

|                                                                                           |                                    |                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|          | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2013-0000950<br>(43) 공개일자 2013년01월03일     |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>G01N 33/53 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)<br>C12Q 1/68 (2006.01) |                                    | (71) 출원인<br>충남대학교산학협력단<br>대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교) |
| (21) 출원번호                                                                                 | 10-2011-0061779                    | (72) 발명자                                               |
| (22) 출원일자                                                                                 | 2011년06월24일                        | 진동일                                                    |
| 심사청구일자                                                                                    | 2011년06월24일                        | 대전광역시 유성구 왕가봉로 23, 1102동 1103호<br>(노은동, 열매마을11단지)      |
| 기술이전 희망                                                                                   | 기술양도, 실시권허여, 기술지도                  | 한영훈                                                    |
|                                                                                           |                                    | 대전광역시 유성구 대학로 99, 농대2호관 2308호<br>(궁동, 충남대학교)           |
|                                                                                           |                                    | 김홍래                                                    |
|                                                                                           |                                    | 서울특별시 구로구 경인로38길 13, 1208호 (개봉동, 신개봉 삼환아파트)            |
|                                                                                           |                                    | (74) 대리인                                               |
|                                                                                           |                                    | 특허법인 충정                                                |

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 T-형(타입) 칼슘 채널의 알파1G 서브유닛의 소 임신 진단 마커로서의 용도

### (57) 요약

본 발명은 소에서 임신특이단백질을 이용한 임신 진단 마커 조성물, 임신 진단용 조성물 및 임신 진단 방법에 관한 것으로서, 본 발명자들은 임신한 암소에서 특이적으로 발현되는 T-타입 칼슘 채널(T-type calcium channel)의  $\alpha 1G$  서브유닛(subunit) 단백질을 찾아내고, 이에 대한 특이적 항체(antibody) 또한 제작하였는 바, 본 발명은 간편하고 신속하고 암소의 임신 여부를 임신 초기에 정확하게 판별할 수 있다는 효과가 있다.

### 대표도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|        |                                           |
|--------|-------------------------------------------|
| 과제고유번호 | 20070401034031                            |
| 부처명    | 농촌진흥청                                     |
| 연구사업명  | 바이오그린21                                   |
| 연구과제명  | 돼지복제 수정란의 효율적인 생산체계 확립                    |
| 주관기관   | 충남대학교                                     |
| 연구기간   | 2007.04.01 ~ 2011.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업 |
| 과제고유번호 | PJ008793                                  |
| 부처명    | 농촌진흥청                                     |
| 연구사업명  | 바이오그린21                                   |
| 연구과제명  | GT-KO 및 FasL 형질전환돼지 조직에서의 이식관용 특성규명       |
| 주관기관   | 충남대학교                                     |
| 연구기간   | 2010.06.10 ~ 2012.12.31                   |

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는  $\alpha 1G$  단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 소 임신 진단용 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기  $\alpha 1G$  단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소 임신 진단용 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA 수준을 측정하는 물질은  $\alpha 1G$  유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브이고, 상기  $\alpha 1G$  단백질의 수준을 측정하는 물질은  $\alpha 1G$  단백질을 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는 소 임신 진단용 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 소 임신 진단용 조성물.

### 청구항 5

T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는  $\alpha 1G$  단백질의 수준을 측정하는 물질을 이용하여  $\alpha 1G$  유전자의 발현을 확인함으로써 소의 임신 여부를 진단하는 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기  $\alpha 1G$  유전자의 발현 확인은 소의 유즙, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 또는 뇨를 사용하는 것을 특징으로 하는 소의 임신 여부를 진단하는 방법.

### 청구항 7

제5항에 있어서,

상기  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA 수준을 측정하는 물질은  $\alpha 1G$  유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브이고, 상기  $\alpha 1G$  단백질의 수준을 측정하는 물질은  $\alpha 1G$  단백질을 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는 소의 임신 여부를 진단하는 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 소의 임신 여부를 진단하는 방법.

### 청구항 9

제5항에 있어서,

상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 및 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis)으로 이루어

진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 소의 임신 여부를 진단하는 방법.

## 청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 소 임신 진단용 키트.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 소의 임신을 조기에 효과적으로 진단 및 예측할 수 있는 신규한 소 임신 진단 마커용 조성물, 임신 진단용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 소 임신 진단방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 젖소의 임신진단은 낙농경영에 있어 계획번식의 가능하게 하고, 번식장애를 조기에 발견하여 치료할 수 있게 하면서도, 인공수정의 수태율 향상과 불임 방지 등을 위해, 임신 초기에 실시하는 것이 중요하다. 진단 결과, 임신한 것으로 판명되는 경우 초기 유산을 방지하고, 건강한 송아지를 분만할 수 있도록 적절한 임신 중 관리 및 위생 환경을 제공해 줄 수 있고, 임신이 아니라고 판명된 경우에는 그 원인을 조기에 파악함으로써 적절한 조치를 취할 수 있을 뿐만 아니라 빠른 시일 내에 인공수정을 실시하여 암소의 번식 효율을 증진시킬 수 있다. 따라서 젖소의 임신은 가급적으로 임신초기에 진단할 수 있어야 하며, 더불어 임신한 소와 태아에는 거의 영향을 주지 말아야 하고, 조작이 간단하고 진단 비용이 저렴한 기술이어야 하면서도, 농가에서도 쉽게 이용이 가능해야 할 것이다.

[0003] 현재 사용되고 있는 암소 임신진단방법으로는 직장검사법, 초음파진단법, 혈액 중 호르몬 농도 변화를 이용한 진단키트에 의한 임신진단방법이 있다.

[0004] 직장검사법은 자궁의 크기, 파동감, 위치, 태막, 황체, 태아, 태반의 촉진 또는 자궁동맥의 비대 등 임신으로 인한 생식기관 내의 변화를 직장검사를 통하여 직접 관찰하여 임신을 판정하는 방법이며, 초음파에 의한 임신 진단법은 주로 초음파 진단장치에 부착되어 있는 5.0 MHz 또는 7.5 MHz의 직장용 탐촉자(linear type probe)를 이용한다. 임신 자궁각 내에 국소성의 원형 또는 타원형의 검게 보이는 태낭을 임신 22일 전후하여 관찰할 수 있으나 임신 27일 이후에 실시하는 것이 좋다. 임신 30일 전후부터 태수가 자궁각 안에서 검게 관찰되며, 태아는 하얀 돌기형으로 관찰되는데, 태아의 체장 및 각 구조물의 크기를 측정하여 임신일령을 추정할 수 있고, 임신 60일부터 120일 사이에는 생식기관의 위치를 확인하여 성감별도 가능하다. 자궁의 전인조작 없이 자궁 위에서 탐촉자를 움직여 검사하므로 유산의 위험성이 매우 낮다는 장점이 있다.

[0005] 혈액 중 호르몬 농도 변화를 이용한 임신 진단키트는, 임신한 젖소보다 임신되지 않은 젖소의 혈액 또는 우유 중의 프로게스테론 농도가 낮다는 점에 착안하여 개발되었다. 암소에서는 임신을 하면 황체가 영구황체로 성장하여 임신유지에 관여하게 되므로, 임신하지 않은 소(1ng/ml 내외)에 비해 임신한 소(3-4ng/ml 이상으로)는 영구황체에서 분비하는 황체호르몬의 영향으로 프로게스테론이 높은 수준으로 유지되기 때문이다.

[0006] 한편, 직장검사법은 임신 30~40일 이후부터 진단이 가능하며 수의사 개인의 훈련의 정도에 따라 진단정확성이 다르므로 기술 숙련의 정도에 따라서 적절한 진단 시기를 택하여 실시해야 한다. 또한, 임신 35~41일에 직장검사로 진단을 실시한 후 임신 150일 이전에 10%가 태아의 조기흡수 등으로 사산되었으며, 조기 임신진단이 실행된 소에서 평균 8%가 임신 60일 전후에 유산되었다는 보고가 있어 임신진단시기가 빠르면 빠를수록 조기 태아사망의 위험성이 높다는 등의 단점이 존재한다. 초음파에 의한 임신진단의 경우, 기기의 화면을 통하여 직접 태수와 태아를 확인할 수가 있어 정확한 임신 진단방법이나, 고가의 초음파 진단기가 필요하여 농가에서의 사용이 제한적이라는 결점이 존재한다. 진단키트에 의한 임신진단의 경우 그 정확도가 70~80% 수준에 불과한데, 그 이유는 암소가 난소질환 또는 자궁질환이 원인이 되는 번식장애에 걸릴 경우 높은 황체호르몬 수준을 보여 오인 확률이 높기 때문이다.

[0007] 현재, 가축의 여러 임신관련 단백질들이 보고되고 있는데, 말에서는 장막성선자극호르몬(equine chorionicgonadotrophin: ECG)이 임신진단에 사용되고 있고, 소에서는 태반락토헨(placental lactogen: bPL)과 임신특이단백질B(Pregnancy specific protein B), 소임신관련 당단백질(bovine pregnancy-associated glycoprotein: bPAG) 등이 보고되었으며, 우유나 혈청의 프로게스테론(progesterone)도 임신 진단에 사용하고 있으나, 상기 임신관련 단백질들과 프로게스테론을 이용한 임신진단의 경우, 음성과 양성치료에 대해서 오인률

이 비교적 높기 때문에 임신테스트를 하였을 때 정확도가 높지가 않아 실용성이 떨어진다는 단점이 존재한다. 따라서, 기존의 이러한 문제들을 해결함과 동시에, 보다 간편하고 신속하게 소의 초기 임신을 정확하게 진단할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필요한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 이에 본 발명자들은 임신 초기에 젖소의 유즙에서 임신특이적으로 발현되는 단백질을 찾아내기 위해, 프로테오믹스 기술을 이용한 임신한 소와 비임신소의 우유 단백질의 비교분석을 통하여 발굴한 임신한 소의 유즙 내 특이적 단백질을 대상으로, 2차원전기영동(2-D)을 실시하여 연구하던 중, T-형 칼슘 채널(T-type calcium channel)의  $\alpha 1G$  서브유닛( $\alpha 1G$ T-type calcium channel subunit,  $\alpha 1G$ )이 특이적으로 소의 유즙에서 임신초기를 비롯하여 임신 전기간에서 발현된다는 것을 발견하고,  $\alpha 1G$  유전자 및 단백질을 이용한 소의 임신 진단 방법을 개발하였다.
- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 T-타입 칼슘 채널의 서브유닛  $\alpha 1G$ ( $\alpha 1G$ ph $\alpha 1G$ ) 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 T-타입 칼슘 채널의 서브유닛  $\alpha 1G$  단백질을 포함하는 소 임신 진단용 마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 따라서 본 발명의 목적은 T-타입 칼슘 채널의 서브유닛  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 소 임신 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 따라서 본 발명의 목적은 T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 양의 수준을 측정하는 물질을 이용하여  $\alpha 1G$  유전자의 발현을 확인함으로써 소의 임신 여부를 진단하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 나아가, 본 발명의 목적은 상기 소 임신 진단용 조성물을 포함하는 소 임신 진단 키트를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0013] 상기의 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 T-타입 칼슘 채널의 서브유닛(subunit)  $\alpha 1G$ ( $\alpha 1G$ ph $\alpha 1G$ ) 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는  $\alpha 1G$  단백질을 포함하는 소 임신 진단용 마커 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는  $\alpha 1G$  단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 소 임신 진단용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기  $\alpha 1G$  단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 물질은  $\alpha 1G$  유전자 또는 그 mRNA를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있고, 상기  $\alpha 1G$  단백질의 수준을 측정하는 물질은  $\alpha 1G$  단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항체는 서열목록 2에 있는 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는  $\alpha 1G$  단백질의 수준을 측정하는 물질을 이용하여  $\alpha 1G$  유전자의 발현을 확인함으로써 소의 임신 여부를 진단하는 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기  $\alpha 1G$  유전자의 발현 확인은 소의 유즙, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 또는 뇨를 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기  $\alpha 1G$  유전자의 mRNA 수준을 측정하는 물질은  $\alpha 1G$  유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브이고, 상기  $\alpha 1G$  단백질의 수준을 측정하는 물질은  $\alpha 1G$  단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 및 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis)으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.

- [0023] 또한, 본 발명은 상기 소 임신 진단용 조성물을 포함하는 소 임신 진단용 키트를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 키트는 PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 소 임신 진단용 조성물을 포함하는 소 임신 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

### 발명의 효과

- [0026] 본 발명은 T-타입 칼슘 채널의 서브유닛인  $\alpha 1G$  ( $\alpha 1G$ ) 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는  $\alpha 1G$  단백질을 이용한 임신 진단 마커 조성물, 임신 진단용 조성물 및 임신 진단 방법에 관한 것으로서, 간편하고 신속하며 정확하게 소의 초기 임신 여부를 진단할 수 있다는 효과가 있다. 발정주기가 21일인 소의 경우 인공수정 후 20일 이전에 임신 여부를 판단할 수 있다면 곧바로 다음 발정시에 인공수정을 실시할 수 있어 암소에서 공태기간을 획기적으로 줄일 수 있는데, 본 발명은 수정 후 18일 경부터 암소의 임신진단이 가능하므로 임신초기에 정확한 임신여부를 제공함으로써, 소에서의 공태기간을 줄이고 임신진단에 따른 비용과 시간을 감소시킴으로써 축산농가의 경제적 부담을 줄여줄 수 있으며, 궁극적으로 번식효율을 높여 축산업의 발달을 촉진할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 임신 및 비임신 유청 단백질 시료를 pH 6~9 스트립(strip)을 이용하여 2-D 전기영동을 실시한 다음 코마시(Coomassie)로 염색한 이미지이다. Image master를 이용하여 이미지 분석시 매개 겔(gel)에서 평균 700개 정도의 단백질 스팟을 볼 수 있었다(P: 임신 30일령 젖소 우유 샘플, NP: 비임신 젖소 우유 샘플).
- 도 2는 2-D 전기영동을 실시한 이미지에서 임신 특이적으로 발현되는 스팟 부분을 확대한 이미지와 image master분석에서 임신과 비임신에서 통계적 차이를 보여주는 도표이다(P: 임신 소 우유 샘플, NP: 비임신 소 우유 샘플).
- 도 3은 MALDI-TOF Mass Spectrometer를 이용하여 획득한 pick date그래픽 이미지이다.
- 도 4a는  $\alpha 1G$  단백질의 아미노산 서열에 따라 합성한 항체를 이용하여 임신과 비임신 샘플을 확인한 결과이다(NP: 비임신 P: 임신).
- 도 4b는 항체를 이용하여 임신 일수(Day)에 따른 임신 특이적 단백질의 우유 샘플에서의 변화양상이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명은 임신한 소에서 임신 특이적으로 발현되는 T-타입 칼슘 채널의 서브유닛인  $\alpha 1G$  ( $\alpha 1G$ ) 유전자 또는 이로부터 코딩되는  $\alpha 1G$  단백질을 포함하는 소의 임신을 진단할 수 있는 마커 조성물을 제공하는 데 그 특징이 있다.
- [0029] 소의 임신진단은 가급적으로 임신 초기에 진단할 수 있어야 하며, 임신 여부 진단시 임신한 소와 태아에는 거의 영향을 주지 말아야 한다. 또한, 간단하고 진단 비용이 저렴한 기술이어야 하고 축산 농가에서도 쉽게 이용이 가능해야만 한다. 기존에 가축에서 여러 임신관련 단백질들이 이미 보고되고 있으나 기존의 단백질을 이용한 임신진단의 경우, 음성과 양성시료에 대해서 정확도가 높지 않아 실용성이 떨어진다는 문제점이 있다.
- [0030] 따라서 발정주기가 21일인 암소에서 인공수정 후 20일 이전에 임신 여부를 정확하게 판단할 수 있는 기술을 개발한다면, 곧바로 다음 발정시에 인공수정을 실시할 수 있어 암소의 공태기간을 획기적으로 줄일 수 있으며, 번식효율을 높여 경제적, 시간적 이익을 가져올 것으로 기대된다.
- [0031] 이에 본 발명자들은 임신한 젖소의 유즙에서 특이적으로 발현되는 단백질인  $\alpha 1G$  ( $\alpha 1G$ -type calcium channel subunit)를 프로테오믹스(Proteomics) 분석방법으로 찾아내었고,  $\alpha 1G$  단백질의 아미노산 배열 중 항원성이 높은 15개 아미노산 부위를 합성하여 토끼에 주입시켜 폴리클로날(polyclonal) 항체를 생산하였다. 제조한 항체를 비임신 및 임신 유즙을 대상으로 각각 웨스턴 블롯(Western blot)을 실시한 결과, 임신특이적으로 T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$  서브유닛이 발현됨을 확인하였다.
- [0032] T-타입 칼슘채널은 전압의존성 칼슘채널의 종류이다. T는 '일시적인(transient)'을 나타내는 것으로 활성화된(activation) 길이를 의미하는데, T-type 칼슘채널은 낮은 전압에서도 활성화(activation[Low-threshold activation])된다.

- [0033] 다른 전압 의존성 칼슘채널의 서브타입(sub-type)과 마찬가지로,  $\alpha 1$  서브유닛(subunit)은 채널의 대부분의 성질을 결정하는 서브유닛이다. T-타입 칼슘채널은 3개의  $\alpha 1$  서브유닛(subunit)을 가지고 있는데  $\alpha 1G$ (Cav 3.1),  $\alpha 1H$ (Cav3.2),  $\alpha 1I$ (Cav3.3)이 그것이다(Perez-Reyes E et al, 1998, Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel, Nature 391 (6670): 896900).
- [0034] T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$  서브유닛(alpha 1G subunit)은 CACNA1G 또는 Cav3.1로도 알려져 있으며, 인간에서는 CACNA1G 유전자에 의해 발현되는 단백질이다.  $\alpha 1G$ 는 많은 조직에 분포되어 있고 칼슘이온의 유입(influx)의 조절과 탈분극에 기여한다. 또한 막전위의 변화에 반응하는데, 특히 휴지막전위(resting membrane potential)에 가까운 곳에서도 지속적인 칼슘이온의 유입을 만드는 것으로 알려져 있다(Cueni et al, 2009, Ca signaling by T type Ca channels in neurons, Pflugers Arch, 457(5), 1161-1172). 이와 관련한 비정상적인 T-타입 채널의 발현은 간질, 부정맥, 수면장애, 비정상적인 체중증가와 관련되는 것으로 보이거나(Anderson et al, 2005, Thalamic Cav3.1 T-type Ca channel plays a crucial role in stabilizing sleep, Proc Natl Acad Sci USA, 102(5), 1743-1748),  $\alpha 1G$  서브유닛의 작용과 구조에 대해서는 많은 것이 알려져 있지 않다.
- [0035] 이에 본 발명자들은, T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$ ( $\alpha 1G$ ) 서브유닛이 임신을 한 암소에서 특이적으로 많이 발현되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0036] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명자들은 2차원 전기영동에서 임신한 암소에서 특이적으로 발현되고 있는 단백질 스팟들을 찾았는데, 이에 각각의 반복샘플들에서 일정하게 발현되는 스팟들을 확인할 수 있었고, 임신 유증과 비임신 유증에서 특이적으로 발현차이를 보이는 단백질 스팟들을 발견하였으며(도 1 참조), 특히 임신한 소에게서 특이적으로 발현되는 T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$ ( $\alpha 1G$ ) 서브유닛을 동정 하였다(실시예1 참조).
- [0037] 또한, 본 발명자들은 소의 유증에서 임신 특이적으로 동정된  $\alpha 1G$  단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제작하기 위하여, 본 발명의 일실시예에 따르면, 특이성을 갖는  $\alpha 1G$  단백질의 아미노산 서열(서열목록 1)을 분석하여, 친수성 있으면서 표면노출성이 높고, 항원성의 가능성이 높은 아미노산 부위를 선택하여 15개의 아미노산 서열을 가진 펩타이드를 합성하였다(서열목록 2). 이 펩타이드를 토끼에 총 3회에 걸쳐 부스팅 면역을 통해 항체를 제작하였다(실시예2 참조).
- [0038] 본 발명에 따른 항체가  $\alpha 1G$  단백질 특이성을 가지는지 확인하기 위하여, 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 제작한 항체를 이용하여 임신하지 않은 대조군 암소 및 임신한 실험군 암소의 유증샘플을 대상으로 웨스턴 블롯(Western blot)을 실시하여  $\alpha 1G$  단백질의 발현 여부를 분석하였는데, 그 결과 임신 샘플에서  $\alpha 1G$  단백질이 강하게 발현되는 것을 본 발명자들이 제작한 항체를 통해 확인하였다.
- [0039] 또한 본 발명자들은 상기  $\alpha 1G$  항체를 이용하여 임신시기별 유증 샘플에 웨스턴 블롯(Western blot)을 실시하였는데,  $\alpha 1G$  단백질의 발현이 임신 초기인 18일부터 발현되는 것으로 나타났으며, 임신 20일경에 그 발현 정도가 가장 강하게 나타났다가 임신 중기와 후기에는 조금 감소하는 경향을 나타내는 것으로 드러났다. 그러나 각 기간의 발현 정도의 차이가 있을 뿐,  $\alpha 1G$  단백질의 발현이 임신 전 기간에 걸쳐 뚜렷하게 증가하는 경향을 보이는 것을 알 수 있었다(실시예3 참조).
- [0040] 그리하여, 본 발명자들은 상기 결과들을 통해 T-타입 칼슘 채널의 서브유닛인  $\alpha 1G$ ( $\alpha 1G$ )을 이용하여, 임신의 거의 모든 기간에 걸쳐 본 발명의 진단용 조성물을 통해 소의 임신 여부를 판별할 수 있을 뿐만 아니라, 특히 기존의 방법들로 손쉬운 임신 진단 여부가 어려웠던, 임신 초기의 임신 여부도 판명할 수 있는, 탁월한 임신 진단 마커로서 사용될 수 있음을 알 수 있었다.
- [0041] 따라서, 본 발명은 T-타입 칼슘 채널의  $\alpha 1G$  유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는  $\alpha 1G$  단백질을 포함하는 소 임신 진단용 마커 조성물을 제공할 수 있다.
- [0042] 상기 임신 진단용 마커(diagnosis marker)란 임신 개체와 임신하지 않은 개체를 구분하여 진단할 수 있는 물질을 의미하며, 임신하지 않은 비임신 개체의 생물학적 시료에 비하여 임신한 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예컨대, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명에서 제공하는 소 임신 진단 마커는 임신 개체의 생물학적 시료에서 발현양이 증가하는 T-타입 칼슘 채널의 서브유닛인  $\alpha 1G$ ( $\alpha 1G$ ) 유전자 또 단백질이며, 바람직하게 상기  $\alpha 1G$  단백질은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0043] 또한, 본 발명은 T-타입 칼슘 채널의 서브유닛인  $\alpha 1G$  유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는  $\alpha 1G$  단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 소 임신 진단용 조성물을 제공할 수 있다. 이는 바람직하게, T-타입 칼슘 채널

널의 서브유닛인  $\alpha$ 1G 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는  $\alpha$ 1G 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 소 임신 진단용 조성물이다.

[0044] 즉, 본 발명에서 상기  $\alpha$ 1G 유전자의 수준은 유전자의 발현량을 의미하며, 바람직하게는  $\alpha$ 1G 유전자가 발현된 mRNA 수준, 즉 발현된 mRNA의 양을 의미하며, 상기 유전자의 발현량의 수준을 측정할 수 있는 물질로는 사용될 수 있는 공지되어 있는 물질을 모두 포함하는 것인데, 바람직하게는  $\alpha$ 1G 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기  $\alpha$ 1G 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브는  $\alpha$ 1G 유전자 전체 또는 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 상기 프라이머란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에 서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다.

[0046] 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인  $\alpha$ 1G 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하다.

[0047] 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0048] 본 발명에서, 상기 프로브라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다.

[0049] 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미테이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명에서 상기  $\alpha$ 1G 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질로는  $\alpha$ 1G 단백질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등의 항체를 포함할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 기술한 바와 같이 임신을 진단할 수 있는 마커 단백질로서  $\alpha$ 1G 단백질이 규명되었으므로, 상기 단백질을 이용하여 항체를 생성하는 방법은 당해 기술분야의 일반적 기술자가 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 다클론 항체의 경우에는  $\alpha$ 1G 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있으며, 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조가능하다. 단일클론 항체의 경우에는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마(hybridoma) 방법(Kohler et al., European Journal of Immunology, 6, 511-519, 1976)을 이용하여 제조할 수 있거나 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al., Nature, 352, 624-628, 1991, Markset al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합

기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 등이 있다.

- [0052] 본 발명에 따른 α1G 단백질을 특이적으로 인식하는 항체는 이에 제한되지는 않으나, 본 발명의 일실시예에서 제작한 것과 같이 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항체일 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 α1G 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 임신 진단용 조성물을 포함하는 소 임신 진단용 키트를 제공한다. 상기 키트는 이에 제한되지는 않으나, PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 임신 진단용 키트에 포함되는 임신 진단용 조성물은 α1G 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있으며, 이들의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.
- [0055] 본 발명의 임신 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 임신 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.
- [0056] 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명은 α1G 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 임신 진단용 조성물을 포함하는 임신 진단용 마이크로어레이를 제공한다.
- [0058] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, α1G 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화 된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라아신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.
- [0059] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명은 α1G 유전자의 발현수준 또는 α1G 단백질 수준을 측정하여 소의 임신 여부를 판단할 수 있는 진단 방법을 제공할 수 있는데, 구체적으로 상기 방법은 T-타입 칼슘 채널의 α1G 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 α1G 단백질의 수준을 측정하는 물질을 이용하여 α1G 유전자의 발현 정도를 확인함으로써 소의 임신 여부를 진단하는 단계를 포함할 수 있다. 상기에서 α1G 유전자의 mRNA 발현수준 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 α1G 단백질 수준을 측정하는 방법은 공지의 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다. 또한, 상기 α1G 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 α1G 단백질의 수준을 측정하는 물질은 본 발명에 따른 상기의 소 임신 진단용 조성물을 포함한다.
- [0061] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"란 임신 발생 또는 진행 정도에 따른 상기 α1G 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 수준이 비임신 대조군과는 다른, 생체로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 소의 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇨 또는 유즙(우유) 등이 포함될 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 α1G 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블롯 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0063] 상기 α1G 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 α1G 마커 단백질을 과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨

(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 본 발명의 따른 상기 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0064] 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블롯, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학적 분석, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.

[0065] 따라서 본 발명은 상기와 같은 검출 방법들을 통하여, 대조군의  $\alpha 1G$  mRNA 발현양 또는 단백질의 양, 및 임신이 의심되는 소(실험군)에서의  $\alpha 1G$  mRNA 발현양 또는 단백질의 양을 각각 확인할 수 있고, 상기 실험군에서의  $\alpha 1G$  발현양의 정도를 대조군의 것과 비교함으로써, 실험군 소의 임신 여부를 예측 및 진단할 수 있다.

[0066] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### [0067] <참고예>

#### [0068] 단백질 시료 준비

[0069] 정상적으로 착유를 하고 있는 인공수정 한 젖소로부터 시기별로 유즙을 채취한 후, 우유의 주요 단백질인 케이신(casein)을 제거하기 위해 1N HCL을 이용하여 pH를 4.6으로 낮춘 다음, 3200rpm 4℃에서 20분간 원심분리하여 케이신을 제거하였다. 이후 얻은 유청을 농축시킨 후 Bradford protein assay를 이용하여 단백질을 정량한 후 분석 시까지 -70℃에 냉동 보관하였다.

#### [0070] <실시예 1>

#### [0071] 본 발명에 따른 $\alpha 1G$ 단백질의 동정

[0072] 본 발명자들은 소의 유즙에서 임신시 특이적으로 발현되는 단백질을 동정하기 위해 2차원 전기영동을 실시하였다.

#### [0073] <1-1> 1차 전기영동

[0074] 1mg의 유청단백질을 pH 6-9의 스트립 겔(strip gel)에서 1차 전기영동(Isoelectricfocusing, IEF)을 수행하여 유청 단백질들이 자신의 등전점(pI value)에 해당하는 pH부분으로 이동할 수 있도록 하였다.

#### [0075] <1-2> 2차 전기영동

[0076] 1차 전기영동(IEF)이 끝난 스트립(strip)를 DTT equilibration buffer (1% DTT, 6M Urea, 2% SDS, 375mM Tris pH8.8, 20% Glycerol, 2.5% Acryamide) 10ml을 넣고 15분간 가볍게 흔들어 주면서 반응시켰다. DTT equilibration buffer를 버린 후 Iodoacetamide equilibration buffer(4% Iodoacetamide, 6M Urea, 2% SDS, 375mM Tris pH8.8, 20% Glycerol, 2.5% Acryamide) 10ml을 넣고 15분간 가볍게 흔들어 주면서 평형화(equilibration)시켰다. 평형화(Equilibration)가 끝난 스트립(strip)을 고정된 8%-16% gradient gel의 상층에 넣고, SDS PAGE running buffer(1.44% Glycine, 0.1% SDS, 0.3% Tris base)가 들어 있는 Ettan DALTwelve Large vertical system(Amersham Bioscience)에 고정시켜 150mA의 전류로 16시간 동안 전기영동을 실시하였다.

#### [0077] <1-3> CBB(Coomassie Brilliant Blue) G-250 염색

[0078] 겔(gel)을 증류수로 세척한 후 고정용액(40% v/v 메탄올, 5% v/v 인산) 1ℓ 을 넣고 가볍게 흔들어 주면서 1시간 고정된 후 용액을 제거하였고, CBB염색용액(17% g/v 황산암모늄, 3% v/v 인산, 0.1% g/v 쿠마시(Coomassie G-

250), 34% v/v 메탄올) 1 l 를 넣고 가볍게 흔들어 주면서 12시간 이상 염색하였다. 염색한 gel 을 탈염색용액(1% 아세트산, 0.02% 아지드화 나트륨(sodium azide))에 넣어 12시간 이상 gel 에서 탈염색을 실시하였다.

#### [0079] <1-4> 스캐닝 및 이미지 분석

[0080] 겔(gel)의 이미지는 스캐너(scanner)를 이용하여 스캔한 후 Image Master 2D platinum software version 5.0 program을 이용하여 분석하였고 통계학적 Data를 얻어 발현 차이를 보이는 단백질 스팟들을 분석하였는데, 그 결과 도 1에서와 같이, 전체 겔(gel)에서 약 700여개의 구분 가능한 단백질 스팟들이 나타나 정상적인 이차원전 기영동이 진행되었다.

#### [0081] <1-5> MALDI-TOF 및 ESI-MS/MS를 이용한 $\alpha$ 1G 동정

[0082] 이미지 분석 후 차이를 보인 단백질 스팟들을 잘라 내어 1.5ml 마이크로튜브(microtube)에 넣고 washing buffer(50% v/v 아세트나이트릴, 25mM 탄산암모늄, pH7.8) 120 $\mu$ l를 첨가하여 CBB의 청색이 탈색될 때까지 반복 한 후, 탈염색한 겔 스팟(gel spot)조각을 진공원심분리기를 이용하여 동결건조하였다.

[0083] 건조한 스팟 조각에 5 $\mu$ l의 trypsin buffer(0.02 $\mu$ g 트립신/ml, 25mM 탄산암모늄)을 넣고 1시간 동안 재수화 (rehydration)하고 겔 조각에 25mM 탄산암모늄 완충제(ammonium bicarbonate buffer)를 추가 하여 12시간 이상 37°C에서 12시간 반응시켰다. Extraction buffer(50% 아세트나이트릴, 0.1% Trifluoro acetic acid(TFA), 3차 증류수) 5 $\mu$ l를 넣고 30분간 초음파처리(sonication)를 실시하고 1 $\mu$ l의 시료를 취하여 매트릭스(matrix)용액( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid 10mg/ml in 50% v/v 아세트나이트릴, 0.1% TFA) 1 $\mu$ l를 추가하여 섞은 후 384 웰 플레이트(well plate)(Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA)에 깔고, 30분간 건조시켜 시료를 준비하였다.

[0084] 96 웰 플레이트에 있는 펩타이드를 MALDI-TOF(Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA)로 분석하여 트립 신으로 분해된 펩타이드 분자량을 측정하였다. 측정된 펩타이드 분자량 데이터를 <http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe> 사이트를 이용하여 Database 검색하여 단백질을 동정하였다.

[0085] 그 결과, 본 발명자들은 2차원 전기영동에서 임신 특이적으로 발현되고 있는 단백질 스팟들을 분석하였고, 각각 의 반복샘플들에서 일정하게 보이는 스팟들을 확인하였는데, 비임신 유증에 비해 임신 유증에서 특이적으로 발 현이 증가된  $\alpha$ 1G 단백질을 동정할 수 있었다(도 2 참조).

#### [0087] <실시예 2>

##### [0088] 본 발명에 따른 $\alpha$ 1G 단백질의 항체 제작

[0089] 본 발명자들은 상기 실시예를 통해 임신 유증에서 임신 특이적으로 발현되는  $\alpha$ 1G 단백질의 존재를 확인한 후,  $\alpha$ 1G 단백질을 효과적으로 검출해 낼 수 있는 실제적인 항체를 제작하고자 하였다.

[0090] DNAATAR 프로그램을 이용해  $\alpha$ 1G 단백질의 알파헬릭스( $\alpha$ -helix) 및 베타시트( $\beta$ -sheet) 생성 가능성이 적은 부 위를 선정하고, NCBI에서 펩타이드 서열에 대한 상동(homology) 분석을 통해 유사성이 낮은 서열을 선택하여, 표면 노출성, 항원성, 유연성(flexibility)가 높고, 임신특이적으로 작용하는 항체를 제작하였다.

[0091] Fmoc chemistry를 이용한 고상합성법으로 펩타이드의 c-term에서부터 n-term까지 차례로 합성반응시키고, 합성 이 종결되면 펩타이드를 90%이상의 TFA를 처리한 후 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 정제 및 매스(mass)확인하 였다. 운반(carrier) 단백질을 링커(linker)로 활성화 시키고(KLH는 GMBS, OVA는 MBS 링커로 각각 활성화함), 펩타이드를 증류수나 DMSO 용액에 녹인 후 운반(carrier) 단백질과 펩타이드 용액을 섞고 1/10 vol of 50mM EDTA(NaPi[pH7.5] 용액)를 첨가하고 실온에서 2시간 반응시키고, Ellman's reagent와 SDS-PAGE를 이용하여 컨 주게이션(conjugation) 여부 확인한 후 탈염(desalting) 시켰다.

[0092] 체중이 1.8 kg 정도의 뉴질랜드 흰토끼(New Zealand White rabbit)을 준비하였고(면역 시작 약 1주일 전에 도입 하여 환경 적응시킴), 400ug conjugate / 500ul PBS + 500ul freund's complete adjuvant를 섞고 에멀전 (emulsion)을 제조한 후 토끼 등에 피하주사(SC injection)하였다. 3주 후 위와 동량의 항원 + freund's

incomplete adjuvant를 섞고 1차 부스팅(boosting)을 실시하였고, 1주일 후 소량의 혈청(serum)을 채취하여 ELISA 수행 및 test 혈청(serum)을 회수하였다. 1차 부스팅(boosting) 후 3주 후에 동량으로 2차 부스팅(boosting)을 실시하였고, 1주일 후 소량의 혈청(serum)을 채취하여 ELISA 수행 및 test 혈청(serum)을 채취하였다. 2차 부스팅(boosting) 후 3주 후에 동량으로 3차 부스팅(boosting) 실시하였고 1주일 후 전체혈하여 혈청(serum)을 채취하였다.

[0093] 그 결과, 본 발명자들은 임신 유증에서 강하게 발현되는 단백질 중, 서열목록 2의 아미노산 서열을 가진  $\alpha 1G$ -type calcium channel subunit( $\alpha 1G$ )의 항체를 제작할 수 있었다(도 3 참조).

[0094]

[0095] <실시예 3>

[0096] 본 발명에 따른  $\alpha 1G$  항체를 이용한 임신 진단 여부 분석

[0097] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제작된 항체가 암소의 임신 여부를 정확히 판명할 수 있는지 분석하기 위해, 제작된 항체를 이용하여 임신 및 비임신 유증 샘플을 대상으로 웨스턴 블롯(Western blot)을 실시하여 임신에 따른 변화를 분석하였다.

[0098] 12% SDS-PAGE gel에 유증 단백질 샘플을 30ug를 적하하여 전기영동을 실시하고, SDS-PAGE의 전기영동이 끝나면 겔(gel)상의 단백질을 PDVF 멤브레인(membrane)으로 트랜스퍼(transfer) 하였다. 이 멤브레인에 TBS-T blocking solution(25mM Tris-base, 0.8% NaCl, 0.002% KCl, 5% non fat milk power, 0.1% Tween-20, pH 7.4)을 첨가한 후 실온에서 2~3시간 교반시켰다. TBS-T buffer(25mM Tris-base, 0.8% NaCl, 0.002% KCl, 0.1% Tween-20 pH 7.4)로 10분간 2번 세척한 후, 폴리클로날 항- $\alpha 1G$  항체(polyclonal anti- $\alpha 1G$  antibody)(1:5000)를 TBS-T buffer에 넣어 한 시간 배양하였다. 다시 TBS-T buffer로 15분씩 2번 세척한 후, 2차 항체(rabbit IgG 1:10000)를 TBS-T buffer에 넣어 한 시간 배양을 실시하였다. 배양이 끝난 후 TBS-T buffer로 10분씩 3번 세척한 후 ECL 키트(kit)를 사용하여 현상하였다.

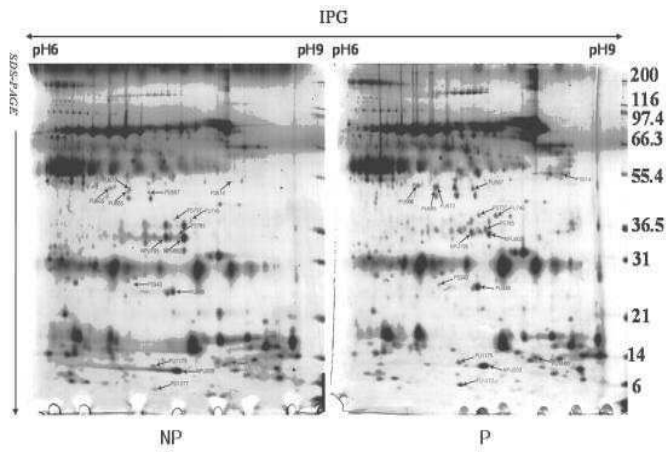
[0099] 그 결과, 항체가 임신 샘플에서만 강하게 발현되는 것으로 분석되었다(도 4a 참조). 또한 본 발명자들은 이 항체를 이용하여 임신시기별 우유 샘플로 웨스턴 블롯(Western blot)을 실시한 결과, 임신 초기혈청에서는 미약하게 발현되다가 임신 20일경부터 증가하는 것을 확인할 수 있었고 임신 초기에 발현이 증가하고 임신 중기와 후기에는 감소하는 경향을 확인할 수 있었다(도 4b 참조). 그러나 각 기간의 발현 정도의 차이가 있을 뿐,  $\alpha 1G$  단백질의 발현이 임신 전 기간에 걸쳐 뚜렷하게 증가하는 경향을 보이는 것을 알 수 있었다.

[0100] 이상의 결과들로부터, 본 발명자들은  $\alpha 1G$  단백질이 임신 초기는 물론 임신한 소에서 특이적으로 발현된다는 것을 확인할 수 있었고, 본 발명에서 제작한 항체가 훌륭한 임신 진단 수단으로 활용될 수 있다는 것을 확인하였다.

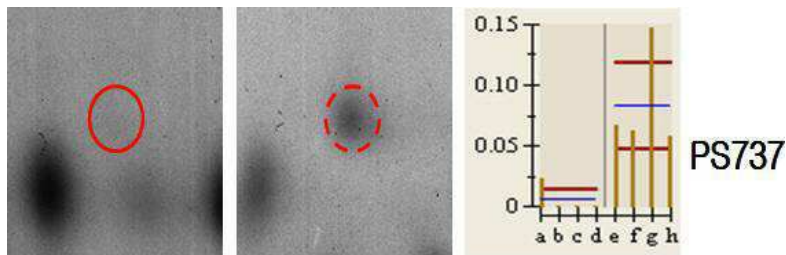
[0101] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

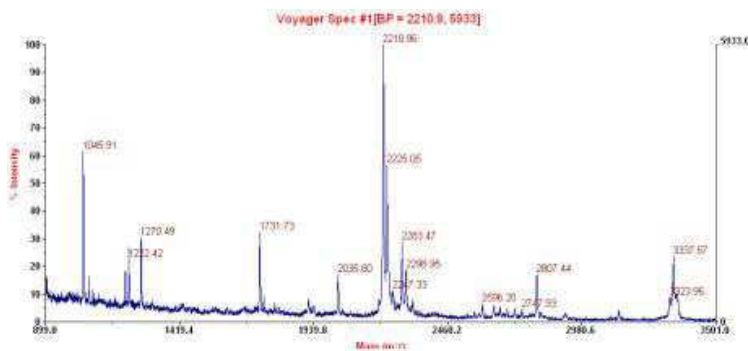
도면1



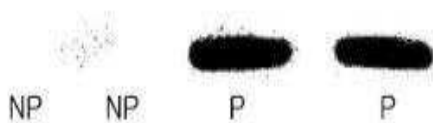
도면2



도면3



도면4a



도면4b



## 서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Chungnam National University

<120> Use of alpha1G subunit of T type calcium channel as a diagnostic marker for pregnancy of cattle

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 342

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> alpha1G protein

<400> 1

Ser Glu Thr Lys Gln Arg Glu Ser Gln Leu Met Arg Glu Gln Arg Val

1 5 10 15

Arg Phe Leu Ser Asn Ala Ser Thr Leu Ala Ser Phe Ser Glu Pro Gly

20 25 30

Ser Cys Tyr Glu Glu Leu Leu Lys Tyr Leu Val Tyr Ile Leu Arg Lys

35 40 45

Ala Ala Arg Arg Leu Ala Gln Val Ser Arg Ala Ala Gly Val Arg Val

50 55 60

Gly Leu Leu Ser Ser Pro Ala Pro Arg Gly Gly Gln Glu Pro Gln Pro

65 70 75 80

Ser Gly Gly Cys Pro Arg Pro His Arg Arg Pro Ser Val His His Leu

85 90 95

Met His His His His His Pro His Tyr His Leu Gly Asn Gly Thr Leu

100 105 110

Arg Ala Pro Arg Pro Ser Pro Gln Ile Gln Asp Arg Asp Ala Ser Gly

115 120 125

Ser Arg Arg Leu Val Leu Pro Pro Pro Ser Thr Pro Ala Leu Ser Arg

130 135 140

Gly Pro Pro Gly Gly Ala Glu Ala Val His Ser Phe Tyr His Ala Asp

145 150 155 160

Cys His Leu Glu Pro Val Arg Cys Gln Ala Pro Pro Pro Arg Ser Pro

165 170 175

Ser Glu Ala Ser Gly Arg Thr Val Asp Ser Gly Lys Val Tyr Pro Thr

180 185 190

Val His Thr Ser Pro Pro Pro Glu Met Leu Lys Glu Lys Ala Leu Met

195 200 205

Glu Val Ala Pro Ala Ser Gly Pro Thr Thr Leu Thr Gly Leu Asn Ile

210 215 220

Pro Pro Arg Pro Tyr Ser Ser Met His Lys Leu Leu Glu Thr Gln Ser

225 230 235 240

Thr Gly Ala Cys Gln Ser Ser Cys Lys Ile Ser Ser Pro Cys Leu Arg

245 250 255

Ala Ala Ser Gly Ala Cys Gly Pro Asp Ser Cys Pro Tyr Cys Ala Arg

260 265 270

Thr Gly Ala Gly Glu Val Gly Leu Thr Gly His Glu Met Pro Asp Ser

275 280 285

Asp Ser Glu Ala Val Tyr Glu Phe Thr Gln Asp Ala Gln His Gly Asp

290 295 300

Leu Arg Asp Pro His Ser Arg Arg Arg Arg Ser Leu Gly Leu Asp Val

305 310 315 320

Glu Pro Asn Ser Val Leu Ala Phe Trp Arg Leu Ile Cys Asp Thr Phe

325 330 335

Arg Lys Ile Val Asp Ser

340

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of alpha1G

<400> 2

His Gly Asp Leu Arg Asp Pro His Ser Arg Arg Arg Arg Ser Leu

1 5 10 15