(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C07K 1/14

(11) 공개번호 특2001-0072372
(43) 공개일자 2001년07월31일

(21) 출원번호 10-2001-7001724
(22) 출원일자 2001년02월09일
번역문 제출일자 2001년02월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US1999/18161
(86) 국제출원출원일자 1999년08월11일
(87) 국제공개번호 WO 2000/09725
(87) 국제공개일자 2000년02월24일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 코스타리카, 도미니카연방, 남아프리카, 그레나다, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 유고슬라비아, 가나, 감비아, 짐바브웨,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘,

(30) 우선권주장 09/132,989 1998년08월11일 미국(US)

(71) 출원인 라지 스케일 바이올로지 코퍼레이션
맥기 데이비드 알
미국 캘리포니아주 (우편번호 95688) 바카빌 바카 밸리 파크웨이3333

(72) 발명자 터펜토마스에이취.
미국캘리포니아주(우편번호:95688)바카빌바카밸리파크웨이3333
가저스티븐제이.
미국캘리포니아주(우편번호:95688)바카빌바카밸리파크웨이3333
맥클로치마이클제이.
미국캘리포니아주(우편번호:95688)바카빌바카밸리파크웨이3333
카메론테리아이.
미국캘리포니아주(우편번호:95688)바카빌바카밸리파크웨이3333
새모넥-포터미켈엘.
미국캘리포니아주(우편번호:95616)데이비스디.캠브리지테라스335
홀츠알.배리
미국캘리포니아주(우편번호:95688)바카빌바카밸리파크웨이3333

(74) 대리인 김명신

심사청구 : 없음

(54) 식물조직의 간질액으로부터 단백질을 추출하는 방법

요약

본 발명은 식물의 세포간극으로부터 단백질을 추출하는 방법에 관한 것으로서,

상기 방법은 식물세포에 의해 합성된 많은 목적 활성 단백질들을 대규모로 분리하는데 사용할 수 있으며, 식물숙주로부터 재조합생성된 단백질을 추출하기 위해 상업용으로 사용되며, 실시가능한 재조합 단백질 생성을 위한 소스로서 식물을 대규모로 사용할 수 있게 하는 것을 특징으로 한다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 단백질의 제조 및 정제분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 식물재료로부터 이차 단백질 추출을 허용하면서, 식물재료를 손상시키지 않는 진공 및 원심분리법에 의해 식물의 세포간 물질로부터 고농축된 활성단백질을 상업적인 규모의 양으로 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

약학적 및 산업적인 용도에 사용가능한 유용한 단백질의 예는 많다. 종종, 상기 분자들은 생성물의 품질 및 성능을 유지하기 위해 일부 또는 고도로 정제된 다량의 배합물을 필요로 한다. 식물들은 재조합 단백질을 포함하는 단백질의 저렴한 소스이다. 식물내에서 단백질을 다량으로 제조하기 위한 바람직한 방법들이 많이 제안되어 있다. 그러나, 재조합 단백질 생성물을 정제 및 추출하는 것 뿐만 아니라 균질화 식물조직으로부터 생성물을 추출 및 처리하는 것과 연관된 문제들이 실질적으로 인식되어왔다. Austin 외 다수의 Annals New York Academy of Science, 721:234-244(1994). 상기 문제들은 식물에서 재조합 단백질을 상업적인 대규모로 성공적으로 생성하기 위한 주요 방해물이 된다.

식물세포들은 소포체 막상에서 단백질을 합성하고, 합성된 단백질을 골지체에서 형성된 분비소포내 세포표면으로 수송한다고 생각된다. 주 논의는 Jones 외 다수의 New Phytology, 111:567-597(1989)에 제시되어 있다. 특정 식물조직 또는 세포배양액에서 여러개의 특정 단백질들에 대한 단백질 분비에 관한 특정 기작들을 해명하기 위해 여러 연구들이 진행되어왔다. 상기 노력들의 예로는 Herbers 외 다수의 Biotechonolgy 13:63-66(1995), Denecke 외 다수의 The Plant Cell 2:51-59(1990), Melchers 외 다수의 Plant Molecular Biology 21:583-593(1993) 및 Sato 외 다수의 Biochemical and Research Communications 211(3):909-913(1995)가 있다. 단백질이 식물세포 아포플라즘(apoplasm) 또는 세포간극으로 분비되지 않는 경우, 단백질을 방출 및 포획하기 위해 식물세포벽을 분해하는 기작이 사용되어야 한다. 세포간 함유물을 방출시키는 세포막을 분해하고, 세포벽을 파괴하기 위해, 식물세포는 매우 큰 전단력에 노출되어야 한다. 모 식물에 의해 재조합 제조되거나 또는 자연 제조되는, 목적 단백질은 비우호적인 화학환경에 노출되고, 조직 균질화전에 구획화된 효소와 소분자에 생성물을 노출시킴에 의해 산화적 및 단백질 분해된다. 그리고, 상기 세포분해과정이 수행된다면, 대부분의 다른 전체 세포단백질은 처리하기 어려운 정제문제를 일으키는 목적 단백질과 혼합된다. 신뢰할 수 있는 단백질 제조를 위한 식물의 생합성능력을 사용하기 위해, 식물조직의 세포간극(아포플라즘)으로 분비될 수 있는 특정 단백질을 얻기 위한 방법이 필요하다. 상기 방법은 균질화를 위해 필요하다. 상기 방법이 수행된다면, 하나 이상의 목적 단백질을 함유하는 식물재료의 프랙션이 균질화없이 얻어질 수 있다. 그러므로, 상기 방법은 식물추출액이 특정 단백질에 풍부해지고, 그 단백질을 일부 화학적 및 효소적 분해로부터 보호해준다.

목적하는 다양한 단백질 및 생성물은 간극에 분배 또는 분비되기 때문에, 진공압력은 침윤배지를 세포간극에 도입하는 것을 용이하게 한다. 유사하게, 보존액을 제거하기 위해 여러 힘들이 가해질 수 있다. 1,000×G의 원심분리력이 효과적이다. 중력을 사용하여, 보존액이 진공하의 트랩내에 수집될 수 있다. 완충액의 진공침윤에 의해 또는 진공침윤없이, 효소는 조직을 동결시키고, 녹이고, 상기 유액을 추출하기 위한 물리적인 압력을 가함으로써 추출될 수 있다. 그러나, 상기 과정으로 인해 바람직하지 않은 세포분해가 증가한다.

유전적으로 변형된 식물은 신뢰할 수 있는 재조합 단백질 제조원이 된다. 생물학적 생성물은 무균 성장조건하에서 축적되고, 상기 생성물은 비교적 저렴한 방법으로 소망하는 양까지 중량을 잴 수 있기 때문에, 목적 단백질을 산업적인 규모로 추출하기 위한 소스로서, 간질액 프랙션과 같은 농축 소스외에 희석액을 사용하는 것이 적당하다. 여러 목적 단백질들은 재조합 식물원으로부터 추출될 수 있지만, 고활성의 약학적 효소, 시토킨 및 항체가 상기 방법에 의해 개발될 수 있는 특히 유용한 생성물들이다.

본 발명의 요약

본 발명은 식물의 세포간극으로부터 고농축 활성단백질을 추출하는 방법을 특징으로 한다. 세포간극은 유액 기질, 단백질 및 세포벽 탄수화물로 구성된다. 상기 방법은 자연적으로 발생하거나, 또는 재조합 기술에 의해 제조된, 식물세포로부터 소망하는 단백질을 산업적인 대규모로 분리하는데 적용될 수 있다. 하기 설명되는 바와 같이, 진공 및 원심분리법은 식물재료를 파괴하지 않고 식물의 간질액으로부터 단백질을 추출하게 하고, 또한 식물재료로부터 소망하는 단백질을 추가로 추출하게 한다.

넓은 관점에서, 상기 방법은 침수 식물잎을 실제 진공환경에 놓음으로써, 식물잎을 완충액에 의해 침윤시키는 단계, 실제 진공환경에 상기 잎을 노출시킨 후에 식물잎으로부터 과량의 액체를 제거하는 단계 및 상기 잎을 원심분리하여 간질액을 얻는 단계로 이루어진다. 상기 결과, 다량의 원하는 단백질이 식물의 세포간극으로부터 제거됨으로써, 자연발생하는 단백질을 식물잎으로부터 분리시키기에 용이하게 하고, 식물내에서 소망하는 단백질을 재조합 제조하고, 식물잎을 균질화하거나, 또는 그렇지 않으면 식물세포 자체를 분해하지 않고도 상업적으로 사용가능한 양으로 단백질을 추출할

수 있게 한다. 상기 물질은 간질액, 이하 " IF" , IF 추출액이라고 언급한다.

한 구체예에서, 본 발명의 식물잎은 이들을 완충액에 노출시키기 전에, 완전히 또는 실제로 주맥을(실제로 반으로) 자른다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 잎들과 완충액을 약 200 내지 1000㎜Hg의 진공압력하에 두었다. 보다 바람직하게는, 상기 잎들과 완충액을 약 400 내지 760㎜Hg의 진공압력하에 두었다. 그리고, 가장 바람직하게는 상기 잎들과 완충액을 약 760㎜Hg의 진공압력하에 두었다. 다른 바람직한 구체예에서, 과량의 완충액이 제거되기 전에, 약 50 내지 5,000×G 이하의 중력(G-force)범위를 갖는 저속으로 상기 잎들을 원심분리하였다. 가장 바람직하게는, 상기 잎들을 약 2,000×G 이하의 중력범위로 상기 잎들을 원심분리하였다.

도면의 간단한 설명

도 1은 IF 추출과정의 일반적인 개략도이며,

도 2는 일괄식 물관침윤을 도시한 것이며,

도 3은 연속식 진공침윤을 도시한 것이며,

도 4는 TT01A 103L의 플라스미드 지도를 도시한 것이며,

도 5는 플라스미드 TT01A 103L의 바이러스 cDNA 서열을 도시한 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 식물의 세포간극으로부터 단백질을 추출하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 식물세포로부터 원하는 고농축 활성 단백질을 대규모의 상업적으로 분리하기 위해 적용될 수 있으며, 상기 단백질은 자연발생하거나 ,또는 식물바이러스 벡터를 사용하거나 또는 유전자도입 식물을 사용하는 재조합 기술에 의해 제조된다. 본 발명의 진공 및 원심분리법은 식물재료를 파괴하지 않고 세포간극으로부터 단백질을 추출할 수 있게 함으로써, 식물재료로부터 원하는 단백질을 추가로 2차 추출할 수 있게 한다. 상기 이차 추출과정으로부터 얻은 단백질은 IF 유액으로부터 정제된 단백질과 같거나 또는 다를 수 있다.

상기 방법은 보통, 실제 진공환경에 침수 식물잎을 둠으로써 식물잎을 완충액에 의해 침윤하는 단계, 잎을 실제 진공환경에 노출시킨후 식물잎으로부터 과량의 액체를 제거하는 단계 및 상기 식물잎을 원심분리하는 단계로 구성된다. 상기 과정의 결과로서, 다량의 원하는 단백질들이 식물의 세포간극으로부터 제거됨으로써 식물세포를 균질화하지 않고 상업적인 규모의 양으로 식물잎으로부터 자연발생된 단백질 및 재조합 제조된 단백질을 분리하는 것이 용이해지며, 식물세포물질로부터 원하는 단백질을 이차 추출할 수 있게 한다.

본 발명자들은 식물숙주내에서 외부 DNA를 발현하기 위해 적당한 벡터를 개발하는 연구를 진행하였다. Ahlquist의 미국특허 제4,885,248호 및 미국특허 제5,173,410호에는 외부 유전물질을 식물숙주내에서 발현하기 위해 식물숙주내로 전달시키는데 사용가능한 전달벡터를 개발하기 위한 예비작업이 기술되어 있다. 하이브리드 RNA 바이러스 및 RNA 형질전환 벡터에 대한 추가설명은 Ahlquist외 다수의 미국특허 제5,466,788호 및 제5,602,242호 제5,627,060호 및 제5,500,360호에 기술되어 있으며, 이는 이후에 참고문헌을 통합된다. Donson외 다수의 미국특허 제5,316,931호 및 미국특허 제5,589,367호에는 식물내에서 외부 유전물질을 조직발현하기에 적당한 식물 바이러스 벡터가 처음으로 명시

되어 있으며, 이는 이후에 참고문헌으로 통합된다. Donson외 다수의 문헌에는 외부 유전자를 안정하게 조직발현하기 위한 이종 서브게놈 프로모터를 갖는 식물 바이러스 벡터가 기술되어 있다. 따라서, 이제 상업적인 규모로 재조합 단백질을 제조하기 위해 식물을 사용할 수 있다. 본 발명은 식물잎의 간질액으로부터 목적 단백질을 추출하는 문제를 해결한다.

식물내 단백질 분비는 기본적으로 완전히 규명되지 않은 과정이다. 분비된 단백질이 조면 소포체 막상에서 합성되어 골지체상에서 합성된 분비소포에 의해 세포표면으로 수송된다는 것은 알려져 있다. 그리고, 분비된 단백질이 소포체를 통과하여 전위하기 위해서는 시그널펩티드가 필요하다는 것도 알려져 있다. 소포체의 세포내강으로 수송된 단백질은 그후 간극으로 분비될 수 있으며, 이들은 세포에 의해 액포와 같은 다른 구획물로 분류되지 않는다.

상기 과정에 대한 지식이 많아짐에 따라, 제조되는 식물세포의 간질극으로 분비하기 위해 특별 고안된 재조합 단백질을 제조할 수 있다.

전체 생성물의 다량(약 10% 이상)이 분비되면, 그후 식물의 세포간극으로부터 목적 단백질을 분리하는 것이 바람직하다. 그렇지 않으면, 목적 단백질을 방출 및 포획하기 위해서는 식물세포벽을 분해하는 기작이 사용되어야한다. 식물세포는 세포벽을 파괴하고, 세포막을 분해하여 세포내 함유물을 방출시키기 위해 매우 높은 전단력에 노출되어야 한다. 모 식물에 의해 재조합제조 또는 자연발생된 목적 단백질은 적대적인 화학적 환경에 노출됨으로써, 종종 효소적으로 촉매되는 산화적 및 단백질 분해 손상을 입는다. 그리고, 대부분의 다른 전체 세포단백질은 상기 세포분해과정이 수행된다면 처리하기 어려운 정제문제를 갖는 단백질과 혼합된다.

세포 간액 추출액은 여러 실험목적을 위해 진공침윤된 잎으로부터 미리 제조되었다. 상기 추출액은 네이티브 및 비네이티브 단백질 뿐만 아니라 다른 분자들도 포함한다. Klement, Z.의 (1965)Phytopathological Notes: 1033-1034에서, 추출액의 성장촉진특성은 식물병리학적 세균종을 사용하여 입증되었다. Rathmell 및 Sequera의 (1974) Plant Physiol. 53:317-318에는, 식물 잎세포의 IF 및 세포기질 구획을 위한 마커 효소를 사용하여, 특이적으로 분비된 단백질 프랙션의 풍부가 확인되어 있으며, 생화학적 및 생리학적 조사에 관한 기초적인 연구에서 상기 추출액의 유용성이 보고되어 있다. Parent 및 Asselin의 (1984) Can. J. Bot. 62:564-569는 병원균 스트레스에 의해 유도되고, IF(발병원인-관련 또는 PR 단백질)내에서 분비된 여러 단백질들 및 아세포 구획에 효소적 활성 및 단백질을 집중시키기 위해 적용된 방법을 특징으로 한다. Van den Blucke외 다수의 (1989) PNAS 86:2673-2677; Heitz외 다수의 (1991) Plant Physiol. 97:651-656. Regalado 및 Ricardo의 (1996) Plant Physiol. 110:227-232에는 특정 IF 단백질이 구성발현됨이 보고되어 있다.

완충조성물 및 처리에 따라, 예를 들어 조면 소포체 및 골면 소포체, 골지체, 핵, 액포, 원형질 관통막, 세포질, 미토콘드리아, 엽록체, 퍼옥시좀, 관련세포막 및 세포기관으로부터 기원하는 성분들을 포함하는 IF 추출액내 여러 추가성분들이 있다.

유전변형된 식물에서, IF 추출방법 뿐만 아니라 다른 방법들도 재조합 생성물의 일부를 아세포로 국한시키는 것을 입증하는데 사용되었다. Sijomns 외 다수의 (1990) Bio/Technology 8:217-221; Firek 외 다수의 (1993) Plant Molecular Biology 23:861-870; Voss 외 다수의 (1995) Molecular Breeding 1:39-50; De Wilde 외 다수의 (1996) Plant Science 114:233-241. IF 추출액은 생화학적 특징화를 위해 소량의 식물 또는 식물 병소-유도성 단백질을 정제하기 위한 출발물질로서 사용되어 왔다. Melchers 외 다수의 (1993) Plant Molecular Biology 21:583-593; Sato외 다수의 (1995) BBRC 211:909-913; Kinai 외 다수의 (1995) Plant Cell 7:677-688; Liu외 다수의 (1996) Plant Science 121:123-131; Maggio외 다수의 (1996) Plant Molecular Biology Reporter 14:249-259.

그러므로, 보다 특이적인 활성의 유효물질을 갖는 추출액질(활성(U)/단백질(㎎))을 분리할 필요가 있으므로, IF 성분들을 상업적인 규모로 제조하는 방법을 제공한다.

IF 추출액이 인간치료제 재료로서 사용할 수 있는 고활성의 잠재 생화학물질을 대규모로 정제하기 위한 출발물질로서 보통 사용가능하다는 것이 종래에는 알려져 있지 않다. 생성물이 분비되는 것으로 나타나는 경우에도 종종, 다른 정제 방법들이 사용된다(Herbers 외 다수, 1995, 상기). 재조합 단백질 생성물의 상업용으로 사용가능한 소스로서 IF 방법을 개발하는데 실패한데는 하기와 같은 요소들이 원인이 된다: 1)추출액의 불완전한 특징화, 즉 수준이 높아진 IF 방법에 의해 얻어질 수 있는 전체 재조합 단백질의 불완전한 비율 측정, 2)고도로 정제된 형태의 생성물의 적당한 활성을 다른 것에 의해 입증하는데 실패, 및 3)상기 목적을 위한 일정량의 생물량을 처리하기 위한 산업적-규모의 장비 설명 부족.

본 발명은 식물로부터 단백질을 상업적-규모로 추출하기 위한 진공 및 원심분리법을 포함한다. 본 발명의 결과로서, 다량의 목적하는 활성단백질이 식물의 세포간극으로부터 제거되고, 추가 정제를 위해 농축됨으로써, 식물잎으로부터 자연발생 단백질 및 재조합-생성 단백질을 상업적으로 사용가능한 양으로 분리할 수 있게 한다. 상기 방법은 IF 추출후 결과 식물조직이 파괴되지 않고, 다른 방법에 의해 다른 사용가능한 성분들을 추출하기 위해 사용된다는 추가의 잇점을 가지고 있다.

상기 잎은 편리한 방법에 의해 수확될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 식물잎은 식물로부터 제거되어, 여러 큰 곁엽의 끝이 노출되도록 이들을 완충액에 노출시키기 전에 완전히 또는실질적으로 주맥에 평행하게 세로로 자른다.

일단, 잎을 절단하면 이들을 완충액에 노출시킨다. 어떤 완충액이 주어진 식물 또는 목적 단백질에 다소 적당한지는 당업자들이 잘 알겠지만, 정해진 EDTA 또는 Tris 완충액이 적당하다. 일부 경우에, 물이 용액으로서 바람직할 수 있다. 완충액의 성질, 특정 pH 또는 온도가 본 발명의 범주내 구체예에서 중요하다는 것은 의도되지 않는다. 그러나, 하나 이상의 목적 단백질의 산화, 침전, 단백질분해를 피하는 조건을 유지하는 것이 보통 권고된다. 따라서, pH, 온도 및 기타 상기 변수들이 측정되고, 필요에 따라 변경되어야 한다.

일단, 식물잎이 완충액내에 넣어지면, 이들은 실질적으로 진공환경에 놓이게 된다. 진공압력은 잎에 의한 완충액의 침적을 촉진시킨다. 일부 구체예에서, 진공압력은 약 200 내지 760㎜Hg이다. 가장 바람직하게는, 잎 및 완충액이 약 400 내지 760㎜Hg의 진공압력하에 놓인다. 진공압력의 양은 본 발명의 범주내에서 다양할 수 있다. 그러나, 본 발명의 범주내에서 다양하게 지속될 수 있지만, 진공환경에 몇초 내지 10분동안 지속해서 노출시키는 것이 특히 효과적이다. 본 발명의 일부 구체예에서, 완충액내 잎이 진공환경에 반복적으로 노출된다. 1 내지 3회의 분할 노출이 특히 효과적이라고 생각한다. 그러나, 노출횟수, 노출지속량 및 진공의 세기는 기술자에 의해 조정될 수 있으며, 특정 식물 및 목적 단백질에 적용되는 방법의 가장 유효한 구체예를 계획한다. 추가로, 당업자는 펩티드 및 단백질과 다른 목적 생성물 또는 분자들이 본 발명에 보통 기술된 방법을 사용하여 간질액으로부터 추출될 수 있었다는 것을 알 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 기술된 방법은 지질, 탄수화물, 지단백질, 당, 다당류, 지방산, 핵산 및 폴리뉴클레오티드을 추출하기 위해 사용될 수 있다.

그후, 식물조직은 완충액으로부터 제거된다. 이들은 필요 또는 소망하는 바에 따라, 완충액을 제거하기 위한 건조단계에 들어가거나, 또는 들어가지 않는다. 그후 상기 잎들은 원심분리하기 위해 적당한 기하학적인 어레이로 놓였다. 바람직한 구체예에서, 상기 잎들을 불연속적인 송출 바스켓 원심분리기 로터에 의해 원심분리기로부터 옮겨진다. 불연속적인 송출 바스켓 원심분리기 로터가 사용될때, 초기 스핀은 로터의 벽에 생물량을 이동시키기 위해 수행되며, 그후 완전

한 속도의 스핀이 수행된다. 특히 바람직한 구체예에서, 다량의 잎들을 진공 및 원심분리장치에 동시에 넣을 것이 계획되어 있다. 따라서, Heine(상표명), Ketna(상표명) 또는 Sandborn(상표명)과 같은 대규모 상업용으로 이용가능한 진공펌프 및 바스켓 원심분리기가 본 발명의 방법에 사용될 것이다. 바스켓 원심분리기용 백에 잎들을 모아넣는 것이 특히 바람직하다.

그후, 과량의 완충액을 실제로 제거한후에, 상기 잎들을 원심분리하였다. 바람직한 구체예에서, 저속 원심분리가 적당하다. 저속 원심분리라는 용어는 약 5,000×G 이하를 의미한다. 원심분리 과정에 의해, 간질액이 식물로부터 제거된다. 간질액은 편리한 수집장치, 예를 들어 탱크로 수집되거나, 또는 추가의 정제장치, 예를 들어 크로마토그래피 및 한외 여과된다.

일단, 간질액이 식물잎으로부터 수집되면, 하나 이상의 목적 단백질들이 적당한 정제과정에 따라 농축 및 정제된다. 상기 과정들로는 단백질 침전, 광역층 크로마토그래피, 한외 여과법, 음이온교환 크로마토그래피, 양이온교환 크로마토그래피, 소수성-상호작용 크로마토그래피, HPLC, FPLC 및 친화도 크로마토그래피가 있지만, 이에 대해 제한되지는 않는다. 일부 단백질 정제방법에 대한 일반적인 논의는 Jervis 외 다수의 Journal of Biotechnology 11:161-198(1989)에 개시되어 있으며, 이는 이후에 참고문헌으로 통합된다.

본 발명의 방법은 진공침윤후 포화된 고체로서 처리된 특정 및 모든 식물조직(가령, 잎, 뿌리, 어린 줄기, 줄기, 꽃, 과실, 씨눈, 묘목)에 의해 사용가능하다는 것이 일반적이다. 예를 들어, 상기는 발아 배 및 묘목을 포함할 수 있다. 그러나, 주맥을 갖는 실제로 대칭인 잎을 갖는 식물들은 간질액이 매우 적당한 형태학의 결과로서 상기 잎들로부터 얻기가 보다 쉽기 때문에 본 발명의 방법에 특히 사용할 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 사용된 식물은 담배이며, 그 이유는 담배가 대규모로 재조합 단백질을 생성하는데 특히 유용한 것으로 입증되었기 때문이다. 그러나, 본 발명이 특정 식물종 또는 조직에 국한되는 것을 의미하는 것은 아니다.

하기 정의들은 본 발명을 명확하게 하기 위해 제공된다.

" 진공환경" 이라는 용어는 대기압력이 해수면에서 정상적인 조건하 압력보다 실제로 감소된, 제조기작과 무관하거나 같은 것을 의미하는 제한과 무관한 환경을 의미한다.

" 목적 단백질" 이라는 용어는 세포내에서 자연발생하거나, 또는 재조합 방법에 의해 생성된 완전한 단백질 또는 펩티드 또는 그의 단편을 의미한다. 상기 용어는 글리코실화된 아미노산 서열 뿐만 아니라 글리코실화되지 않은 아미노산 서열도 포함한다. 상기 용어는 또한, 자연발생한 서열 또는 변형 또는 돌연변이된 야생형 서열을 포함하며, 상기 변형은 단백질이 세포내 특정 구획에 들어가게 하는 시그널펩티드 서열을 포함한다. 상기 용어는 또한, 단백질 융합을 포함하여 의미한다.

" 간질액" 이라는 용어는 세포 표면막과 같은 원형질막에 포함되지 않는 식물 전체로부터 얻은 추출액을 의미한다. 상기 용어는 심각한 세포분해없이 상기 처리에 의해 원형질막으로부터 방출된 분자들을 포함하는 세포간(세포간이란, 세포내와 유사하다)에 있지 않는 유액, 물질, 식물공간 모두를 포함하여 의미한다. 상기 용어에 대한 유사어는 외세포질 또는 아포플라즘 또는 세포내액 또는 세포외액이다. 본 발명에서 간질액의 약자는 IF이다.

바람직한 구체예

하기의 실시예가 추가로 본 발명을 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 단지 설명할 뿐이지 한정하지는 않는다.

이 실험들은 잎의 전체 단백질의 상당 부분이 순도를 향상시키면서 간질 프랙션으로부터 간단하게 추출될 수 있다는 것을 보여준다. 이 실험들은 고활성 생성물을 매우 큰 규모로 분리하기 위한 방법이 사용될 수 있다는 것을 또한 보여준다. 당업자들은 각 단백질에 대한 매우 다양한 특성들, 가령 완충액 조성 및 온도 등에 대한 방법을 최적화할 수 있다.

실시예

실시예 1

α-트리코산틴 단백질의 추출

α-트리코산틴(α-TCS)은 28S rRNA에 N-글리코시드 결합을 제거하는 진핵 리보솜-비활성화 효소이다. α-TCS 뿐만 아니라 다른 리보솜-비활성화 단백질 및 결합체는 세포-관련 죽음에 대한 치료제로서 평가된다. 종래 공정에서 독점 RNA 바이러스 벡터에 의해 형질감염된 식물이 전체 가용성 잎 단백질의 2%에 대해 재조합 α-TCS를 매우 똑같이 생성한다는 것을 보여준다(쿠마가이(Kumagai)외 다수, PNAS 90:427-430(1993)).

벡터 TB2(ATCC 기탁 제 75280호)에 의해 형질감염된 식물로부터 얻은 잎을 잎자루에서 제거하고, 주맥을 잘라 두개의 반쪽을 만들었다. 전체 세포 균질액을 얻기 위해, 반쪽잎의 한 그룹은 액체 질소내에서 조직을 동결시킨 후 막자와 막자사발로 4배 부피의 제제 추출 완충액(100mM 인산 칼륨, pH 6.5, 5mM EDTA, 10mM α-메르캅토에탄올 및 0.5%w/v 타우로콜산 나트륨(sodium taurocholate))에서 갈았다. 간질액(IF)을 추출하기 위해, 상기 조직을 함침시키고, 중간 진공(500mmHg)을 펌핑함으로써, 같은 효소 추출 완충액은 반쪽잎의 반대 그룹을 침윤시켰다. 과량의 완충액을 배출시킨 후, 분쇄되지 않은 반쪽잎은 파라필름으로 조심스럽게 말아, 사용하기 쉬운 시험관에 넣고, 간질액을 5-15분동안 저속 원심분리(1,000 × G)에 의해 수집하였다. 침윤된 잎 조직으로부터 추출된 완충액의 중량을 기록하고, 이는 잎의 원래 중량에 대략 1/2에서부터 일치하는 것까지 다양하다. IF 추출액내 α-TCS 발현은 웨스턴(Western) 분석에 의해 확인되고, 수준은 쿠마시(Coomassie) - 착색 겔의 흔적을 밝히는 농도계를 사용하여 정량화였다. 전체 단백질은 Bradford. Bradford, Anal. Biochem 72:248 1976에 개시된 방법으로 측정되었다.

표 1에 개시된 하기 데이타는 전체 효소 활성을 유지하는 이전 공정에서 보여진 재조합 α-TCS는 본 방법을 이용하여 식물 잎의 간질액으로부터 성공적으로 추출되어지는 것을 입증한다. IF 방법이 균질화(H)에 의해 추출액에 대해 6배 농축되어 잎의 전체 α-TCS의 9% 추출율을 얻는다. α-TCS 생성은 바이러스 벡터에 의해 후-접종 시간을 최적화하고, 및 간질 프랙션내 바이러스 코트 단백질의 오염을 최소화함으로 향상된다.

[표 1]

시료	생체중(gr)	전체 용적(㎖)	단백질 농도(mg/㎖)	전체단백질(mg)	단배질수율(mg/gr)	R단백질 농도(mg/㎖)	전체 R단백질(mg)	IR단백질 수율(mg/gr)	IF에서 R단백질 추출율%	X-배 정화
TB2/IF	8.00	7.8	0.13	1.03	0.13	ND	ND	ND	ND	ND
TB2/TCS/IF	8.00	8.3	0.14	1.20	0.15	0.017	0.143	0.018	9	6
*TB2/TCS/H	ND	ND	ND	80.00	ND	ND	1.600	ND	ND	ND
*PNAS 90:427-430(1993)으로부터 측정됨										

IF ="간질액" 추출

H ="균질화" 추출

ND ="측정되지" 않음

실시예 2

아밀라제 단백질의 추출

아밀라제(AMY)는 전분을 분해하는데 사용되는 중요한 산업용 효소이다. 벡터 TT01A 103L에 형질감염된 식물의 잎을 잎자루에서 제거하고, 주맥을 잘라 두개의 반쪽을 제조하였다. TT01A 103L의 플라스미드 지도는 도 4에서 보여진다. 플라스미드 TT01A 103L의 바이러스 cDNA 서열은 도 5의 SEQ ID NO:1에서 나타나있다. 전체 세포 균질액을 얻기 위해, 반쪽잎의 한 그룹을 액체 질소에서 조직을 동결시킨 후 막자와 막자사발에 의해 4배 부피의 제제 추출 완충액(100mM 인산칼륨 pH 6.5, 5mM EDTA, 10mM α-메르캅토에탄올 및 0.5% w/v 타우로콜산 나트륨)에서 갈았다. 간질액(IF)을 추출하기 위해, 상기 조직을 함침시키고, 중간 진공(500mm Hg)을 펌핑함으로써, 같은 효소 추출 완충액은 반쪽잎의 반대 그룹을 침윤시켰다. 과량의 완충액을 배출시킨 후, 분쇄되지 않은 반쪽잎은 파라필름으로 조심스럽게 말아, 사용하기 쉬운 시험관에 넣고, 간질액(IF)을 저속 원심분리(1,000 × G, 15분 동안)에 의해 수집하였다. 침윤된 잎 조직으로부터 추출된 완충액의 중량을 기록하고, 이는 잎의 원래 중량에 대략 1/2에서부터 일치하는 것까지 다양하다. IF 추출액내 AMY 발현은 상업적으로 유용한 효소 분석 시약과 프로토콜을 사용하여 정량화하였다. 전체 단백질은 Bradford, Anal. Biochem 72:248 1976에 개시된 방법으로 측정된다. AMY 효소 분석은 시그마 방법(Sigma Procedure) 제 577호에 개시되어 있다.

표 2에 개시된 하기 데이타는 활성 재조합 AMY가 본 방법을 사용하여 식물 잎의 간질액으로부터 성공적으로 추출된다는 것을 입증한다. IF 방법은 균질화(H)에 의해 추출액에 대해 27배 농축되어 잎의 전체 AMY 활성의 34% 추출율을 얻는다. AMY 생성은 바이러스 벡터에 의해 후-접종 시간을 최적화 및 간질 프랙션으로부터 바이러스 코트 단백질의 오염을 최소화함으로써 향상된다.

실시예 3

글루코세레브로시다아제 단백질의 추출

인간의 태반 조직 또는 중국산 햄스터 난소 세포(CHO)로부터 얻은 재조합 종으로부터 유도된 글루코세레브로시다아제(GCB)는 현재 고셔(Gaucher) 병으로 알려진 유전적 대사저장 장해의 효과적이지만 비싼 치료법에 사용된다. 본 발명자들은 플라스미드 pBSG638을 제조하기 위해 꽃양배추 모자이크 바이러스(35S)로부터 얻은 이중 프로모터, 토바코 에칭(Tobacco Etch) 바이러스로부터 얻은 해독가능한 증폭제 및 네이티브 인간의 GCB cDNA를 갖는 아그로박테리움 튜파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 노팔린(nopaline) 합성효소 유전자로부터 얻은 폴리아데닐화 영역을 조합하였다. 상기 발현 요소들은 식물에서 핵-인코딩된 유전자의 가장 높게 가능한 구성 발현을 제공하는데 널리 사용된다.

표준 아그로박테리움-매개된 형질전환 방법을 사용하여, 네개의 다른 담배 재배 변종(TO 생성)의 잎반(leaf disc)으로부터 93개의 비의존성 카나마이신-내성 형질전환체를 재생했다. 전체 단백질 추출액의 웨스턴 블롯에서 교차-반응 항원은 인간의 글루코세레브로시다아제에 대해 생성되는 항체를 갖은 상기 TO 개체중 46에서 감응되었다. 식물-발현 재조합 효소의 특이성은 14C-방사성 동위 원소로 표시된 글루코실세라미드의 가수분해에 의해 확인되었다. 상기 발현 결과에 따라 rGCB 양성의 형질전환체는 보통(A), 낮은(B) 및 무시할 수 있는 양(C)의 활성 그룹으로 분류되었다.

본 발명자들은 또한, 자살 기질 콘듀리톨(conduritol) B-에폭시드(CBE)를 사용하여 식물 글루코시다아제의 존재하에서 rGCB 효소 활성을 우선적으로 억제하는 반응 조건을 알았다. 전체 글루코시다아제 활성 및 rGCB 활성은 CBE를 가진 것과 가지지 않은 형광 기질 4-메틸룸벨리페릴 글루코피라노시드(4-MUG)의 가수분해에 의해 측정하였다. 유전

자 도입 식물의 잎을 입자루에서 제거하고, 사용되는 장치에 맞는 크기의 잎 재료를 만들기 위해 주맥을 잘라 두개의 같은 반쪽으로 나눴다. 전체 세포 균질액을 얻기 위해 반쪽잎의 한 그룹을 액체 질소에서 조직을 동결시킨 후 막자와 막자 사발에 의해 4배 부피의 제제 추출액 완충액(100mM 인산 칼륨 pH 6.5 5mM EDTA, 10mM α-메르캅토에탄올 및 0.5% w/v 타우로콜산 나트륨)의 존재하에서 갈았다. 당업자중 한명은 EDTA가 EGTA 및 시트레이트와 같은 기타 킬레이트제에 의해 치환된 완충액을 쉽게 고려할 것이다. 당업자 중 한명은 아스코르브산염, 소듐 메타비설파이트 및 디티오트레이톨을 포함하는 다른 산화방지제에 의해 α-메르캅토 에탄올이 치환된 완충액을 쉽게 고려한다.

[표 2]

시료	생체중(gr)	전체 용적(㎖)	단백질 농도(mg/㎖)	전체 단백질(mg)	단백질 수율(mg/gr)	R단백질 농도(U㎖)	전체 R단백질(U)	2특정 수율(U/gr)	3R단백질 수율(U/gr)	IF에서 R단백질 추출율(%)	X배 정화
아밀라아제/IF	1.76	1.8	0.22	0.39	0.22	0.319	0.57	0.33	1.463	34	27
아밀라아제/H	1.76	5.8	5.40	31.33	17.80	0.290	1.68	0.96	0.054	ND	1

IF ="간질액" 추출

H ="균질화" 추출

ND ="측정되지" 않음

당업자중 한명은 완충액이 타우로콜산 나트륨을 SDS, 트리톤, Tween(상표명), 인지질, 담즙산염, 소듐 데옥시콜레이트 및 소듐 라우릴설페이트를 포함하는 다른 제제로 대체한다는 것을 쉽게 고려할 것이다. 간질액(IF)을 추출하기 위해, 조직을 함침시키고 중간 진공(500 mm Hg)을 펌핑함으로써 같은 효소 추출 완충액을 반쪽잎의 반대 그룹에 침윤시켰다. 과량의 완충액을 배출시킨 후, 분쇄되지 않은 반쪽잎은 파라필름에 조심스럽게 말아, 사용하기 쉬운 시험관에 넣고, 간질액을 15분동안 저속 원심분리(1,000 × G)에 의해 수집하였다. 침윤된 잎 조직으로부터 추출된 완충액의 중량을 기록하고, 이는 잎의 원래 중량에 대략 1/2에서부터 일치하는 것까지 다양하다. 자살 기질, 콘듀리톨 β-에폭시드(CBE)를 사용하여, 식물 글루코시다아제의 존재하에서 재조합 글루코세레브로시다아제(rGCB) 활성의 억제를 이루었다. 효소 활성은 CBE에 의해 또는 없이 5 mM 메틸룸벨리페릴 β-D 글루코시드, 0.1 M 인산 칼륨, 0.15% 트리톤-X100, 0.125% 타우로콜산 나트륨, 0.1% 소혈청 알부민, pH 5.9를 함유하는 반응 혼합물에서 37℃에서 측정하였다. 전체 글루코시다아제 활성 및 rGCB 활성은 형광 기질 4-메틸룸벨리페릴 글루코피라노시드의 가수분해에 의해 측정되었다. 활성의 한 유닛은 시간당 1nmol의 기질의 가수분해를 촉매하는데 필요한 효소의 양으로 정의된다. 전체 단백질은 Bradford의 (Bradford, M., Anal. Biochem. 72:248;1976) 방법에 기초한 Bio-Rad 단백질 분석(상표명)을 사용하여 측정하였다.

도 3에 개시된 하기 데이타는 활성 재조합 GCB가 본 방법을 사용하여 식물 잎의 간질액으로부터 성공적으로 추출된다는 것을 입증한다. IF 방법은 균질화에 의해 얻는 추출액에 대해 18배 농축한 잎의 전체 GCB 활성의 22%의 추출율을 얻는다.

실시예 4

조류의 인터페론 타입 II(감마) 추출

조류(닭)의 인터페론 타입 II(감마)를 발현하고, 활성 효소는 니코티아나 벤타미아나(Nicotiana benthamiana) 및 니코티아나 타마쿰(Nicotiana tabacum)의 간극으로부터 추출하였다. 인터페론은 식물 조직의 그램(벤치-규모 추출) 또는 킬로그램(중간시험-규모 추출) 정량을 이용하여 들판 또는 온실에서 키운 식물로부터 효과적으로 추출될 수 있다.

활발하게 자란 N. 벤타미아나 또는 N. 타바쿰을 닭의 인터페론 감마 유전자를 포함하는 Donson외 다수의 상기 문헌에 기술된 바와 같이 재조합 식물 구조물의 감염성 전사물 또는 비리온에 의해 접종하였다. 조류의 인터페론은 접종 후 10 일 내지 3 주후에 조직 감염된 잎으로부터 추출하였다.

실시예 4a

벤치-규모 추출을 위해, 조직 감염된 잎(3-80g)은 엽저에서 식물로부터 분리시켜 중량재고 적당한 크기의 비이커에 넣었다. 잎 재료를 완충액(5 mM $MgCl_2$ 및 2 mM EDTA를 포함한 100 mM 트리스-HCl pH 7.5 완충액)에 의해 완전히 담궜다. 잠긴 잎은 날진(Nalgene) 진공 병으로 덮고 진공을 (720 mm Hg) 펌프하고 2분 동안 유지시킨 후 신속하게 해제하였다. 그후, 상기 진공 침윤은 전체 2주기 반복하였다. 진공 침윤 후에, 잎을 비이커에서 제거하고, 표면 완충액을 흡수지 사이에서 흡수함으로써 잎 표면으로부터 제거하였다. 잎 재료로부터 IF를 분리하고 추출하게 하는 지지된 메시(mesh)를 포함하는 250 ㎖ 병에 잎을 넣었다. 간질액(IF)은 원심분리(3,000 × G, 15분)에 의해 진공 침윤된 잎으로부터 추출하였다.

실시예 4b

중간시험-규모 추출을 위해, 들판에서 재배된 식물로부터 조직 감염된 잎을 손으로 길게 자르고 중량을 쟀다. 잎 5kg을 폴리에스테르 메시 백(Filtra-Spec(상표명), 12-2-1053)에 넣고, 잎 5kg 2개를 금속 바스켓에 넣었다. 잎 재료를 포함하는 금속 바스켓을 50 리터 이하의 완충액(5mM $MgCl_2$ 및 2mM EDTA를 포함한 100mM 트리스-HCl pH 7.5 완충액)을 포함하는 200L Mueller(상표명) 진공 탱크에 넣었다.

[표 3]

시료	생체중(g)	전체 용적(㎖)	단백질 농도(mg/㎖)	전체 단백질(mg)	단백질 수율(mg/㎖)	R단백질 농도(U㎖)	전체 R단백질(U)	특정 수율(U/g)	R단백질 수율(U/g)	IF에서 R단백질 추출율(%)	X배 정화
GCB/IF	2.48	1.9	0.24	0.45	0.18	720	1368	552	3007	22	18
GCB/H	2/08	8.1	3.89	31.48	15.13	653	5289	2543	168	ND	1

IF ="간질액" 추출

H ="균질화" 추출

ND ="측정되지" 않음

70lb. 스테인레스 스틸 플레이트를 잎/백 위에 놓아 완전히 함침시킨다. 진공은 27 인치 Hg까지 펌핑하고, 1분동안 유지한 후 신속하게 해제하였다. 그후 상기 진공 침윤을 전체 2주기 반복하였다. 진공 침윤후에, 잎과 바스켓을 진공 탱크로부터 제거하였다. 진공 침윤된 잎을 포함한 백은 원심분리하기 전에 10분동안 표면 완충액을 중력 배출시켰다. 간질액(IF)은 Heine(상표명) 바스켓 원심분리기(볼 치수 직경 28.0 인치 × 16.5 인치)를 사용하여 원심분리(1,800 × G, 30분)에 의해 진공 침윤된 잎으로부터 추출되었다. 수집된 IF는 25 ㎛, Rosedale(상표명) 소크(sock) 필터 및 5 ㎛, Campbell Waterfilter(상표명) 카트리지 필터를 통해 여과하고 분석전에 4℃에서 저장하였다.

IF 추출액내 인터페론 단백질 양은 조류 타입 II 인터페론 및 알려진 표준량에서 E. coli 제조 타입 II 인터페론에 대한 특정 항혈청을 사용하는 정량 면역흡수 방법에 의해 측정하였다. 정량 면역흡수 및 부분 정화를 기초로 하여, 본 발명자들은 네이티브 소스로부터 분리된 인터페론과 거의 같은 정확히 또는 거의 10^7 U/mg에서 N. 벤타미아나 IF내 인테페론의 특정 활성을 추정한다. 생물학적 활성은 Lowenthal, J.W., Digby,M.R. 및 York, J.J.의 Production of Interferon-y by Chicken T Cells, J.Interferon and Cytokine Res.(1995) 15:933-938에서 기술된 바와 같이 아산화 질소(NO) 방출 분석에 의해 측정하였다. 활성의 특이성은 IF 유액을 중화 항체와 함께 사전 배양하고, 아산화 질소 방출 분석에서 활성을 측정함으로써 측정하였다.

[표 4]

온실:

식물종류	Av. 조직 Amt.	인터페론 단백질 수율[1]	수율 활성[2]
N. 벤타미아나	3-60g	1mg/100g fresh wt	30,000 U/㎖ IF
N. 타바쿰 cv. MD609	20g	0.1mg/100g fresh wt	3,000 U/㎖ IF
니타바쿰 TI231	20g	0.1mg/100g fresh wt	3,000 U/㎖ IF

[표 5]

들판:

온실 식물 종류	Av. 조직 Amt.	인터페론 단백질 수율[1]	수율 활성[2]
N. 타바쿰 cv TI264	80g	0.05mg/100g fresh wt	ND*
N. 타바쿰 cv TI264	10kg	0.01mg/100g fresh wt	200 U/㎖ IF**

[1] 인터페론 단백질 수율은 정량 면역흡수에 의해 추정된다.

[2] 인터페론 활성은 상기 Lowenthal외 다수에 의해 기술된 바와 같이 아산화 질소 방출 분석에 의해 측정된다.

* 측정되지 않음

** 활성 추정은 아산화 질소 방출 분석에서 특이성의 결여(특정 항체에 의해 중화되지 않는 활성)를 포함한다.

실시예 5

마우스 scFv 단백질의 추출

38C13 마우스 림프종으로부터 얻은 scFv 단백질을 포함하는 Donson외 다수의 상기 문헌에 기술된 바와 같은 재조합 식물 구조물의 감염성 전사물을 활발하게 성장한 N. 벤타미아나에 접종하였다. 마우스 38C13 scFv 단백질은 접종후 11-14 일후에, 조직 감염된 잎으로부터 추출하였다.

조직 감염된 잎(3-80그램)을 엽저에서 식물로부터 분리하고, 중량을 재고, 적당한 크기의 비이커에 넣었다. 잎 재료를 완충액(10mM $MgCl_2$ 및 2mM EDTA를 포함한 100mM 트리스-HCl pH 7.5의 완충액)으로 덮었다. 함침된 잎을 날진 진공 병으로 덮고 진공을 700mmHg로 하고, 2분간 유지한 후 신속하게 해제하였다. 상기 진공 침윤을 전체 2주기를 반복하였다. 진공 침윤후에, 잎을 비이커에서 제거하고, 흡수지 사이에서 흡수함으로써 표면 완충액을 잎의 표면에서 제거하였다. 원심분리(3,000 × G, 15분)에 의해 진공 침윤된 잎으로부터 간질액(IF)을 제거하였다. 잎 재료로부터 IF의 분리 및 추출시키는 지지된 메시를 포함한 250 ㎖ 병에서 잎을 원심분리하였다. scFv 단백질을 포함하는 IF 유액은 0.2㎛ 막을 통해 여과시키고 -80℃에서 저장하였다.

식물 IF 유액으로부터 얻은 38C13 scFv 단백질의 제조 및 정화는 네이티브 38C13 IgM 단백질을 인식하는 S1C5, 모노클론 항-이디오타입 항체를 사용하는 웨스턴 분석에 의해 측정하였다. S1C5 항체는 scFv 이량체를 자발적으로 조합하기에 알맞은 크기의 38C13 scFv 및 60 KD 단백질을 예상되는 크기의 30 KD 단백질과 교차 반응한다. 통제 감염된 식물로부터 제조한 IF 추출액내 식물 단백질에 대해서는 교차 반응성이 관찰되지 않았다.

IF 추출액으로부터 추출된 식물-생성된 38C13 scFv 단백질의 양은 S1C5 ELISA에 의해 측정하였다. 잎 IF 추출액은 38C13 scFv 단백질 20-60㎍/IF 액체(㎖) 또는 38C13 scFv 단백질 11-30g/생체중(g)을 포함하는 것으로 측정되었다. ELISA 조건이 용액에서 항-이디오타입을 더 잘 인식하기 때문에 식물 IF 유액으로부터 분리된 38C13 scFv의 주된 프랙션이 가용성이고 적당히 겹쳐지는 것으로 결론지었다.

실시예 6

유전자도입 담배로부터 분비 면역글로불린의 추출

N. 타바쿰(tabacum)을 발현하는 유전자도입 SIgA-G(Science, 268:716,1995)로부터 얻은 잎(15g)을 엽저에서 식물로부터 분리하고, 중량을 재고, 적당한 크기의 비이커에 넣었다. 10mM $MgCl_2$, 2mM EDTA 및 14.3mM 2-메르캅토에탄올, 또는 100mM 인산 칼륨, pH 6.0, 5mM EDTA, 10.0mM 2-메르캅토에탄올 및 0.5% 타우로콜산을 포함하는 100mM 트리스-HCl pH 7.5의 완충액에 잎 재료를 완전히 담궜다. 함침된 잎을 날진(상표명) 진공 병에 덮고 진공은 750mmHg로 하고, 1분간 유지한후 신속하게 해제하였다. 진공 침윤후에, 잎을 비이커에서 제거하고, 흡수지 사이에 흡수함으로써 잎의 표면에서 표면 완충액을 제거하였다. 간질액(IF)은 원심분리 (1500 × G, 15분)에 의해 진공 침윤된 잎으로부터 추출하였다. 잎은 잎 재료로부터 IF를 분리 및 추출하기 위해 지지 메시를 포함하는 250㎖ 병에서 원심분리하였다.

IF 추출액의 단백질 면역블롯은 환원 조건하에서 제조하였다. Ig는 서양고추냉이 퍼옥시다아제에 결합된 염소 안티-마우스 IgA를 사용하는 면역 블롯에서 검출되었다. 식물에 존재하는 IgA중 대략 10%가 IF 추출액에서 검출되었다. 상기에 기술된 다른 완충액을 사용하여 제조된 IF 프랙션내 Ig의 양에는 별 차이를 볼 수 없었다. 대조군 식물로부터 제조된 IF 추출액내에서는 식물 단백질에 대한 교차 반응성이 관찰되지 않았다.

실시예 7

담배의 세포내액으로부터 글루코세레브로시다아제의 중간시험 규모 정화

리소좀 효소 글루코세레브로시다아제를 발현하는 유전자도입 담배의 MD609 잎 조직(1-2kg)을 수확하고, 주맥을 제거하고, 조직의 중량을 쟀다. 조직은 한번에 수 kg의 잎조직을 수용하는 침윤 용기를 사용하여 완충액(0.1M KPO_4 완충액, pH 6.0, 5mM EDTA, 0.5% 타우로콜산, 10mM 2-메르캅토에탄올)의 2-4배 용적에 의해 함침시켰다. 조직의 중량을 줄이기 위해 조직의 위에 구멍 뚫린 금속 플레이트를 놓고 진공은 1-2분간 3회 620-695mmHg로 하였다. 진공은 다음 사용 사이에 해제하였다. 조직을 회전시키고, 진공을 다시 가해 완벽한 침윤을 이뤘다. 간질액을 분리하지 않으면서 진공을 여러번 가하는데는 단일 침윤 과정이 포함된다. 완벽한 침윤은 잎 조직의 밑바닥의 색이 어두워지는 것으로 알 수 있다. 조직상 과량의 완충액을 배출시켰다. 바스켓 로터(10 인치 × 4.25 인치, InterTest Equipment Services, San Jose, CA/Biosource Design 25-0611000)에서 4200RPM(2500×G)으로 10분간 조직을 원심분리함으로 조직으로부터 간질액을 방출하였다. 간질액은 흡인법(IF-1)에 의해 수집하였다. 선택적으로, 잎 조직은 상기 사용된 것과 같은 완충액 및 반복된 방법(IF-2)으로 침윤 용기에 잎을 다시 넣음으로써 재침윤할 수 있다. 두번째 침윤은 진공 침윤 및 진공 해제의 여러 순환이 요구되지 않는다. 또한 완충액을 침윤 용기(소모성 완충액)로부터 배출시키고 1차 및 2차 IF 프랙션에 의해 풀(pool)되었다. 그 결과, IF-1, IF-2 및 소모된 완충액이 IF 풀을 구성한다. 침윤된 잎 조직으로부터 수집된 간질액의 용적은 실시된 침윤횟수에 따라 잎 조직 50-100 중량%이었다.

재조합 GCB는 페닐 스트림라인(Phenyl Streamline, 상표명) 수지를 포함하는 파마시아 스트림라인(Pharmacia Streamline) 25(상표명) 컬럼에 직접적으로 희석 IF(공급물 스트림)를 송출함으로써 정제하였다. 확장층 크로마토그래피는 원심분리 및/또는 미세여과 단계의 필요없이 한번의 단계에서 목적 단백질을 포획하고, 구체화하고, 농축할 수 있게 한다. 컬럼을 평형화하고, 기록기의 UV-시그널이 25mM 시트레이트, 20% 에틸렌 글리콜, pH 5.0의 기준선으로 복귀할 때까지 세척하고; 결합된 효소는 25mM 시트레이트, 70% 에틸렌 글리콜에 의해 용출하였다. 용출된 물질은 25mM 시트레이트, 75 mM NaCl, pH 5.0에서 평형화된 양이온 교환 수지, SP Big Beads(상표명)(파마시아)상에서 추가로 정제되었다. GCB는 25mM 시트레이트, 0.5M NaCl, 10% 에틸렌 글리콜, pH 5.0의 단계 구배 또는 25mM 시트레이트와, pH 5.0에서 75mM-0.4M NaCl의 선형 구배로 추출된다. 모든 크로마토그래피 과정은 실온에서 실시되었

다.

자살 기질, 콘듀리톨 β-에폭시드(CBE)를 사용하여, 식물 글루코시다아제의 존재하에 재조합 글루코세레브로시다아제(rGCB) 활성 억제가 이루어진다. 효소 활성은 CBE와 함께 또는 없이 5mM 메틸룸벨리페릴 β-D 글루코시드, 0.1 M 인산 칼륨, 0.15% 트리톤-X100, 0.125% 타우로콜산 나트륨, 0.1% 소혈청 알부민, pH 5.9를 포함한 반응 혼합물에 37℃에서 측정되었다. 전체 글루코시다아제 활성과 rGCB 활성은 형광 기질 4-메틸룸벨리페릴 글루코피라노시드의 가수분해에 의해 측정하였다. 활성의 한 유닛은 시간당 1nmol의 기질의 가수분해를 촉매 작용하는데 필요한 효소의 양을 의미한다. 전체 단백질은 브라드포드(Bradford, M. Anal. Biochem. 72:248;1976) 방법에 기초한 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정하였다.

IF-1만 수집된 잎 1kg으로부터 전형적으로 20,000의 특정 활성에서 GCB의 4백만 유닛을 얻었다. IF 풀이 수집될 때(IF-1, IF-2 및 소모된 완충액) 유닛/kg은 10,000의 낮은 특정 활성의 6백만으로 증가한다.

하기 표 6은 여러 실험예를 나타내는 데이타를 포함한다.

실시예 8

글루코세레브로시다아제로 발현하는 담배로부터 세포내액의 한외 여과/농축

리소좀 효소 글루코세레브로시다아제를 발현하는 유전자도입 담배로부터 MD609 잎 조직의 2.3킬로그램을 얻고, 주맥을 제거하여 조직의 중량을 쟀다. 조직은 한번에 수 킬로그램의 잎조직을 수용하는 침윤 용기내 완충액(0.1M KPO_4 완충액, pH 6.0, 5mM EDTA, 0.5% 타우로콜산, 10mM 2-메르캅토에탄올)의 2-4배 용적에 함침된다. 조직의 중량을 줄이기 위해 구멍 뚫린 금속 플레이트를 조직 위에 놓았다. 진공은 1-2분 3회 동안 620-695mmHg로 하였다. 진공은 다음 사용 사이에 해제되었다. 조직을 회전시키고, 진공을 다시 가해 완벽한 침윤을 얻었다. 조직상 과량의 완충액을 배출시켰다. 4200RPM(2500 × G)으로 10분동안 바스켓 로터(10인치 × 4.25 인치, Intertest Equipment Services, San Jose, CA/Biosource Design 25-0611000)에서 조직을 원심분리함으로 조직으로부터 간질액을 방출시켰다. 간질액은 흡인법(IF-1)에 의해 수집되었다. 잎 조직은 상기 사용된 것과 같은 완충액 및 반복된 과정(IF-2)에서 침윤 용기에 잎을 다시 넣음으로써 재침윤시켰다. 완충액은 침윤 용기(소모성 완충액)로부터 배출시키고, 1차 및 2차 IF 프랙션에 의해 풀되었다. 그 결과, IF-1, IF-2 및 소모성 완충액이 IF 풀을 구성한다. IF 풀을 미라클로드(Miracloth)를 통해 여과시키고 LP-1 펌프가 구비된 Amicon RA 2000(상표명) 농축기를 사용하여 1 sq. ft. 나선형 막(30K 분자량 차단)을 통해 IF 풀을 통과하여 6배로 농축시켰다.

[표 6]

GCB-실험실 규모 IF 방법

시료/프랙션#	생체중 (g)	전체 용적 (ml)	단백질 농도 (mg/ml)	전체 단백질 (mg)	GCB (mg)	단백질 수율 (mg/g)	GCB 농도 (U/ml)	전체 GCB (유닛)	유닛/kg 조직	Sp 활성도 nmol/hr (U)/mg	%GCB 전체 단백질의 % = GCB	단계 회수율 (%)	단계 정제율 (배)	전체 회수율 (%)	전체 정제율 (배)
IF1	**1045**	**930**	**0.236**	**219**	**2.91**	**0.21**	**4,692**	**4,363,544**	**4,175,640**	**19,881**	**1.33**	**100**	**1**	**100**	**1**
페닐 스트림라인 4/30/97	**1045**	**400**	**0.065**	**26**	**2.47**	**0.025**	**9,276**	**3,710,467**	**3,550,686**	**142,710**	**9.51**	**85**	**7.2**	**85**	**7.2**
IF1,2 & 소모성 완충액	**1027**	**4020**	**0.29**	**1166**	**4.32**	**1.135**	**1,611**	**6,478,201**	**6,307,888**	**10,047**	**0.67**	**100**	**1**	**100**	**1**
IF1,2 & SD 페닐 SL 컬럼부하	**1027**	**2330**	**0.29**	**676**	**2.5**	**0.658**	**1,611**	**3,752,778**	**3,656,064**	**10,047**	**0.67**	**100**	**1**	**100**	**1**
페닐 스트림라인 용출된 물질	**1027**	**400**	**0.078**	**31**	**2.36**	**0.03**	**8,858**	**3,543,390**	**3,450,234**	**113,570**	**7.57**	**94.4**	**11.3**	**94.4**	**11.3**
SP빅 비드 용출액 용출된 물질	**1027**	**70**	**0.078**	**5**	**1.72**	**0.005**	**36,952**	**2,586,674**	**2,518,670**	**473,750**	**31.58**	**73**	**4.2**	**68.9**	**47.2**

IF = 간질액

자살 기질, 콘듀리톨 β - 에폭시드(CBE)를 사용하여, 식물 글루코시다아제의 존재하에 재조합 글루코세레브로시다아

제(rGCB) 활성의 억제가 이루어졌다. 효소 활성은 CBE에 의해 또는 없이 5mM 메틸룸벨리페릴 β-D 글루코시드, 0.1M 인산 칼륨, 0.15% 트리톤-X100, 0.125% 타우로콜산 나트륨, 0.1% 소 혈청 알부민, pH 5.9를 함유하는 반응 혼합물에서 37℃에서 측정하였다. 전체 글루코시다아제 활성 및 rGCB 활성이 형광 기질 4-메틸룸벨리페릴 글루코피라노시드의 가수분해에 의해 측정되었다. 활성의 한 유닛은 시간당 1nmol의 기질의 가수분해를 촉매 작용하는데 필요로 하는 효소의 양으로 정의된다. 전체 단백질은 브라드포드(Bradford, M. Anal. Biochem. 72:248;1976)의 방법에 기초한 Bio-Rad 단백질 분석(상표명)를 사용하여 측정하였다. 하기 표 7을 참조한다.

실시예 9

들판에서 재배한 담배의 세포내액으로부터 얻은 글루코세레브로시다아제의 중간실험규모 정화

리소좀 효소 글루코세레브로시다아제를 발현하는 유전자도입 담배로부터 얻은 MD609 잎 조직 100kg을 2주간 매일 들판으로부터 수확하였다. 조직을 줄기로부터 손으로 떼어내 중량을 쟀다. 잎 5kg을 폴리에스테르 백(Filtra-Spec(상표명), 12-2-1053)에 넣고 4개의 5kg 백을 금속 바스켓에 넣었다. 잎 재료를 포함한 금속 바스켓을 100 리터의 완충액(0.1 KPO_4 완충액, pH 6.0, 5mM EDTA, 0.5% 타우로콜산, 10mM 2-메르캅토에탄올)을 포함하는 200 리터 뮬러(Mueller) 진공 탱크에 넣었다. 완전히 함침시키기 위해 70lb. 스테인레스 스틸 플레이트를 잎/백 위에 놓았다. 진공은 695mmHg까지 펌핑하고 1분동안 유지한 후 신속하게 해제하였다. 상기 진공 침윤은 전체 2주기 반복하였다. 간질액의 분리없이 진공을 여러회 사용하는데는 단일 침윤 과정이 포함된다. 완벽한 침윤의 표시는 잎 조직의 밑바닥 색이 어두워지는 것이다. 진공 침윤후에, 잎과 바스켓은 진공 탱크에서 제거하였다. 진공 침윤된 잎을 포함한 백을 원심분리 전에 10분 동안 표면 완충액을 중력 배출하였다. 간질액(IF)은 Heine(상표명) 바스켓 원심분리기(볼 치수 직경 28.0 인치 × 16.5 인치)를 사용하여 원심분리(1,800 × G, 30분)에 의해 진공 침윤된 잎으로부터 추출하였다.

[표 7]

GCB UF 실험

시료/프랙션#	생체중 (g)	전체 용적 (ml)	단백질 농도 (mg/ml)	전체 단백질 (mg)	GCB (mg)	단백질 수율 (mg/g)	GCB 농도 (U/ml)	전체 GCB (유닛)	유닛/kg 조직	Sp 활성도 nmol/hr ((U)/mg)	%GCB 전체 단백질의 %= GCB	단계 회수율 (%)	단계 정제율 (배)	전체 회수율 (%)	전체 정제율 (배)
IF	1,102	5,874	0.223	1310	6.5	1.189	1,659	9,745,470	8,843,439	7,440	0.5	100	1	100	1
30K 농축물	1,102	875	0.593	519	6.39	0.471	10,947	9,578,575	8,691,992	18,460	1.23	98.3	2.5	98.3	2.5

IF = 간질액

수집된 IF는 50μ 카트리지 필터를 통해 여과하고 조직의 전체 100kg이 침윤될 때까지 4℃에서 저장하였다. 상기 방법

은 모든 조직이 침윤될 때까지 5kg 백(5 × 20kg 전체 주기) 네개의 다음 세트로 반복하였다. 조직을 완전히 함침시키기 위해 각 침윤주기 동안 완충액을 추가로 첨가하였다. 선택적으로, 잎 조직은 상기 사용된 것과 같은 완충액 및 반복되는 방법(IF-2)에서 침윤 용기에 잎을 다시 넣음으로써 재침윤할 수 있다. 또한, 완충액은 침윤 용기(소모성 완충액)로부터 배출되고, 1차 및 2차 IF 프랙션에 의해 풀되었다.

그 결과, IF-1, IF-2 및 소모된 완충액이 IF 풀을 구성한다. 침윤된 잎 조직으로부터 수집된 간질액의 부피는 실시된 침윤횟수에 따라 잎 조직의 42-170중량%였다.

재조합 GCB는 페닐 스트림라인(상표명) 수지를 포함하는 파마시아 스트림라인 200(상표명) 컬럼에 직접 희석 IF(원료 스트림)를 송출함으로써 정제되었다. 확장층 크로마토그래피는 원심분리 및/또는 미세여과 과정의 필요없이 한번의 과정에서 본 발명의 단백질을 포획하고, 구체화하고 수집할 수 있게 한다. 컬럼을 평형화하고, 기록기의 UV-시그널이 25mM 시트레이트, 20% 에틸렌 글리콜, pH 5.0의 기준선에 복귀할 때까지 세척하고; 결합된 효소는 25mM 시트레이트, 70% 에틸렌 글리콜에 의해 용출된다. 용출된 물질은 1 sq. ft. 0.8um 사토클린 지에프(Sartoclean GF, 상표명) 캡슐 후에 1 sq. ft. 0.2um 사토브란 피(Sartobran P, 상표명) 무균 필터를 통해 용출된 물질을 통과시킴으로 무균 여과하고 다음 크로마토그래피 과정때까지 4℃에서 저장하였다. 4-5일간 페닐 스트림라인(상표명) 크로마토그래피 실시로부터 용출된 물질이 함께 풀이 되고 25mM 시트레이트, 75mM NaCl, pH 5.0에 평형화된 양이온 교환 수지, SP Big Beads(상표명)(파마시아)상에서 추가로 정제되었다. GCB는 25mM 시트레이트, 0.4M NaCl, 10% 에틸렌 글리콜, pH 5.0의 과정 구배에 의해 용출되었다. 모든 크로마토그래피 과정이 실온에서 실시되었다. 용출된 물질은 1 sq. ft. 0.8um Sartoclean GF(상표명) 캡슐 후에, 1 sq. ft. 0.2um Sartobran P(상표명) 무균 필터(Sartorius, Corp.)를 통해 용출된 물질을 통과시킴으로 무균 여과되고 4℃에서 저장하였다.

자살 기질, 콘듀리톨 β-에폭시드(CBE)를 사용하여, 식물 글루코시다아제의 존재하에 재조합 글루코세레브로시다아제(rGCB) 활성의 억제가 이루어졌다. 효소 활성은 CBE에 의해 또는 없이 5mM 메틸룸벨리페릴 β-D 글루코시드, 0.1M 인산 칼륨, 0.15% 트리톤-X100, 0.125% 타우로콜산 나트륨, 0.1% 소 혈청 알부민, pH 5.9를 함유하는 반응 혼합물에서 37℃에서 측정하였다. 전체 글루코시다아제 활성 및 rGCB 활성은 형광 기질 4-메틸룸벨리페릴 글루코피라노시드의 가수분해에 의해 측정되었다. 전체 단백질은 브라드포드(Bradford, M. Anal. Biochem.72:248;1976)의 방법에 기초한 Bio-Rad 단백질 분석(상표명)를 사용하여 측정하였다.

IF-1만 수집된 GCB를 발현하는 전형적으로 들판에서 재배한 담배 1kg으로부터 2,745 유닛의 특정 활성에서 GCB의 435,000 유닛을 얻었다. IF 풀이 수집될(IF-1, IF-2 및 소모성 완충액)때 유닛/kg은 3,400의 특정 활성의 755,000까지 증가하였다.

하기 표 8은 1주간 실험을 나타내는 데이타를 포함한다.

[표 8]

GCB 현장시험규모 -P.SL

시료/프랙션#	생체중 (g)	전체 용적 (ml)	단백질 농도 (mg/ml)	전체 단백질 (Mg)	GCB (mg)	단백질 수율 (mg/g)	GCB 농도 U/ml	전체 GCB (유닛)	유닛/kg 조직	Sp 활성도 nmol/hr ((U)/mg)	%GCB 전체 단백질의 % = GCB	단계 회수율 (%)	단계 정제율 (배)	전체 회수율 (%)	전체 정제율 (배)
IF1, 2&SB-Day 1	100,000.00	164,500	0.12	19740	49.24	0.197	449	73,860,500	738,605	3,742	0.25	100	1	100	1
페닐 스트림라인 용출된 물질	100,000.00	37,600	0.04	1504	5.84	0.015	233	8,760,800	87,608	5,825	0.39	11.9	1.6	11.9	1.6
IF1,2&SB-Day 2	100,000.00	171,000	0.144	24624	51.41	0.246	451	77,121,000	771,210	3,132	0.21	100	1	100	1
페닐 스트림라인 용출된 물질	100,000.00	42,500	0.036	1530	8.67	0.015	306	13,005,000	130,050	8,500	0.57	16.9	2.7	16.9	2.7
IF1,2-Day 3	100,000.00	95,500	0.547	52239	39.16	0.522	615	58,732,500	587,325	1,124	0.07	100	1	100	1
페닐 스트림라인 용출된 물질	100,000.00	34,000	0.059	2006	22.05	0.02	973	33,082,000	330,820	16,492	1.1	56.3	14.7	56.3	14.7
IF1-Day 4	100,000.00	50,000	0.273	13650	20.23	0.137	607	30,350,000	303,500	2,223	0.15	100	1	100	1
페닐 스트림라인 용출된 물질	100,000.00	35,800	0.046	1647	14.77	0.016	619	22,160,200	221,602	13,457	0.9	73	6.1	73	6.1
IF1-Day 5	100,000.00	86,000	0.348	29928	35.03	0.299	611	52,546,000	525,460	1,756	0.12	100	1	100	1
페닐 스트림라인 용출된 물질	100,000.00	40,700	0.065	2646	19.73	0.226	727	29,588,900	295,889	11,185	0.75	56.3	6.4	56.3	6.4
PSL 진행의 SP 빅 비드-5일 SP 빅 비드 용출된 물질	500,000.00	191,650	0.053	10157	62.08	0.02	486	93,113,911	931,139	9,167	0.61	100	1	100	1
	500,000.00	17,000	0.043	731	48.35	0.001	4,266	72,529,928	725,299	99,220	6.61	77.9	10.8	77.9	10.8

실시예 10

절단된 조직 실험예

상기 실험은 리소좀 효소 글루코세레브로시다아제를 발현하는 유전자도입 담배의 MD609 잎조직 100kg을 줄기에서 손으로 수확하고, 중량재고, 완충액 침윤을 위해 표면적을 증가시키기 위해 작은 조각으로 자름으로써 실시하였다. 잎 5kg을 폴리에스테르 백(Filtra-Spec(상표명), 12-2-1053)에 넣고, 잎 4 ×5kg 백을 금속제 바스켓에 넣었다. 잎재료를 함유하는 금속제 바스켓을 완충액 100ℓ 이하(0.1 KPO_4 완충액, pH 6.0, 5mM EDTA, 0.5% 타우로콜산, 10mM 2-메르캅토에탄올)를 함유하는 200ℓ Mueller(상표명) 진공탱크에 넣었다. 완전한 함침을 위해 잎/백위에 70lb. 스테인레스 스틸 판을 올려놓았다. 진공을 695㎜Hg로 조절하고, 1분동안 유지한후 신속하게 해제한다. 상기 진공침윤을 전체 2주기 반복하였다. 진공침윤후, 잎과 바스켓을 진공탱크로부터 꺼낸다. 진공침윤된 잎들을 함유하는 백을 원심분리하기 전체 10분 이하동안 중력 드레인 표면 완충액에 넣었다. Heine(상표명) 바스켓 원심분리기(볼 치수, 직경 28.0인치×16.5인치)를 사용하여 원심분리(1,800×G, 30분)함으로써 진공침윤된 잎들로부터 간질액(IF)을 추출하였다. 수집된 IF를 50μ 카트리지 필터를 통해 여과한후, 조직 전체 100kg이 침윤될때까지 4℃에서 저장하였다. 모든 조직이 침윤될때까지, 상기 방법을 다음 셋트의 4개의 5kg 백(5주기×20kg 전체주기)에 의해 반복하였다. 조직을 완전히 함침시키기 위해, 각 침윤주기동안 추가의 완충액을 첨가하였다. 간질액내에서 얼마나 많은 효소가 추출되는 지를 평가하기 위해, 간질액이 분리되는 조직을 상기와 같은 침윤완충액 4부피와 함께 와링(Waring(상표명)) 혼합기내에서 균질화하고, 원심분리하고, 효소활성에 대해 상층액 분석하였다.

페닐 스트림라인(Phenyl Streamline, 상표명) 수지를 함유하는 파마시아 스트림라인(Pharmacia Streamline)) 200(상표명) 컬럼상에 희석 간질액(공급스트림)을 직접 가함으로써 재조합 GCB를 정제하였다. 상기 컬럼을 평형화하고, 레코더상의 UV-시그널이 25mM 시트레이트, 20% 에틸렌 글리콜, pH 5.0에 의해 기준선으로 복귀하고 25mM 시트레이트, 70% 에틸렌 글리콜에 의해 희석될때까지 세척하였다. 모든 크로마토그래피 단계들을 실온에서 실시하였다. 하기의 표 9는 절단실험 데이터를 포함한다.

[표 9]

GCB 현장시험 표

시료/프랙션	생체중 (g)	전체 용적 (ml)	단백질 농도 (mg/ml)	전체 단백질 (mg)	GCB (mg)	단백질 수율 (mg/g)	GCB 농도 (U/ml)	전체 GCB (유닛)	유닛/kg 조직	Sp 활성도 nmol/hr ((U)/mg)	%GCB 전체 단백질의 % = GCB	단계 회수율 (%)	단계 정제율 (배)	전체 회수율 (%)	전체 정제율 (배)
IF1/ 촙	100,000.00	56,000	0.678	37946	10.42	0.379	279	15,624,000	156,240	412	0.03	100	1	100	1
페닐 스트림라인 용출된 물질	100,000.00	30,000	0.072	2147	9.38	0.021	469	14,070,000	140,700	6,553	0.44	90.1	15.9	90.1	15.9
조직 균질화액	100,000.00	56,000	ND	ND	15.08	0	404	22,621,081	226,211	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = 측정되지 않음

실시예 11

니코티아나 벤타미아나의 간질액으로부터 알파 갈락토시다아제의 실험실규모 정제

활발하게 성장하는 니코티아나 벤타미아나 식물에 리소좀 효소 α 갈락토시다아제 유전자를 함유하는 재조합 식물 바이러스 구조물의 감염성 전사물을 접종하였으며, 상기 α-갈락토시다아제 유전자는 간극에 분비할 수 있는 뉴클레오티드 서열로의 카르복시-말단 변형물을 포함한다. 접종후 14일후 α 갈락토시다아제를 발현하는 니코티아나 벤타미아나로부터 조직감염된 잎조직(1-2kg)을 수확하였다. 상기 조직의 중량을 재고, 1회에 수 kg의 잎조직을 축적할 수 있는 침윤용기내 2-4용적의 완충액(25mM 비스 트리스 프로판 완충액, pH 6.0, 5mM EDTA, 0.1mM 2-메르캅토에탄올)에 함침하였다. 조직 하부의 중량을 재기 위해, 조직상부에 구멍난 금속판을 놓았다. 진공을 30초동안 620-695㎜Hg로 펌프시키고, 신속하게 해제하였다. 조직을 회전시키고, 진공을 다시 가해 완전한 침윤을 얻었으며, 이는 원하지 않는 쪽의 잎조직의 색상을 명확하게 어둡게 함으로써 확인되었다. 조직상 과량의 완충액을 빼냈다. 바스켓 로터에서 10-15분동안 3800RPM(2100×G)으로 조직을 원심분리(깊이 10인치×4.25인치, InterTest Equipment Services, San Jose, CA/Biosource Design 25-0611000)함으로써, 조직으로부터 방출되었다. 흡인법에 의해 간질액을 수집했다. 일부 경우에, 감염된 잎조직만 수확하였다. 선택적으는, 침윤을 위한 잎조직에서 잎병과 줄기를 수확하였다. 침윤하기 전에 조직으로부터 주맥은 제거하지 않았다.

부틸 스트림라인(상표명) 수지를 함유하는 파마시아 스트림라인 25(상표명) 컬럼상에 희석 세포간 (공급 스트림)을 부하함으로써 α 갈락토시다아제를 정제하였다. 확장층 크로마토그래피는 원심분리 및/또는 미세여과단계가 필요없이 단백질을 한단계에서 포획, 정화 및 농축시킬 수 있다. 상기 컬럼을 평형화하고, 레코더상의 UV-시그널이 25mM 비스 트리스 프로판 pH 6.0 20% $(NH_4)_2SO_4$에 의한 기준선으로 복귀할때까지, 세정하고, 그후 25mM 비스 트리스프로판 pH 6.0에 의해 용출시켰다. 용출된 물질을 1mM $NaPO_4$완충액, 5% 글리세롤, pH 6.0에 의해 수산화인회석상에서 상기 용출된 물질을 추가정제하고, 1-250mM $NaPO_4$완충액, 5% 글리세롤, pH 6.0 선형구배 또는 단계 구배에 의해 용출시켰다. 모든 크로마토그래피 단계들은 실온에서 수행하였다.

α 갈락토시다아제 활성은 형광 기질 4-메틸룸벨리페릴 α-D 갈락토피라노시드를 가수분해함으로써 측정하였다. 효소활성은 5mM 메틸룸벨리페릴 α-D 갈락토피라노시드, 0.1M 인산칼륨, 0.15% 트리톤-X100(상표명), 0.125% 소듐 타우로콜레이트, 0.1% 소혈청 알부민, pH 5.9를 함유하는 반응혼합물내에서 37℃에서 측정하였다. 전체 단백질은 Bradford(Bradford, M. Anal. Biochem. 72:248; 1976)의 방법에 기초한 Bio-Rad Protein Assay(상표명)을 사용하여 측정하였다.

잎 1kg에서, 본 발명자들은 단일 침윤과정(IF-1)후에 800,000개의 유닛의 특정활성에서 α 갈락토시다아제의 1억 4천만 - 1억 6천만개의 유닛을 얻었다.

하기 표 10은 여러 실험예를 나타내는 데이터를 포함한다.

[표 10]

중간시험규모 발파 gal

시료/프래션#	생체중 (g)	전체 용적 (ml)	단백질 농도 (mg/ml)	전체 단백질 (mg)	Gal (mg)	단백질 수율 (mg/g)	Gal 농도 (U/ml)	전체 Gal (유닛)	유닛/mg 조직	Sp활성도 Nmol/hr (IU/mg)	%Gal 전체 단백질의 % = Gal	단계 회수율 (%)	단계 정제율 (배)	전체 회수율 (%)	전체 정제율 (배)
IF	2026	1,450	0.236	342	74.5	0.169	226,201	327,992,085	161,891,454	958,481	21.78	100	1	100	1
부틸 스트렙타인 추출된 물질	2026	300	0.392	118	74	0.038	1,085,873	325,761,839	160,790,641	2,770,084	62.96	99.3	2.9	99.3	2.9
스사화안희석 추출된 물질	2026	470	0.076	36	54.2	0.018	507,640	238,590,619	117,764,173	6,679,469	151.81	73.2	2.4	72.1	7

IF = 간질액 조추출물

실시예 12

목초지 재배 담배의 잎 간질액으로부터의 글루코세레브로시다아제 및 잎 균질화액으로부터의 재조합 바이러스의 중간 시험규모 정제

리소좀 효소 글루코세레브로시다아제를 발현하는 유전자도입 담배(MD609)에 코트 단백질 루프 융합을 함유하는 담배 모자이크 바이러스 유도체 TMV291을 기계접종하였다(Turpen외 다수, 1995, Bio/Technology 13:23-57). 접종하고 5주후에 유전자도입, 형질도입된 잎조직 100kg 전체를 목초지로부터 수확하였다. 상기 조직을 손으로 조직으로부터 벗겨내고, 중량재었다. 폴리에스테르 백(Filtra-Spec(상표명), 12-2-1053)에 잎 5kg을 넣고, 4개의 잎 5kg 백을 금속 바스켓에 넣었다. 잎재료를 함유하는 금속바스켓을 100ℓ 이하의 완충액(0.1 KPO4 완충액, pH 6.0, 5mM EDTA, 0.5% 타우로콜산, 10mM 2-메르캅토에탄올)을 함유하는 200ℓ 뮐러(Mueller, 상표명) 진공탱크내에 넣었다. 완전한 함침을 위해 잎/백위에 70lb. 스테인레스 스틸 판을 올려놓았다. 진공을 695㎜Hg로 조절하고, 1분동안 유지한후 신속하게 해제한다. 상기 진공침윤을 전체 2주기 반복하였다. 간질액을 분리하지 않으면서 진공을 여러번 사용하는 것은 단일 침윤과정을 구성한다. 완전한 침윤의 표시는 잎조직의 밑바닥 색이 어두워지는 것이다. 진공침윤후, 잎과 바스켓을 진공탱크로부터 꺼낸다. 진공침윤된 잎들을 함유하는 백을 원심분리하기 전체 10분 이하동안 중력 드레인 표면 완충액에 넣었다. Heine(상표명) 바스켓 원심분리기(볼 치수, 직경 28.0인치×16.5인치)를 사용하여 원심분리(1,800×G, 30분)함으로써 진공침윤된 잎들로부터 간질액(IF)을 추출하였다. 수집된 IF를 50μ 카트리지 필터를 통해 여과한후, 조직 전체 100kg이 침윤될때까지 4℃에서 저장하였다. 모든 조직이 침윤될때까지, 상기 방법을 다음 셋트의 4개의 5kg 백(5주기×20kg 전체주기)에 의해 반복하였다. 조직을 완전히 함침시키기 위해, 각 침윤주기동안 추가의 완충액을 첨가하였다.

페닐 스트림라인(상표명) 수지를 함유하는 파마시아 스트림라인 200(상표명) 컬럼상에 희석 세포간액(공급스트림)을 직접 가함으로써 재조합 GCB를 정제하였다. 확장층 크로마토그래피는 원심분리단계 및/또는 미량여과단계의 필요없이 단백질을 한단계로 포획, 정화 및 농축할 수 있게 한다. 상기 컬럼을 평형화하고, 레코더상의 UV-시그널이 25mM 시트레이트, 20% 에틸렌 글리콜, pH 5.0에 의해 기준선으로 복귀하고 결합효소가 25mM 시트레이트, 70% 에틸렌 글리콜에 의해 희석될때까지 세척하였다. 용출된 물질을 1sq.ft.0.8㎛ Sartoclean GF(상표명) 캡슐 및 1sq.ft.0.2㎛ Sartobran P(상표명)을 통해 통과시킴으로써 멸균여과하고, 다음 크로마토그래피 단계까지 저장하였다. 4-5일 진행한 페닐 스트림라인(상표명) 크로마토그래피로부터 용출된 물질을 함께 진행하고, 양이온 교환수지인 SP 빅 비드(상표명) 상에서 추가로 정제하고, 25mM 시트레이트, 75mM NaCl, pH 5.0. 25mM 시트레이트, 0.4M NaCl, 10% 에틸렌 글리콜, pH 5.0의 단계 구배에 의해 GCB를 용출하였다. 모든 크로마토그래피 단계들은 실온에서 실시하였다. 용출된 물질은 1sq.ft.0.8㎛ Sartoclean GF(상표명), 1sq.ft. 0.2㎛ Sartobran P(상표명) 멸균필터(Sartorius, Corp.)을 통해 용출된 물질들을 통과시킴으로써 멸균여과하고, 4℃에서 저장하였다.

자살기질인 콘듀리톨(conduritol) β-에폭시드(CBE)를 사용하여, 식물 글루코시다아제의 존재하에서 재조합 글루코세레브로시다아제(rGCB) 활성의 억제가 얻어졌다. 효소활성은 CBE와 함께 및 없이, 5mM 메틸룸벨리페릴 β-D 글루코시드, 0.1M 인산칼륨, 0.15% 트리톤-X100(상표명), 0.125% 소듐 타우로콜레이트, 0.1% 소혈청 알부민, pH 5.9를 함유하는 반응혼합물내에서 37℃에서 측정하였다. 전체 글루코시다아제 활성 및 rGCB 활성은 형광 기질 4-메틸룸벨리페릴 글루코피라노시드의 가수분해에 의해 측정하였다. 전체 단백질은 Bradford의 방법(Bradford, M. Anal. Biochem. 72:248(1976))에 기초한 Bio-Rad Protein Assay(상표명)을 사용하여 측정하였다.

IF 추출된 잎조직내에 남은 바이러스 양은 균질화 및 폴리에틸렌 글리콜 침전법을 사용하여 측정하였다. 그리고, 포합된 간질액내에 존재하는 바이러스의 양은 폴리에틸렌 글리콜 침전에 의해 직접 측정되었다. 침전된 시료로부터의 최종 바이러스 수율은 260㎚ 흡광도에 의해 분광광도적으로 측정하였다(표 11 참조)

[표 11]

시료	바이러스 역가
풀된 IF	바이러스 0.004㎎/생체중(g), 바이러스 0.010㎎/IF(㎎)
IF 추출후 균질화된 잎조직	바이러스 0.206㎎/생체중(g)

표 12에는 TMV 형질도입 식물조직으로부터의 GCB 추출데이터가 포함되어 있다.

본 실시예는 특이적인 표적생성물을 아포플라스트 및 세포질내에 위치시키는 추출과정에 기초한 같은 잎조직으로부터 2개의 다른 생성물을 추출할 수 있는 능력을 입증한다.

본 발명의 상세한 설명이 본 발명의 바람직한 구체예를 참고로 하여 개시되는 반면, 본 상세한 설명을 제한한다기 보다 상술한다는 의미로 이해하여야 한다. 당업자는 본 발명의 정신 및 청구의 범위내에서 쉽게 변형할 수 있을 것이다. 또한, 본 발명은 제조된 모든 단백질 또는 식물내에서 재조합생성될 수 있는 단백질에 적용되며, 본 명세서에 기술된 단백질에만 국한되는 것이 아니라는 것도 이해될 것이다.

[표 12]

TMV 항질드이된 식물로부터의 GCB 회수율

시료/프레션#	생체중 (g)	전체 용적 (ml)	단백질 농도 (mg/ml)	전체 단백질 (mg)	GCB (mg)	단백질 수율 (Mg/g)	GCB 농도 (U/ml)	전체 GCB (유닛)	유닛/kg 조직	SD 활성도 nmol/hr (U)/mg	%GCB 전체 단백질의 %	단계 회수율 (%)	단계 정제율 (배)	전체 회수율 (%)	전체 정제율 (배)
IFI/바이러스	100,000	40,000	0.383	15320	18.7	0.153	701	28,055,851	280,559	1,831	0.12	100	1	100	1
페니스트릴라인 용출된 물질	100,000	25,000	0.024	600	6.66	0.006	400	9,990,926	99,909	16,652	1.11	35.6	9.1	35.6	9.1

실시예 13

IF 프랙션의 대규모 원심분리

본 실시예에는 다운스트림 처리를 위해 IF 추출액의 일정한 스트림을 형성할 불연속적인 일련의 방법을 사용하여 IF 추출액을 제조하기 위한 규모-향상 과정이 설명되어 있다. 상기 과정은 하기의 요소들로 구성된다:

1. 자동화된 전체 잎 수확.

2. 대규모 연속식 침윤.

3. 대규모 바스켓 원심분리.

적어도 2개의 사용가능한 전체-규모의 전체 잎 수확기 디자인이 있다. 1개는 R.J.Reynolds Company에 의해 개발되었으며, 노스캐롤라이나주의 아보카장치로 사용되고 있다. 다른 1개는 켄터기 대학의 농업공학부에 의해 개발되었으며, 데비어스 카운티 켄터키의 상업용 담배농장에서 3계절동안 증명되었다. 상기 수확기들은 온전한 식물을 자를 수 있고, 전체 잎을 벗길 수 있고, 잎 및 줄기 조직을 시간당 수 에이커에서 일정한 속도로 분리할 수 있는 능력을 나타냈다. 그 후, 잎들은 트레일러내 추출장치로 수송될 것이다.

그후, 상기 잎들을 기계적 컨베이어 및 중량 벨트 공급기에 의해 진공침윤 시스템으로 내려질 것이다. 2가지 시스템이 디자인된다. 시스템 1(도 1)은 벌크 탱크이다. 상기 탱크는 완전한 진공을 위해 구성되며, 모든 잎들이 침윤매질내에 함침되도록 저속(50이하)의 rpm으로 회전가능하다. 종래의 기계적 진공펌프 또는 21인치의 물 컬럼 압력과 동일한 진공으로의 증기 배출기에 의해 형성된다. 그후, 상기 진공은 조직을 침윤시킨다. 그후, 완충액 재사용을 위해 제2 탱크로 용기를 배출하고, 잎조직을 탱크의 바닥내 오거를 통해 컨베이어상에서 용기로부터 배출포트로 배출하였다. 상기 컨베이어는 중량벨트를 통해 바스켓 원심분리기로 상기 잎들을 수송하였다. 중량벨트는 측정량의 물질이 각 원심분리 주기를 위한 원심분리기에 첨가되도록 한다. 시스템 2는 연속식 진공침윤시스템이다. 상기 시스템은 내부 오거 컨베이어를 갖는 대형 원통형 튜브로 구성된다(도 2). 실린더가 각을 형성하며 위치되어 있다. 실린더는 침윤액에 의해 일부 채워진다. 종래의 진공펌프 또는 증기 배출기에 의해 대략 21인치의 물 컬럼 압력으로 제공된 진공하에 실린더를 둔다. 잎조직을 회전밸브를 통해 첨가하고, 조직을 첨가함에 따라 진공을 유지한다. 그후 튜브위로 완충액이 이동하고, 오거에 의해 수송되는 시간동안 잎조직을 함침시킨다. 침윤된 잎들을 다른 회전밸브를 통해 오거의 높아진 끝에서 배출된다. 상기 지점에서 진공이 해제된다. 회전밸브 및 오거 수송 플라이트를 구비한 상기 종류의 압력용기는 증기압력을 사용하여 쌀 및 다른 물질들을 연속요리하기 위해 사용되는 크리스티안 엔지니어링(샌프란시스코)에 의해 설계된 압력용기로부터 개작된다. 일단 배출되면, 잎은 중량벨트를 구비한 컨베이어를 통해 바스켓 원심분리기에 수송된다. 중량벨트는 상기 기술된 바와 같이, 바스켓 원심분리기의 각 주기에 물질을 적당히 배출시키도록 기능한다.

바스켓 원심분리기는 세척후 샐러드 그린을 탈수하기 위한 채소산업용 기본 Sanborn(UPE) 디자인의 변형예이다. 원심분리기는 바스켓의 내부상에 원뿔형 스핀들을 구비한 바스켓 디자인이다. 상기 바스켓은 수압 피스톤을 통해 실린더로부터 바닥면을 분리하도록 하는 2구획 디자인이다. 원심분리기는 원뿔형 스핀들을 구비한 바스켓의 중앙위에 위치되어 있는 컨베이어를 통해 매우 느린 속도(예를 들어, 낮은 RPM 또는 낮은 G력)로 부하된다. 컨베이어로부터 물질이 떨어질때, 뚫린 바스켓의 측면에서 원뿔에 의해 전형된다. 잎이 완전히 채워졌을때, 오거는 정지하고, 바스켓은 대략 6-50분동안 2000-2500×G로 가속화된다. IF 유액이 원심분리기로부터 추출된다. 원심분리 종반에, 바스켓은 낮은 rpm으로 감속된다. 바스켓의 바닥이 수압 피스톤의 작용에 의해 측면(실린더)로부터 분리된다. 잎조직이 컨베이어로 배출되고, 원심분리기의 바닥이 닫히고, 상기 주기가 반복된다. 상기 디자인은 보다 높은 G력에 대해 평가될 수 있는 로터 및 드라이브가 설계될 필요가 있다. 보통, Sanborn형 기계는 600 내지 800G에서만 작동한다. 그러나, 상기 유일한 용도를 위한 개선된 기계를 구조하기 위해 정상적인 엔지니어링 변수내에 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a)완충액에 의해 식물 잎을 침윤시키는 단계;

(b)식물조직과 완충액을 진공환경에 넣는 단계;

(c)완충액으로부터 조직을 제거하는 단계;

(d)조직을 원심분리하여 간질액을 제거하는 단계; 및

(e)간질액으로부터 목적 단백질을 농축시키는 단계로 구성된, 식물조직의 간질액으로부터 목적하는 농축된 활성 단백질을 대규모로 추출하는 방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기 조직은 바스켓 원심분리기에 의해 원심분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 1 항에 있어서,

상기 단백질은 한외 여과법에 의해 농축되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서,

상기 단백질은 확장층 크로마토그래피에 의해 농축되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1 항에 있어서,

상기 식물조직은 잎, 줄기, 어린 가지, 꽃, 과실 및 뿌리로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 1 항에 있어서,

완충액에 의해 식물 잎을 침윤시키기 전에, 주맥을 따라 식물 잎을 자르는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 1 항에 있어서,

상기 완충액은 시트레이트, 인산염 및 트리스로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서,

상기 완충액은 라우로콜산 나트륨, SDS, 트리톤, Tween(상표명)s, 인지질, 담즙산염, 소듐 디옥시콜레이트 및 소듐 라우릴 설페이트로 구성된 군에서 선택되는 제제를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 7 항에 있어서,

상기 완충액은 EDTA, EGTA 및 시트레이트로 구성된 군에서 선택되는 킬레이터를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 7 항에 있어서,

상기 완충액은 α-메르캅토 에탄올, 아스코르브산염, 소듐 메타비설페이트 및 디티오트레이톨로 구성된 군에서 선택되는 산화방지제를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제 1 항에 있어서,

상기 식물 잎 및 완충액은 200-760㎜Hg의 진공압력으로 가해지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제 11 항에 있어서,

상기 진공압력은 400-760㎜Hg인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

제 11 항에 있어서,

상기 진공압력은 740-760㎜Hg인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제 11 항에 있어서,

상기 진공압력은 760㎜Hg인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제 1 항에 있어서,

상기 원심분리는 50-5,000×G의 중력 범위에서 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 1 항에 있어서,

상기 원심분리는 약 2,000×G의 중력 범위에서 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제 1 항에 있어서,

상기 목적 단백질은 재조합 식물 바이러스 벡터에 의해 식물내에서 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제 1 항에 있어서,

상기 목적 단백질은 유전자도입 식물에 의해 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제 1 항에 있어서,

상기 목적 단백질은 식물내에서 자연적으로 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제 1 항에 있어서,

원심분리하기 전에, 조직으로부터 과량의 완충액을 배출시키거나 또는 흡수하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

제 1 항에 있어서,

불연속적인 일련의 방법에 의해 완충액으로부터의 조직을 원심분리기로 이동시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제 1 항에 있어서,

원심분리에 의해 간질액을 제거한 후에 남은 조직으로부터 목적 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

제 1 항에 있어서,

상기 단백질은 원형질 관통막, 페록시좀, 관련 세포막, 기타 세포기관, 핵, 골지체, 세포기질, 조면 및 활면 소포체, 미토콘드리아, 액포 및 엽록체로 구성된 군에서 선택되는 세포성분으로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.

제 1 항에 있어서,

목적 단백질은 리보솜 불활성 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

제 1 항에 있어서,

목적 단백질은 인간의 리소좀 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.

제 1 항에 있어서,

목적 단백질은 산업용 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.

제 1 항에 있어서,

목적 단백질은 시토킨인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.

제 1 항에 있어서,

목적 단백질은 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.

제 1 항에 있어서,

목적 단백질은 α-갈락토시다아제 또는 α-갈락토시다아제의 아이소자임인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.

제 1 항에 있어서,

목적 단백질은 글루코세레브로시다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 아이소자임인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31.

제 1 항에 있어서,

목적 단백질은 세포내 특정 구획으로 단백질을 안내하는 시그널 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.

제 1 항에 있어서,

한 종류 이상의 단백질이 동시에 정제될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33.

(a)완충액에 의해 식물 조직을 침윤시키는 단계;

(b)식물 조직과 완충액을 진공환경에 넣는 단계;

(c)완충액으로부터 조직을 제거하는 단계;

(d)조직을 원심분리하여 간질액을 제거하는 단계; 및

(e)간질액으로부터 단백질을 농축시키는 단계로 구성된, 식물 조직의 간질액으로부터 추출된, 식물로부터 얻은 단백질.

청구항 34.

제 33 항에 있어서,

목적 단백질은 α-갈락토시다아제 또는 α-갈락토시다아제의 아이소자임인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 35.

제 33 항에 있어서,

목적 단백질은 글루코세레브로시다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 아이소자임인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 36.

제 33 항에 있어서,

목적 단백질은 리보솜 불활성 단백질인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 37.

제 33 항에 있어서,

목적 단백질은 인간의 리소좀 효소인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 38.

제 33 항에 있어서,

목적 단백질은 산업용 효소인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 39.

제 33 항에 있어서,

목적 단백질은 시토킨인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 40.

제 33 항에 있어서,

목적 단백질은 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 41.

제 1 항에 있어서,

상기 식물조직은 벌크 회전식 진공침윤 탱크에 의해 상기 식물조직에 완충액을 불연속적으로 운반함으로써 상기 완충액에 의해 침윤되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42.

제 1 항에 있어서,

상기 침윤은 회전식 입구 및 회전식 배출 밸브를 구비한 내부 오거를 포함하는 원통형 압력용기에 의한 연속식 침윤인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43.

제 2 항에 있어서,

상기 바스켓 원심분리기는 약 2000-2500×G에서 간질액을 추출하기 위해, 저속으로 부하 또는 배출되고, 가속화될 수 있으며, 잎재료는 스플릿 로터 디자인을 통해 배출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44.

(a)완충액에 의해 식물조직을 침윤시키는 단계;

(b)식물조직과 완충액을 진공환경으로 넣는 단계;

(c)완충액으로부터 조직을 제거하는 단계;

(d)조직을 원심분리하여 간질액을 제거하는 단계; 및

(e)간질액으로부터 생체 분자를 농축시키는 단계로 구성된, 지질, 탄수화물, 지단백질, 다당류, 당, 지방산, 핵산 및 폴리뉴클레오티드로 구성된 군에서 선택된 목적하는 농축된 생체분자를 대규모로 추출하는 방법.

청구항 45.

제 44 항에 있어서,

조직은 바스켓 원심분리기에 의해 원심분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46.

제 44 항에 있어서,

상기 생체분자는 한외 여과법에 의해 농축되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47.

제 44 항에 있어서,

상기 생체분자는 확장층 크로마토그래피에 의해 농축되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48.

제 44 항에 있어서,

상기 식물조직은 잎, 줄기, 어린 가지, 꽃, 과실 및 뿌리로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49.

제 44 항에 있어서,

완충액에 의해 식물 잎을 침윤시키기 전에, 식물 잎을 주맥을 따라 자르는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50.

제 44 항에 있어서,

상기 완충액은 시트레이트, 인산염 및 트리스로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51.

제 50 항에 있어서,

상기 완충액은 라우로콜산 나트륨, SDS 트리톤, Tween(상표명)s, 인지질, 담즙산염, 소듐 데옥시콜레이트 및 소듐 라우릴 설페이트로 구성된 군에서 선택된 제제를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52.

제 50 항에 있어서,

상기 완충액은 EDTA, EGTA 및 시트레이트로 구성된 군에서 선택된 킬레이터를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53.

제 50 항에 있어서,

상기 완충액은 α-메르캅토 에탄올, 아스코르브산염, 소듐 메타비설페이트 및 디티오트레이톨로 구성된 군에서 선택되는 산화방지제를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54.

제 44 항에 있어서,

식물 잎 및 완충액은 200-760㎜Hg의 진공압력으로 가해지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55.

제 54 항에 있어서,

상기 진공압력은 400-760㎜Hg인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56.

제 54 항에 있어서,

상기 진공압력은 740-760㎜Hg인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57.

제 54 항에 있어서,

상기 진공압력은 760㎜Hg인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58.

제 44 항에 있어서,

상기 원심분리는 50-5,000×G의 중력 범위에서 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59.

제 44 항에 있어서,

상기 원심분리는 약 2,000×G의 중력 범위에서 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60.

제 44항에 있어서,

상기 목적 단백질은 재조합 식물 바이러스 벡터에 의해 식물내에서 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61.

제 44 항에 있어서,

상기 목적 단백질은 유전자도입 식물에 의해 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62.

제 44 항에 있어서,

상기 목적 단백질은 식물내에서 자연적으로 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63.

제 44 항에 있어서,

원심분리하기 전에, 조직으로부터 과량의 완충액을 배출시키거나 또는 흡수하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64.

제 44 항에 있어서,

불연속적인 일련의 방법에 의해 완충액으로부터의 조직을 원심분리기로 이동시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65.

제 44 항에 있어서,

원심분리에 의해 간질액을 제거한 후에 남은 조직으로부터 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 66.

제 44 항에 있어서,

상기 단백질은 원형질 관통막, 페록시좀, 관련 세포막, 기타 세포기관, 핵, 골지체, 세포기질, 조면 및 활면 소포체, 미토콘드리아, 액포 및 엽록체로 구성된 군에서 선택되는 세포성분으로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67.

(a)완충액에 의해 식물 조직을 침윤시키는 단계;

(b)식물 조직과 완충액을 진공환경에 넣는 단계;

(c)완충액으로부터 조직을 제거하는 단계;

(d)조직을 원심분리하여 간질액을 제거하는 단계; 및

(e)간질액으로부터 단백질을 농축시키는 단계로 구성된, 지질, 탄수화물, 지단백질, 다당류, 당, 지방산, 핵산 및 폴리뉴클레오티드로 구성된 군에서 선택되며, 식물로부터 얻은 생체분자.

청구항 68.

제 44 항에 있어서,

식물조직은 벌크 회전식 진공침윤 탱크에 의해 상기 식물조직에 완충액을 불연속적으로 운반함으로써 상기 완충액에 의해 침윤되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69.

제 44 항에 있어서,

상기 침윤은 회전식 입구 및 회전식 배출 밸브를 구비한 내부 오거를 포함하는 원통형 압력용기에 의한 연속식 침윤인 것을 특징으로 하는 방법.

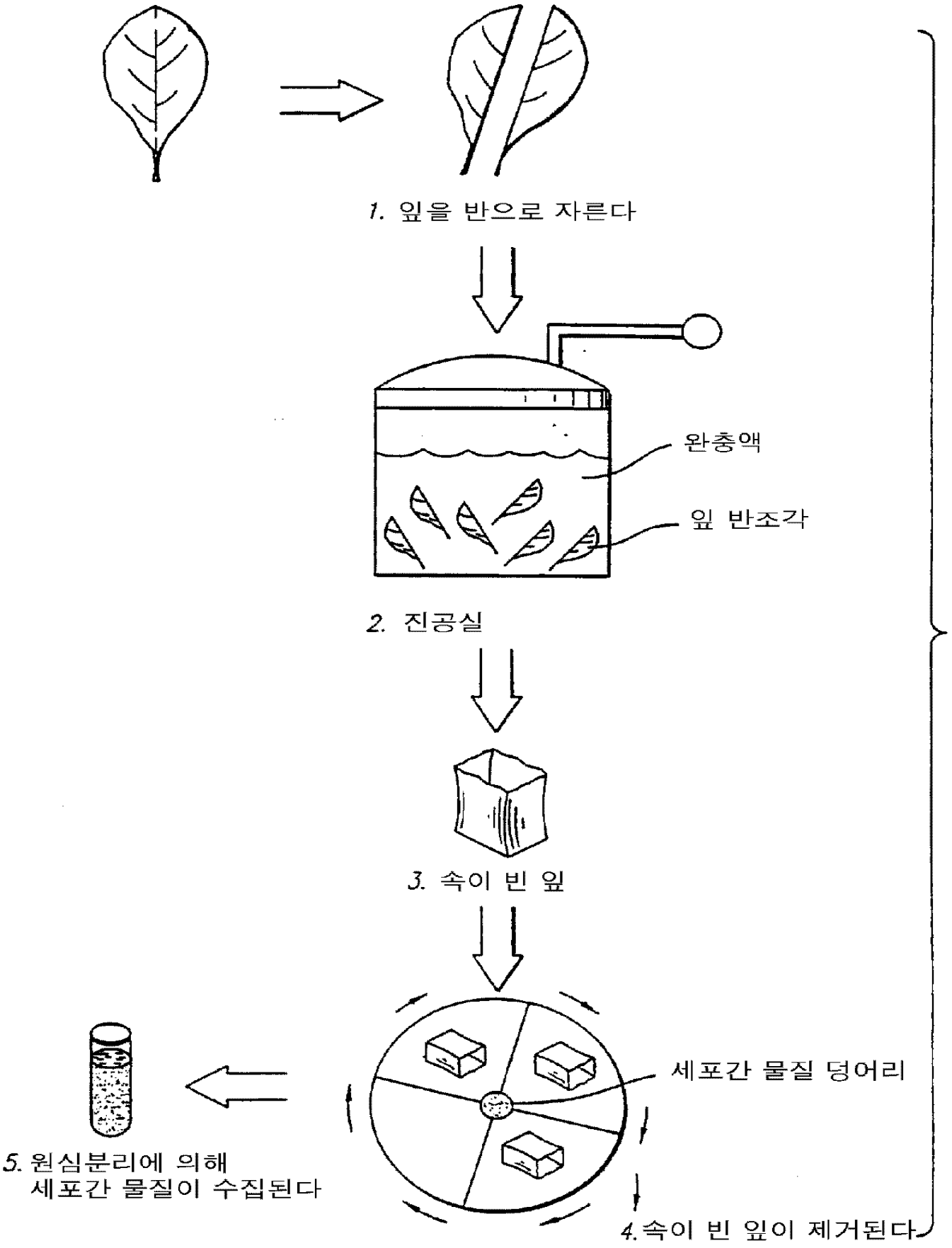
청구항 70.

제 45 항에 있어서,

상기 바스켓 원심분리기는 약 2000-2500×6에서 IF를 추출하기 위해, 저속으로 송출 또는 배출되고, 가속화될 수 있으며, 잎재료는 스플릿 로터 디자인을 통해 배출되는 것을 특징으로 하는 방법.

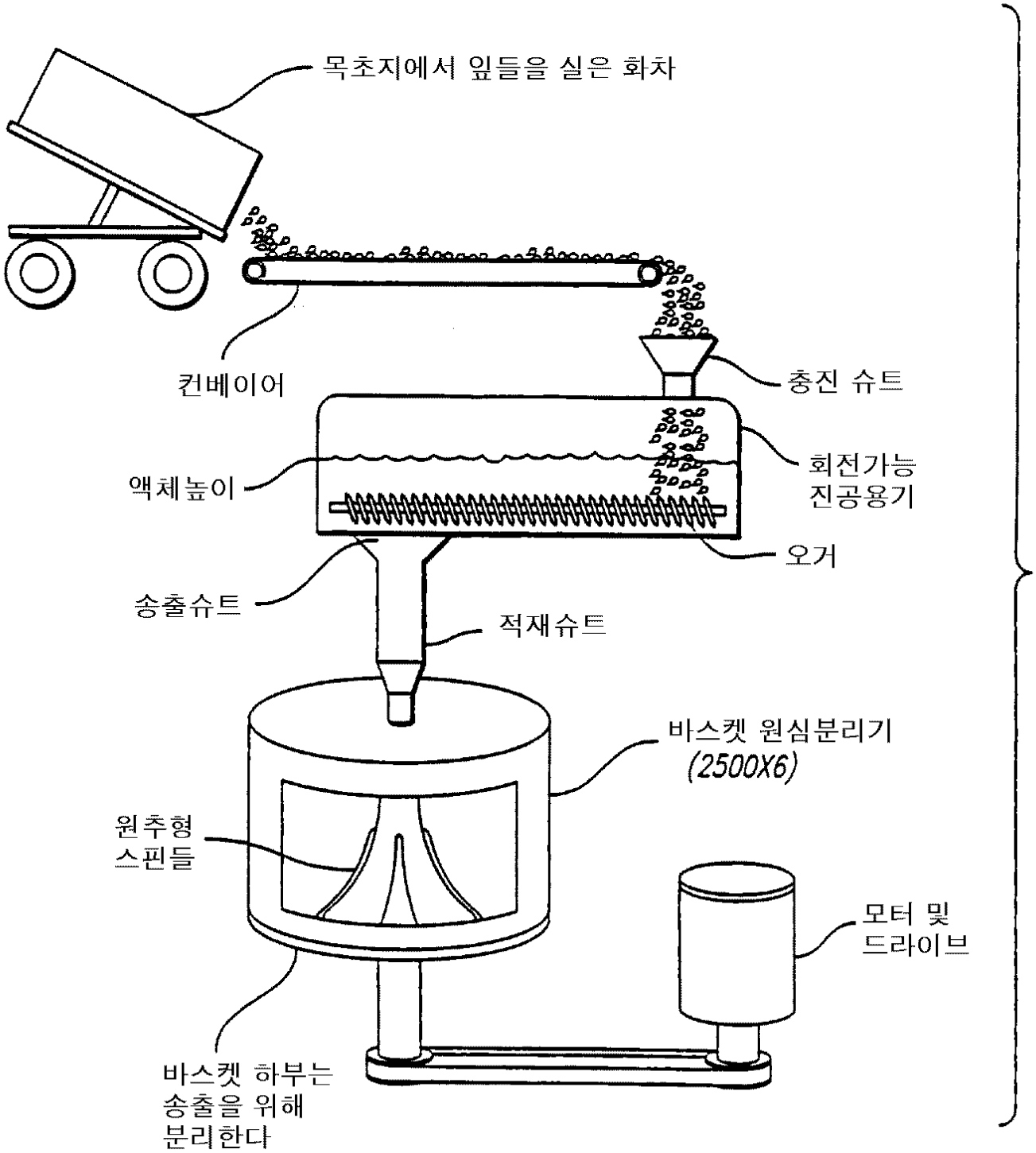
도면

도면 1


1. 잎을 반으로 자른다
완충액
잎 반조각
2. 진공실
3. 속이 빈 잎
세포간 물질 덩어리
4. 속이 빈 잎이 제거된다
5. 원심분리에 의해
세포간 물질이 수집된다

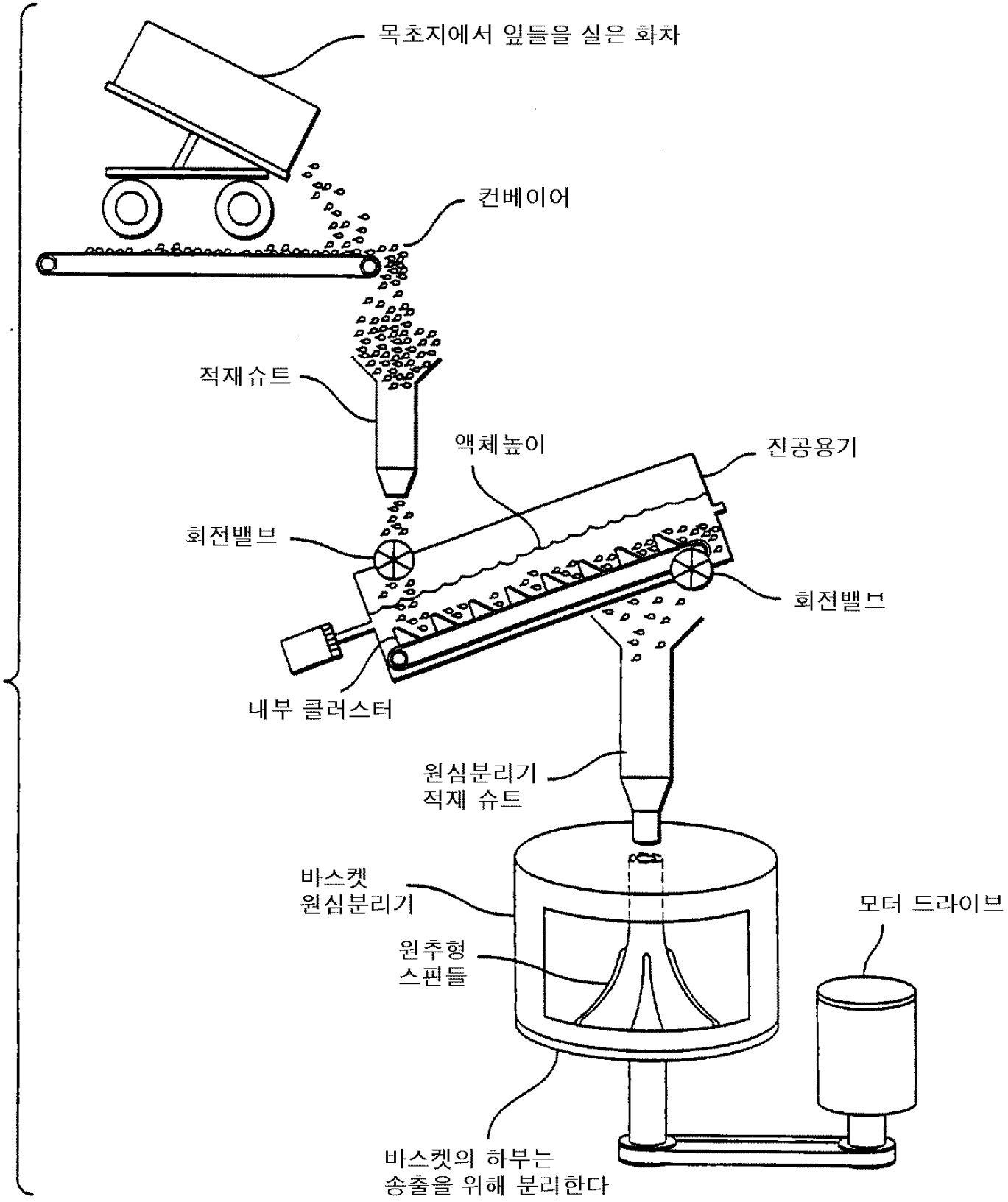
도면 2

배치식 물관침윤

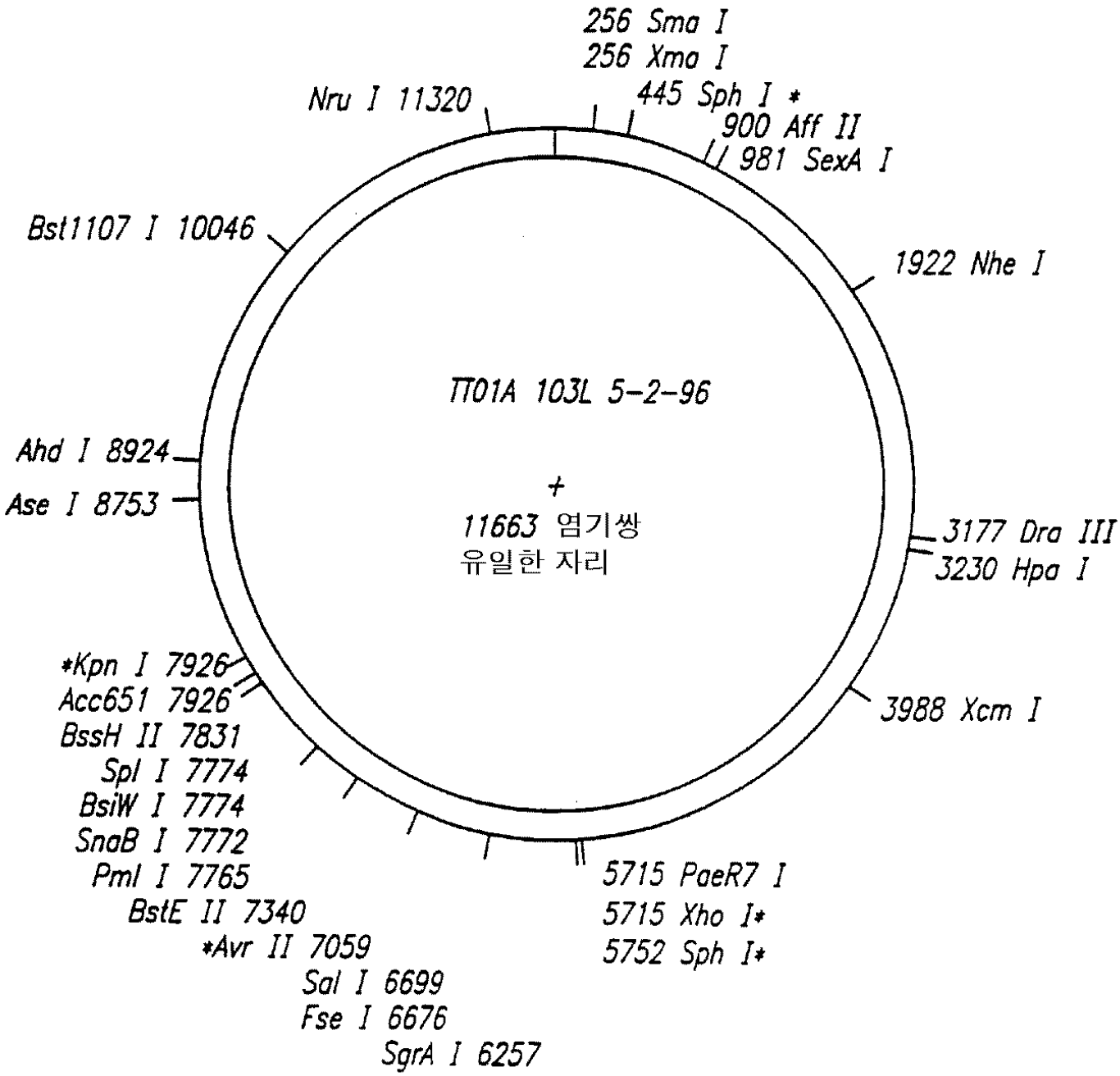

목초지에서 잎들을 실은 화차
컨베이어
충진 슈트
액체높이
회전가능
진공용기
오거
송출슈트
적재슈트
바스켓 원심분리기
(2500X6)
원추형
스핀들
모터 및
드라이브
바스켓 하부는
송출을 위해
분리한다

도면 3

연속식 진공침윤


목초지에서 잎들을 실은 화차
컨베이어
적재슈트
액체높이
진공용기
회전밸브
회전밸브
내부 클러스터
원심분리기
적재 슈트
바스켓
원심분리기
모터 드라이브
원추형
스핀들
바스켓의 하부는
송출을 위해 분리한다

도면 4


256 Sma I
256 Xma I
445 Sph I *
900 Aff II
981 SexA I
1922 Nhe I
3177 Dra III
3230 Hpa I
3988 Xcm I
5715 PaeR7 I
5715 Xho I*
5752 Sph I*
SgrA I 6257
Fse I 6676
Sal I 6699
*Avr II 7059
BstE II 7340
PmI I 7765
SnaB I 7772
BsiW I 7774
SpI I 7774
BssH II 7831
Acc651 7926
*Kpn I 7926
Ase I 8753
Ahd I 8924
Bst1107 I 10046
Nru I 11320
TT01A 103L 5-2-96
11663 염기쌍
유일한 자리

도면 5A

TT01A 103L바이러스cDNA

```
      |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60      |   70      |   80
    1 gtatttttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattacaa ttactattta caattacaAT GGCATACACA 80
   81 CAGACAGCTA CCACATCAGC TTTGCTGGAC ACTGTCCGAG GAAACAACTC CTTGGTCAAT GATCTAGCAA AGCGTCGTCT 160
  161 TTACGACACA GCGGTTGAAG AGTTTAACGC TCGTGACCGC AGGCCCAAGG TGAACTTTTC AAAAGTAATA AGCGAGGAGC 240
  241 AGACGCTTAT TGCTACCCGG GCGTATCCAG AATTCCAAAT TACATTTTAT AACACGCAAA ATGCCGTGCA TTCGCTTGCA 320
  321 GGTGGATTGC GATCTTTAGA ACTGGAATAT CTGATGATGC AAATTCCCTA CGGATCATTG ACTTATGACA TAGGCGGGAA 400
  401 TTTTGCATCG CATCTGTTCA AGGGACGAGC ATATGTACAC TGCTGCATGC CCAACCTGGA CGTTCGAGAC ATCATGCGGC 480
  481 ACGAAGGCCA GAAAGACAGT ATTGAACTAT ACCTTTCTAG GCTAGAGAGA GGGGGGAAAA CAGTCCCCAA CTTCCAAAAG 560
  561 GAAGCATTTG ACAGATACGC AGAAATTCCT GAAGACGCTG TCTGTCACAA TACTTTCCAG ACAATGCGAC ATCAGCCGAT 640
  641 GCAGCAATCA GGCAGAGTGT ATGCCATTGC GCTACACAGC ATATATGACA TACCAGCCGA TGAGTTCGGG GCGGCACTCT 720
  721 TGAGGAAAAA TGTCCATACG TGCTATGCCG CTTTCCACTT CTCTGAGAAC CTGCTTCTTG AAGATTCATA CGTCAATTTG 800
  801 GACGAAATCA ACGCGTGTTT TTCGCGCGAT GGAGACAAGT TGACCTTTTC TTTTGCATCA GAGAGTACTC TTAATTATTG 880
  881 TCATAGTTAT TCTAATATTC TTAAGTATGT GTGCAAAACT TACTTCCCGG CCTCTAATAG AGAGGTTTAC ATGAAGGAGT 960
  961 TTTTAGTCAC CAGAGTTAAT ACCTGGTTTT GTAAGTTTTC TAGAATAGAT ACTTTTCTTT TGTACAAAGG TGTGGCCCAT 1040
 1041 AAAAGTGTAG ATAGTGAGCA GTTTTATACT GCAATGGAAG ACGCATGGCA TTACAAAAAG ACTCTTGCAA TGTGCAACAG 1120
 1121 CGAGAGAATC CTCCTTGAGG ATTCATCATC AGTCAATTAC TGGTTTCCCA AAATGAGGGA TATGGTCATC GTACCATTAT 1200
 1201 TCGACATTTC TTTGGAGACT AGTAAGAGGA CGCGCAAGGA AGTCTTAGTG TCCAAGGATT TCGTGTTTAC AGTGCTTAAC 1280
 1281 CACATTCGAA CATACCAGGC GAAAGCTCTT ACATACGCAA ATGTTTTGTC CTTTGTCGAA TCGATTCGAT CGAGGGTAAT 1360
 1361 CATTAACGGT GTGACAGCGA GGTCCGAATG GGATGTGGAC AAATCTTTGT TACAATCCTT GTCCATGACG TTTTACCTGC 1440
 1441 ATACTAAGCT TGCCGTTCTA AAGGATGACT TACTGATTAG CAAGTTTAGT CTCGGTTCGA AAACGGTGTG CCAGCATGTG 1520
 1521 TGGGATGAGA TTTCGCTGGC GTTTGGGAAC GCATTTCCCT CCGTGAAAGA GAGGCTCTTG AACAGGAAAC TTATCAGAGT 1600
 1601 GGCAGGCGAC GCATTAGAGA TCAGGGTGCC TGATCTATAT GTGACCTTCC ACGACAGATT AGTGACTGAG TACAAGGCCT 1680
 1681 CTGTGGACAT GCCTGCGCTT GACATTAGGA AGAAGATGGA AGAAACGGAA GTGATGTACA ATGCACTTTC AGAGTTATCG 1760
 1761 GTGTTAAGGG AGTCTGACAA ATTCGATGTT GATGTTTTTT CCCAGATGTG CCAATCTTTG GAAGTTGACC CAATGACGGC 1840
 1841 AGCGAAGGTT ATAGTCGCGG TCATGAGCAA TGAGAGCGGT CTGACTCTCA CATTTGAACG ACCTACTGAG GCGAATGTTG 1920
 1921 CGCTAGCTTT ACAGGATCAA GAGAAGGCTT CAGAAGGTGC TTTGGTAGTT ACCTCAAGAG AAGTTGAAGA ACCGTCCATG 2000
 2001 AAGGGTTCGA TGGCCAGAGG AGAGTTACAA TTAGCTGGTC TTGCTGGAGA TCATCCGGAG TCGTCCTATT CTAAGAACGA 2080
 2081 GGAGATAGAG TCTTTAGAGC AGTTTCATAT GGCAACGGCA GATTCGTTAA TTCGTAAGCA GATGAGCTCG ATTGTGTACA 2160
 2161 CGGGTCCGAT TAAAGTTCAG CAAATGAAAA ACTTTATCGA TAGCCTGGTA GCATCACTAT CTGCTGCGGT GTCGAATCTC 2240
 2241 GTCAAGATCC TCAAAGATAC AGCTGCTATT GACCTTGAAA CCCGTCAAAA GTTTGGAGTC TTGGATGTTG CATCTAGGAA 2320
```

도면 5B

```
2321 GTGGTTAATC AAACCAACGG CCAAGAGTCA TGCATGGGGT GTTGTTGAAA CCCACGCGAG GAAGTATCAT GTGGCGCTTT 2400
2401 TGGAATATGA TGAGCAGGGT GTGGTGACAT GCGATGATTG GAGAAGAGTA GCTGTCAGCT CTGAGTCTGT TGTTTATTCC 2480
2481 GACATGGCGA AACTCAGAAC TCTGCGCAGA CTGCTTCGAA ACGGAGAACC CGATGTCAGT AGCGCAAAGG TTGTTCTTGT 2560
2561 GGACGGAGTT CCGGGCTGTG GGAAAACCAA AGAAATTCTT TCCAGGGTTA ATTTTGATGA AGATCTAATT TTAGTACCTG 2640
2641 GGAAGCAAGC CGCGGAAATG ATCAGAAGAC GTGCGAATTC CTCAGGGATT ATTGTGGCCA CGAAGGACAA CGTTAAAACC 2720
2721 GTTGATTCTT TCATGATGAA TTTTGGGAAA AGACACAGCT GTCAGTTCAA GAGGTTATTC ATTGATGAAG GGTTGATGTT 2800
2801 GCATACTGGT TGTGTTAATT TTCTTGTGGC GATGTCATTG TGCGAAATTG CATATGTTTA CGGAGACACA CAGCAGATTC 2880
2881 CATACATCAA TAGAGTTTCA GGATTCCCGT ACCCCGCCCA TTTTGCCAAA TTGGAAGTTG ACGAGGTGGA GACACGCAGA 2960
2961 ACTACTCTCC GTTGTCCAGC CGATGTCACA CATTATCTGA ACAGGAGATA TGAGGGCTTT GTCATGAGCA CTTCTTCGGT 3040
3041 TAAAAAGTCT GTTTCGCAGG AGATGGTCGG CGGAGCCGCC GTGATCAATC CGATCTCAAA ACCCTTGCAT GGCAAGATCC 3120
3121 TGACTTTTAC CCAATCGGAT AAAGAAGCTC TGCTTTCAAG AGGGTATTCA GATGTTCACA CTGTGCATGA AGTGCAAGGC 3200
3201 GAGACATACT CTGATGTTTC ACTAGTTAGG TTAACCCCTA CACCAGTCTC CATCATTGCA GGAGACAGCC CACATGTTTT 3280
3281 GGTCGCATTG TCAAGGCACA CCTGTTCGCT CAAGTACTAC ACTGTTGTTA TGGATCCTTT AGTTAGTATC ATTAGAGATC 3360
3361 TAGAGAAACT TAGCTCGTAC TTGTTAGATA TGTATAAGGT CGATGCAGGA ACACAATAGC AATTACAGAT TGACTCGGTG 3440
3441 TTCAAAGGTT CCAATCTTTT TGTTGCAGCG CCAAAGACTG GTGATATTTC TGATATGCAG TTTTACTATG ATAAGTGTCT 3520
3521 CCCAGGCAAC AGCACCATGA TGAATAATTT TGATGCTGTT ACCATGAGGT TGACTGACAT TTCATTGAAT GTCAAAGATT 3600
3601 GCATATTGGA TATGTCTAAG TCTGTTGCTG CGCCTAAGGA TCAAATCAAA CCACTAATAC CTATGGTACG AACGGCGGCA 3680
3681 GAAATGCCAC GCCAGACTGG ACTATTGGAA AATTTAGTGG CGATGATTAA AAGGAACTTT AACGCACCCG AGTTGTCTGG 3760
3761 CATCATTGAT ATTGAAAATA CTGCATCTTT AGTTGTAGAT AAGTTTTTTG ATAGTTATTT GCTTAAAGAA AAAAGAAAAC 3840
3841 CAAATAAAAA TGTTTCTTTG TTCAGTAGAG AGTCTCTCAA TAGATGGTTA GAAAAGCAGG AACAGGTAAC AATAGGCCAG 3920
3921 CTCGCAGATT TTGATTTTGT AGATTTGCCA GCAGTTGATC AGTACAGACA CATGATTAAA GCACAACCCA AGCAAAAATT 4000
4001 GGACACTTCA ATCCAAACGG AGTACCCGGC TTTGCAGACG ATTGTGTACC ATTCAAAAAA GATCAATGCA ATATTTGGCC 4080
4081 CGTTGTTTAG TGAGCTTACT AGGCAATTAC TGGACAGTGT TGATTCGAGC AGATTTTTGT TTTTCACAAG AAAGACACCA 4160
4161 GCGCAGATTG CGGATTTCTT CGGAGATCTC GACAGTCATG TGCCGATGGA TGTCTTGGAG CTGGATATAT CAAAATACGA 4240
4241 CAAATCTCAG AATGAATTCC ACTGTGCAGT AGAATACGAG ATCTGGCGAA GATTGGGTTT TGAAGACTTC TTGGGAGAAG 4320
4321 TTTGGAAACA AGGGCATAGA AAGACCACCC TCAAGGATTA TACCGCAGGT ATAAAAACTT GCATCTGGTA TCAAAGAAAG 4400
4401 AGCGGGGACG TCACGACGTT CATTGGAAAC ACTGTGATCA TTGCTGCATG TTTGGCCTCG ATGCTTCCGA TGGAGAAAAT 4480
4481 AATCAAAGGA GCCTTTTGCG GTGACGATAG TCTGCTGTAC TTTCCAAAGG GTTGTGAGTT TCCGGATGTG CAACACTCCG 4560
4561 CGAATCTTAT GTGGAATTTT GAAGCAAAAC TGTTTAAAAA ACAGTATGGA TACTTTTGCG GAAGATATGT AATACATCAC 4640
4641 GACAGAGGAT GCATTGTGTA TTACGATCCC CTAAAGTTGA TCTCGAAACT TGGTGCTAAA CACATCAAGG ATTGGGAACA 4720
```

도면 5C

```
4721 CTTGGAGGAG TTCAGAAGGT CTCTTTGTGA TGTTGCTGTT TCGTTGAACA ATTGTGCGTA TTACACACAG TTGGACGACG 4800
4801 CTGTATGGGA GGTTCATAAG ACCGCCCCTC CAGGTTCGTT TGTTTATAAA AGTCTGGTGA AGTATTTGTC TGATAAAGTT 4880
4881 CTTTTTAGAA GTTTGTTTAT AGATGGCTCT AGTTGTTAAA GGAAAAGTGA ATATCAATGA GTTTATCGAC CTGACAAAAA 4960
4961 TGGAGCCGAT CTTACCGTCG ATGTTTACCC CTGTAAAGAG TGTTATGTGT TCCAAAGTTG ATAAAATAAT GGTTCATGAG 5040
5041 AATGAGTCAT TGTCAGAGGT GAACCTTCTT AAAGGAGTTA AGCTTATTGA TAGTGGATAC GTCTGTTTAG CCGGTTTGGT 5120
5121 CGTCACGGGC GAGTGGAACT TGCCTGACAA TTGCAGAGGA GGTGTGAGCG TGTGTCTGGT GGACAAAAGG ATGGAAAGAG 5200
5201 CCGACGAGGC CACTCTCGGA TCTTACTACA CAGCAGCTGC AAAGAAAAGA TTTCAGTTCA AGGTCGTTCC CAATTATGCT 5280
5281 ATAACCACCC AGGACGCGAT GAAAAACGTC TGGCAAGTTT TAGTTAATAT TAGAAATGTG AAGATGTCAG CGGGTTTCTG 5360
5361 TCCGCTTTCT CTGGAGTTTG TGTCGGTGTG TATTGTTTAT AGAAATAATA TAAAATTAGG TTTGAGAGAG AAGATTACAA 5440
5441 ACGTGAGAGA CGGAGGGCCC ATGGAACTTA CAGAAGAAGT CGTTGATGAG TTCATGGAAG ATGTCCCTAT GTCGATCAGG 5520
5521 CTTGCAAAGT TTCGATCTCG AACCGGAAAA AAGAGTGATG TCCGCAAAGG GAAAAATAGT AGTAATGATC GGTCAGTGCC 5600
5601 GAACAAGAAC TATAGAAATG TTAAGGATTT TGGAGGAATG AGTTTTAAAA AGAATAATTT AATCGATGAT GATTCGGAGG 5680
5681 CTACTGTCGC CGAATCGGAT TCGTTTTAAA TACGCTCGAG ATCAATCATC CATCTCCGAA GTGTGTCTGC AGCATGCAGG 5760
5761 TGCTGAACAC CATGGTGAAC AAACACTTCT TGTCCCTTTC GGTCCTCATC GTCCTCCTTG GCCTCTCCTC CAACTTGACA 5840
5841 GCCGGGCAAG TCCTGTTTCA GGGATTCAAC TGGGAGTCGT GGAAGGAGAA TGGCGGGTGG TACAACTTCC TGATGGGCAA 5920
5921 GGTGGACGAC ATCGCCGCAG CCGGCATCAC CCACGTCTGG CTCCCTCCGC CGTCTCACTC TGTCGGAGAG CAAGGCTACA 6000
6001 TGCCTGGGCG GCTGTACGAT CTGGACGCGT CTAAGTACGG CAACGAGGCG CAGCTCAAGT CGCTGATCGA GGCGTTCCAT 6080
6081 GGCAAGGGCG TCCAGGTGAT CGCCGACATC GTCATCAACC ACCGCACGGC GGAGCACAAG GACGGCCGAG GCATCTACTG 6160
6161 CCTCTTCGAG GGCGGGACGC CCGACTCCCG CCTCGACTGG GGCCCGCACA TGATCTGCCG CGACGACCCC TACGGCGATG 6240
6241 GCACCGGCAA CCCGGACACC GGCGCCGACT TCGCCGCCGC GCCGGACATC GACCACCTCA ACAAGCGCGT CCAGCGGGAG 6320
6321 CTCATTGGCT GGCTCGACTG GCTCAAGATG GACATCGGCT TCGACGCGTG GCGCCTCGAC TTCGCCAAGG GCTACTCCGC 6400
6401 CGACATGGCA AAGATCTACA TCGACGCCAC CGAGCCGAGC TTCGCCGTGG CCGAGATATG GACGTCCATG GCGAACGGCG 6480
6481 GGGACGGCAA GCCGAACTAC GACCAGAACG CGCACCGGCA GGAGCTGGTC AACTGGGTCG ATCGTGTCGG CGGCGCCAAC 6560
6561 AGCAACGGCA CGGCGTTCGA CTTCACCACC AAGGGCATCC TCAACGTCGC CGTGGAGGGC GAGCTGTGGC GCCTCCGCGG 6640
6641 CGAGGACGGC AAGGCGCCCG GCATGATCGG GTGGTGGCCG GCCAAGGCGA CGACCTTCGT CGACAACCAC GACACCGGCT 6720
6721 CGACGCAGCA CCTGTGGCCG TTCCCCTCCG ACAAGGTCAT GCAGGGCTAC GCATACATCC TCACCCACCC CGGCAACCCA 6800
6801 TGCATCTTCT ACGACCATTT CTTCGATTGG GGTCTCAAGG AGGAGATCGA GCGCCTGGTG TCAATCAGAA ACCGGCAGGG 6880
6881 GATCCACCCG GCGAGCGAGC TGCGCATCAT GGAAGCTGAC AGCGATCTCT ACCTCGCGGA GATCGATGGC AAGGTGATCA 6960
6961 CAAAGATTGG ACCAAGATAC GACGTCGAAC ACCTCATCCC CGAAGGCTTC CAGGTCGTCG CGCACGGTGA TGGCTACGCA 7040
7041 ATCTGGGAGA AAATCTGACC taggctcgca aagtttcgaa ccaaatcctc aaaaagaggt ccgaaaaata ataataattt 7120
```

도면 5D

```
7121 aggtaaggag cgttcaggcg gaaggcctaa accaaaaagt tttgatgaag ttgaaaaaga gtttgataat ttgattgaag 7200
7201 atgaagccga gacgtcggtc gcggattctg attcgtatta aatatgtctt actcaatcac ttctccatcg caatttgtgt 7280
7281 tttttgtcatc tgtatggcct gaccctatag aattgttaaa cgttttgtaca aattcgttag gtaaccagtt tcaaacacag 7360
7361 caagcaagaa ctactgttca acagcagttc aggaaggtgt ggaaaccttt ccctcagagc accgtcagat ttcctggcga 7440
7441 tgtttataag gtgtacaggt acaatgcagt tttagatcct ctaattactg cgttgctggg ggcttttgat actaggaata 7520
7521 gaataatcga agtagaaaac cagcagagtc cgacaacagc tgaaacgtta gatgctaccc gcaggctaga cgacgctacg 7600
7601 gttgcaattc ggtctgctat aaataattta gttaatgaac tagtaagagg tactggactg tacaatcaga atactttga 7680
7681 aagtatgtct gggttggtct ggacctctgc acctgcatct taaatgcata ggtgctgaaa tataaagttt gtgttctaa 7760
7761 aacacacgtg gtacgtacga taacgtacag tgttttccc tggacttaaa tcgaaggta gtgtcttgga gcgcgcggag 7840
7841 taaacatata tggttcatat atgtccgtag gcacgtaaaa aaagcgaggg attcgaattc cccggaacc cccggttggg 7920
7921 gcccag                                                                              7926
```

< SEQUENCE LISTING
< 110> BIOSOURCE TECHNOLOGIES, INC.
< 120> METHOD FOR RECOVERING PROTEINS FROM THE INTERSTITIAL FLUID OF PLANT TISSUES
< 130> 008010135PC00
< 150> PCT/US 99/18161
< 151> 1998-08-11
< 160> 1
< 170> FastSEQ for Windows Version 3.0
< 210> 1
< 211> 7926
< 212> DNA
< 213> VIRAL
< 400> 1