(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0052806
(43) 공개일자 2010년05월20일

(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01) *G01N 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0111667
(22) 출원일자 2008년11월11일
심사청구일자 2008년11월11일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
김동명
대전광역시 서구 삼천동 청솔아파트 7동 303호
김경온
대전광역시 서구 월평2동 샛별아파트 101동 305호
이미지
부산광역시 부산진구 가야동 588 가야반도 보라빌 103동 2402호
(74) 대리인
권오식, 박창희, 김종관

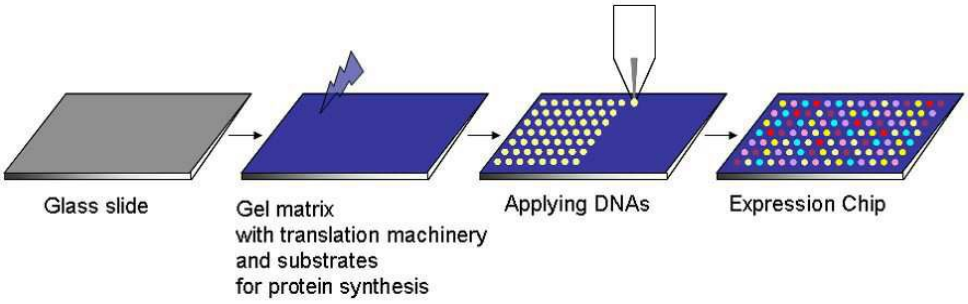
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체 및 유전자 어레이, 이로부터 얻어지는 단백질 어레이, 및 이의 제조 및 사용 방법

(57) 요 약

본 발명은 단백질 생합성 기구를 포함하는 하이드로겔이 코팅된, 단백질 어레이(protein array)의 동소(*in situ*) 생성을 위한 지지체 및 유전자 어레이, 이로부터 얻어지는 단백질 어레이, 및 이의 제조 및 사용 방법에 관한 것으로서, 다종의 DNA 또는 mRNA를 어레이 형태의 활성 단백질로 빠르게 전환할 수 있을 뿐만 아니라, 발현된 단백질 분자들은 3차원의 다공성 하이드로겔 구조 내에 고정화되므로, 단위면적 당 고정화될 수 있는 단백질 양의 증가를 통해 단백질 어레이를 사용한 분석의 감도를 현저히 증가시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(1) 고형 지지체(solid support); 및

(2) 상기 고형 지지체 상에 코팅되고, 단백질 생합성 기구(protein biosynthesis machinery)를 포함하는 하이드로겔(hydrogel):

을 포함하는, 단백질 어레이의 동소(*in situ*) 생성을 위한 지지체.

청구항 2

제1항에 있어서, 단백질 생합성 기구는 유전자 주형을 제외한 무세포 단백질 합성용 반응혼합물(reaction mixture for cell-free protein synthesis)에 함유된 것인, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체.

청구항 3

제1항에 있어서, 고형 지지체는 유리, 석영, 실리콘, 플라스틱, 폴리프로필렌, 폴리카보네이트 또는 활성화된 아크릴아마이드로 이루어지는 것인, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체.

청구항 4

제1항에 있어서, 하이드로겔은 아가로스 겔(agarose gel)인 것인, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체.

청구항 5

제1항에 있어서, 하이드로겔은 습윤(wet) 또는 건조(dried) 상태의 것인, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체.

청구항 6

제5항에 있어서, 하이드로겔은 스핀 코팅(spin coating)에 의해 필름형태로 제작된 것인, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체.

청구항 7

제1항에 있어서, 유전자 주형은 DNA 또는 mRNA인 것인, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체.

청구항 8

(1) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체; 및

(2) 상기 지지체 상에 스팟팅된(spotted) 유전자 주형:

을 포함하는, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 유전자 어레이.

청구항 9

제8항에 따른 유전자 어레이를 단백질 합성이 일어날 수 있는 조건 하에 위치시켜 어레이 상의 유전자로부터 단백질 합성이 일어나도록 함으로써 생성되는 단백질 어레이.

청구항 10

(1) 단백질 생합성 기구와 하이드로겔 용액을 혼합하여 단백질 합성 활성을 갖는 하이드로겔 용액을 제조하고;

(2) 상기 혼합용액을 고형 지지체 상에서 겔화시켜 하이드로겔을 형성하는:

단계를 포함하는, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체의 제조방법.

청구항 11

(1) 단백질 생합성 기구와 하이드로겔 용액을 혼합하여 단백질 합성 활성을 갖는 하이드로겔 용액을 제조하고;

(2) 상기 혼합용액을 고형 지지체 상에서 겔화시켜 하이드로겔을 형성하고;

(3) 상기 하이드로겔이 형성된 고형 지지체에 유전자 주형 용액을 스팟팅하는:

단계를 포함하는, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 유전자 어레이의 제조방법.

청구항 12

제11항에 따른 방법에 의해 제조된 유전자 어레이를 단백질 합성이 일어날 수 있는 조건 하에 위치시켜 단백질 합성이 일어나도록 하는:

단계를 포함하는, 동소에서 단백질 어레이를 생성하는 방법.

청구항 13

제9항에 따른 단백질 어레이 상에서 합성된 단백질을 검출 또는 분석하는:

단계를 포함하는, 단백질의 검출 또는 분석 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단백질 어레이(protein array)에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 단백질 어레이의 동소(*in situ*) 생성을 위한 지지체 및 유전자 어레이, 이로부터 얻어지는 단백질 어레이, 이의 제조 방법, 및 이를 사용한 단백질 검출 및 분석 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근의 생물공학의 주요 관심은 프로테오믹스(proteomics)라 일컬어지는 단백질 생산과 활성조절 및 그 구조와 기능 및 상호작용에 대한 체계적이고 전반적인 이해를 하려는 노력으로 집중되고 있다. 특히, 단백질 기능의 대규모 분석을 위한 다양한 방법 중에서 단백질 마이크로어레이(protein microarray)는 가장 유망한 기술로 주목받고 있다. 단백질 어레이 기술은 다른 방법들과 비교하여 다량의 샘플을 동시에 정확하게 분석할 수 있고, 반응물의 소비도 크게 줄일 수 있다는 이점을 가지고 있다. 그러나 단백질 마이크로어레이 기술은 유전자 마이크로어레이와 달리 어레이 상에 고정된 단백질이 안정적으로 활성을 유지하기 어렵다는 단점을 갖는다. 이는 단백질은 유전자와 달리 반드시 완벽한 3차 구조를 수화된 상태로 유지하여야 하기 때문이다. 또한, 어레이 표면에 고정할 다종의 단백질들을 확보하기 위하여 정제된 단백질을 준비하는 데에 있어서 유전자의 준비, 세포 배양, 단백질 정제의 여러 단계의 복잡한 과정이 필요하다는 점 역시 단백질 어레이 기술의 본격적인 활용을 제약하는 요인 중의 하나로 지적되어 왔다.

[0003] 이러한 단점들을 극복하기 위하여, 최근 개별 단백질을 발현하고 정제하는 과정을 생략하고 어레이 표면상에서 직접 단백질을 생성하고자 하는 다양한 방법들이 개발되어 왔다. 이러한 방법들은 대부분 마이크로어레이의 표면에 고정된 유전자로부터 무세포 단백질 합성(cell-free protein synthesis)을 통해 동소에서(*in situ*) 단백질을 생성하는 방법이다. 예를 들어, Ramachandran 등(문헌 [Ramachandran, N., Hainsworth, E., Demirkan. G., LaBaer, J. (2006) On-chip protein synthesis for making microarrays. Methods Mol Biol. 328:1-14])은 자가 조립 단백질 마이크로어레이 시스템을 개발하였는데, 이는 단백질이 유리 표면에 고정된 플라스미드로부터 무세포 단백질 합성 시스템을 통해 합성되고, 합성된 단백질은 근접해 있는 항-GST 항체(Anti-Glutathione-S-Transferase(GST) antibody) 에 의해 고정화되는 방법이다. NAPPA(Nucleic acid programmable protein array)라고 불리는 이 방법을 사용하여 29종의 다양한 인간 유전자 복제 단백질 간의 상호작용을 파악할 수 있었다. 이는 이러한 동소 단백질 어레이 기술이 단백질 간의 기능적인 네트워크를 연구하는 수단으로 사용될 수 있음을 제시하는 것이다. 그러나 이 방법은 유전자 주형의 화학적 수식(chemical modification)과, 목적 단백질을 고정화하는 친화성 택(affinity tag)이 필요하다는 단점을 지니고 있다. 최근, Angenendt 등은 NAPPA 방법을 개선하기 위하여 스팟팅(spotting) 기술을 이용하여 고정화되지 않은 DNA 주형을 사용하는 단백질 마이크로어레이(PISA; Protein *in situ* array)를 고안하였다(문헌 [Angenendt, P., Kreutzberger, J., Glㅎkler, J., and Hoheisel, J. D. (2006) Generation of high density protein microarrays by cell-free in situ expression

of unpurified PCR products. Mol. Cell. Proteomics 5, 1658-1666]). DNA 주형을 우선 유리판에 점착시킨 후 그 위에 무세포 단백질 합성을 위한 반응액을 첨가하여 습도가 일정하게 유지되는 공간에 넣어두면, DNA가 점착된 곳에서 수화되면서 단백질 합성이 시작된다. 이 방법을 통해 동소 단백질 마이크로어레이를 수행하는 절차를 단순화할 수 있었으나, 유리 표면에 단백질이 직접 닿게 되어 단백질의 구조가 안정하게 유지되기 어려우며 반응액이 쉽게 증발하여 합성된 단백질의 구조나 기능에 영향을 미치게 된다. 또한, 이 방법은 하나의 고정화할 수 있는 단백질의 양이 제한되어 검출 감도가 문제될 수도 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0004] 상기한 바와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 보다 간편하게 제작할 수 있을 뿐만 아니라 단백질의 활성과 구조를 안정하게 유지하여 단백질을 보다 효과적으로 검출 및 분석할 수 있는 동소 단백질 어레이 기술을 개발하기 위하여 지속적인 연구를 수행하였다. 그 결과, 어레이 상에 DNA를 고정화하는 대신, 단백질 생합성 기구를 어레이 상의 하이드로겔에 고정화한 후 여기에 개별 유전자를 가하여 단백질을 동소에서 합성할 수 있으며, 합성된 단백질들이 하이드로겔에 의해 제공되는 수분 및 완충 조건에 의해 그 활성과 구조를 잘 유지할 수 있어, 가해진 유전자로부터의 단백질 발현 및 활성을 빠르고 쉽게 검출 및 분석할 수 있음을 확인하였다.

[0005] 따라서 본 발명의 제1목적은 단백질 생합성 기구를 포함하는 하이드로겔이 코팅된 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체를 제공하기 위한 것이다.

[0006] 본 발명의 제2목적은 상기 지지체를 포함하는 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 유전자 어레이를 제공하기 위한 것이다.

[0007] 본 발명의 제3목적은 상기 유전자 어레이로부터 얻어지는 단백질 어레이에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 제4목적은 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

[0009] 본 발명의 제5목적은 상기 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 유전자 어레이의 제조 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0010] 본 발명의 제6목적은 상기 유전자 어레이를 이용한 단백질 어레이의 동소 생성 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0011] 본 발명의 제7목적은 상기 단백질 어레이를 이용한 단백질의 검출 또는 분석 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

[0012] 본 발명의 제1면은

[0013] (1) 고형 지지체(solid support); 및

[0014] (2) 상기 고형 지지체 상에 코팅되고, 단백질 생합성 기구(protein biosynthesis machinery)를 포함하는 하이드로겔(hydrogel):

[0015] 을 포함하는, 단백질 어레이의 동소(*in situ*) 생성을 위한 지지체에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 제2면은

[0017] (1) 상기 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체; 및

[0018] (2) 상기 지지체 상에 스팟팅된(spotted) 유전자 주형:

[0019] 를 포함하는, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 유전자 어레이에 관한 것이다.

[0020] 본 발명의 제3면은 상기 유전자 어레이를 단백질 합성이 일어날 수 있는 조건 하에 위치시켜 어레이 상의 유전자로부터 단백질 합성이 일어나도록 함으로써 생성되는 단백질 어레이에 관한 것이다.

[0021] 본 발명의 제4면은

[0022] (1) 단백질 생합성 기구와 하이드로겔 용액을 혼합하여 단백질 합성 활성을 갖는 하이드로겔 용액을 제조하고;

[0023] (2) 상기 혼합용액을 고형 지지체 상에서 겔화시켜 하이드로겔을 형성하는:

[0024] 단계를 포함하는, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 지지체의 제조방법에 관한 것이다.

[0025] 본 발명의 제5면은

[0026] (1) 단백질 생합성 기구와 하이드로겔 용액을 혼합하여 단백질 합성 활성을 갖는 하이드로겔 용액을 제조하고;

[0027] (2) 상기 혼합용액을 고형 지지체 상에서 겔화시켜 하이드로겔을 형성하고;

[0028] (3) 상기 하이드로겔이 형성된 고형 지지체에 유전자 주형 용액을 스팟팅하는:

[0029] 단계를 포함하는, 단백질 어레이의 동소 생성을 위한 유전자 어레이의 제조방법에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 제6면은

[0031] 상기 방법에 의해 제조된 유전자 어레이를 단백질 합성이 일어날 수 있는 조건 하에 위치시켜 단백질 합성이 일어나도록 하는:

[0032] 단계를 포함하는, 동소에서 단백질 어레이를 생성하는 방법에 관한 것이다.

[0033] 본 발명의 제7면은

[0034] 상기 단백질 어레이 상에서 합성된 단백질을 검출 또는 분석하는:

[0035] 단계를 포함하는, 단백질의 검출 또는 분석 방법에 관한 것이다.

효 과

[0036] 본 발명에 따르면, 단백질 생합성 기구를 고체 표면에 고정화하고 여기에 유전자를 스팟팅하여 직접 단백질로 번역할 수 있어, 클로닝되거나 중합효소연쇄반응 등을 통해 합성된 다종의 DNA 또는 mRNA를 어레이 형태의 활성 단백질로 빠르게 전환할 수 있으므로, 다양한 세포내 단백질의 기능적인 네트워크 분석 연구에 있어서 중요한 도구로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 발현된 단백질 분자들은 통상적인 2차원 고체 표면이 아니라 3차원의 다공성 하이드로겔 구조 내에 고정화될 수 있으므로, 단위면적 당 고정화될 수 있는 단백질 양의 증가를 통해 단백질 어레이를 사용한 분석의 감도를 현저히 증가시킬 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0038] 무세포 단백질 합성 기술은 단백질 합성 반응을 세포 내의 제한된 공간이 아니라 일반 생화학 반응과 같이 다양한 반응조건 및 환경 하에서 수행할 수 있는 장점을 가지고 있다. 예를 들어, 최근 본 발명자들은 단백질 합성이 매트릭스 표면에서 폴리펩타이드를 실시간으로 분리할 수 있는 친화력을 가진 매트릭스 상에서도 이루어진다는 것을 알아내었고(문헌 [Kim, T.W., Oh, I.S., Ahn, J.H., Choi, C.Y., Kim, D.M.(2006) Cell-free synthesis and in situ isolation of recombinant protein. Protein Expr. Purif. 45, 249-254]), 세포로부터 분리된 단백질 생합성 기구들이 계면활성제나 반응성 화학물질을 포함하는 다양한 반응 조건에서도 활성을 유지한다는 것을 밝힌 바 있다(문헌 [Oh, I.S., Kim, D.M., Kim, T.W., Park, C.G., Choi, C.Y. (2006) Providing an oxidizing environment for the cell-free expression of disulfide-containing proteins by exhausting the reducing activity of *Escherichia coli* S30 Extract. Biotechnol. Prog. 22, 1225-1228]). 즉, 무세포 단백질 발현 시스템은, 단백질 생합성 기구들의 활성에 영향을 미치지 않는 한, 다양한 환경 및 다양한 화학조건 하에서 단백질을 생산할 수 있다는 장점을 가지고 있는 것이다.

[0039] 본 발명에서는, 무세포 단백질 합성이 갖는 이러한 이점을 활용하여, 단백질 생합성 기구를 아가로스 겔(agarose gel)과 같은 하이드로겔 매트릭스 구조 내에 고정화하고 여기에 유전자를 어레이 형태로 가하여 겔 구조 내에서 단백질 합성이 이루어지도록 함으로써 유전자 어레이를 단백질 어레이로 손쉽게 전환할 수 있는 방법을 안출하였다. 도 1에 본 발명에 따른 단백질 어레이의 동소 생성 과정을 도식적으로 나타내었다.

[0040] 본 발명자들은 먼저 일반적으로 시험관 또는 반응기 내의 용액 상에서 진행되는 무세포 단백질 합성반응이 하이드로겔 구조 내에서도 일어날 수 있는지를 확인하였다. 그 결과, 세포로부터 추출된 단백질 생합성 기구들은 하이드로겔의 구조 내에서도 일반적인 용액 상태에서와 마찬가지로 정상적으로 작동할 수 있음을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 바탕으로, 단백질 전사/번역 인자들을 포함하고 있는 하이드로겔 매트릭스에 유전자들을 스팟팅하고, 유전자가 가해진 위치에서 해당 단백질이 발현/합성되는지를 확인하였다. 그 결과, 하이드로겔 구조

내에 고정화된 단백질 생합성 기구를 이용하여 유전자 어레이를 단백질 어레이로 효율적으로 전환시킬 수 있음을 확인하였다.

[0041] 본 발명에 있어서, 용어 "하이드로겔"은 탈수 상태에서는 유리질(glassy)이나 물의 존재 하에서는 겔을 형성하여 부풀게 되는 친수성 네트워크 폴리머를 의미한다. 본 발명에서, 하이드로겔은 단백질 생합성 기구와 혼합되고 고형 지지체 상에 코팅되어 단백질 합성 활성 및 기능을 나타낼 수 있는 것인 한 특별한 제한이 없으며, 예를 들어,아가로스 겔, 폴리아크릴아미드 겔, 알긴산 겔, 전분 겔, 폴리비닐알코올 겔, 실리콘 하이드로겔을 포함하나, 본 발명의 범위가 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 하이드로겔은 고형 지지체 상에 코팅되는바, 고형 지지체로는 유전자 또는 단백질 칩 제조분야에서 통상적으로 사용되는 어떠한 것이라도 사용가능하며, 예를 들어, 유리, 석영, 실리콘, 플라스틱, 폴리프로필렌, 폴리카보네이트 또는 활성화된 아크릴아마이드로 이루어지는 것을 포함하나, 본 발명의 범위가 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명에서, 단백질 생합성 기구는 유전자 주형을 제외한(유전자 주형은 하이드로겔 형성 후 겔 상에 스팟팅됨) 무세포 단백질 합성용 반응혼합물(reaction mixture for cell-free protein synthesis)에 함유된 것일 수 있다. 예를 들어, 무세포 단백질 합성용 반응혼합물은 목적 단백질의 합성을 위해 필요한 세포 소기관 및 인자를 포함하는 세포 파쇄액(cell lysate), 아미노산 혼합물, 단백질 합성 에너지원, 유전자 주형 및 완충용액을 포함한다. 세포 파쇄액을 제조하기 위한 세포로는 대장균, 고초균, 밀배아, 쌀배아, 보리 배아, CHO 세포, 하이브리도마 세포 또는 망상적혈구 세포를 사용할 수 있고, 세포 파쇄액은 문헌 [Pratt, J.M. (1984) Coupled transcription - translation in prokaryotic cell-free system. In: Hames, B.D., Higgins, S.J.(Eds.), Transcription and translation: a practical approach, IPL Press, New York, pp. 179]에 기재된 방법에 따라 제조된 S30 추출액(S30 extract), 한국등록특허 제733,712호(2007. 6. 29 공고)에 기재된 방법에 따라 제조된 S12 추출액 등일 수 있다. 아미노산 혼합물은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 시스테인, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파테이트, 글루타메이트, 아스파라긴 또는 글루타민으로부터 선택되는 L-아미노산의 혼합물이며, 단백질 합성 에너지원은 ATP, CTP, GTP, TTP 또는 UTP로부터 선택되는 하나 이상이고, 유전자 주형은 목적 단백질을 코딩하는 DNA 또는 mRNA일 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 하이드로겔 구조 내에서의 무세포 단백질 합성은 27~37 ℃, 특히 37 ℃ 항온배양기 내에서 1~5시간 동안 이루어질 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 하이드로겔은 습윤(wet) 상태의 것일 수 있다. 그러나, 향후 이러한 개념의 단백질 어레이를 대량 생산하여 상업화하고자 할 경우에는, 습윤 상태의 아가로스 겔을 사용하는 것이 보관 등에 있어 문제가 될 수 있을 것으로 판단되어, 단백질 생합성 기구가 포함된 하이드로겔 용액을 지지체 표면에 스핀 코팅(spin coating)하여 필름 형태로 제작한 후 여기에 유전자 용액을 스팟팅한 경우 하이드로겔의 재수화에 의해 그 안에 고정된 단백질 생합성 기구가 다시 활성을 보일 수 있는지를 조사하였다. 그 결과, 유전자가 프린팅된 부분에서 단백질이 성공적으로 발현됨을 알 수 있었다. 따라서 본 발명에 따른 하이드로겔은 건조(dried) 상태의 것, 예를 들어 스핀 코팅에 의해 필름 형태로 제작된 것일 수 있으며, 재수화에 의해 단백질 생합성 기구가 활성화될 수 있다.

[0045] 본 발명에 따르면, 기존의 단백질 어레이 제조 공정이 가지는 복잡한 클로닝, 발현 및 정제 과정을 생략하고 주형 DNA/mRNA로부터 즉각적으로 단백질을 발현함으로써 통상적인 마이크로어레이어를 사용하여 활성 단백질 어레이를 제작할 수 있다. 또한, 발현된 단백질 분자들은 통상적인 2차원 고체 표면이 아니라 3차원의 다공성 하이드로겔 구조 내에 고정화되므로, 단위면적 당 고정화될 수 있는 단백질 양의 증가를 통해 단백질 어레이를 사용한 분석의 감도를 현저히 증가시킬 수 있을 것이다.

실 시 예

[0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명하나, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0047] **실시예 1: 하이드로겔 구조 내에서의 무세포 단백질 합성 확인**

[0048] 일반적으로 시험관 또는 반응기 내의 용액 상에서 진행되는 무세포 단백질 합성반응이 하이드로겔 구조 내에서도 일어날 수 있는지를 확인하였다. 즉, 무세포 단백질 합성에 필요한 반응혼합물과 유전자 주형으로서 형광단

백질 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein) 유전자가 도입된 플라스미드 pIVEX2.3d-EGFP(Roche)를 2%(w/v)의 저융점 아가로스(low-melting agarose) 용액(최종 농도 1%)과 혼합한 후 유리 슬라이드 표면에 떨어뜨려 겔화시켰다. 이를 항온배양기에 1 시간가량 방치하여 아가로스겔 내에서 단백질 합성 반응이 진행되도록 하였다. 겔 내에서의 단백질 발현은 형광스캐너를 사용하여 488 ㎚ 파장에서 형광을 측정하여 분석하였다.

[0049] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 아가로스 겔 스팟들에서 단백질의 형광 활성을 확인함으로써 아가로스 겔 내에 고정화된 단백질 생합성 기구가 함께 고정화된 주형 DNA로부터 전사 및 번역 반응을 통하여 형광활성을 갖는 EGFP 단백질을 발현함을 확인할 수 있었다. 즉, 세포로부터 추출된 단백질 생합성 기구들은 하이드로겔의 구조 내에서도 일반적인 용액 상태에서와 마찬가지로 정상적으로 작동하여 유전자의 전사, 번역, 폴딩 반응이 진행될 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 중합효소연쇄반응을 통해 증폭된 유전자로부터도 환형의 플라스미드 유전자와 같이 아가로스 매트릭스에서 효과적으로 단백질이 합성됨을 확인할 수 있었다.

[0050] **실시예 2: 단백질 생합성 기구가 고정화된 아가로스 겔에 스팟팅된 유전자로부터 단백질의 동소 생성**

[0051] 상기 실시예 1에서 확인한 결과를 토대로, 단백질 생합성 기구가 고정화된 아가로스 겔로 코팅된 고체 표면에 유전자를 스팟팅하여 각각의 스팟에서 개별 단백질이 생성되도록 하는 개념의 단백질 어레이를 제작하였다. 즉, 유전자 주형을 제외한 나머지 무세포 단백질 합성에 필요한 반응혼합물[57 mM HEPES-KOH(pH 8.2), 1.2 mM ATP, 각각 0.85 mM의 CTP, GTP, UTP, 2 mM DTT(dithiothreitol), 0.17 ㎎/㎖ 대장균 tRNA 혼합물, 90 mM 포타슘 글루타메이트, 80 mM 암모늄 아세테이트, 12 mM 마그네슘 아세테이트, 34 ㎍/㎖ L-5-포밀-5,6,7,8-테트라하이드로폴산(폴린산), 각각 1.5 mM의 20종류 아미노산, 2% 폴리에틸렌글리콜8000, 67 mM 크레아틴 포스페이트(CP), 3.2 ㎍/㎖ 크레아틴 키나제(CK), 6.7 ㎍/㎖ DNA, 30%(v/v) S30 추출액(문헌 [Pratt, J.M. (1984) Coupled transcription - translation in prokaryotic cell-free system. In: Hames, B.D., Higgins, S.J.(Eds.), Transcription and translation: a practical approach, IPL Press, New York, pp. 179]) 또는 한국등록특허 제733,712호에 개시된 S12 추출액]과 같은 양의 2%의 아가로스 용액(최종 농도 1%)을 혼합하여 미리 37 ℃로 덥혀진 유리 슬라이드 표면에 도포한 후, 상온에서 겔화시켰다. 이후, 겔화된 아가로스 표면에 pIVEX2.3d-EGFP 유전자 용액을 마이크로피펫 또는 마이크로어레이어를 사용하여 스팟팅하고 항온배양기에서 1 시간 방치한 후, 형광스캐너를 사용하여 488 ㎚ 파장에서 EGFP 단백질의 발현 여부를 조사하였다.

[0052] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, EGFP를 코딩하는 유전자가 프린트된 스팟에서 무세포 단백질 합성 시스템을 이용하여 단백질로 성공적으로 발현되었고, 동일한 양의 유전자를 반복적으로 스팟팅하여 발현된 형광단백질의 형광을 측정한 결과 재현성 있는 단백질 발현이 일어남을 확인할 수 있었다.

[0053] **실시예 3: 스핀 코팅에 의해 필름 형태로 제작된 아가로스 겔 상에서의 단백질 발현**

[0054] 상기 실시예 2의 결과를 통해 아가로스 겔 구조상에 고정화된 단백질 생합성 기구를 이용하여 유전자 어레이를 단백질 어레이로 전환시킬 수 있음을 확인하였다. 이에, 무세포 단백질 합성 반응용액이 포함된 아가로스 겔을 유리판 표면에 스핀 코팅하여 필름 형태로 제작한 후 여기에 pIVEX2.3d-EGFP 유전자 용액을 스팟팅할 경우 아가로스 겔의 재수화에 의해 그 안에 고정된 단백질 생합성 기구가 다시 활성을 보일 수 있는지를 조사하였다.

[0055] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 유리 슬라이드 표면에서 필름 형태로 스핀 코팅된 무세포 단백질 합성 반응혼합물을 포함하는 아가로스 겔에 유전자 어레이어를 사용하여 유전자 용액을 프린팅한 후 포화습도 조건 하에서 반응시킨 경우에도 형광 활성을 가지는 형광단백질이 유전자가 프린팅된 부분에서 성공적으로 발현됨을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 본 발명에 따른 단백질 어레이의 동소 생성 과정을 도식적으로 보여주는 도면이고;

[0057] 도 2는 단백질 생합성 기구가 고정화된 하이드로겔 구조 내에서의 무세포 단백질 합성 결과를 보여주는 사진이며;

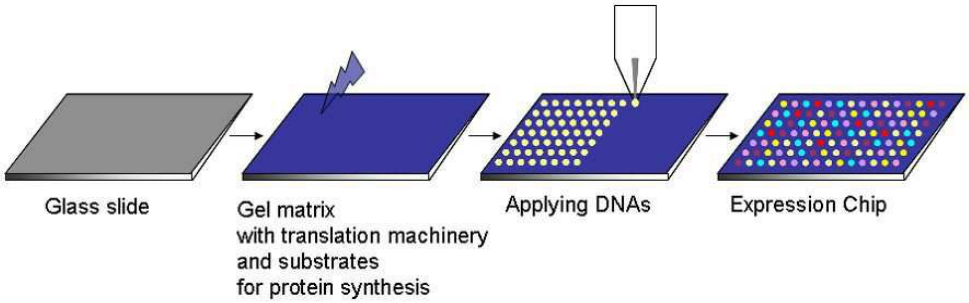
[0058] 도 3은 단백질 생합성 기구가 고정화된 하이드로겔 상에 스팟팅된 유전자로부터의 단백질의 동소 생성을 보여주

는 사진이고;

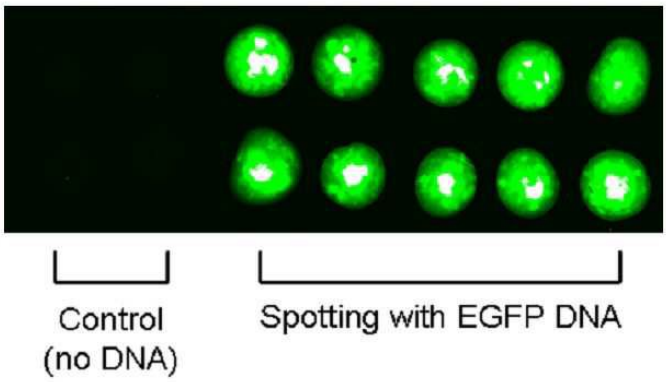
[0059] 도 4는 스핀 코팅에 의해 필름 형태로 코팅된 단백질 생합성 기구를 포함하는 하이드로겔 상에서 스팟팅된 유전자로부터의 단백질의 동소 생성을 보여주는 사진이다.

도면

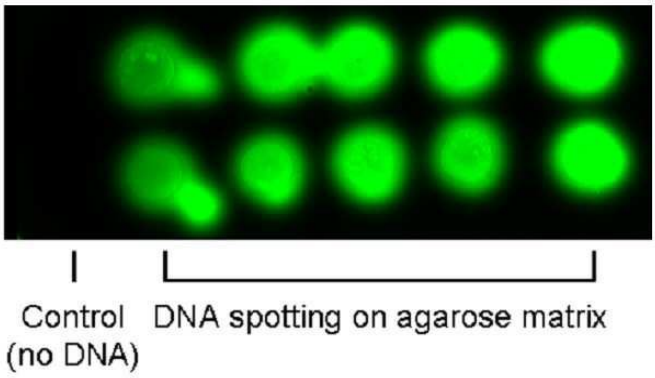
도면1



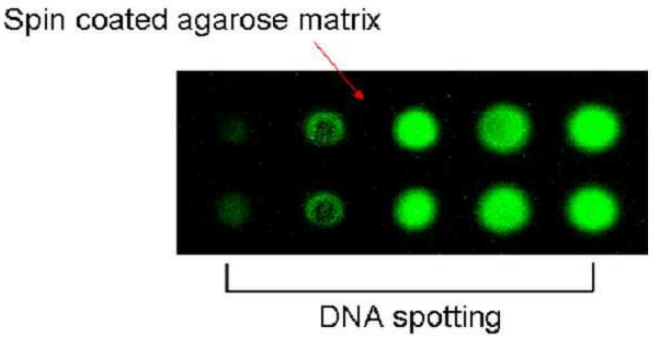
도면2



도면3


Control
(no DNA)
DNA spotting on agarose matrix

도면4


Spin coated agarose matrix
DNA spotting