



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

(45) 공고일자 2014년10월31일  
 (11) 등록번호 10-1457186  
 (24) 등록일자 2014년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)  
 G01N 33/53 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0054954  
 (22) 출원일자 2012년05월23일  
 심사청구일자 2012년05월23일  
 (65) 공개번호 10-2013-0131128  
 (43) 공개일자 2013년12월03일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR101047422 B1\*  
 US20100320086 A1\*  
 Langmuir, 2011.04.19, Vol. 27, No. 8, pp.  
 4867-4872\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 차의과학대학교 산학협력단  
 경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)  
 (72) 발명자  
 고성호  
 경기 성남시 분당구 운중로233번길 18-5, 201호 (판교동)  
 정광희  
 경기 성남시 분당구 서현로 170, A동 2406호 (서현동, 분당풍림아이원플러스오피스텔)  
 김아람  
 서울 은평구 녹번로 45-7, 301호 (녹번동, 금원빌라)  
 (74) 대리인  
 손민

전체 청구항 수 : 총 22 항

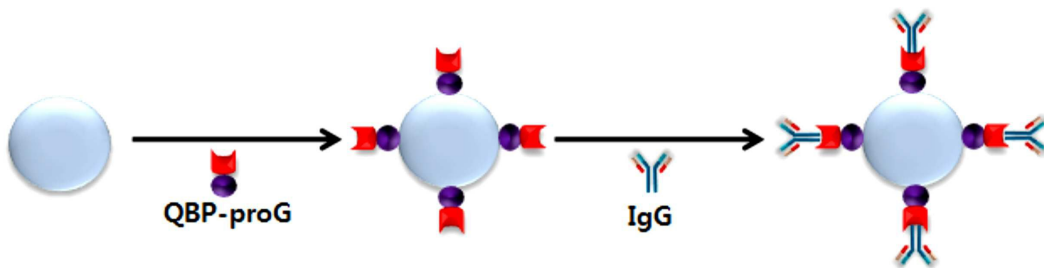
심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 **신규한 단백질 및 이의 용도**

**(57) 요약**

본 발명은 신규한 단백질, 이를 포함하는 바이오센서, 바이오센서의 제작방법, 바이오센서를 이용한 면역검출법, 상기 단백질이 결합된 실리카-함유 고체상에 항체를 결합한 특정 항원 분리정제용 컬럼, 컬럼을 이용한 분리정제 방법과 생체내 약물전달체에 관한 것이다. 본 발명은 실리카에 높은 결합력을 갖는 N-말단과 항체의 Fc 부위에 결합력을 갖는 C-말단으로 이루어진 단백질을 이용하여 생체적합성이 뛰어난 실리카에 항체를 부착시키는 기술을 제공한다. 해당 단백질을 링커로 사용할 경우 부착된 항체는 적절한 배향성을 가질 수 있어 바이오센서로서 높은 항원 검출 민감도를 가지게 되는 효과가 있다. 또한, 단백질을 통해서 실리카-함유 고체상에 다양한 항원에 대한 항체를 결합시킬 수 있어, 항체가 존재하는 각종 항원에 대한 바이오센서, 면역검출법, 분리 또는 정제, 표적특이적 약물전달 및 표적특이적 이미징에 이용될 수 있어 활용될 수 있는 분야가 매우 넓은 효과가 있다.

**대표도** - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012008957

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 스마트 융합단백질과 전극 오염막 형성 저해 기술에 의한 고감도 전기화학식 나노바이오센서 개발

기여율 2/3

주관기관 차의과학대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 111033-03-1-HD110

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발 사업

연구과제명 즉석식품 유통 중 주요 식중독균(*Listeria monocytigenes*)의 신속 검출 시스템 및 식중독균 저감화를 위한 천연복합저해제의 개발

기여율 1/3

주관기관 차의과학대학교

연구기간 2011.08.19 ~ 2012.08.18

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 5의 아미노산 서열로 구성되는 재조합 단백질로서, 상기 단백질은 N-말단은 실리카에 결합할 수 있고, C-말단은 항체의 Fc 부위에 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 단백질.

### 청구항 2

제 1항의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

### 청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드.

### 청구항 4

제 3항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

### 청구항 5

제 4항의 발현벡터로 형질전환된, 인간을 제외한 형질전환체.

### 청구항 6

- a) 제 1항의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터 제조단계;
- b) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체로 형질전환하는 단계; 및
- c) 상기 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 제 1항의 단백질을 제조하는 방법.

### 청구항 7

제 1항의 단백질이 결합된 실리카-함유 고체상을 포함하는 바이오센서.

### 청구항 8

- a) 제 1항의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 숙주세포에 삽입하여 형질전환체를 준비하는 단계;
- b) 상기 형질전환체를 배양하여 제 1항의 단백질을 발현시키는 단계;
- c) 상기 단백질이 발현된 형질전환체를 회수한 다음, 과쇄하여 상기 단백질을 수득하는 단계; 및
- d) 상기 수득한 단백질을 실리카-함유 고체상에 특이적으로 고정시키는 단계를 포함하는 제 7항의 바이오센서 제작방법.

**청구항 9**

제 7항의 바이오센서를 이용한 면역검출법.

**청구항 10**

제 9항에 있어서, 상기 바이오센서의 융합 단백질에 항체를 특이적으로 결합시키는 단계; 및 상기 항체에 특이적인 항원을 처리하여 항원-항체의 특이적 결합을 검출하는 단계를 포함하는 면역검출법.

**청구항 11**

제 1항의 단백질이 결합된 실리카-함유 고체상에 특정 항원에 대한 항체를 결합시킨 해당 특정 항원 분리 또는 정제용 컬럼.

**청구항 12**

제 11항에 있어서, 상기 항원은 독소, 단백질, 세포, DNA 또는 RNA인 컬럼.

**청구항 13**

제 11항의 특정 항원 분리 또는 정제용 컬럼을 이용하여 특정 항원 물질을 분리 또는 정제하는 방법.

**청구항 14**

제 1항의 단백질이 실리카 나노입자에 결합 되어 있고;  
상기 단백질을 통해 표적특이적 결합성을 갖는 항체가 결합 되어 있는;  
내외부에 약물을 함유하는 실리카 나노입자.

**청구항 15**

제 14항에 있어서, 상기 표적특이적 결합성을 갖는 항체는 암세포 특이 항원에 대한 항체인 실리카 나노입자.

**청구항 16**

제 14항에 있어서, 상기 약물은 항암제인 실리카 나노입자.

**청구항 17**

제 14항 내지 제 16항 중 어느 한 항의 실리카 나노입자를 포함하는 약물전달체.

**청구항 18**

제 1항의 단백질이 실리카 나노입자에 결합 되어 있고;  
상기 단백질을 통해 표적특이적 결합성을 갖는 항체가 결합 되어 있는;

내외부에 형광물질을 함유하는 실리카 나노입자.

**청구항 19**

제 18항에 있어서,

상기 표적특이적 결합성을 갖는 항체는 암세포 특이 항원에 대한 항체인 실리카 나노입자.

**청구항 20**

제 18항에 있어서,

상기 형광물질은 fluorescein 계열의 TRITC(Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate), FITC(Fluorescein-5-isothiocyanate), DAPI( 4,6-diamidino-2-phenylindole), 피렌, 프로피디움 요오드화물 및 RITC(Rhodamine isothiocyanate)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 실리카 나노입자.

**청구항 21**

제 1항의 단백질이 실리카 나노입자에 결합 되어 있고;

상기 단백질을 통해 표적특이적 결합성을 갖는 항체가 결합 되어 있는;

내외부에 조영제를 함유하는 실리카 나노입자.

**청구항 22**

제 21항에 있어서,

상기 표적특이적 결합성을 갖는 항체는 암세포 특이 항원에 대한 항체인 실리카 나노입자.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 신규한 단백질, 이를 포함하는 바이오센서, 바이오센서의 제작방법, 바이오센서를 이용한 면역검출법, 상기 단백질이 결합된 실리카-함유 고체상에 항체를 결합한 특정 항원 분리정제용 컬럼, 컬럼을 이용한 분리정제 방법, 생체내 약물전달체 및 이미징 수단에 관한 것이다. 본 발명은 실리카에 높은 결합력을 갖는 N-말단과 항체의 Fc 부위에 결합력을 갖는 C-말단으로 이루어진 단백질을 이용하여 생체적합성이 뛰어난 실리카에 항체를 부착시키는 기술을 제공한다. 해당 단백질을 링커로 사용할 경우 부착된 항체는 적절한 배향성을 가질 수 있어 바이오센서로서 높은 항원 검출 민감도를 가지게 되는 효과가 있다. 또한, 단백질을 통해서 실리카-함유 고체상에 다양한 항원에 대한 항체를 결합시킬 수 있어, 항체가 존재하는 각종 항원에 대한 바이오센서, 면역검출법, 분리 또는 정제, 표적특이적 약물전달 및 표적특이적 이미징에 이용될 수 있어 활용될 수 있는 분야가 매우 넓은 효과가 있다.

**배경기술**

[0002] 항체-항원의 특이적 반응을 기본으로 하는 면역분석법은 고민감도와 고선택성 때문에 광범위하게 사용되는 중요한 기술 중에 하나이다. 이러한 면역분석법에서 항체가 고체 기질 상에 안정적으로 고정화되었을 때, 그 구조 및 기능을 유지할 수 있게 되고 이에 따라 용액 내에 존재하는 여타의 목적 항원을 효과적으로 포획할 수 있다는 연구 결과들이 발표되면서 지난 10년 동안 항체를 비롯한 단백질 고정화 기술은 바이오나노 기술 분야에서

핵심적인 부분을 차지하게 되었다.

[0003] 실리카(SiO<sub>2</sub>)는 생체적합성이 뛰어나 실리카 나노입자와 실리카 기관 및 실리카가 코팅된 자성 나노입자에 항체를 고정시킨 후 항원-항체 특이적 반응 기반 바이오센서 및 생체물질 전달시스템 연구에 광범위하게 사용되고 있다. 일반적으로 생체 분자들을 실리카(SiO<sub>2</sub>)와 같은 무기물 표면에 고정화시키기 위한 전통적인 화학적 방법으로 아민(amine), 리간드 티올(ligand thiol), 알데히드(aldehyde)를 수식화하거나 기능기가 부착된 리간드를 자기조립 단일층(self-assembly monolayer)으로서 형성하는 방식을 사용하여 왔다. 하지만 위의 방법으로 항체가 실리카 표면에 임의로 흡착될 수 있어 항원과 결합하는 활성화 부위가 항원이 있는 용액의 방향으로 향하는 적절한 배향성(orientation)을 유지하지 못할 수 있고 항체의 변성 역시 야기시킬 수 있다. 이러한 결과는, 항체-실리카 반응을 응용하는 분야에서 민감성(sensitivity)과 재현성(reproducibility)을 떨어뜨려 이 방법의 유용성을 감소시키는 문제를 야기하였다. 즉, 상기 방법은 고체 기질 표면에 항체 고정화시 복잡한 단계의 화학적 표면처리 과정이 필요하고, 항체의 배향성 및 기능을 적절히 유지시키지 못하며, 고체 기질 표면에 형성된 자기조립 단일층이 단백질이 고정화되는 동안 안정성이 떨어지는 등의 문제가 발생하는 단점이 있었다 (K. Fujiwara, H. Watarai, H. Itoh, E. Nakahama, N. Ogawa, Anal. Bioanal. Chem. 2006, 386, 639.; T. J. Park, S. Y. Lee, S. J. Lee, J. P. Park, K. S. Yang, K. B. Lee, S. Ko, J. B. Park, T. Kim, S. K. Kim, Y. B. Shin, B. H. Chung, S. J. Ku, D. H. Kim, I. S. Choi, Anal. Chem. 2006, 78, 7197.).

[0004] 최근 무기물 표면으로의 강한 결합 가능성을 갖는 펩타이드가 등장하면서 이들을 링커로서 사용하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 무기물에 직접적으로 결합 가능한 펩타이드는 규조류와 같은 딱딱한 조직을 갖는 유기체로부터 분리해 내거나 무기물과 특이적인 결합을 할 수 있는 세포 표면 단백질을 재조합 분자 기술을 이용하여 선택적으로 획득할 수 있었다. 위와 같은 노력을 통해 갈륨비소(GaAs), 백금(Pt), 금(Au), 산화구리(Cu<sub>2</sub>O), 산화아연(ZnO), 실리카, 은(Ag), 이산화타이타늄(TiO<sub>2</sub>), 불석 등에 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드들이 발견되었으며, 이러한 유전자 조작 펩타이드를 활용한 연구 활동이 활발해 지면서 무기물 표면에 생체 물질의 결합, 조립 및 연결을 위한 링커로서 이용하기 위한 연구에 많은 노력을 기울이고 있다.

[0005] 한편, 실리카 나노입자(silica nanoparticles, Si-NPs)는 다양한 크기, 모양 및 기능을 가진 물질을 포획할 수 있는 훌륭한 호스트로 알려져 있다. 다공성 실리카나노입자는 기공 채널(porous channels)을 가지고 있어서, 채널 내에 외부 물질은 포획할 수 있는 높은 안정성과, 외부 자극에 대한 특이한 반응성 때문에 약물전달 등의 분야에 적용할 수 있다.

[0006] 다공성 실리카 나노입자는 주위 환경에 안정적인 다공성 구조체로서 넓은 표면적을 가지고 있고, 기공크기를 조절할 수 있고, 표면 특성이 알려져 있다. 다공성 실리카 나노입자는 표면 기능화가 용이하기 때문에 최근에는 자극-제어 방출에 적용할 수 있도록 표면을 기능화시킨 다공성 실리카 나노입자에 대한 연구가 이루어지고 있다. 또한, 실리카 나노입자 내부에 형광 물질 또는 자기 공명 조영제 등을 포함하는 실리카 나노입자를 이용한 이미징 기술에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 실리카의 높은 생체적합성과 가공기술의 발전으로 다양한 용도로의 개발이 이루어지고 있는 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 항체를 실리카-함유 고체상에 결합시키기 위한 연결자를 연구하던 중에, 실리카에 강한 결합력을 가지는 N-말단과 항체 Fc 부위에 강한 결합력을 가지는 C-말단으로 구성된 단백질이 실리카-함유 고체상에 결합하는 능력이 우수함을 발견하였다. 해당 단백질을 이용하여 실리카-함유 고체상에 항체를 항체의 배향성을 유지시키며 고정시킴으로써 항원에 대한 민감성이 현저히 향상되었음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명의 목적은 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성되는 단백질로서, 상기 단백질은 N-말단은 실리카에 결합

할 수 있고, C-말단은 항체의 Fc 부위에 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 단백질을 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현백터를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현백터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질이 결합된 실리카-함유 고체상을 포함하는 바이오센서를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질이 결합된 실리카-함유 고체상을 포함하는 바이오센서의 제작방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오센서를 이용한 면역검출법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질이 결합된 실리카-함유 고체상에 특정 항원에 대한 항체를 결합한 특정 항원 분리 또는 정제용 컬럼을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 특정 항원 분리 또는 정제용 컬럼을 이용하여 특정 항원 물질을 분리 또는 정제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질과 결합하고; 표적특이적 결합성을 갖는 항체를 결합시키며; 내외부에 약물을 함유하는 실리카 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질과 결합하고; 표적특이적 결합성을 갖는 항체를 결합시키며; 내외부에 형광물질을 함유하는 실리카 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질과 결합하고; 표적특이적 결합성을 갖는 항체를 결합시키며; 내외부에 조영제를 함유하는 실리카 나노입자를 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0021] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성되는 단백질로서, 상기 단백질은 N-말단은 실리카에 결합할 수 있고, C-말단은 항체의 Fc 부위에 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 단백질을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 신규한 단백질은 바이오센서의 실리카-함유 고체상과 항체를 연결시키는 연결자로서 역할을 한다. 상기 단백질은 기원이 다른 두 개 이상의 이종 단백질의 일부 또는 전부가 연결 또는 결합된 융합 단백질을 의미한다. 이와 같은 융합 단백질은 하나의 벡터 내에서 재조합 형태로 제작되거나, 각기 서로 다른 벡터에서 항체의 Fc 부위에 결합하는 단백질 및 실리카 결합 단백질을 발현시킨 후, 효소나 화학적 방법에 의해 결합하여 제작될 수 있다. 본 발명의 목적상 바람직하게는 하나의 벡터에서 발현시킬 수 있다.
- [0023] 상기 단백질은 실리카와 결합하는 특성을 갖는 N-말단과 항체의 Fc 부위와 결합할 수 있는 단백질 G의 기능을 갖는 C-말단으로 이루어진바, 기능적인 면을 반영하여 단백질을 SBP-protein G와 같이 나타낼 수 있다.
- [0024] 본 발명의 단백질은 항체와의 특이적 결합 효율성을 향상시키기 위하여 실리카 결합 단백질 및 항체의 Fc 부위에 결합하는 단백질을 연결한 융합 단백질로서, 바람직하게는 도 2에 도시한 바와 같이, 항체의 Fc 부위에 결합하는 단백질(도 2의 protein G)의 5-말단에 실리카결합 단백질(SBP)의 3-말단을 연결할 수 있다(도 2). 이와 같은 연결은 항체의 항원과 결합하는 활성화 부위가 항원이 있는 용액의 방향으로 향하도록 하는 적절한 배향성을 줄 수 있게 한다.
- [0025] 본 발명의 항체의 Fc 부위에 결합하는 단백질은 항체의 Fc 부위에 결합하는 활성을 가진 단백질로서, 이러한 활성을 가진 단백질, 펩티드는 제한 없이 사용할 수 있다. 바람직하게는 단백질 G 또는 단백질 A일 수 있고, 보다 바람직하게는 서열번호 3의 단백질 G일 수 있다.

[0026] 단백질 G : 서열번호3

[0027] L K G E T T T E A V D A A T A E K V F K Q Y A N D N G V D G E W T Y D D A T K T F T V T E K P E V I D  
 A S E L T P A V T T Y K L V I N G K T L K G E T T T E A V D A A T A E K V F K Q Y A N D N G V D G E W  
 T Y D D A T K T F T V T E K P E V I D A S E L T P A V T T Y K L V I N G K T L K G E T T T K A V D A E  
 T A E K A F K Q Y A N D N G V D G V W T Y D D A T K T F T V T E L E H H H H H H

[0028] 단백질 G는 그룹 G 스트렙토코카이(streptococci)에서 분리된 박테리아 세포막 단백질(cell wall protein)로서, 포유동물 항체의 Fc 부위 및 Fab 부위와 결합하는 것으로 알려져 있다(J. Immunol. Methods 1988, 112,113-120). 그러나, 단백질 G는 항체의 Fc 부위에 대한 결합력이 Fab 부위에 대한 결합력보다 약 10배 정도 높다고 알려져 있다. 또한, 단백질 G와 유사하게 항체 Fc 부위에 결합하는 특성을 갖는 단백질 A는 rat, sheep, goat, 및 horse에서 만든 항체에는 미약하게 결합하는 것에 비해, 단백질 G는 이들 항체에 많은 양으로 강하게 결합한다.

[0029] 본 발명에 있어서, 단백질 G는 그 기원이 특별히 제한되지 아니하며, 항체의 Fc 부위와의 결합력을 보유하는 한 천연형의 단백질 G에 아미노산이 결실, 부가, 치환 등이 일어난 단백질 G 유도체도 본 발명의 목적에 부합되게 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 실리카결합 단백질(silica binding protein, SBP)은 실리카-함유 고체상에 결합하는 활성을 가진 단백질로서, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 실리카결합 단백질 일 수 있다.

[0031] 실리카결합 단백질 : 서열번호 1

[0032] P P P W L P Y M P P W S

[0033] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 배양하여 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 실리카결합 부위과 항체의 Fc 부위에 결합하는 단백질이 연결된 신규한 단백질을 코딩하는 DNA, RNA 등의 폴리뉴클레오티드로서, 바람직하게는 서열번호 6의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 일 수 있다.

[0035] SBP-protein G : 서열번호 6

[0036] ccacctccttggctaccatacatgccgcttggctcttgaaggcgaaacaactactgaagctgttgatgctgctactgcagaaaaagtcttcaacaat ac  
 gctaacgacaacggtgttgacggtgaatggacttacgacgatgcgactaagaccttacagttactgaaaaccagaagtgatcgatgcgctctgaat taaca  
 ccagccgtgacaacttacaacttgttat taatggtaaaacattgaaaggcgaaacaactactgaagctgttgatgctgctactgcagaaaaagtcttcaaa  
 caatagctaacgacaacggtgttgacggtgaatggacttacgacgatgcgactaagaccttacagttactgaaaaccagaagtgatcgatgcgctctgaa  
 ttaacaccagccgtgacaacttacaacttgttat taatggtaaaacattgaaaggcgaaacaactactaaagcagtagacgcagaaactgcagaaaaagcc  
 t tcaacaat acgctaacgacaacggtgttgatggtgtttggacttatgatgatgcgactaagaccttacggt aactgaactcgagcaccaccaccaccac  
 cactga

[0037] 발현벡터는 본 발명의 신규 단백질을 발현시키는 형질전환체를 만들기 위하여 숙주세포에 DNA를 도입하여 상기 단백질을 발현시키기 위한 수단으로서, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 등이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 플라스미드 벡터를 사용할 수 있다. 본 발명의 목적상 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서 같은 발현조절 엘리먼트를 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 실시예에서는 실리카결합 부위과 단백질 G이 연결된 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 발현백



터 pET-SBP-protein G를 제조하였다(실시예 3). 본 발명의 신규 단백질의 분리를 편하게 하기 위하여 N-말단에 단백질 정제를 위한 태그를 포함할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 헥사 히스티딘(6His)을 N-말단에 결합시켰으나, 본 발명의 목적상 단백질 정제를 위한 태그는 공지된 태그를 제한 없이 사용할 수 있다.

- [0039] 형질전환체는 본 발명의 융합 단백질을 발현할 수 있는 대장균(E.coli), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis) 등의 임의의 숙주세포를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 대장균을 사용할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 단백질은 펩티드 합성법에 의해 제조할 수도 있으나, 유전공학적 방법에 의해 특히 효율적으로 제조할 수 있다. 유전공학적 방법은 유전자조작에 의해 원하는 단백질을 대장균(E.coli) 등의 숙주세포에서 다량으로 발현시키는 방법이다.
- [0041] 본 발명의 유전자 서열은 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들 조합에 의해 용이하게 변형될 수 있다. 따라서, 서열번호 5와 높은 상동성을 갖는 DNA 또는 단백질, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상의 높은 상동성을 갖는 DNA와 단백질도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [0042] 본 발명의 신규한 단백질은 a) 본 발명의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터 제조단계; b) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체로 형질전환하는 단계; 및 c) 상기 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 제 1항 또는 제 2항의 단백질을 생산하는 방법을 통하여 제조할 수 있다.
- [0043] 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환하는 방법은 바람직하게 본 발명의 DNA를 포함하는 발현 벡터를 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation) 등의 공지 방법으로 숙주세포에 도입하여 형질전환시킬 수 있다.
- [0044] 형질전환체를 배양하여 본 발명의 융합 단백질을 생산하기 위한 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있는데, 예를 들면, 대장균을 키우는 일반적인 조건인 37°C, 호기조건, LB 배지에서 수행할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 실시예를 보면, 대장균 BL21(DE3)을 컴피턴트 세포로 제작한 후 발현벡터 pET-SBP-protein G로 형질전환하여 SBP-protein G를 발현시켰다(실시예 1-3).
- [0046] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서, 단백질이 결합된 실리카 함유 고체상을 포함하는 바이오센서 및 바이오센서의 제조방법을 제공한다.
- [0047] 본 발명에 따른 신규한 단백질은 실리카결합 부위와 단백질 G가 연결된 형태로서, 여기서 본 발명에 따른 상기 실리카결합 부위는 12개의 아미노산으로 이루어져 있으며 실리카에 선택적으로 결합할 수 있다. 상기 단백질의 단백질 G는 다른 단백질과 달리 항체의 Fc 부위에 특이적으로 결합한다.
- [0048] 따라서, 본 발명에 따른 융합 단백질에 실리카결합 단백질 부분은 실리카-함유 고체상에 선택적으로 결합하고, 단백질 G 부분은 항체의 Fc 부위에 특이적으로 결합하므로, 이를 이용하는 경우, 실리카-함유 고체상에 선택적으로 결합하면서, 항체의 Fc 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 바이오센서를 제공할 수 있게 된다.
- [0049] 이로써 상기 바이오센서는, 상기 융합 단백질이 실리카-함유 고체상에 결합되며, 또한 항체의 Fc 부위에 결합하여 항원이 결합하는 활성화 부분인 Fab 부분이 용액의 방향으로 향하는 적절한 배향성을 유지할 수 있게 됨으로써, 항체-실리카 반응을 응용하는 면역분석 분야에서 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 배향성으로 인해 항체의 항원과 결합하는 활성화 부위가 효율적으로 항원과 반응할 수 있다.
- [0050] 바이오센서(biosensor)는 생물이 가지고 있는 기능을 이용하여 물질의 성질 등을 조사하는 기계로서, 효소 분석법과 면역 분석법에 사용하는 바이오센서, 광학적 바이오센서와 전기화학적 바이오센서 등이 있으며, 본 발명의 바이오센서는 샘플 주입, 혼성화 반응과 검출 등 실험의 전 과정을 하나의 작은 칩으로 자동적으로 처리하는 랩 온어칩(lab-on-a-chip)일 수 있다.

- [0051] 또한, 본 발명의 바이오센서는 바람직하게는 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)을 이용한 바이오센서일 수 있다. 표면 플라즈몬 공명을 이용하는 바이오센서는 정성적인 정보(두 분자들이 특이적으로 결합을 하는지)와 정량적인 정보(반응 속도, Kinetics와 평형상수, equilibrium constants)를 제공할 뿐만 아니라 형광으로 표지할 필요 없이 실시간으로 감지할 수 있어, 항원과 항체 결합을 측정하는데 특히 유용하다.
- [0052] 본 발명의 실리카-함유 고체상은 바람직하게는 실리카 비드, 실리카 입자, 실리카코팅 입자 및 실리카가 도포된 기관으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 바이오센서는 용합 단백질을 이용하여 다른 생물학적 활성에 영향을 주지 않으면서 강력하게 항체를 실리카-함유 고체상에 고정시킬 수 있다.
- [0054] 본 발명의 바이오센서는 a) 본 발명의 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현백터를 숙주세포에 삽입하여 형질전환체를 준비하는 단계; b) 상기 형질전환체를 배양하여 상기 단백질을 발현시키는 단계; c) 상기 단백질이 발현된 형질전환체를 회수한 다음, 파쇄하여 상기 단백질을 수득하는 단계; 및 d) 상기 수득한 단백질을 실리카-함유 고체상에 특이적으로 고정시키는 단계를 통하여 제조할 수 있다.
- [0055]
- [0056] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 바이오센서를 이용한 면역검출법을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 바이오센서에는 항체가 결합되어 있으므로 상기 항체에 특이적으로 결합하는 항원을 검출할 수 있다. 항원-항체의 특이적 결합을 확인하는 것을 특징으로 하는 면역검출법은 가시적(visually), 광학적(optically), 전기화학적(electrochemically) 방법을 통해 수행할 수 있으며, 특히, 광학적 방법의 한 예로 표면플라즈몬공명 (SPR) 기술을 들 수 있다. 본 발명의 면역분석법은 바람직하게는 표면 플라즈몬 공명 방법을 사용할 수 있다. 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR)은 전반사(attenuated total reflectance)에 의한 표면 플라즈몬 공명 현상을 이용하는 것으로, 전류 또는 기계적 변화를 이용하는 검출 시스템과 비교하였을 때, 용매의 흐름이나 전기적 잡음에 의해 방해받지 않기 때문에 안정된 신호를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다.
- [0058] 본 발명의 면역검출법은 a) 바이오센서의 용합 단백질에 항체를 특이적으로 결합시키는 단계; 및 b) 상기 항체에 특이적인 항원을 처리하여 항원-항체의 특이적 결합을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 용합 단백질을 포함하는 바이오센서를 이용한 면역분석은 단백질이 항체와 결합하는 빈도가 현저히 향상되었기 때문에, 고가인 항체의 손실 없이 용합 단백질에 결합된 항체에 반응시키고자 하는 항원을 처리하고, 표면 플라즈몬 공명 신호의 변화를 측정함으로써 항원-항체의 특이적 결합을 검출할 수 있는 이점이 있다.
- [0060] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 용합 단백질이 결합된 실리카-함유 고체상에 특정 항원에 대한 항체를 결합시킨 특정 항원 분리정제용 컬럼을 제공한다.
- [0061] 본 발명에서 용어, 분리정제는 어떤 물질을 혼재해 있는 불순물로부터 분리하여, 다른 불순물을 제거하여 순도를 높이는 조작을 의미하며, 본 발명의 목적상 부착한 항체에 따라, 해당 항체가 특이적으로 결합하는 항원을 액체에 혼재해 있는 불순물로부터 검출하는 방법을 통해 이뤄질 수 있다. 상기 불순물은 정제의 과정에서 목적 물질 이외에 섞여있는 물질로서, 본 발명에서는 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 숙주세포 단백질(HCP), 숙주세포 단백질(HCP), 숙주세포 유래 DNA(HCD) 및 세포생장을 위한 인자 등을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 본 발명에서 주로 제거하고자 하는 불순물은 숙주세포 단백질일 수 있다. 상기 불순물의 제거는 품질 조절의 목적을 포함한다.
- [0062] 본 발명에서 용어, 컬럼은 물질의 각종 물리화학적 특성을 이용해 혼합물을 분리하거나 정제하는 수단이다. 구체적으로, 물질의 친수성이나 소수성 정도 또는 분자의 전위, 특정 물질의 결합력 여부 등에 따라 컬럼을 특정 비드로 채워 혼합물로부터 물질을 분리하는 기구이다.
- [0063] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 단백질이 결합된 실리카-함유 고체상에 특정 항원에 대한 항체를 결합시킨 특정 항원 분리정제용 컬럼을 이용한 특정 항원 물질의 분리 또는 정제 방법을 제공한다.

- [0064] 본 발명은 항체의 Fc 부위에 결합하는 protein G를 이용하기 때문에 다양한 항체를 컬럼 비드에 부착시킬 수 있다는 특징이 있다. 따라서, 항체가 존재하는 각종 항원을 분리 또는 정제할 수 있는 장점을 가지고 있다. 특히, protein G와 유사하게 항체 Fc 부위에 결합하는 특성을 갖는 protein A는 rat, sheep, goat, 및 horse에서 만든 항체에는 미약하게 결합하는 것에 비해, Protein G는 이들 항체에 많은 양으로 강하게 결합한다. 따라서, Fc 부위에 결합하는 기능은 비슷하지만 사용할 수 있는 항체의 범위에서 큰 차이를 가지고 있다.
- [0065] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 단백질과 결합하고; 표적특이적 결합성을 갖는 항체를 결합시키며; 내외부에 약물을 함유하는 실리카 나노입자를 제공한다.
- [0066] 본 발명에서 용어 "표적특이"는 인간 또는 동물의 생체 내 존재하는 각종 표적 또는 조직에 있어서, 해당 표적 또는 조직에 특징적으로 갖는 성질을 말한다. 해당 성질은 단백질이나 세포의 크기, 모양 같은 물리적 특징 뿐 아니라 특정 유전자 발현 여부나 발현 정도, modification 여부, 세포 내 위치 등 생리화학적 특징을 포함한다. 또한, 해당 표적 또는 조직은 정상적으로 인체를 구성하는 뇌조직이나 횡장조직에 있는 것 뿐 아니라 암세포 조직과 같은 비정상적인 조직등에 있는 표적이나 조직도 포함한다.
- [0067] 본 발명에서 용어 "표적특이적 결합성"은 생체 내 각 표적의 특성에 따라 어떤 물질이 해당 표적에 결합하는 능력을 말한다. 본 발명에서는 주로 세포의 표적특이적 표면 항원을 표적으로 인식한 항체의 결합능력을 말한다. 특히, 암세포의 특이적 표면 항원, 예를 들어, CD20이나 Her2등의 항원에 대해 결합성을 갖는 항체가 암세포에 특이적으로 결합하는 능력을 포함한다.
- [0068] 본 발명에서 용어 "약물"은 특정 질환의 증상을 완화시키거나 병인을 제거하거나 예방하는 물질로서, 본 발명에서는 결합된 항체가 인식하는 조직과 관련된 질환에 대한 약물을 말한다. 특히, 암세포에 특이적 결합하는 항체를 이용하는 경우 해당 약물은 항암제를 포함한다.
- [0069] 본 발명에서 용어 "실리카 나노입자"는 생체적합성이 뛰어난 실리카 재질로 이루어진 최소 1-100nm의 크기의 입자를 뜻한다. 본 발명에서 실리카 나노입자는 다공성으로 실리카 내부에 다양한 물질을 포함하고 이를 표적특이적 항체를 통해 특정 표적이 존재하는 조직에 밀집하게 되는 성질을 포함한다.
- [0070] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 단백질과 결합하고; 표적특이적 결합성을 갖는 항체를 결합시키며; 내외부에 형광물질을 함유하는 실리카 나노입자를 제공한다.
- [0071] 본 발명에 있어서 용어 "형광물질"은 특정 파장을 쬐었을 때 고유의 파장의 빛을 방출하는 물질로서, 구체적으로는 fluorescein 계열의 TRITC(Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate), FITC(Fluorescein-5-isothiocyanate), DAPI( 4,6-diamidino-2-phenylindole), 피렌, 프로피디움 요오드화물 또는 RITC(Rhodamine isothiocyanate)이 될 수 있다. 본 발명에서는 실리카 나노입자의 내외부에 함유되어 특정 조직에 밀집되어 고유 파장의 빛을 방출하는 성질을 포함한다.
- [0072] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 단백질과 결합하고; 표적특이적 결합성을 갖는 항체를 결합시키며; 내외부에 조영제를 함유하는 실리카 나노입자를 제공한다.
- [0073] 본 발명에 있어서 용어 "조영제"는 특정 파장을 쬐었을 때 양성적으로 또는 음성적으로 광학적 특성을 보이는 물질로, 구체적으로는 자기공명영상 촬영이나 컴퓨터 단층촬영, 또는 혈관조영술 등에 사용되며 각 조직의 X선 흡수차를 인위적으로 크게함으로써 영상의 대조도를 크게 해주는 약품이다. 본 발명에서 조영제는 요오드 함유 조영제, 황산 바륨, 공기, 가스, 탄산 가스 등을 포함한다.

**발명의 효과**

- [0074] 본 발명에 따른 융합 단백질은 간단한 과정만으로 항체를 적절한 배향성을 가진 상태로 실리카-함유 고체상에 고정시킬 수 있어 항원와의 결합성을 높여 줌으로써 바이오센서의 항원에 대한 검출 민감도 증가를 유도할 수 있는 효과가 있다. 또한, 다양한 항원-항체 반응을 통한 컬럼, 바이오센서, 약물전달체 등 적용 기기에서 배향성을 줄 수 있는 구성요소로 제공될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0075] 도 1은 SBP와 protein G를 융합한 단백질을 실리카 비드와 결합시킨 모식도이다.
- 도 2는 6His-protein G 단백질에 SBP를 삽입한 염기서열과 이에 사용된 primer의 위치를 보여주는 모식도이다.
- 도 3은 SBP-ProG의 염기 서열이 올바르게 증폭되었는지 확인하고자 아가로스겔에 전기영동한 결과로, 약 639bp의 밴드를 확인하였다.
- 도 4는 도 3에서 확인된 SBP-ProG를 아가로스겔에서 elution하여 pET 22b 벡터에 ligation한 결과 제작된 발현 벡터 및 해당 발현벡터를 대장균에 형질전환시켜 SBP-ProG 단백질을 생산하는 방법의 모식도이다.
- 도 5는 해당 벡터에 SBP-protein G의 삽입 여부를 확인하기 위해 NdeI/XhoI 제한효소를 사용하여 digestion한 후 전기영동한 사진이다. 약 639bp정도에서 밴드를 확인하였다.
- 도 6은 실리카 표면에 아무런 화학적 처리도 없는 상태에서 SBP의 특이적 결합 정도를 확인하기 위하여 FITC가 표지된 단백질 G 또는 SBP-ProG (FITC-ProG 또는 FITC-SBP-ProG)를 실리카 나노비드에 반응시켜 형광 세기를 측정관 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 신규한 단백질의 단백질 G 부위의 항체 Fc 부위 특이적 결합을 하는 지에 대한 확인을 위해 FITC-IgG와 실리카비드/SBP-ProG의 특이적 결합에 의한 형광세기를 보인 도이다.
- 도 8은 FITC-ProG 와 FITC-SBP-ProG를 실리카 슬라이드 고체 기판에 결합시켜 결합 정도를 보인 도이다.
- 도 9는 실리카 슬라이드 표면에 결합한 SBP-ProG 단백질과 ProG 층 각각에 500 µg/mL FITC-IgG(5 µL)를 결합시켜 결합 정도를 보인 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0076] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0077] **실시예 1. 실리카 및 항체 Fc 부위와 결합할 수 있는 신규한 단백질 제조**

[0078] **실시예 1-1. 실리카 및 항체 Fc 부위와 결합할 수 있는 신규한 단백질의 발현벡터 제작**

[0079] 본 발명가들은 이전 본 연구진이 보유하고 있던 pET22b/ProG 발현벡터에서 6개의 His와 단백질 G의 N-말단 사이에 서열번호 1의 실리카 결합 단백질을 삽입하였다. SBP를 삽입하기 위해 3개의 프라이머(서열번호 7 내지 9)를 제작하였다. 해당 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 최종적으로 6His-SBP와 단백질 G가 융합된 형태의 유전자 산물 6His-SBP-protein G를 수득하였다(도 2). PCR 조건으로 첫 번째 변성(denaturation)은 95℃에서 5분간 한번 하였으며, 이후 두 번째 변성은 95℃에서 30초간, 교잡(annealing)은 65℃에서 30초간, 연장(extension)은 72℃에서 40초간 수행하였으며 이를 40회 반복하였다. 이후 72℃에서 5분간 마지막 연장을 한번 더 수행하였다. PCR 반응이 끝난 후에는 4℃에서 보관되도록 하였다 (표 1).

**표 1**

SBP-ProG 합성을 위한 PCR 조건

[0080]

PCR condition			
Pre-denaturation	95℃	5 min	40 cycle
Denaturation	95℃	30 sec	
Anneling	65℃	30 sec	
Extension	72℃	40 sec	
Final extention	72℃	5 min	
	4℃		

- [0081] PCR mixture는 template 1 $\mu$ L, 10mM dNTPs 0.4 $\mu$ L, 프라이머 10pmol 1 $\mu$ L씩, 10X buffer 2 $\mu$ L, taq polymerase(Takara LA taq) 0.2 $\mu$ L, 나머지를 D.W.로 채워 총 부피를 20 $\mu$ L으로 넣어 주었다. 상기 표 1의 PCR 조건으로 PCR을 수행하였고, SBP-ProG의 염기 서열이 올바르게 증폭되었는지 확인하고자 아가로스겔에 전기영동 하였다. 그 결과 약 639bp의 밴드를 확인할 수 있었다(도 3). 위 그림 3에서 확인된 SBP-ProG를 아가로스겔에서 elution하여 pET 22b 벡터에 ligation하였다(도 4).
- [0082] 상기 벡터에 DNA의 삽입 여부를 확인하고자 NdeI/XhoI 제한효소(NEB)를 사용하여 digestion을 수행하였다. Enzyme cutting mixture는 DNA 10 $\mu$ L, enzyme 0.5 $\mu$ L, 10Xbuffer 2 $\mu$ L, D.W를 총 부피 20 $\mu$ L되도록 채워 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation한 뒤 바로 ice에 넣어 아가로스겔에 전기영동하여 약 639bp정도에서 밴드를 확인하였다(도 5).
- [0083] **실시예 1-2. 신규 단백질인 SBP-ProG의 발현 형질전환체 제작**
- [0084] SBP-ProG의 발현벡터를 DH5 cell을 이용하여 cloning 하였다. 1.5mL epitube에 DH5 competent cell(cp) 50 $\mu$ L와 pET-6His-SBP-ProG 1 $\mu$ L를 넣고 45분간 ice에서 incubation하였다. 42 $^{\circ}$ C heat shock을 20초간 주어 형질전환하고 바로 ice에 넣어둔다. 1분이 지나면 LB 800 $\mu$ L을 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 incubation한 뒤 amp, IPTG, Xgal이 함유된 LB plate에 50 $\mu$ L을 37 $^{\circ}$ C에서 overnight 키웠다. White colony를 따서 용액상태의 LB배지에서 밤새 키운 후 preparation kit을 사용하여 DNA를 추출하였다.
- [0085] 상기 DNA를 BL21(DE3) cp cell에 주입하여 형질전환체를 제작하였다. 구체적으로는, 농도가 1 $\mu$ g/mL인 발현벡터(in TE buffer)를 100 $\mu$ L cp cell에 넣고 resuspention한 뒤 얼음에 30분간 배양하고, 30초간 42 $^{\circ}$ C 진탕기에서 heat shock을 주었다. 이 후 바로 얼음에 2~3분간 놓아두었다. 액체 LB배지 900 $\mu$ L을 넣고 200rpm 37 $^{\circ}$ C 조건으로 1시간 shaking incubation을 한 뒤 ampicillin(100mg/L)을 포함한 LB plate에 깔아준다. 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 밤새 배양하였다. 형성된 colony를 LA(ampicillin을 포함하고 있는 LB배지)배지 10mL에서 37 $^{\circ}$ C 밤새 배양한 후, 1mL은 DNA 추출하여 plasmid가 cell내에 성공적으로 삽입되었는지를 확인하였다. 나머지는 단백질 정제를 위해 70% glycerol에 cell stock으로 만들어 deep freezer에 보관하였다.
- [0086] **실시예 1-3. SBP-ProG 단백질 정제**
- [0087] Cell stock 200L을 LA배지 5에 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 250rpm으로 shaking 배양한 후 800 $\mu$ L씩 4개의 신선한 50mL LA배지에 분주하였다. 이를 spectrophotometer 600nm에서 O.D 0.6이 나올 때까지 배양한 후 1mM IPTG(isopropylthiogalactoside)를 첨가하여 shaking 배양을(270rpm 37 $^{\circ}$ C 3hr)하면서 융합 단백질을 발현시켰다. 다음으로 cell과 배지를 50mL falcon tube로 옮겨 원심분리(4000g, 4 $^{\circ}$ C, 30min)하여 상등액을 제거하고, 액체 질소를 이용하여 급속 냉각시켜 deep freezer에 보관하였다.
- [0088] 융합 단백질의 정제는 NiNTA His Bind Resins(Novagen,USA)이용하였다. 보관한 sample은 정제 전에 꺼내어 약 15분간 얼음에 넣어둔 뒤 1x Ni NTA bind buffer(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8.0; 300mM NaCl; 10mM imidazole) 각 1.5mL을 넣어 resuspension 한 뒤, 15mL falcon tube로 sample을 옮겨 lysozyme을 1mg/mL이 되도록 넣어 30min간 얼음에 incubation하였다. 다음으로 10초간 sonication, 10초간 ice incubation하여 총 25분간 초음파처리(sonication)한다. 다음으로 원심분리(10,000g, 4 $^{\circ}$ C, 30min)를 실시하여 상등액을 취하였다. 초음파 처리를 하는 동안 50% NiNTA HisBind slurry 1mL을 4mL 1X NiNTA Bind Buffer와 섞어 준 뒤, 중력에 의해 slurry와 buffer가 분리되도록 하여 상층액 4mL 제거하였다. 초음파분쇄한 샘플을 slurry와 4 $^{\circ}$ C에서 shaking incubation을 한시간 동안 진행하였다. Slurry에 charge에 의해 결합되어진 단백질 샘플들을 정제하기 위해 column에 slurry/단백질을 loading하여 버퍼를 제거하였다. 그 후, 4mL 1X NiNTA Wash Buffer(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8.0; 300mM NaCl; 80mM imidazole)를 두 번 흘려 SBP-ProG 외에 잔류하는 단백질 및 불순물을 제거하였다. 마지막으로 0.5 mL 1X NiNTA Elution buffer(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8.0; 300mM NaCl; 200mM imidazole)를 4번에 걸쳐 column에 흘려 주면서 SBP-ProG를 정제하였다. 정제된 단백질은 모두 SDS-PAGE로 확인한 뒤 centricon(>10kDa)으로 농축하여 PBS 버퍼에 희석한 다음 -72 $^{\circ}$ C 냉동보관 하였다.



[0089] **2. 신규한 단백질의 기능 분석**

[0090] 신규한 단백질의 기능 확인 실험에 앞서 ProG, SBP-ProG, Immunoglobulin G(IgG)를 AnaTag™ 5-FITC Protein Labeling Kit(ANASPEC,USA)을 이용하여 형광 표지 하였다.

[0091] **2-1. SBP-ProG와 실리카 비드와의 결합 확인**

[0092] 실리카 표면에 아무런 화학적 처리도 없는 상태에서 SBP의 특이적 결합 정도를 확인하기 위하여 FITC가 표지된 ProG 또는 SBP-ProG (FITC-ProG 또는 FITC-SBP-ProG)를 실리카 나노비드에 반응시켜 형광 세기를 측정하였다. 120 μL의 D.W.(증류수)에 100nm 크기의 실리카 비드 15 μL 넣어 vortexing 한 뒤 17000rpm, 4℃, 30min 조건으로 원심 분리하였다. 다음으로 상층액을 제거하고 PBS 100 μL를 넣어 고르게 분포하도록 초음파처리(sonication) 및 vortexing을 충분히 가해 주었다. 그 뒤 500 μg/mL의 농도로 PBS 버퍼에 희석해 놓은 FITC-ProG 또는 FITC-SBP-ProG를 20 μL씩 넣어 실온에서 20분 동안 반응시키고 위와 같은 조건으로 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS 버퍼 100 μL 넣어 초음파처리 및 vortexing하였다(원심분리는 3 반복 실시함). 최종적으로 Nikon C1si Laser Confocal Microscope(Nikon, Tokyo)을 통해 형광세기를 측정하였다. 도 6에서 보듯, 실리카 나노비드에 FITC-ProG를 반응시켰을 때 보다 FITC-SBP-ProG를 반응시켰을 때 3.2배 높은 형광세기를 보였다. 이는 본 발명의 신규한 단백질이 N 말단 부위에 의해서 실리카 나노비드 표면에 효과적으로 결합할 수 있음을 보여준다.

[0093] **2-2. 실리카비드/SBP-ProG 복합체의 항체와의 결합력 확인**

[0094] 위 실험을 통해 본 발명의 신규한 단백질에서 N 말단 부위가 실리카 비드 표면에 단백질의 특이적 결합에 직접적으로 관여한다는 것을 확인한 다음, 단백질의 C말단에 존재하는 단백질 G 부위가 항체의 Fc부위에 특이적 결합을 성공적으로 하는지에 대한 확인 실험을 수행하였다.

[0095] 위 실험과 같이 실리카 나노비드(100 nm)에 ProG 또는 SBP-ProG를 반응시켜 실리카비드/SBP-ProG 및 실리카비드/ProG 복합체를 만들었다.

[0096] 그 다음 1% BSA 20L 넣어 30분간 실온에서 반응시켜 반응하지 않은 실리카 비드 표면을 blocking 한 후 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 다양한 농도의 FITC-IgG(10, 100, 250, 500, 1000 μg/mL) 10μL를 각각 30분간 반응시킨 후 30분 간 원심분리(10000rpm, 4℃) 하여 상층액을 제거하였다 (원심분리와 상층액 제거 2 반복). 그 후 PBS 버퍼를 100 μL 넣고 최종적으로 Nikon C1si Laser Confocal Microscope(Nikon, Tokyo)을 통해 형광세기를 측정하였다.

[0097] 도 7의 결과를 보면, FITC-IgG와 실리카비드/SBP-ProG의 특이적 결합에 의한 형광세기는 실리카비드/ProG와 FITC-IgG 반응의 형광세기 보다 모든 농도에서 높았고, FITC-IgG의 농도가 올라감으로써 형광의 세기가 높아짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 본 발명의 신규한 단백질이 N-말단 부위에 의해서 효과적으로 실리카 나노비드 표면에 결합하였고 단백질의 C-말단의 단백질 G 부위 또한 항체 Fc부위와의 특이적 결합 기능이 소실되지 않았음을 의미한다. 따라서 본 발명의 단백질이 실리카 표면에 어떠한 화학적 처리 없이 신속하고 간단히 배향성을 가지면서 고정화 시킬 수 있는 효율적인 생체 연결자임을 보여준다.

[0098] **2-3. 실리카 슬라이드 고체 기판에서 신규한 단백질의 결합 기능 확인**

[0099] 본 발명의 신규한 단백질의 결합 기능을 실리카 나노비드 뿐만 아니라 실리카 슬라이드 고체 기판에도 확인하였다. 실리카 슬라이드에 1mg/mL 농도의 FITC-ProG 와 FITC-SBP-ProG를 20 분간 반응시킨 뒤 버퍼로 세척한 후 공초점형광현미경으로 형광 세기를 측정하였다. 도 8에서 보듯이, SBP-ProG 단백질이 ProG 보다 약 4배가량 잘 붙는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과 또한 실리카 슬라이드 고체 기판에도 본 단백질은 N-말단에 의해서 효과적으로 결합함을 보여준다.

[0100] 실리카 슬라이드 표면에 결합한 SBP-ProG 단백질과 ProG 층 각각에 500 μg/mL FITC-IgG(5 μL)를 실온에서 30분간 반응시키고 버퍼로 세척한 후 결합 정도를 확인하기 위해 공초점 현미경으로 형광세기를 확인하였다. 도 9는 항체가 ProG 층 보다 SBP-ProG 단백질 층에 4.5배 정도 더 많이 결합하였음을 보여준다. 이는 또한 본 발명의

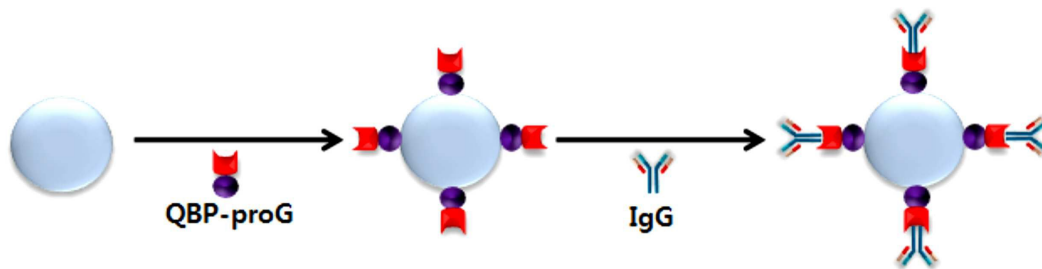
신규 단백질은 실리카 나노입자 뿐만 아니라 슬라이드 기판에도 항체를 효과적으로 간단히 결합시킬 수 있음을 의미한다.

[0101]

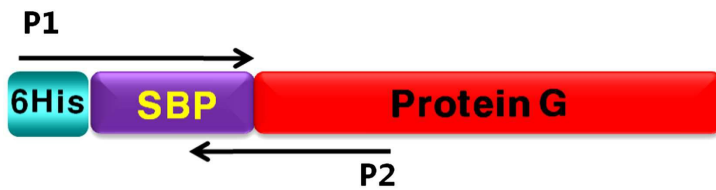
상기와 같은 결과들은 본 발명의 신규한 단백질이 효과적으로 N-말단을 통해 실리카에 결합할 수 있고, C-말단은 항체의 Fc 말단에 결합할 수 있음을 뒷받침하는 것으로, 실리카 결합 부위와 단백질 G를 링커없이 연결시킨 신규한 단백질이 각각의 기능의 간섭없이 효과적으로 실리카 및 항체의 Fc 영역에 결합할 수 있는 것을 뒷받침하는 것이다.

도면

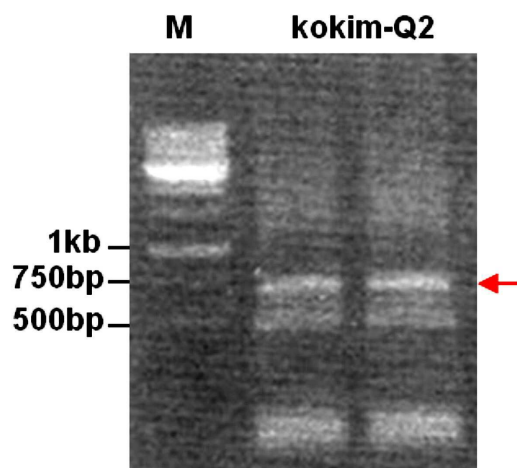
도면1



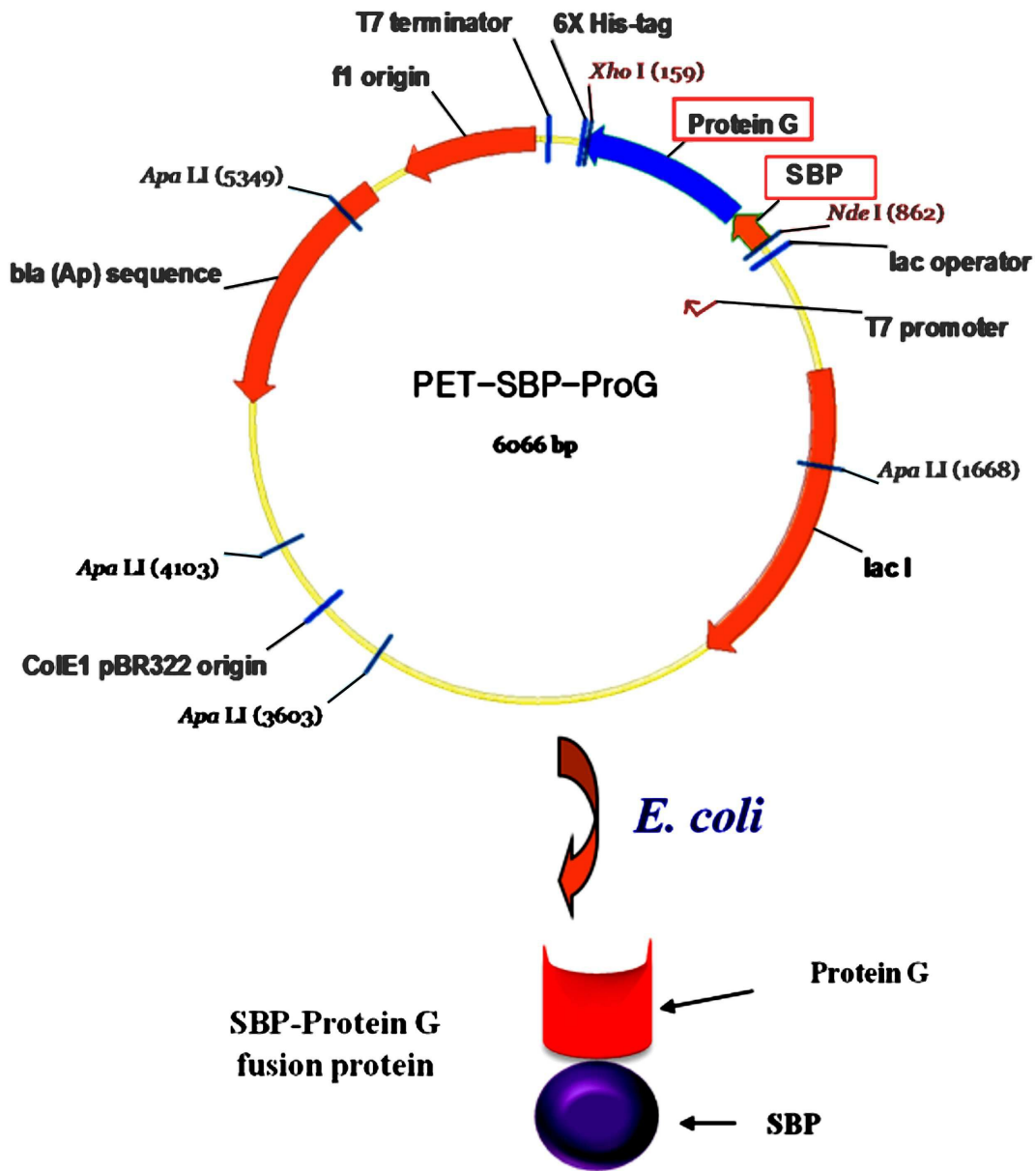
도면2



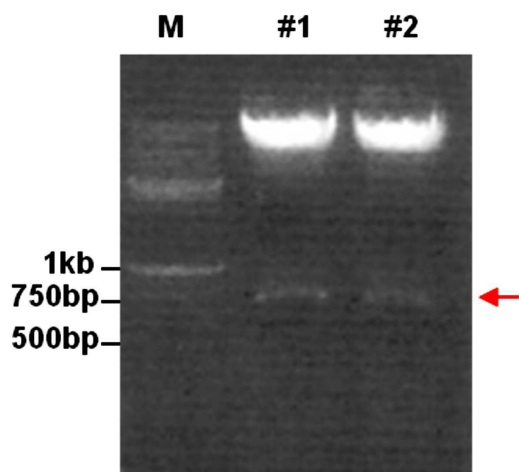
도면3



도면4

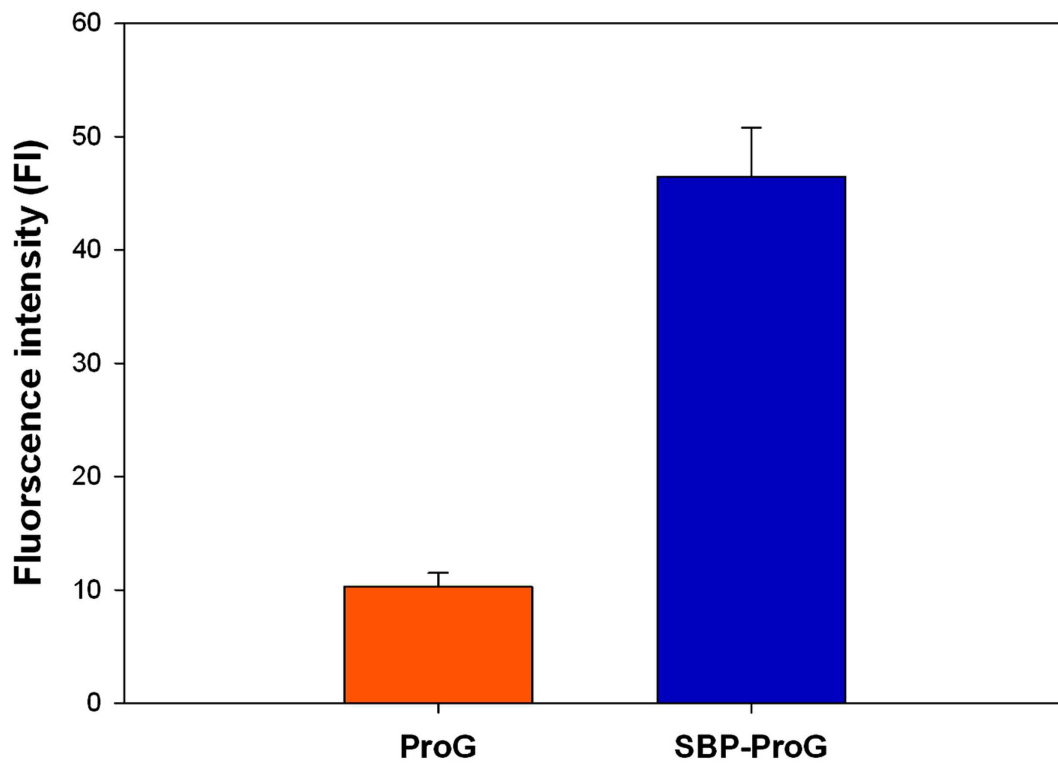
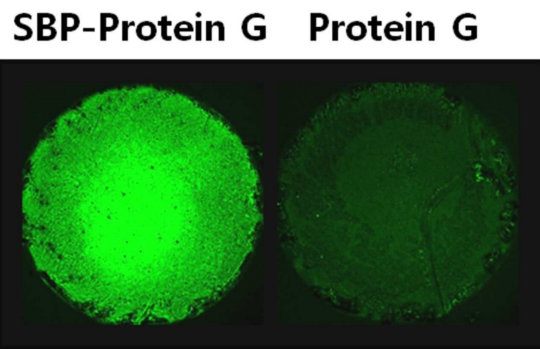


도면5

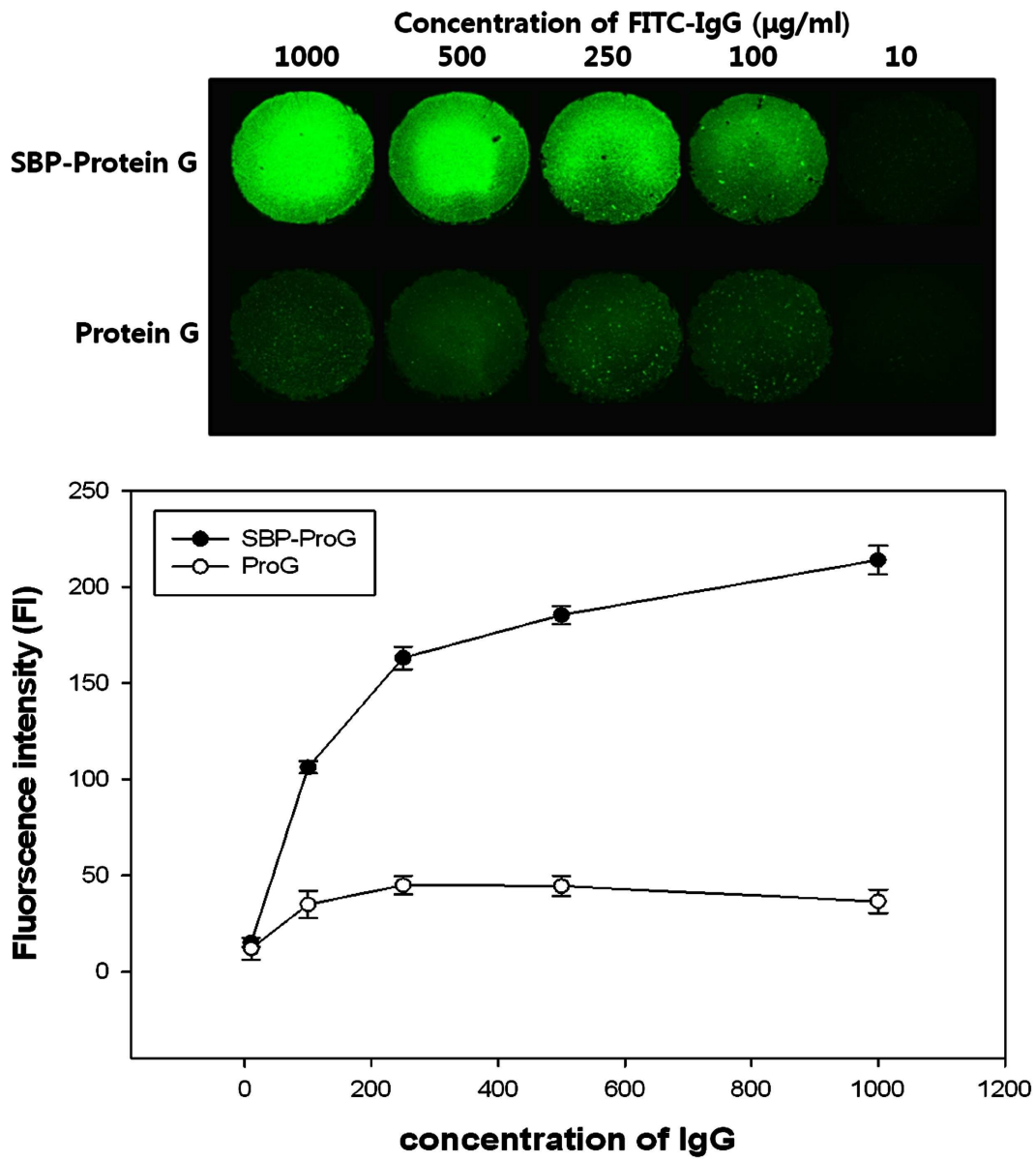




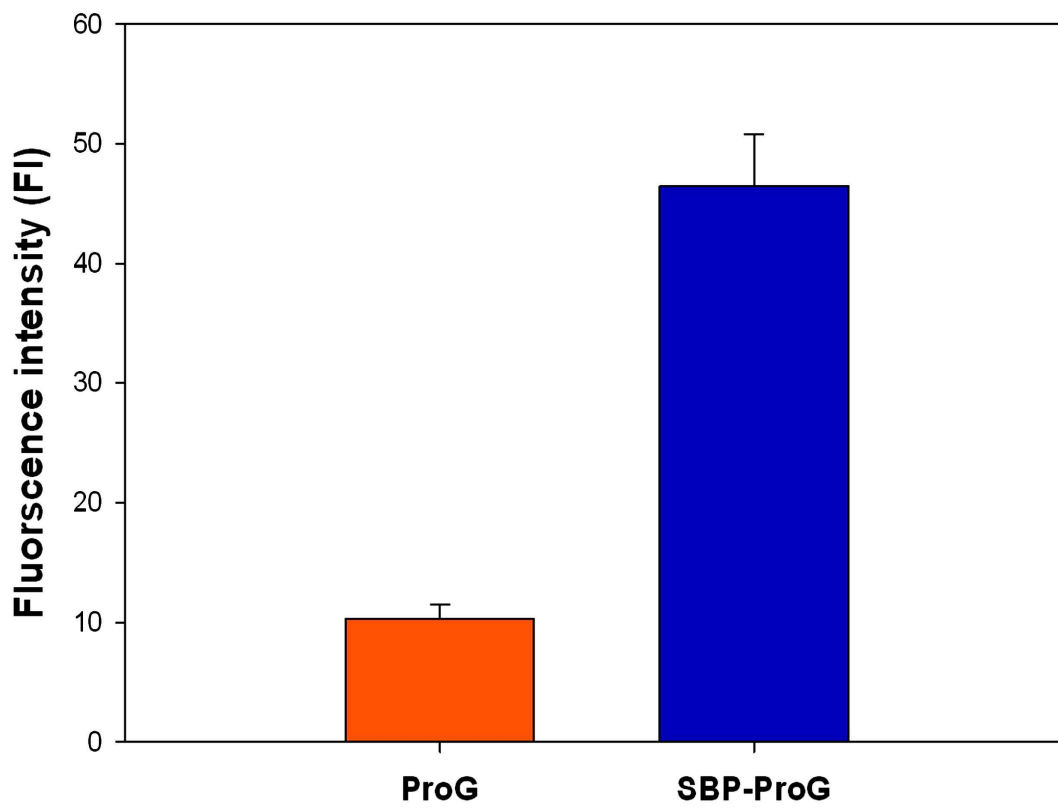
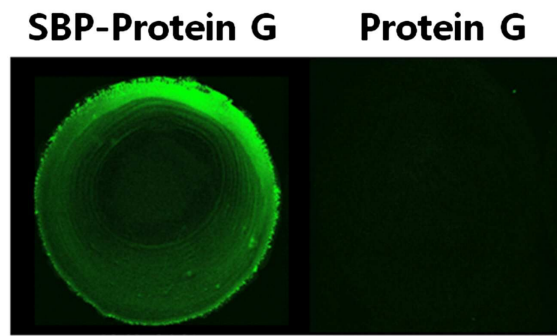
도면6



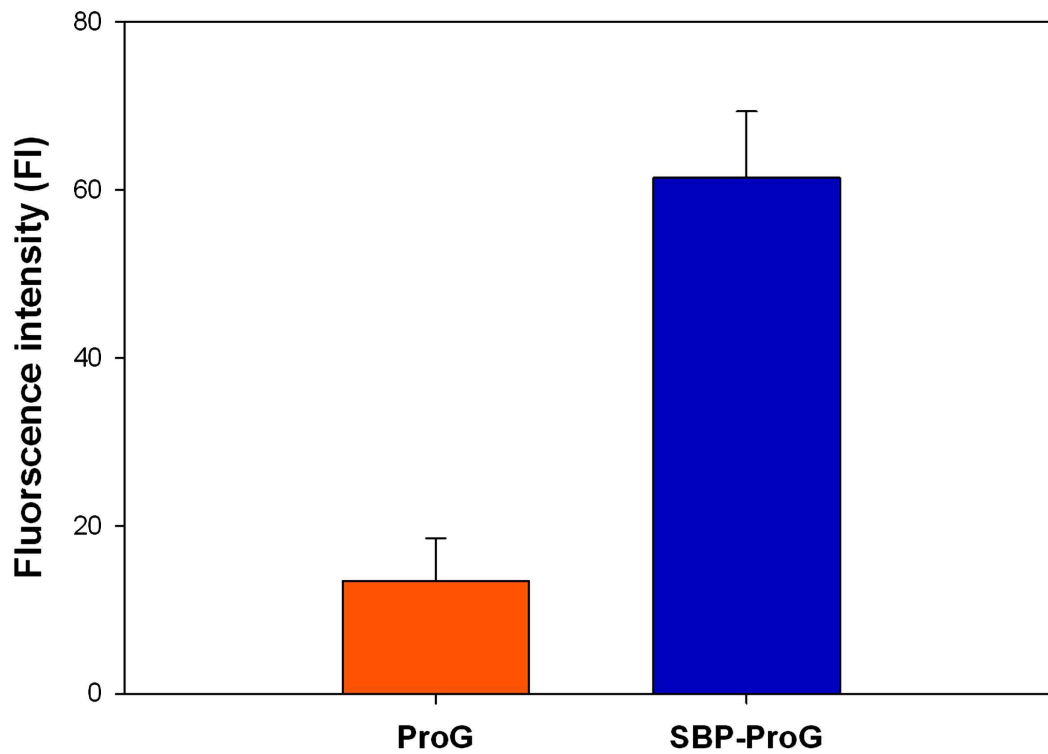
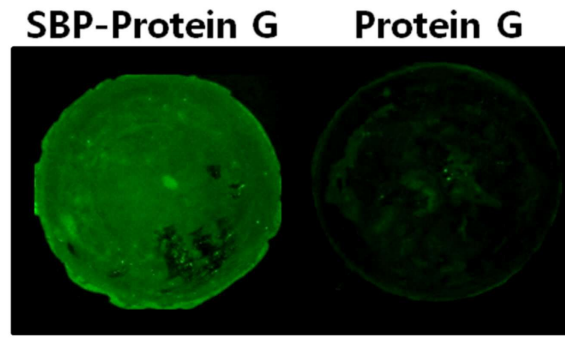
도면7



도면8



도면9



서열목록

<110> College of Medicine Pochon CHA University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Novel protein and use thereof

<130> PA120417/KR

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Silica binding protein

<400> 1

Pro Pro Pro Trp Leu Pro Tyr Met Pro Pro Trp Ser

1                    5                    10  
 <210> 2  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Silica binding protein

<400> 2  
 ccacctcctt ggetaccata catgccgcct tggctc

36

<210> 3  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> protein G

<400> 3  
 Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp  
                   20                    25                    30  
 Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu  
                   35                    40                    45  
 Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu  
 50                    55                    60  
 Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val  
 65                    70                    75                    80  
 Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn  
                   85                    90                    95  
 Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr  
                   100                    105                    110  
 Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala  
                   115                    120                    125  
 Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu  
                   130                    135                    140

Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys  
 145                      150                      155                      160  
 Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp  
                                  165                      170                      175  
 Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Leu Glu His His His His His

                                 180                      185                      190  
 His

- <210> 4
- <211> 582
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> protein G
- <400> 4

ttgaaaggcg aaacaactac tgaagctggt gatgctgcta ctgcagaaaa agtcttcaaa            60  
 caatacgcta acgacaacgg tgttgacggt gaatggactt acgacgatgc gactaagacc            120  
 ttacagtta ctgaaaaacc agaagtgatc gatgcgtctg aattaacacc agccgtgaca            180  
 acttacaac ttgttattaa tggtaaaaca ttgaaaggcg aaacaactac tgaagctggt            240  
 gatgctgcta ctgcagaaaa agtcttcaaa caatacgcta acgacaacgg tgttgacggt            300  
  
 gaatggactt acgacgatgc gactaagacc ttacagtta ctgaaaaacc agaagtgatc            360  
 gatgcgtctg aattaacacc agccgtgaca acttacaac ttgttattaa tggtaaaaca            420  
 ttgaaaggcg aaacaactac taaagcagta gacgcagaaa ctgcagaaaa agccttcaaa            480  
 caatacgcta acgacaacgg tgttgatggt gtttggactt atgatgatgc gactaagacc            540  
 ttacggtaa ctgaactcga gcaccaccac caccaccact ga                                    582

- <210> 5
- <211> 205
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> SBP-ProG
- <400> 5

Pro Pro Pro Trp Leu Pro Tyr Met Pro Pro Trp Ser Leu Lys Gly Glu

1                      5                      10                      15

Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys  
 20 25 30  
 Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp  
 35 40 45  
 Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala  
 50 55 60  
 Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly  
 65 70 75 80

Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr  
 85 90 95  
 Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly  
 100 105 110  
 Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys  
 115 120 125  
 Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr  
 130 135 140

Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys  
 145 150 155 160  
 Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn  
 165 170 175  
 Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr  
 180 185 190

Phe Thr Val Thr Glu Leu Glu His His His His His His  
 195 200 205

<210> 6  
 <211> 618  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> SBP-ProG

<400> 6  
 ccacctcctt ggetaccata catgccgcct tggctctttga aaggcgaaac aactactgaa 60  
 gctgttgatg ctgctactgc agaaaaagtc ttcaaacat acgctaacga caacggtgtt 120

gacgggtgaat ggacttacga cgatgcgact aagaccttta cagttactga aaaaccagaa 180  
 gtgatcgatg cgtctgaatt aacaccagcc gtgacaactt acaaacttgt tattaatggt 240  
 aaaacattga aaggcgaaac aactactgaa gctgttgatg ctgctactgc agaaaaagtc 300  
 ttcaacaat acgctaacga caacgggtgtt gacgggtgaat ggacttacga cgatgcgact 360  
 aagaccttta cagttactga aaaaccagaa gtgatcgatg cgtctgaatt aacaccagcc 420

gtgacaactt acaaacttgt tattaatggt aaaacattga aaggcgaaac aactactaaa 480  
 gcagtagacg cagaaactgc agaaaaagcc ttcaacaat acgctaacga caacgggtgtt 540  
 gatgggtgtt ggacttatga tgatgcgact aagaccttta cggtaactga actcgagcac 600  
 caccaccacc accactga 618

<210> 7  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer1  
 <400> 7  
 caccatcacc atcaccacca cccacctcct tgctaccat acatg 45  
 <210> 8

<211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer2  
 <400> 8  
 ctaccataca tgccgccttg gtctttgaaa ggcgaaacaa ctactg 46  
 <210> 9  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer3  
 <400> 9  
 catgattggt agccaaggag gtgggtggtg gtgatggtga tgggtg 45