



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년06월17일  
 (11) 등록번호 10-1406740  
 (24) 등록일자 2014년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12N 15/09 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)  
 C12N 15/33 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0017707  
 (22) 출원일자 2012년02월21일  
 심사청구일자 2012년02월21일  
 (65) 공개번호 10-2012-0027445  
 (43) 공개일자 2012년03월21일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 논문1: Molecular plant-microbe interactions  
 KR1020110131159 A  
 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(73) 특허권자  
 배재대학교 산학협력단  
 대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동)  
 (72) 발명자  
 최창원  
 대전광역시 서구 배재로 155-40, 생물의약학과 (도마동, 배재대학교)  
 (74) 대리인  
 박창희, 김종관, 권오식

전체 청구항 수 : 총 2 항

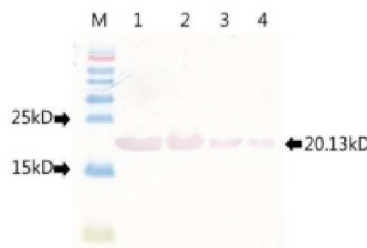
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 토마토황화잎말림바이러스 시2유전자의 대장균내 발현 및 재조합 시2단백질에 대한 다클론항체 생산법

**(57) 요약**

본 발명은 일차적으로 TYLCV(*Tomato yellow leaf curl virus*, 토마토황화잎말림바이러스)의 C2 유전자를 PCR로 합성하고 이를 단백질 발현벡터인 pET28a에 클로닝한 후, 대장균(*Escherichia coli*) 내 과대발현 되도록 유도하여 재조합(recombinant) TYLCV-C2단백질을 생산하는 공정을 제공하는 것이다. 이차적으로 재조합 TYLCV-C2단백질을 분리정제한 후 면역원(immunogen)으로 실험동물에 접종한 후, 다클론항체(polyclonal antibody)를 생산하기 위한 목적으로 공정을 제공하는 것이다. 본 발명의 TYLCV-C2단백질은 바이러스-숙주식물 상호작용에 다양한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서, 본 공정과정을 통하여 분리정제된 재조합 C2단백질에 대한 다클론항체를 생산하면 생물학적, 분자유전학적, 면역학적 연구에 널리 활용할 수 있고, 특히 바이러스-숙주 상호작용 연구 및 바이러스 진단키트 개발에 유용하게 활용할 수 있다.

**대표도 - 도4**



▶ Western blot  
 M: protein ladder,  
 Lane 1 : 5ug of expressed HYVV-C2  
 Lane 2 : 1ug of expressed HYVV-C2  
 Lane 3 : 0.5g of expressed HYVV-C2  
 Lane 4 : 0.1ug of expressed HYVV-C2

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0005031

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 국내에서 발생한 토마토 감염 토마토잎말림황화바이러스의 생물학 및 분자유전학적 특성  
규명 및 아그로박테리아 접종법을 이용한 저항성 품종 탐색

기 여 율 1/1

주관기관 배재대학교

연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

a) TYLCV-[bus](GQ141873)의 전체 게놈을 포함한 pGEM T-Easy 벡터를 주형으로 하여, 정방향 프라이머로 5'-GGATCCATGCAACCTTCGTCACCCCTCTAC-3'와 역방향 프라이머로 5'-AAGCTTCTAAATACTCTTAAGAAATGACCAGTCTGA-3'을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하여 GQ141873 게놈에 포함된 TYLCV-C2 유전자 DNA를 증폭하는 단계;

b) 상기 증폭된 DNA를 *Bam*HI 및 *Hind*III 제한효소로 처리한 후, pET28a 벡터에 도입하여 플라스미드 pET-TYLCV-C2를 제조하는 단계;

c) 상기 pET-TYLCV-C2로 대장균을 형질전환시키는 단계;

d) 상기 형질전환된 대장균을 2.5 내지 3.5 mM의 IPTG를 포함한 배지에서 36.5 내지 37.5 °C, 3.5 내지 4.5 시간 동안 배양하는 단계;

를 포함하는 TYLCV-C2 단백질의 배양방법.

**청구항 2**

a) 제 1항의 배양방법에 따라 TYLCV-C2 단백질을 생산하는 단계;

b) 상기 생산된 단백질을 Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 정제하는 단계;

c) 상기 정제된 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 분석하는 단계;

d) 상기 분석한 19.5 내지 20.5 kDa의 분자량을 갖는 단백질을 Sprague-Dawley 6주령 수컷쥐에 주입하여 항혈청을 생산하는 단계;

e) 상기 생산된 항혈청에서 다클론항체 IgG를 분리정제하는 단계;

를 포함하는 TYLCV-C2에 대한 다클론항체의 제조방법.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 TYLCV(*Tomato yellow leaf curl virus*, 토마토황화잎말림바이러스)의 C2유전자를 대장균(*Escherichia coli*) 내 발현을 유도하여 재조합(recombinant) C2단백질을 생산하고 분리정제한 후, 이를 면역원(immunogen)으로 이용하여 실험동물에 접종하여 다클론항체(polyclonal antibody)를 생산하기 위한 목적으로 공정을 제공하는 것이다.

**배경기술**

[0002] 최근 수년 동안 국내 여러 지역의 토마토 시설하우스에서 제미니바이러스과(Geminiviridae family), 베고모바이러스속(Begomovirus genus)으로 분류되고 있는 바이러스의 발병이 급속도로 확산되어 국내 토마토 농가에 심각한 경제적 손실을 초래하고 있다. 그중 하나인 *Tomato yellow leaf curl virus*(TYLCV, 토마토황화잎말림바이

러스)는 단일가닥 DNA로 구성된 단분절지놈(monopartite genome)을 가진 바이러스로서 자연에서는 담배가루이 (*Bemisia tabaci*)에 의해 매개되고 전세계적으로 광범위하게 분포되어 있다. TYLCV는 단기간 내에 돌연변이가 발생하여 국제적으로도 수많은 변이종이 보고되었다. 국내에서도 2008년도부터 전국적으로 확산되어 토마토 시설농가에 큰 피해를 주고 있으며, 유전적으로 다양한 변이종(quasi isolate)이 빈번하게 보고되고 있다 [Kim et al., 2011, Virus Genes 42:117-127].

[0003] 이분절지놈(bipartite genome) 제미나이바이러스는 지놈에 전사활성단백질(transcriptional activator protein; TrAP, AL2 혹은 AC2)을 코딩하고 있다. *Tomato golden mosaic virus*(TGMV)와 *African cassava mosaic virus*(ACMV)의 경우, TrAP는 외피단백질(coat protein; CP)과 이동단백질(movement protein; MP)의 조절 및 nuclear shuttle protein(NSP)의 발현에 관여한다고 보고되었다 [Hartitz et al. 1997, Virology 263:1-14; Hong et al. 1996, Virology 220:119-127; Sunter and Bisaro, 1997, Virology 232:269-280]. TGMV의 TrAP는 인단백질(phosphoprotein)로서 아연(zinc)과 부착하여 TrAP와 단일가닥 DNA 최적 상호작용을 수월하게 촉진하는데, C-terminal 도메인(domain)이 전사활성에 관여하는 것으로 알려져 있다 [Hartitz et al., 1997]. ACMV의 TrAP는 바이러스 병원성에 관여하고 RNA 사일렌싱(silencing)의 억제자(suppressor)로 알려져 있다 [Voignet et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96:14147-14512].

[0004]

[0005] 이분절지놈 제미나이바이러스 AC2의 위치적 상동체인 단분절지놈(monopartite genome) 제미나이바이러스의 C2단백질은 기능에 있어 AC2와 다소 차이점은 있지만 상당히 유사성을 가지고 있다. 예를 들어 *Tomato yellow leaf curl China virus*(TYLCCNV)의 C2단백질도 RNA 사일렌싱 억제 기능을 가지고 있는데, 이 기능에 필요한 DNA 부착 도메인, zinc finger 도메인, 핵국부화 신호(nuclear localization signal) 등이 존재한다 [Van Wezel et al., 2002, Mol. Plant Microbe Interact. 15:203-208; Van Wezel et al., 2003, J. Virol. 77:696-700]. 또한 *Tomato leaf curl virus*(ToLCV)의 C2단백질도 CP 발현 조절에 관여한다고 보고되었다 [Dry et al., 2000, Mol. Plant-Microbe Interact. 13:529-537].

[0006] 상기에 서술한 바와 같이 베고모바이러스의 C2단백질은 바이러스-숙주 상호작용에 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 C2단백질의 생물학적, 분자유전학적, 면역학적 연구를 심도있게 수행하기 위해서는 재조합 C2단백질을 합성하고 이에 대한 항체를 생산할 필요가 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 상기와 같은 필요성을 해결하기 위해서, 본 발명에서는 단분절지놈 베고모바이러스인 TYLCV의 재조합 C2단백질을 합성하는 방법과 이에 대한 다클론항체를 생산하는 방법이 절대적으로 필요하다. 이하 본 발명의 해결 수단을 더 상세히 설명한다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명에서는 TYLCV-C2유전자를 PCR을 통하여 증폭하고 이를 pET28a 벡터에 클로닝(cloning)한 후, *E. coli*에 형질전환(transformation)시켰다. 형질전환된 대장균 콜로니(colony)를 선별하여 배양한 후, 재조합단백질을 발현시키기 위해 다양한 농도의 IPTG를 첨가하여 최적조건을 결정하였다. 재조합 TYLCV-C2단백질에 대한 항체를 생산하기 위해 재조합 C2단백질을 분리정제하였다. 이를 위해 변성조건에서 Ni-NTA resin 크로마토그래피(chromatography)를 실시하여 TYLCV-C2-6X His 융합단백질(fusion protein)을 용리(elution)하였다.

[0009] 상기와 같은 방법으로 획득된 재조합 TYLCV-C2단백질은 실험동물용 쥐에 3회 주사하여 채혈한 후 항혈청

(antiserum)을 분리하고 이로부터 면역글로블린(immunoglobulin G; IgG)을 순수 분리정제하여 다클론항체를 획득하였다.

**발명의 효과**

[0010] 본 과제에서는 TYLCV에 감염된 식물 조직에서 바이러스의 유전자 단백질을 탐색하고 상호작용 연구에 보편적으로 활용되는 항체의 생산공정을 제공하여 바이러스 진단키트 개발 및 바이러스-숙주 상호작용 연구에 유용하게 사용할 수 있다. 이하 본 발명의 구체적 방법을 실시예를 들어 상세히 설명한다. 그러나 본 발명의 권리범위는 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**도면의 간단한 설명**

[0011] 도1은 TYLCV-C2유전자를 PCR 반응으로 증폭한 후 그 크기를 확인하기 위하여 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색한 아가로스젤(agarose gel)

도2는 TYLCV-C2단백질을 대장균 내 발현하기 위해 pET-28a 벡터에 클로닝하는 과정. pET-28a 벡터(lane 1, 상좌)와 PCR반응으로 증폭된 표적유전자 C2(lane 1, 상중)를 동일한 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단한 후 pET-28a 벡터 안으로 표적유전자를 삽입하여 합성한 재조합벡터 pET-TYLCV-C2를 대장균에 형질전환한 후 분리하여 아가로스젤 전기영동을 실시함 (상우). 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단하여 표적유전자 C2가 재조합벡터 pET-TYLCV-C2내에 존재하는 가를 확인함 (하좌). 또한, PCR 합성을 통해서 표적유전자가 재조합벡터 pET-TYLCV-C2내에 존재하는 가를 확인함 (하우)

도3(좌)는 재조합 TYLCV-C2단백질 발현을 유도하기 위해 배지에 다양한 농도의 IPTG(lanes 1, 6: 0 mM, lanes 2, 7: 0.1 mM, lanes 3, 8: 1 mM, lanes 4, 9: 3 mM, lanes 5, 10: 5 mM)를 처리한 후 37°C에서 4시간 배양한 후 저속 원심분리하여 분획함(lanes 1-5: 대장균 용해물의 수용성 분획, lanes 6-7: 대장균 용해물의 불용성 분획). 도3(우)는 변성조건에서 Ni-NTA resin 크로마토그래피(chromatography)를 통해서 재조합 TYLCV-C2단백질 분리정제함

도4는 재조합 TYLCV-C2단백질에 대한 쥐의 항혈청을 생산한 후 분리정제한 다클론 IgG를 항체로 다양한 농도의 재조합 TYLCV-C2단백질에 대해 교차반응(cross-reactivity)을 실시한 웨스턴블롯(Western blot). M: protein ladder, lanes 1-4: 분리정제된 재조합 TYLCV-C2단백질 (10 $\mu$ g, 5 $\mu$ g, 1 $\mu$ g, 0.5 $\mu$ g).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0012] {실시예}

[0013] 1. 바이러스 및 바이러스 지놈 DNA

[0014] 본 발명에 활용된 바이러스는 부산으로부터 분리한 TYLCV-[Bus](GQ141873) isolate이다. 그 바이러스의 전체지놈 DNA를 함유한 pGEM T-Easy 벡터를 [Kim et al., 2011, Virus Genes 42:117-127] 하기에 명기된 PCR 반응의 주형(template)으로 사용하였다.

[0015] 2. PCR 합성

[0016] (1) TYLCV-C2단백질 유전자 특이적 프라이머(primer)

[0017] PCR 증폭을 위해 다음과 같은 TYLCV-C2단백질 유전자의 특정 염기서열을 프라이머로 활용하였다.

[0018] - forward primer: 5' -GGATCCATGCAACCTTCGTCACCCTCTAC-3'

[0019] - reverse primer: 5' -AAGCTTCTAAATACTCTTAAGAAATGACCAGTCTGA-3'

[0020] (2) PCR 반응

- [0021] 상기 1에 명시한 TYLCV-[Bus] 지놈 DNA를 함유한 pGEM T-Easy 벡터를 주형으로 PCR을 실시하였다. 50 $\mu$ l PCR 반응액은 5 $\mu$ l 10X 완충액(Dakara Bio. Inc., Japan), 10 $\mu$ l DNA(최종농도: 10ng), 4 $\mu$ l 각각 2.5mM dNTPs, 1 $\mu$ l 각각 forward 및 reverse 프라이머(50 pmol), 3-9 $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>(최종농도: 1.5-4.5mM), 0.5 $\mu$ l(1U) ExTaq 중합효소로 구성하였다. PCR 반응은 DNA를 95 $^{\circ}$ C에서(2분, 1 사이클) 변성(denaturation)시킨 후, 35 사이클 연속 반응(변성: 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing: 56 $^{\circ}$ C에서 2분, 증폭: 72 $^{\circ}$ C에서 3분)을 거쳐 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 더 처리하였다.
- [0022] 상기에 명시한 실험 결과, MgCl<sub>2</sub> 농도에 상관없이 표적 밴드인 C2유전자가 합성되었고 그 DNA 밴드의 크기는 408bp로 관찰되었다 (도 1).
- [0023] 3. PCR 증폭 TYLCV-C2유전자 DNA를 pET28a 벡터로 클로닝
- [0024] (1) pET28a 벡터
- [0025] 상기 2-(2)에 PCR 반응으로 증폭한 TYLCV-C2유전자 DNA를 pET28a 벡터에 클로닝하기 위해 Novagen(Germany)으로부터 구입하여 2가지 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단하였다 (도2-상좌, lane 1).
- [0026] (2) 클로닝
- [0027] 표적 유전자 클로닝을 위해 상기 2-(2)에서 PCR로 증폭한 TYLCV-C2 DNA를 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단한 (도2-상중, lane 1) 후, 3-(1)에 명시한 pET28a 벡터와 ligation을 실시하였다. 반응액은 다음과 같이 혼합한 (1.5 $\mu$ l C2 DNA, 2 $\mu$ l pET28a 벡터, 1 $\mu$ l 10x buffer, 5 $\mu$ l 증류수, 0.5 $\mu$ l T4 DNA ligase(Fermentas, Canada) 후, 16 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 반응액 중 5 $\mu$ l를 *E. coli*(XL1-Blue) 형질전환에 이용하였다.
- [0028] Kanamycin(30 $\mu$ g/ml)을 함유한 Luria-Bertani(LB) 고체배지에 *E. coli*를 도말하여 형질전환된 콜로니를 선발하고, 이를 LB(+kanamycin) 액체배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C 온도에서 배양하였다. 배양액을 수거하여 저속원심분리하여 상층액(supernatant)은 제거한 후, 침전물(pellet)을 수확하였다. High Speed Plasmid Kit(Geneaid, Taiwan)를 이용하여 제조사의 지침에 따라서 침전물로부터 플라스미드를 분리정제하고 이를 pET-TYLCV-C2라고 명명하였다 (도2-상우).
- [0029] 상기와 같이 실시하여 획득된 재조합 플라스미드(pET-TYLCV-C2)에 표적유전자 C2가 제대로 삽입되었는가를 검증하기 위해 pET-TYLCV-C2를 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 처리한 결과 표적유전자 크기의 DNA 밴드가 확인되었고 (도2-하좌), pET-TYLCV-C4 DNA를 주형으로 상기 2-(1)에 명시한 프라이머를 이용하여 PCR을 실시한 결과, C2 DNA가 합성되었다 (도2-하우). 또한, pET-TYLCV-C2의 염기서열을 결정하여 표적유전자가 벡터에 제대로 삽입되어 코돈 프레임(codon frame)에 문제가 없음을 확인하였다.
- [0030] 4. 재조합단백질 발현
- [0031] (1) IPTG 발현 유도 및 분석
- [0032] TYLCV-C2유전자의 단백질 발현을 유도하기 위해 pET-TYLCV-C2를 함유한 *E. coli*를 LB(+kanamycin) 액체배지에 OD<sub>600nm</sub> 값이 0.6이 될 때까지 배양한 후, IPTG(Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactoside)를 농도별로 첨가하였다. Lac operon에 의해 조절되는 단백질 발현을 위해 lactose 대신 0.1-5mM(최종농도) IPTG를 배지에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양한 후 최적조건을 결정하였다. 배양 시료별로 수확하여 저속원심분리하고 침전된 대장균을 수확하였다. 이를 용해완충액(lysis buffer)에 녹인 후 초음파분해를 3회(30초/1회 및 1분 간격) 실시하였다. 분해된 시료는 저속원심분리한 후 상층액과 침전물 분획으로 각각 수확하였다. 또한, 상층액에 존재하는 총단백질은 수용성 분획(soluble fraction), 침전물은 불용성 분획(insoluble fraction)이라 명명하고, 불용성 분획은 1X

PBS(phosphate-buffered saline, pH7.4)에 녹인 후 SDS-PAGE 분석하였다.

[0033] - 용해완충액: 10mM imidazole, 300mM NaCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8.0

[0034] (2) TYLCV-C2-6XHis 융합단백질 분리정제

[0035] TYLCV-C2-6XHis 융합단백질 분리정제는 변성조건(8M Urea)에서 Ni-NTA resin(Qiagen, USA) 크로마토그래피를 이용하여 용리하였다.

[0036] - 용리완충액은 6M guanidine hydrochloride + 0.2M actic acid

[0037] (3) SDS-PAGE 분석: 분자량 및 과대발현 조사

[0038] 상기와 같이 추출된 분획물 뿐만 아니라 분리정제 과정의 각 단계가 완료될 때 마다 시료를 확보하여 변성완충액을 [Laemmli, 1970, Nature 227:680-685] 첨가하고 3-5분간 가열한 후 변성된 시료를 준비된 15% 폴리아크릴아마이드젤(polyacrylamide gel)에 적재하여 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 완료된 후 젤을 Coomassie blue 용액(methanol: glacial acetic acid: water, 5:1:5, v/v/v 혼합액에 0.05% Coomassie brilliant blue R-250를 용해시킴)으로 염색하여 단백질을 분석하였다.

[0039] 상기와 같이 방법으로 SDS-PAGE 분석한 결과, 재조합 TYLCV-C2단백질은 불용성 분획에서 첨가된 IPTG 농도와 상관없이 과대발현(overexpression)되었고, 분자량은 약 20 kDa으로 관찰되었다 (도3-좌). 따라서, 단단계 세척 및 용리를 통해 분리정제된 재조합 TYLCV-C2단백질 (도3-우)은 정량 후 실험동물에 주사하기 위한 항원으로 준비되었다.

[0040]

[0041] 5. 재조합단백질에 대한 항혈청 생산 및 다클론항체 정제

[0042] (1) 항혈청 생산

[0043] - 항원: 분리정제된 재조합 TYLCV-C2단백질

[0044] - 실험동물 : Sprague-Dawley 쥐 (6주령) 수컷

[0045] - 주사 3회 (2주 간격) 및 채혈(최종 주사 1주일 후)

[0046] 1차 주사: 재조합단백질 (농도 100 $\mu$ g) + complete adjuvant → 채혈

[0047] 2차 주사: 재조합단백질 (농도 50 $\mu$ g) + complete adjuvant → 채혈

[0048] 3차 주사: 재조합단백질 (농도 50 $\mu$ g) → 채혈

[0049] (2) 다클론항체 IgG 분리정제

[0050] 5-(1)에서 채혈된 항혈청으로부터 TYLCV-C2-IgG를 분리정제하기 위하여 Millipore사로부터 Montage Antibody Purification Kit 및 Prosep-G media를 구입하여 제조사의 지침에 따라 다음과 같이 시도하였다. 먼저 항혈청을 PROSEP-G media를 이용하여 10ml 부착완충액(binding buffer)A와 평형화(equilibration)한 후, 0.22 $\mu$ m Sterflip-GP 장치를 이용하여 항혈청에 존재하는 불순물을 제거하였다. 여과된 항혈청은 부착완충액A로 희석(1:1, v/v)하여 spin column에 적재한 후, 150g에서 20분 동안 원심분리하였다. Spin column에서 탈부착된 불순물을 제거하기 위해 10ml 부착완충액A를 첨가한 후 200g에서 2분 동안 원심분리하였고, 부착된 IgG는 10ml 용리완충액B2로 용리한 후, pH를 중성으로 유지시키기 위해서 1.3ml 중화완충액C가 들어있는 새로운 spin column으로 옮겼다. 5분 동안 500g에서 원심분리 후 IgG를 함유한 상층액을 모아 Amicon Ultra-15 centrifugal filter 장치를 이용하여 탈염(desalting) 및 농축하였다.

[0051] - 부착완충액A: 1.5M glycine-NaOH, 3M NaCl, 0.1% sodium azide, pH 9.0

[0052] - 용리완충액B2: 0.2M glycine-HCl, 0.1% sodium azide, pH 2.5

[0053] - 중화완충액C: 1M Tris-HCl, 0.1% sodium azide, pH 9.0

[0054] (3) 재조합 TYLCV-C2단백질에 대한 다클론항체의 항원탐색: Western blot

[0055] 재조합 TYLCV-C2단백질을 1X PBS 완충액으로 희석(10 $\mu$ g, 5 $\mu$ g, 1 $\mu$ g, 0.5 $\mu$ g)한 후 변성완충액을 첨가하고 3-5분간 가열한 후 변성된 시료를 준비된 폴리아크릴아마이드젤에 적재하여 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 완료된 후 젤은 염색하지 않고 면역학적 분석을 위해 electro-transfer 방법으로 단백질을 nitrocellulose membrane(NCM)으로 이동시켰다. NCM은 비특이적 반응을 억제하기 위해 5% 무지방 분유(nonfat milk)를 1X PBS에 녹여 만든 블로킹 용액(blocking solution)에 담근 후, 교반기위에서 1시간 동안 처리한 후 0.03% Tween-20이 함유된 1x PBS 완충액으로 세척하였다. 일차항체(primary antibody)는 5-(3)에서 분리정제한 IgG를 1X PBS로 희석하여(1:1,000, v/v) 사용하였고, 이차 항체는 goat anti-rat alkaline phosphatase conjugate(Sigma Co., USA)를 1X PBS로 희석하여(1: 30,000, v/v) 사용하였다. 일차 및 이차항체는 각각 1 시간씩 반응시켰고, 각 단계 후 3회 세척하였다. 마지막으로 항원-항체반응을 육안으로 관찰하기 위해 NCM은 nitroblue tetrazolium(NBT)/ 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate(BCIP)가 함유된 발색완충액에 처리하여 발색시켰다.

[0056] - 발색완충액: 100 mM Tris, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5

[0057] 상기의 명시된 방법으로 재조합단백질을 탐색한 결과, 항원인 재조합 TYLCV-C2단백질과 강하고 선명하게 반응하였다. 그리고 TYLCV-C2 항원탐색의 한계는 항원 0.5 $\mu$ g까지 가능하였다 (도4).

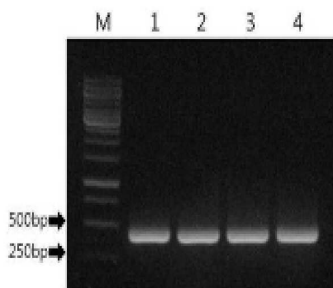
[0058] 상기의 결과에서 고안된 재조합 TYLCV-C2단백질에 대한 다클론항체 생산은 바이러스-숙주 상호작용 연구 및 TYLCV 감염식물로부터 바이러스를 판별하는데 적용할 수 있다.

**부호의 설명**

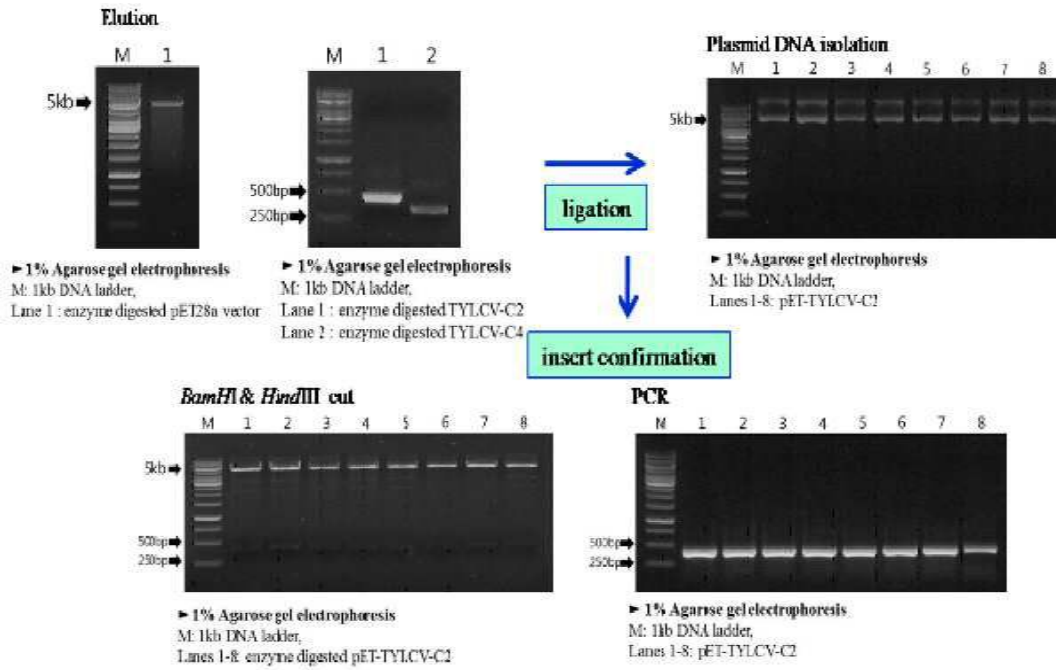
[0059] 해당사항 없음

**도면**

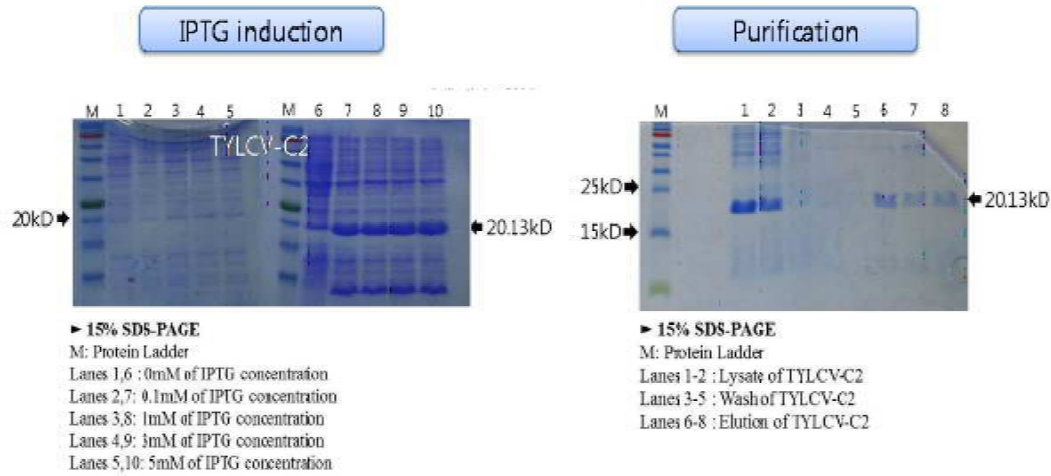
**도면1**



도면2



도면3



도면4

