 자이겐티아 단백질 검출용 조성물 및 키트에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 애기장대 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 단백질 절단체를 이용한 식물 생체시계 주요인자 자이겐티아 단백질에 대한 항체 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 자이겐티아 단백질의 아미노 말단과 카복시 말단의 절단체 펩티드를 대장균에서 각각 생산한 후, 생산된 재조합 자이겐티아 절단체 펩티드를 토끼에 혼합주사하여 자이겐티아 단백질에 대한 다클론(polyclonal) 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 애기장대 자이겐티아(GIGANTEA, 이하 GI) 단백질은 단일 유전자에 의해 코딩되어 있고, 관속식물(vascular plants)에 매우 잘 보존되어 있으며, 광주기적 개화시기를 매개하는 생체시계에 의해 조절된다. GI는 저녁 시간대에 생체시계 주요인자인 TOC1(Timing of Cab expression 1) 및 PRR5(Pseudo-Response Regulator 5) 단백질의 표적화된 프로테오좀 관련 분해를 유도하는 F-박스 단백질인 ZTL(ZEITLUPE)과 결합하여 안정화시킨다. GI는 또한 광 신호전달, 하배축(hypocotyl) 길이 신장, 당 신호전달, 전분 축적, 엽록소 축적, 증산(transpiration)과 같은 다양한 식물 생리 반응과 염, 저온 및 가뭄과 같은 비생물적학적 스트레스에 대한 내성 획득 등과 같은 다양한 식물내 생리반응에 관여한다. 그러나, 아직까지 GI 단백질내 보존된 도메인 및 분자 수준에서의 기능은 확인되지 않고 있다. 흥미롭게도, GI 전사체의 발현이 변형된 몇몇 *gi* 돌연변이 대립형질은 서로 다른 개화 시기 및 일주기 차이를 보여주었다. 최근의 연구에서, 본 발명자들은 GI의 아미노 말단(1~858aa)이 ZTL 단백질의 안정화를 위한 분자샤페론으로서 전체 길이 GI 단백질과 동일한 활성을 보이며, 더 나아가 카복시 말단(920~1,173aa)과는 다르게 분자샤페론인 HSP90과 함께 ZTL의 일주기성 단백질 리폴딩(재접힘)을 촉진하는 것으로 보고한 바 있다.
애기장대에서, 활동일주기는 아침- 및 저녁- 단계 유전자-단백질 간의 복잡한 피드백 고리를 가진 전사, 번역 및 번역 후 과정으로 이루어져 있다. GI는 암 조건에서 프로테아좀 의존성 분해를 보이며, 전사 및 번역 수준의 발현 변화를 매일 반복하며, 낮동안 증가된 GI 단백질은 애기장대 활동일주기의 번역 후 고리에서 ZTL 단백질 항상성 조절에 필수적이다. 본 발명자들의 이전 연구에서, GI가 프로테아좀 의존성 방식으로 염에 의해 분해되면 염 저항성에 핵심 기작인 SOS(Salt-Overly Sensitive) 신호 경로의 활성을 유도한다고 보고하였고, 이는 GI 단백질의 결핍이 염 스트레스에 대한 내성을 부여함을 의미한다. 비록, 생리학적 및 발달 과정뿐만 아니라 생물학적/비생물학적 스트레스 반응에 있어서 GI가

다양한 다면발현적 기능을 수행할지라도, GI에 특이적인 항체의 결핍으로 인해 GI의 독특한 분자적 기능을 확인하기에는 어려움이 있다. 따라서, 다양한 환경적 요인들에 의해 조절되는 GI 단백질의 전사 후 변형을 밝히기 위해 GFP, HA와 같은 에피토프 태그를 GI에 융합하여 사용하지만, 형질전환 식물체를 제조하는데 수개월이 소모되는 단점이 있다.

[3] 한편, 한국등록특허 제1406740호에는 '토마토황화잎말림바이러스 C2유전자의 대장균내 발현 및 재조합 C2단백질에 대한 다클론항체 생산법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1348131호에는 자이겐티아 단백질의 아미노-말단(1~391aa)만 발현하는 재조합 단백질에 관한 '염분 스트레스 저항성을 조절하는 자이겐티아 단백질'이 개시되어 있으나, 본 발명의 애기장대 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법에 대해서는 기재된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 전체 길이의 자이겐티아 단백질로는 발현이 어려운 문제점을 해결하고자, 아미노 및 카복시-말단으로 절단된 두 개의 자이겐티아 펩티드를 대장균에서 발현시키고, 생산된 두 개의 절단된 자이겐티아 펩티드의 혼합물을 항원으로 사용하여, 토끼에서 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체를 생산하였고, 야생형 애기장대, 배추, 유채, 토마토, 옥수수 및 톨페스큐 식물체에서 본연의 전체 길이 자이겐티아 단백질을 성공적으로 검출할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[5] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 (a) 애기장대 유래 자이겐티아(GIGANTEA) 단백질의 아미노-말단 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; (b) 애기장대 유래 자이겐티아 단백질의 카복시-말단 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; (c) 상기 (a) 및 (b) 단계에서 제조한 재조합 벡터를 숙주세포에 각각 형질전환하여 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드를 각각 발현시키는 단계; (d) 상기 (c) 단계의 각각 발현된 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드를 정제하는 단계; (e) 상기 (d) 단계의 정제된 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드를 동물에 투여하여 항혈청을 생산하는 단계; 및 (f) 상기 (e) 단계에서 생산된 항혈청에서 다클론 항체를 분리정제하는 단계;를 포함하는 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법을 제공한다.

[6] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 다클론 항체를 유효성분으로 포함하는 자이겐티아 단백질 검출용 조성물을 제공한다.

[7] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 다클론 항체를 유효성분으로

포함하는 자이겐티아 결합 단백질 검출용 조성물을 제공한다.

[8] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 다클론 항체를 유효성분으로 포함하는 자이겐티아 단백질 검출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[9] 본 발명의 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법은 발현 및 분리가 어려운 전체길이의 자이겐티아 단백질을 절단체 형태의 펩티드로 재조합하여 발현시킴으로써 발현 및 분리를 용이하게 하였으며, 각각의 절단체 펩티드를 혼합주사하여 생산된 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체는 식물체 시료를 대상으로 한 면역블롯팅 실험에서 효과적으로 자이겐티아 단백질을 인식할 수 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명의 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체는 밝혀지지 않은 다양한 자이겐티아 단백질의 분자적 기작을 규명하는데 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[10] 도 1은 전체 GI 단백질 발현을 위해 pGEX-KG 벡터에 *GI* 전장 cDNA를 클로닝한 후, 대장균에 형질전환하여 재조합 단백질의 발현을 확인한 결과이다. S: 세포 파쇄물 중 수용성 분획, P: 세포 파쇄물 중 불용성 분획.

[11] 도 2는 대장균에서 절단된 GI 단편 재조합 단백질의 발현을 확인한 결과로, (A)는 1~858번째 아미노산으로 이루어진 GI 절단체(GI^{1-858})의 발현양상을 확인한 6% SDS-PAGE 결과이고, (B)는 920~1,173번째 아미노산으로 이루어진 GI 절단체($GI^{920-1173}$)의 발현양상을 확인한 12% SDS-PAGE 결과이다. T: 총 추출물, P: 펠릿, S: 상층액.

[12] 도 3은 절단된 GI^{1-858}와 $GI^{920-1173}$의 SDS-PAGE 결과로, (A)와 (B)는 50㎖ 배양 수준에서 IPTG에 의해 단백질 발현유도한 세포의 펠릿(P)과 상층액(S)를 각각 8% 및 12% SDS-PAGE에서 확인한 결과이고, (C)는 (A)와 (B)에서 분리한 펠릿(P) 분획 중 각 GI 절단체만을 겔에서 추출한 후, Electro-eluter를 통해 절단체 단백질만을 재추출하여 재영동한 결과이다.

[13] 도 4의 (A)는 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체 제작에 관한 실험 과정을 모식화한 것이고, (B)는 면역화된 토끼로부터 획득한 전체 혈청, 정제 후의 혈청 잔액, 및 정제된 자이겐티아에 대한 항체(α-GI, 1:500)을 사용하여 *GI::GI-HA*, *35S::GI-HA* 및 *gi-201* 식물체에서 추출한 총 단백질 시료를 대상으로 자이겐티아 단백질의 검출능을 확인한 웨스턴 블롯 결과이고, (C)는 정제된 α-GI 항체의 결합능을 확인하기 위해 항체 희석 비율을 달리하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. *GI::GI-HA*: GI 프로모터 유도 HA 에피토프 태그 결합 GI 유전자 발현 애기장대 식물체, *35S::GI-HA*: HA 에피토프 태그 GI 유전자 과발현 애기장대 식물체, *gi-201*: GI 유전자 결핍 애기장대 식물체.

[14] 도 5의 (A)는 정제된 α-GI 항체의 면역침강을 위한 일차 결합능을 확인한 결과로, Input은 차이트게버 시간(zeitgeber time, 빛이 들어온 시간) 13(ZT 13,

빛이 들어오고 13시간 뒤)에 수확한 야생형(Col-0) 및 35S::HA-GI 애기장대 식물체의 추출물 내에 존재하는 GI 단백질을 의미하며, IP by α-GI는 차이트게버 시간 13에 수확한 야생형(Col-0) 및 35S::HA-GI 애기장대 식물체의 추출물내 GI 단백질을 α-GI 항체-결합 단백질 A-아가로스 비드 혼합물로 검출해낸 GI 단백질을 의미한다. (B)는 GI 결합 단백질인 ZTL을 담배 표피 세포내에 GI-HA 유무 조건에 따라 발현시킨 후, A와 동일한 방법으로 α-GI 항체로 면역침강을 위한 일차 결합을 유도하고, ZTL 단백질의 결합여부를 확인한 결과이다.

[15] 도 6은 정제된 α-GI 항체를 이용한, 야생형 애기장대 식물체에서 일주기성 자이겐티아 단백질의 발현 변화를 확인한 결과이다. CBB: 코마시 블리리안트 블루 염색 블랏.

[16] 도 7은 정제된 애기장대 α-GI 항체를 이용하여, 다양한 식물체에서 α-GI 항체의 교차 반응성을 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[17] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[18] (a) 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 자이겐티아(GIGANTEA) 단백질의 아미노-말단 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;

[19] (b) 애기장대 유래 자이겐티아 단백질의 카복시-말단 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;

[20] (c) 상기 (a) 및 (b) 단계에서 제조한 재조합 벡터를 숙주세포에 각각 형질전환하여 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드를 각각 발현시키는 단계;

[21] (d) 상기 (c) 단계의 각각 발현된 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드를 정제하는 단계;

[22] (e) 상기 (d) 단계의 정제된 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드를 동물에 투여하여 항혈청을 생산하는 단계; 및

[23] (f) 상기 (e) 단계에서 생산된 항혈청에서 다클론 항체를 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법을 제공한다.

[24] 본 명세서의 용어 "다클론 항체(polyclonal antibody)"란 하나의 항원에 대하여 여러 개의 클론이 동시에 활성화되어 만들어진 항체를 의미한다. 즉, 하나의 항원에 존재하는 여러 가지 항원결정기(에피토프)를 인식하는 항체의 모임이 다클론 항체인 것이다.

[25] 상기 용어 "항체"는 당업계에 공지된 용어이며 공지된 항원에 결합하는 분자 또는 분자의 활성 단편을 의미한다. 공지된 항원에 결합하는 활성 단편의 예는 Fab 및 F(ab')2 단편을 포함한다. 상기 활성 단편은 수많은 기술에 의해서 본 발명의 항체로부터 유도될 수 있다. 항체의 활성 단편 분리에 대한 일반적인

기술들에 대한 설명은 문헌(예를 들면, Khaw, B.A. et al., (1982) J. Nucl. Med. 23:1011-1019)을 참조한다. 또한 용어 "항체"는 이특이적(bispecific) 및 키메라(chimeric) 항체를 포함한다.

[26] 본 발명의 일 구현 예에 따른 다클론 항체의 제조방법에 있어서, 상기 애기장대 유래 자이겐티아(GIGANTEA) 단백질의 아미노-말단 펩티드 및 카복시-말단 펩티드는 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 1은 전체 자이겐티아 단백질(GenBank accession no. AT1G22770.1; Protein: NP_564180.1)의 1~858번째 아미노산으로 이루어진 것이고, 서열번호 2는 전체 자이겐티아 단백질의 920~1,173번째 아미노산으로 이루어진 것이다.

[27] 본 발명의 일 구현 예에 따른 다클론 항체의 제조방법에 있어서, 상기 (c) 단계의 숙주세포는 대장균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[28] 본 발명의 일 구현 예에 따른 다클론 항체의 제조방법에 있어서, 상기 (e) 단계의 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드는 면역증강제와 혼합하여 투여될 수 있다. 상기 면역증강제(adjuvant)는 항원(면역원)을 투여(주사)하기 전 또는 함께 투여시, 항체 형성과 같은 항원에 대한 포유동물의 면역 반응을 증강시킬 목적으로 사용되며, Freund's, Alum, the Ribi Adjuvant System 또는 Titermax 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[29] 본 발명의 일 구현 예에 따른 다클론 항체의 제조방법에 있어서, 상기 (e) 단계의 동물은 바람직하게는 토끼, 생쥐 또는 염소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 항체의 제조에 이용되는 동물은 더 많은 항체를 분리할 수 있는 더 많은 양의 혈청을 가지는 비교적 큰 포유동물이 우선적으로 선택될 수 있다. 상기 동물에 면역원이 주입되면, 면역계의 B 세포를 자극하여 면역원에 대해 특이적인 면역글로불린(immunoglobulin, Ig)이 생산된다.

[30] 본 명세서의 용어 "항혈청(antiserum)"은 외부로부터 들어온 항원에 대해 특이적인 항체를 갖고 있는 혈청을 의미한다. 항원이 사람 및 실험동물의 체내에 들어가면 이에 대하여 특이적으로 반응하는 항체가 생성되는데, 새롭게 만들어진 항체는 혈액의 혈청(serum) 성분에 존재하게 되며, 이렇듯 항체를 포함한 혈청을 항혈청 또는 면역혈청(immune serum)이라고 부른다. 항체는 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD 면역글로불린 중의 어느 것이지만, 통상은 그들의 혼합이고 혈청 내에 많은 다른 혈청단백질과 동시에 혼합하고 있다.

[31] 본 발명의 일 구현 예에 따른 다클론 항체의 제조방법에 있어서, 상기 (f) 단계의 다클론 항체는 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드로 면역시킨 동물의 항혈청에서 분리하여 얻을 수 있다. 상기 항체는 여과, 투석, 이온 교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 항혈청으로부터 정제될 수 있다.

[32] 본 발명의 일 구현 예에 따른 다클론 항체의 제조방법에 있어서, 상기 (f) 단계의 다클론 항체는 IgG인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[33] 본 발명은 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 다클론 항체를 유효성분으로 포함하는 자이겐티아 단백질 검출용 조성물 및 자이겐티아 결합 단백질 검출용 조성물을 제공한다.

[34] 본 발명은 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 다클론 항체를 유효성분으로 포함하는 자이겐티아 단백질 검출용 키트를 제공한다.

[35] 상기 다클론 항체에 대해서는 전술한 바와 같다. 본 발명의 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체를 포함하는 검출용 조성물을 사용하면, 시료 내 자이겐티아 단백질 및/또는 자이겐티아 단백질과 결합하는 단백질의 유무를 확인할 수 있다.

[36] 본 발명의 항체는 검출 가능한 물질, 즉 검출 표지제와 커플링시켜 검출을 용이하게 할 수 있다. 검출 표지제의 예는 다양한 효소, 보결분자족, 형광 물질, 발광 물질, 생물 발광 물질 또는 방사성 물질 등을 포함한다. 검출 표지제는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 본 발명의 PINK1 다클론 항체에 직접적으로 커플링 또는 결합되거나, 중간체(예를 들면, 당해 분야에 공지된 링커)를 통해 간접적으로 커플링 또는 결합되거나, PINK1 단백질을 인식하는 또 다른 다클론 항체 또는 PINK1 항체를 인식하는 항체인 2차 항체에 커플링 또는 결합될 수 있다. 적합한 효소의 예는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 아세틸콜린 에스터라제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, β-D-갈락토시다아제, 글루코스 옥시다아제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산 디하이드로게나아제 또는 인버타제 등을 포함하고; 적합한 보결분자족 복합체의 예는 스트렙트아비딘/비오틴 또는 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 댄실 클로라이드, 피코에리트린 또는 피코빌리프로테인 등을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀, 이소루시놀 또는 루시제닌을 포함하고; 생물 발광 물질의 예는 루시퍼라제, 루시페린 또는 아에쿠오린을 포함하며; 적합한 방사선 물질의 예는 ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C 또는 ^{3}H 등을 포함할 수 있으나, 이제 제한되지는 않는다.

[37] 본 발명의 자이겐티아 단백질 검출용 키트는 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분을 가진 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.

[38] 본 발명의 상기 키트는 면역분석용 키트로, 일반적으로 면역분석법은 효소면역분석법에 비하여 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)가 모두 우수한 장점이 있다.

[39] 본 명세서의 용어 "면역분석"은 항원-항체 반응 등의 특이적인 면역반응을 이용하여 분석물질을 검출하는 방법을 의미한다.

[40]

[41] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[42]

[43] **재료 및 방법**

[44] **1. 식물 재료 및 생장 조건**

[45] 애기장대 식물체는 야생형으로서 Columbia-0(Col-0)을 사용하였고, HA-태깅된 *GI::HA-GI*, *35S:HA-GI*, 및 *gi-201* 변이체를 사용하였다(David KM et al., 2006, FEBS Lett. 580:1193-1197; Kim YW et al., 2007, Nature 449(7160):356-360; Martin-Tryon et al., 2007, Plant Physiol. 143:473-486). 멸균한 종자를 MS 고체배지에 올리고 23℃에서, 100~120μmol·m^{-2}·s^{-1} 광량의 백색광의 장일 조건(16시간 명/8시간 암) 하의 생장 챔버에서 배양하였다. 항체의 교차 반응성을 확인하기 위해, 애기장대(Col-0), 배추(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*), 유채(*Brassica napus* L.), 토마토(*Lycopersicon lycopersicum* L. *Hongkwang*), 옥수수(*Zea mays* L.) 및 톨페스큐(*Festuca arundinacea* Schreb.)의 종자를 표면 멸균하고, MS 또는 B5(토마토) 고체배지에 준비하여 23℃, 12시간 명/12시간 암 조건의 생장 챔버에서 2주간 배양하였다. 옥수수와 톨페스큐는 종자 멸균 없이 바로 토양에 심어 3주간 위와 같이 배양하였다.

[46]

[47] **2. 절단된 자이겐티아(GI) cDNA의 제작 및 재조합 단백질 발현**

[48] 절단된 GI 변이체의 제작은 이전의 방법(Cha JY et al., 2017, Nature Commun. 8(1):3)에 따라 제작하였다. 간단하게, 1~858번째 아미노산으로 이루어진 GI 절단체(GI^{1-858})와 920~1,173번째 아미노산으로 이루어진 GI 절단체($GI^{920-1173}$)를 pDONR-zeo 벡터에 클로닝한 후, 재조합-기반 게이트웨이 클로닝 시스템(Invitrogen, 미국)을 이용하여 6xHis 태그를 가진 gREST 벡터로 이동시켰다. 재조합 단백질 생산을 위해, 상기 플라스미드를 대장균 BL21 (DE3) pLysS 균주로 형질도입하고, 형질도입된 세포는 37℃에서 OD_{600}=0.8이 될 때까지 배양한 후, 1mM의 IPTG(isoprophyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)를 첨가하여 발현 유도한 후 30℃에서 3시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 6,000rpm에서 10분동안 원심분리하여 세포를 수거하고, 세포 펠릿은 1x PBS(Phosphate-buffered saline)로 재현탁한 후, 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[49]

[50] **3. 항원의 준비 및 다클론 항체의 생산**

[51] 냉동 보관된 세포를 녹인 후, 1%(v/v) Triton-100을 첨가하여 20분동안 반응시킨 후, 초음파분쇄를 통해 세포를 파쇄하였다. His-GI^{1-858} 및 His-$GI^{920-1173}$의 수용성 및 불용성 분획물은 4℃, 12,000rpm, 10분의 조건으로 원심분리를 통해 나누었고, 12% SDS-PAGE를 통해 확인하였다. 불용성 분획물에서 His-GI^{1-858} 및 His-$GI^{920-1173}$를 발현하는 단백질 밴드를 잘라내어, Electro-Eluter(Bio-Rad, 미국)를 사용하여 단백질을 회수하였다. 각 절단체를 1:1 비율로 혼합한 500㎍의

단백질을 완전 프로인트 항원보강제(Complete Freund's Adjuvant)와 1:1의 비율로 혼합한 후, 토끼(뉴질랜드 화이트종, 수컷, 10주령, 3kg)의 피하지방 내로 주사하여 면역화하였고, 면역화는 2주 간격으로 3회 실시하였다. 면역화된 토끼로부터 혈액 시료를 수집하여, 4℃, 1,000x*g*, 10분의 조건으로 원심분리를 수행하고, 항혈청은 재조합 His-GI$^{1-858}$ 및 His-GI$^{920-1173}$를 사용하여 항원-특이적 친화성 분리법을 사용하여 분리하였다. 모든 실험동물은 윤리적인 원칙에 따라 사육하였으며, 실험 과정은 경상대학교 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 표준 프로토콜을 준수하여 진행하였다. 항체 순수정제방법은 멤브레인 기반 친화성 분리법을 이용한 것으로서, 불용성 His-GI$^{1-858}$ 및 His-GI$^{920-1173}$은 12% SDS-PAGE로 전개한 후, PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인으로 트랜스퍼하고, 비특이적 반응을 줄이기 위해, His-GI$^{1-858}$ 및 His-GI$^{920-1173}$의 밴드 부분만 잘라냈다. 잘라낸 멤브레인은 1%(w/v) BSA(bovine serum albumin)가 들어있는 1xTBS 버퍼로 블록킹한 후, 항혈청을 혼합하고 4℃에서 밤새 반응시켰다. 상기 멤브레인 스트립을 1xTBS로 3회 세척한 후, 결합된 다클론 α-GI 항체는 0.1M 글리신(pH 2.5)으로 용리시켰으며, 즉시 2M Tris-HCl(pH 8.0)으로 중화시켰다. 정제한 항체는 -20℃에서 사용전까지 보관하였다.

[52]

[53] **4. 정제한 α-GI 항체를 이용한 웨스턴 블랏**

[54] 식물 조직으로부터 총 단백질은 8M의 요소(urea), 5%(w/v) SDS, 100mM Tris-HCl(pH 6.8), 1mM EDTA, 2%(v/v) β-머캅토에탄올, 0.00125%(w/v) 브로모페놀블루 및 프로테아제/포스파타아제/프로테아좀 저해제(1mM PMSF, 5㎍/㎖ leupeptin, 1㎍/㎖ aprotinin, 1㎍/㎖ pepstatin, 5㎍/㎖ antipain, 5㎍/㎖ chymostatin, 2mM Na_2VO_3, 2mM NaF 및 50μM MG132)를 포함하는 버퍼를 사용하여 추출하였다. 4℃, 12,000rpm, 10분의 조건으로 원심분리한 후, 상층액을 회수하여 6% SDS-PAGE로 분리하고, PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼한 후, 다클론 α-GI 항체를 사용하여 면역블랏을 수행하고, ECL 검출 시약(Thermo, 미국)을 이용하여 화학발광을 통해 GI 단백질을 검출하였다.

[55]

[56] **5. 면역침강법(Immunoprecipitation)**

[57] 2주령 애기장대(Col-0 및 *35S:HA-GI*) 식물체의 추출물을 100mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM 염화나트륨, 0.5%(v/v) NP-40, 1mM EDTA, 3mM DTT 및 상기에서 언급한 프로테아제/포스파타아제/프로테아좀 저해제를 포함하는 추출 버퍼를 사용하여 추출한 후, 4℃, 12,000rpm, 5분의 조건으로 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 다클론 α-GI 항체를 단백질-A 아가로스(Sigma, 미국)와 함께 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 상기 상층액을 혼합하여 4℃에서 3시간동안 혼합하였다. 비드를 상기의 추출 버퍼(저해제는 미포함)로 3회 세척한 후, 차가운 1xPBS로 재현탁하였다. 투입물(상층액)과 면역침강 단백질을 각각 로딩버퍼와

혼합하여 6% SDS-PAGE로 분리하였다. 면역블랏 수행은 전술한 바와 같다.

[58]

[59] **6. 공동면역침강법(Co-immunoprecipitation)**

[60] 3.5주령 담배(*Nicotiana Benthamiana*)의 표피세포하에 ZTL과 GI-HA가 과발현되는 벡터가 실린 아그로박테리움을 주입해 ZTL 및 GI-HA 단백질을 발현시킨 후, 2일차 ZT13에 잎을 수확하여 상기 기술한 방법과 동일하게 전체 단백질을 추출하였다. 또한 상기 면역침강법에 기술된 방법과 같이 α-GI 항체와 단백질 A-아가로스가 결합된 레진에 담배 단백질 추출액을 결합시킨 후, 상기와 동일한 방법으로 세척, SDS-PAGE 분리 및 면역 블랏을 α-ZTL 항체와 α-GI 항체로 각 단백질을 검출하여 GI-HA에 의해 공동 면역 침강된 ZTL을 확인하였다.

[61]

[62] **실시예 1. 절단된 자이겐티아(GI) 펩티드의 발현**

[63] 본 발명자들은 GI의 전체 cDNA 서열을 단백질 발현용 벡터인 pGEX-KG에 클로닝한 후, 숙주세포인 대장균 BL21 (DE3) pLysS에 형질전환 하였으며, 하기 GI 절단체 단백질 발현 배양 조건과 동일하게 3㎖ 액체배지에서 OD_{600}=0.8이 될 때까지 37℃에서 배양한 후, 1mM IPTG를 첨가하고 단백질 발현을 유도하였다. 단백질 발현 유도 후, 24, 30 또는 37℃ 배양기로 옮겨 추가 배양하였다. 배양한 세포를 파쇄해 4℃, 12,000rpm, 10분의 조건으로 원심분리하고, 수용성(S) 및 불용성(P) 분획물로 나누어 8% SDS-PAGE 전기영동을 통해 전체 GI 단백질의 발현양을 살펴보았다. 그 결과, *pGEX KG::GI* 클론에 의해 생산되는 GI 단백질의 전체 크기는 155 kDa으로 예상되지만, 1mM IPTG 유도 조건하에서 IPTG 무첨가 조건과 비교하여 증가된 단백질 밴드가 검출되지 않았다(도 1). 이와 같은 전체 길이 GI 단백질의 발현 시도는 뉴질랜드 오클랜드 대학의 Jo Putterill 박사 연구진에 의해서도 수행되었지만, 전체 길이 GI 단백질 추출에는 실패하였으며, GI 단백질이 상당히 불안정하며 쉽게 단편으로 분해된다고 국제학술지에 보고된 바 있다(Black 등, 2010년, Protein Expression and Purification Vol. 76, p197-204). 이에 본 발명자들은 GI 단백질의 절단체 제작하여 발현하고자 시도하였다.

[64] 1~858번째 아미노산으로 이루어진 GI 절단체(GI^{1-858})와 920~1,173번째 아미노산으로 이루어진 GI 절단체($GI^{920-1173}$) 펩티드의 대장균에서의 발현양상을 소규모 배양 조건(3㎖)에서 확인한 결과, 불용성 분획물에서 상당량의 재조합 GI 절단체들이 발현되는 것을 확인하였다(도 2). 항원으로 사용할 재조합 GI 절단체들의 양을 늘이기 위해 대규모 배양조건(50㎖)에서 소규모 배양조건과 동일하게 GI 절단체를 발현시킨 후, 불용성 분획물에서의 재조합 GI 절단체들의 발현이 높음을 동일하게 확인하였고, 각 GI 절단체의 크기에 해당하는 펩티드 밴드를 잘라내어, Electro-Eluter를 사용하여 각 GI 펩티드를 회수하고, 단백질 정량을 위해 알고 있는 농도의 BSA(bovine serum albumin)와 함께 전기영동하였다(도 3). 회수된 각 GI 절단체의 양은 GI^{1-858}가 1㎍/㎕, $GI^{920-1173}$가

3㎍/㎕ 이었다. 회수된 각각의 GI 펩티드를 혼합하여 토끼에 주입하여 면역화시켰다. 면역화시킨 토끼로부터 항혈청을 획득하여 이를 실험에 사용하였다(도 4A).

[65]

[66] **실시예 2. 다클론 α-GI 항체의 검출능 분석**

[67] 획득한 항혈청으로부터 다클론 α-GI 항체를 멤브레인 기반 친화성 분리법으로 정제하고, 정제한 α-GI 항체가 자이겐티아 단백질을 효과적으로 검출할 수 있는지 확인하기 위해, *GI::GI-HA*, *35S:HA-GI*, 및 *gi-201* 변이체로부터 추출한 단백질 시료를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 먼저, 정제하지 않은 항혈청, 상기 항혈청에서 α-GI 항체를 순수 정제하고 난 후의 상층액, 및 정제한 α-GI 항체를 이용하여 애기장대 자이겐티아 단백질의 검출유무를 확인한 결과, 정제하지 않은 항혈청과 정제 후 상층액을 사용한 두 블랏에서는 *GI::HA-GI*, *35S:HA-GI*, 및 *gi-201* 변이체 시료 모두에서 약 80kDa 및 130kDa 크기의 비특이적인 밴드가 확인되었으나, 순수 분리정제한 α-GI 항체를 사용한 블랏에서는 *GI::GI-HA* 및 *35S:HA-GI*의 시료에서만 약 130kDa 크기의 단백질 밴드가 확인되었으며, 자이겐티아 유전자 결핍 돌연변이 식물체인 *gi-201* 변이체 시료에서는 검출 밴드가 나타나지 않았다(도 4B). *GI::GI-HA*와 *35S:HA-GI* 식물체별 GI 단백질 차이는 에피토프 태깅 벡터의 구축 차이로 GI 과발현 식물체인 *35S:HA-GI* 내 GI 단백질이 *GI::HA-GI*에 비해 다소 크게 확인되었다. 정제한 다클론 α-GI 항체의 민감도를 확인하기 위해, 희석 비율을 1:250, 1:500 및 1:1,000으로 조절하여 자이겐티아 단백질의 검출능을 확인한 결과, 모든 희석 비율에서 시료 내의 자이겐티아 단백질이 검출되는 것을 확인하였다(도 4C). 또한 *GI::GI-HA* 및 *35S:HA-GI* 식물체 모두 *GI* 유전자에 HA가 태깅되어 있어 α-GI 항체를 이용해 검출된 GI 단백질 밴드를 α-HA 항체를 이용해 교차 점검하였으며, 동일한 크기의 GI 단백질 밴드를 검출할 수 있었다. 상기 결과를 통해, 정제한 다클론 α-GI 항체가 식물체 내의 자이겐티아 단백질을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

[68]

[69] **실시예 3. 다클론 α-GI 항체의 단백질-단백질 결합 검출능 분석**

[70] 항체는 단순히 생체내 단백질 검출만을 목적으로 하지 않으며, 생체내 단백질-단백질간 결합을 확인할 수 있는 공동 면역침강법(Co-immunoprecipitation)과 단백질-DNA 결합을 확인할 수 있는 크로마틴 면역침강법(Chromatin-immunoprecipitation)에 유용하게 이용할 수 있다. 이를 위해선 단백질 A-아가로스와 같은 항체 결합 레진을 통해 생체내 타겟 단백질을 항체가 검출할 수 있는지 확인하여야 한다. 도 5A는 정제된 α-GI 항체를 단백질 A-아가로스 레진에 결합시킨 후(4℃에서 1시간), 애기장대 야생형(Col-0)과 *35S::HA-GI*(GI 과발현 식물) 식물체로부터 추출한 전체 단백질을 항체와 단백질 A-아가로스 결합 레진과 혼합하여 4℃에서 3시간동안

반응시켜 식물체내 GI 단백질과 결합을 유도하였다. 정제된 α-GI 항체와 식물체내 GI 단백질의 특이적 결합만을 보기 위해 식물체 단백질 추출 버퍼를 이용해 3번 세척해 비특이적 결합 단백질을 제거한 후, 6% SDS-PAGE로 분리하고 α-GI 항체를 이용해 면역블랏을 수행하였으며, α-GI 항체를 통해 식물체내 GI 단백질이 면역 침강되었음을 확인하였다. 더 나아가 애기장대 내에서 GI 단백질과 결합해 안정성이 조절되는 ZTL 단백질과의 결합을 정제된 α-GI 항체를 이용하여 공동면역침강법으로 확인하였다. 이를 위해 담배 표피세포에 GI-HA와 ZTL을 동시에 과발현시켜 α-GI 항체를 이용해 상기의 면역침강법과 동일한 방법으로 검출한 후 GI-ZTL 단백질간 결합을 확인한 결과, GI-HA가 없는 식물체의 경우 α-GI 항체와 결합한 GI-HA 단백질이 없어 ZTL 단백질 결합이 없는 반면, GI-HA가 발현된 식물체의 경우, α-GI 항체와 결합을 통해 식물체내 발현된 ZTL 단백질이 검출되는 것을 확인하였다(도 5B). 이를 통해 본 발명의 α-GI 항체는 식물체내 GI 단백질 발현을 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 다양한 면역침강법을 통해 식물체내 GI 단백질과 결합하는 파트너 단백질의 검출과 GI 단백질-DNA 결합을 통한 전사조절 기능 검증까지 폭넓게 이용될 수 있을 것으로 유추되었다.

[71] *GI* 유전자는 육지식물 발달과 함께 모든 식물 종에서 유전적으로 잘 보존된 유전자이다. 또한 현재까지 보고된 모든 식물종의 *GI* 유전자는 전사수준에서 광주기-의존적 일주기성 발현 변화가 보고되었다. 하지만 GI 항체가 없어 현재까지 단백질 수준에서 일주기성 발현 변화는 HA와 TAP 태그를 통해 관찰되었을 뿐이다. 이에 본 발명에서 제조한 α-GI 항체를 이용하여 야생형(Col-0) 애기장대 내 GI 단백질의 일주기성 발현을 관찰하였으며, 그 결과, 기존 HA와 TAP 태그를 통해 보고된 GI 단백질 발현 양상과 일치하게 차이트게버 시간 12(ZT12) 시간대에서 가장 높은 발현양을 보였으며, 이후로 감소하는 것이 확인되었다(도 6).

[72]

[73] **실시예 4. 다클론 α-GI 항체의 교차 반응성 분석**

[74] 애기장대 자이겐티아 단백질을 항원으로 이용하여 제조된 본 발명의 다클론 α-GI 항체의 교차 반응성을 분석하기 위해, 배추, 유채, 토마토, 옥수수 및 톨페스큐 시료를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 각 식물체는 차이트게버 시간(zeitgeber time) 1(ZT1) 및 13(ZT13)의 총 단백질 추출물을 시료로 사용하였고, 쿠마시 브릴리언트 블루(CBB) 염색을 통해 동량의 시료가 로딩되었음을 확인하였다.

[75] 교차 반응성 실험 결과, 본 발명의 다클론 α-GI 항체는 애기장대 식물체뿐만 아니라, 배추, 유채, 토마토, 옥수수 및 톨페스큐 식물체의 자이겐티아 단백질 또한 효과적으로 검출할 수 있었으며, 일주기성 발현 변화를 보임을 알 수 있었다(도 7). 상기 연구결과는 애기장대 외 다른 작물에서 세계 최초로 보고된 GI 단백질의 일주기성 발현 변화 결과이며, 동 결과를 통해, 본 발명의 다클론

α-GI 항체는 GI 연구에 훌륭한 검출 수단으로 활용될 수 있을 것으로 예측되었다.

청구범위

[청구항 1] (a) 애기장대 유래 자이겐티아(GIGANTEA) 단백질의 아미노-말단 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;
(b) 애기장대 유래 자이겐티아 단백질의 카복시-말단 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;
(c) 상기 (a) 및 (b) 단계에서 제조한 재조합 벡터를 숙주세포에 각각 형질전환하여 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드를 각각 발현시키는 단계;
(d) 상기 (c) 단계의 각각 발현된 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드를 정제하는 단계;
(e) 상기 (d) 단계의 정제된 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드를 동물에 투여하여 항혈청을 생산하는 단계; 및
(f) 상기 (e) 단계에서 생산된 항혈청에서 다클론 항체를 분리정제하는 단계;를 포함하는 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 애기장대 유래 자이겐티아(GIGANTEA) 단백질의 아미노-말단 펩티드 및 카복시-말단 펩티드는 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 숙주세포는 대장균인 것을 특징으로 하는 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 (e) 단계의 자이겐티아 단백질의 아미노-말단 및 카복시-말단 펩티드는 면역증강제와 혼합하여 투여하는 것을 특징으로 하는 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 (e) 단계의 동물은 토끼인 것을 특징으로 하는 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (f) 단계의 다클론 항체는 IgG인 것을 특징으로 하는 자이겐티아 단백질에 대한 다클론 항체의 제조방법.

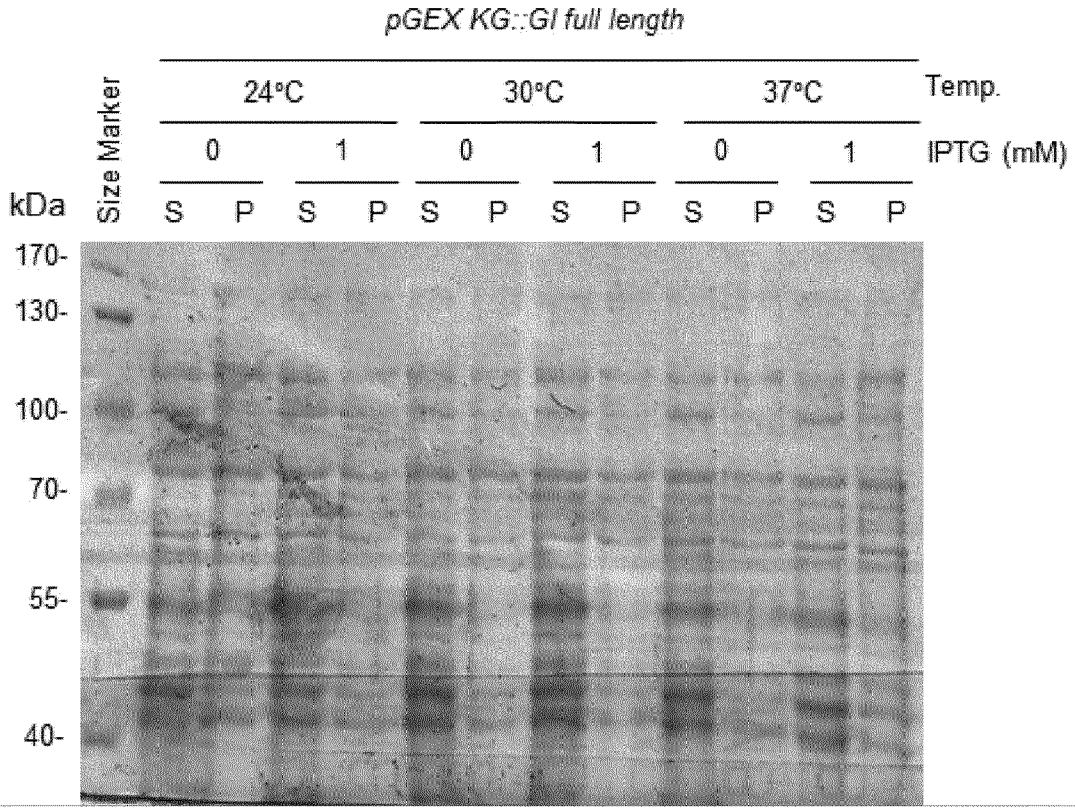
[청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 다클론 항체를 유효성분으로 포함하는 자이겐티아(GIGANTEA) 단백질 검출용 조성물.

[청구항 8] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 다클론 항체를 유효성분으로 포함하는 자이겐티아(GIGANTEA) 결합 단백질 검출용 조성물.

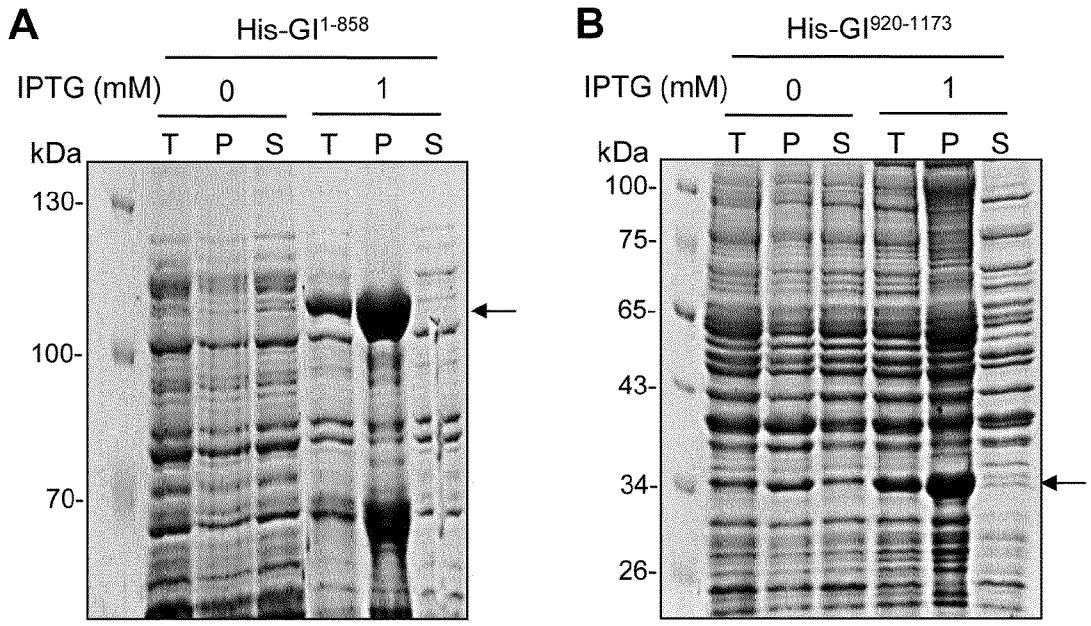
[청구항 9] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 다클론 항체를 유효성분으로 포함하는 자이겐티아(GIGANTEA) 단백질 검출용 키트.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 키트는 면역분석용 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

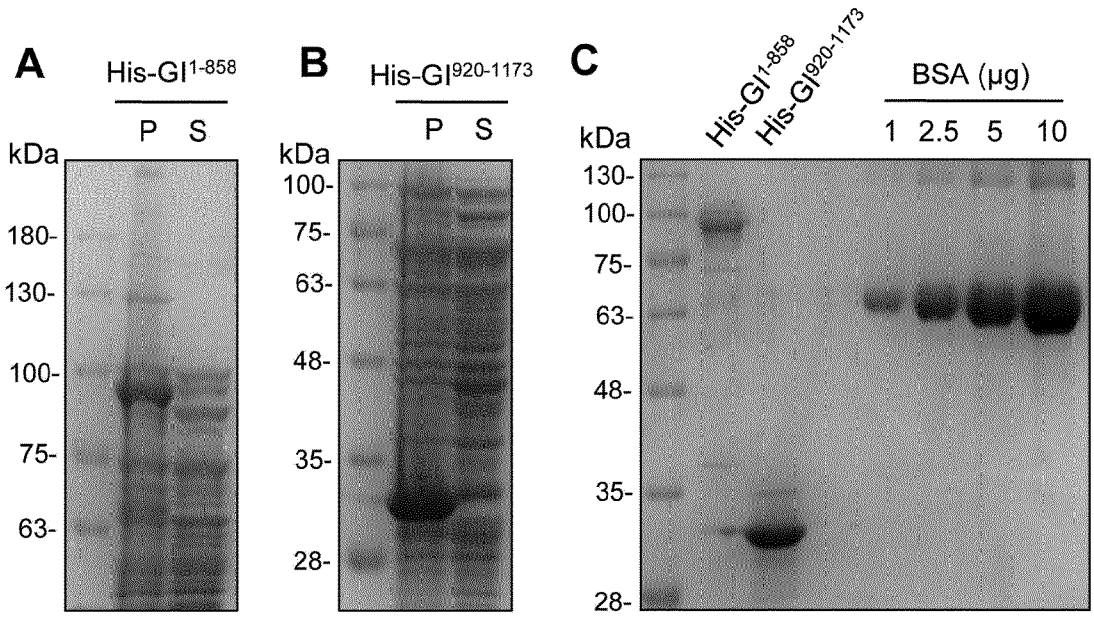
[도1]


pGEX KG::GI full length
Size Marker
24°C
30°C
37°C
Temp.
0
1
0
1
0
1
IPTG (mM)
kDa
S P S P S P S P S P S P
170-
130-
100-
70-
55-
40-

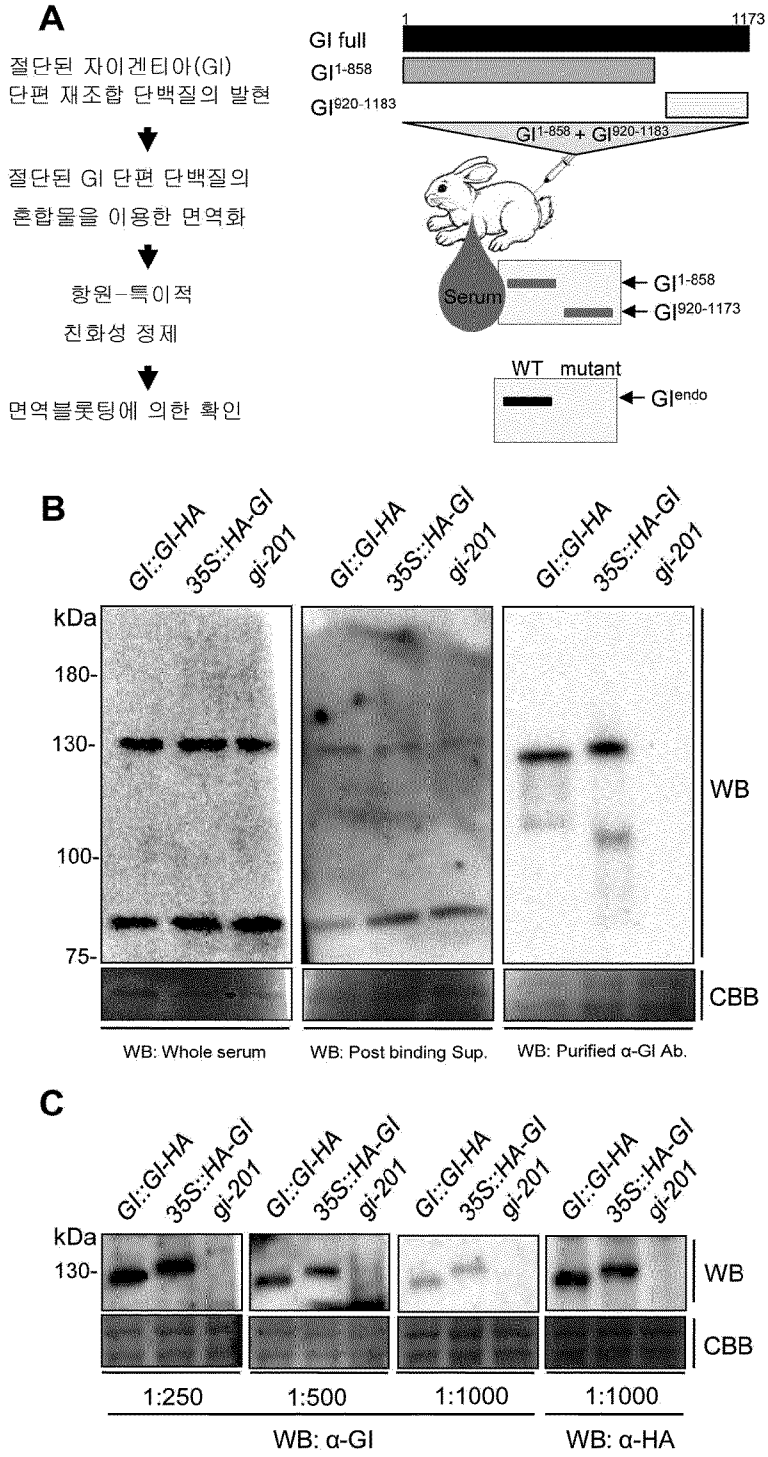
[도2]


A
His-GI1-858
IPTG (mM)
0
1
kDa
T P S T P S
130-
100-
70-
B
His-GI920-1173
IPTG (mM)
0
1
kDa
T P S T P S
100-
75-
65-
43-
34-
26-

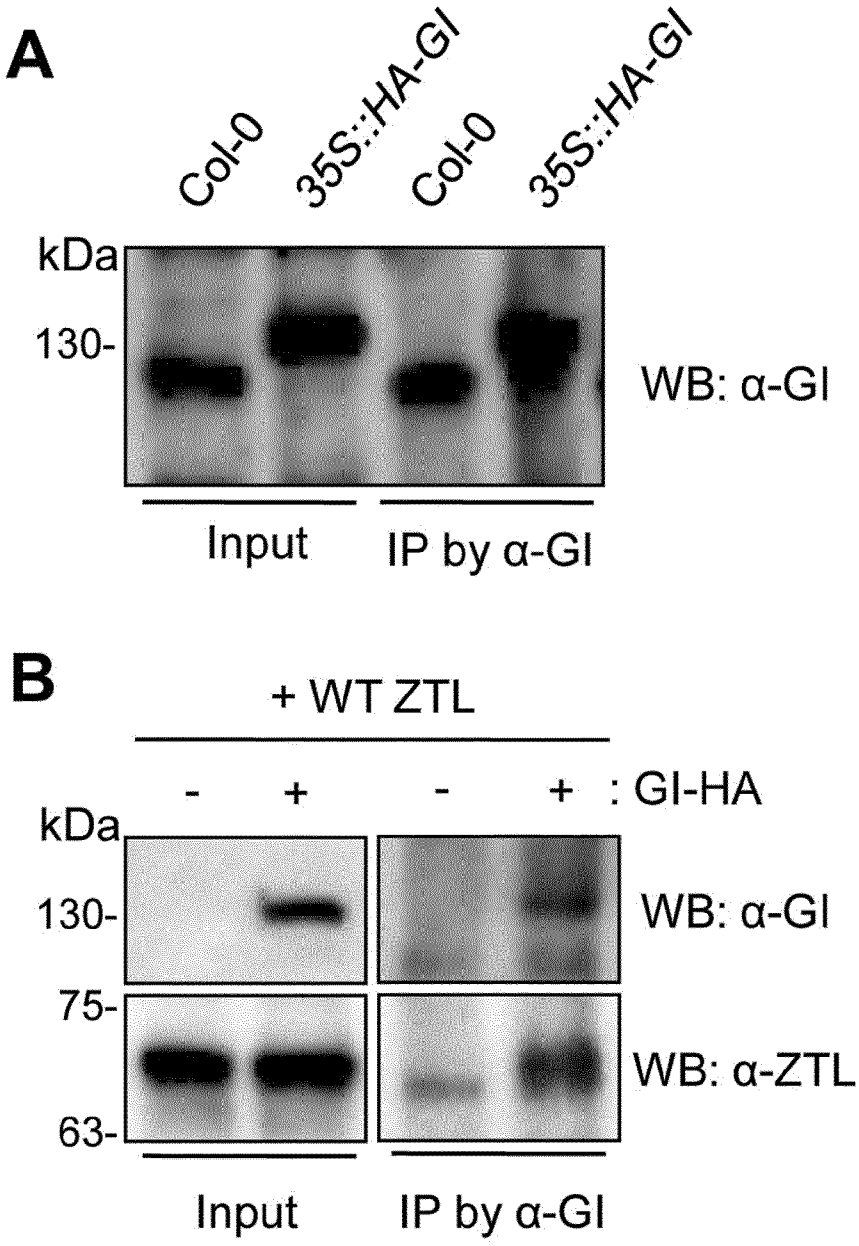
[도3]


A
His-GI1-858
P S
kDa
180-
130-
100-
75-
63-
B
His-GI920-1173
P S
kDa
100-
75-
63-
48-
35-
28-
C
His-GI1-858
His-GI920-1173
BSA (μg)
1 2.5 5 10
kDa
130-
100-
75-
63-
48-
35-
28-

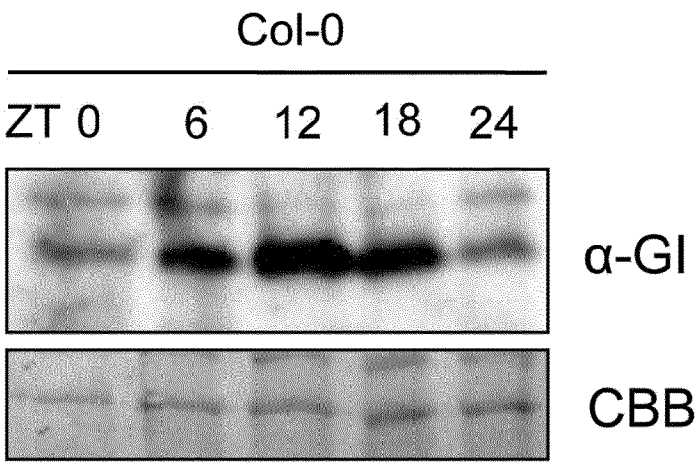
[도4]


A
절단된 자이겐티아(GI)
단편 재조합 단백질의 발현
절단된 GI 단편 단백질의
혼합물을 이용한 면역화
항원-특이적
친화성 정제
면역블롯팅에 의한 확인
GI full
GI1-858
GI920-1183
1
1173
GI1-858 + GI920-1183
Serum
GI1-858
GI920-1173
WT mutant
GIendo
B
GI::GI-HA
35S::HA-GI
gi-201
kDa
180-
130-
100-
75-
WB
CBB
WB: Whole serum
WB: Post binding Sup.
WB: Purified α-GI Ab.
C
kDa
130-
WB
CBB
1:250
1:500
1:1000
1:1000
WB: α-GI
WB: α-HA

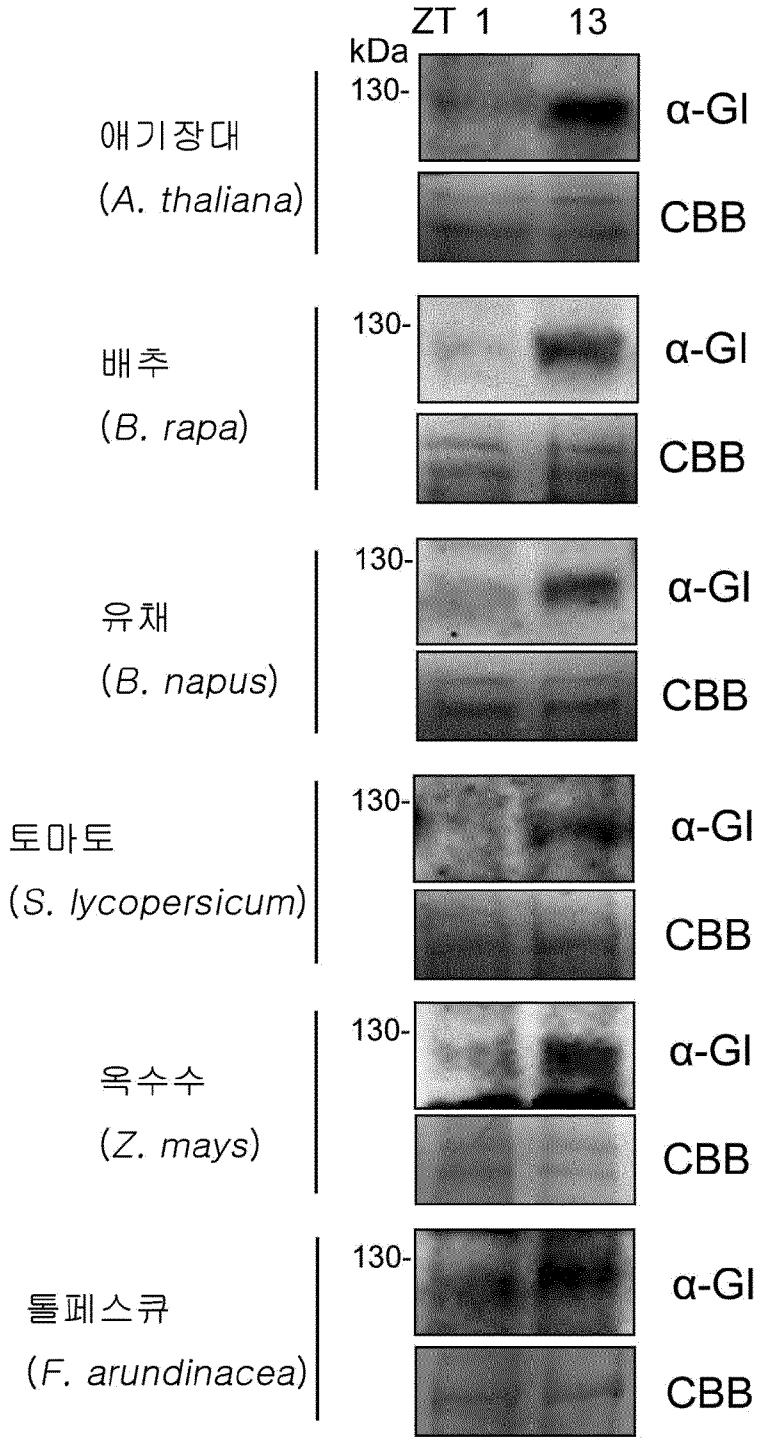
[도5]


A
Col-0
35S::HA-GI
Col-0
35S::HA-GI
kDa
130-
WB: α-GI
Input
IP by α-GI
B
+ WT ZTL
- + - + : GI-HA
kDa
130-
WB: α-GI
75-
63-
WB: α-ZTL
Input
IP by α-GI

[도6]


Col-0
ZT 0 6 12 18 24
α-GI
CBB

[도7]


ZT 1 13
kDa
130-
애기장대
(A. thaliana)
α-GI
CBB
130-
배추
(B. rapa)
α-GI
CBB
130-
유채
(B. napus)
α-GI
CBB
130-
토마토
(S. lycopersicum)
α-GI
CBB
130-
옥수수
(Z. mays)
α-GI
CBB
130-
톨페스큐
(F. arundinacea)
α-GI
CBB

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/009412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/16(2006.01)i, C07K 16/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/16; C07K 14/435; C12N 15/29; C12N 15/70; C07K 16/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: mouseear cress, gigantea, vector, polyclonal antibody, recombination, vector

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2017-0013174 A (PAICHAI UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 06 February 2017 See abstract; claims 1, 4-9; paragraph [0023].	1-10
Y	CHA, J.-Y. et al., "GIGANTEA Is a Co-chaperone which Facilitates Maturation of ZEITLUPE in the Arabidopsis Circadian Clock", Nature Communications, electronic publication on 23 February 2017, vol. 8, document no. 3, pages 1-12 See abstract; page 2, right column, page 8.	1-10
Y	NCBI, GenBank Accession No. ABP96484.1, "GIGANTEA, Partial [Arabidopsis thaliana]", 23 July 2016 See the entire document.	2
Y	KR 10-2017-0013181 A (PAICHAI UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 06 February 2017 See claims 1, 4-9; paragraph [0023].	1-10
Y	KR 10-2001-0029127 A (POSTECH FOUNDATION) 06 April 2001 See claims 1-2; sequence no. 2.	2
PX	KHALEDA, L. et al., "Production and Characterization of Polyclonal Antibody against Arabidopsis GIGANTEA, a Circadian Clock Controlled Flowering Time Regulator", J. Plant Biol., December 2017, vol. 60, pages 622-629 See abstract; pages 627-628.	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 DECEMBER 2018 (11.12.2018)	**11 DECEMBER 2018 (11.12.2018)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/009412

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0013174 A	06/02/2017	NONE	
KR 10-2017-0013181 A	06/02/2017	NONE	
KR 10-2001-0029127 A	06/04/2001	KR 10-0319395 B1	09/01/2002

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/009412

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/16(2006.01)i, C07K 16/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 16/16; C07K 14/435; C12N 15/29; C12N 15/70; C07K 16/06

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 애기장대, 자이겐티아, 벡터, 다클론 항체, 재조합, 벡터

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2017-0013174 A (배재대학교 산학협력단) 2017.02.06 요약; 청구항 1, 4-9; 단락 [0023] 참조.	1-10
Y	CHA, J.-Y. 등, `GIGANTEA is a co-chaperone which facilitates maturation of ZEITLUPE in the Arabidopsis circadian clock`, Nature Communications, 전자공개 2017.02.23, 8권, 문헌번호 3, 페이지 1-12 초록; 페이지 2, 우칼럼, 페이지 8 참조.	1-10
Y	NCBI, GenBank Accession No. ABP96484.1, `GIGANTEA, partial [Arabidopsis thaliana]`, 2016.07.23 전체 문헌 참조.	2
Y	KR 10-2017-0013181 A (배재대학교 산학협력단) 2017.02.06 청구항 1, 4-9; 단락 [0023] 참조.	1-10
Y	KR 10-2001-0029127 A (학교법인 포항공과대학교) 2001.04.06 청구항 1-2; 서열번호 2 참조.	2
PX	KHALEDA, L. 등, `Production and characterization of polyclonal antibody against Arabidopsis GIGANTEA, a circadian clock controlled flowering time regulator', J. Plant Biol., 2017.12, 60권, 페이지 622-629 초록; 페이지 627-628 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2018년 12월 11일 (11.12.2018)	2018년 12월 11일 (11.12.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
감유림
전화번호 +82-42-481-3516

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/009412

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0013174 A	2017/02/06	없음	
KR 10-2017-0013181 A	2017/02/06	없음	
KR 10-2001-0029127 A	2001/04/06	KR 10-0319395 B1	2002/01/09