(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0010220
(43) 공개일자 2015년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/37 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0084914
(22) 출원일자 2013년07월18일
심사청구일자 2013년07월18일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
박천석
경기 남양주시 와부읍 덕소로116번길 49, 106동 1303호 (현대홈타운아파트)
서동호
경기 수원시 영통구 매영로425번길 2, 402호 (영통동)
정종현
서울 강서구 양천로57길 37, 402동 504호 (가양동, 가양4단지아파트)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 14 항

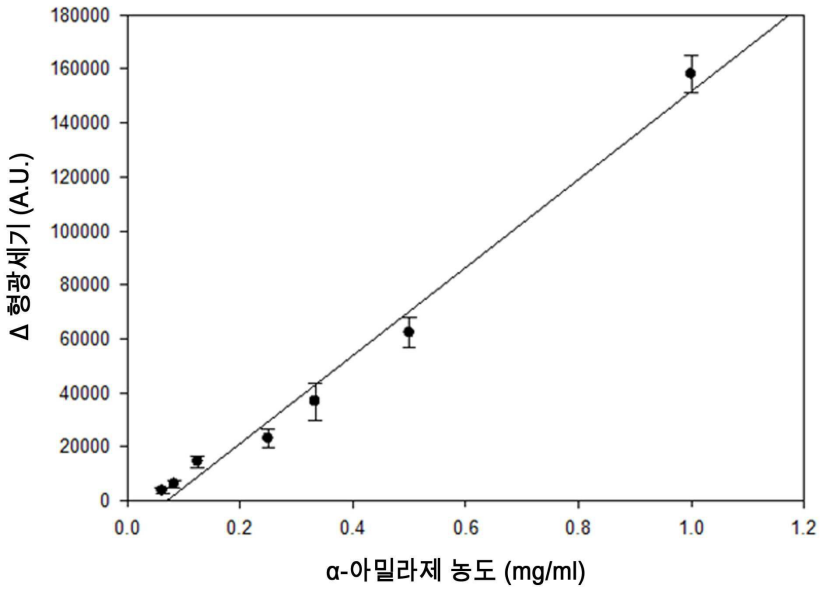
(54) 발명의 명칭 **시차 주사 형광측정법을 이용한 단백질 정량방법**

(57) 요 약

본 발명은 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry)을 이용한 단백질 정량방법, 이를 이용한 재조합 단백질 생산 공정의 품질관리(quality control; QC) 방법 및 특정 단백질을 과발현하는 세포의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2



본 발명에 따른 DSF를 이용한 단백질의 정량방법은 표적 단백질의 표지나 항체 등을 필요로 하지 않고 적은 양의 시료로도 단백질을 정량할 수 있으며, 특히 별도의 정제과정 없이 세포 용해물로부터 직접 생산된 단백질의 정량이 가능하고 상용화된 RT-PCR 기기 및 플레이트를 이용할 수 있어 동시에 96개 내지는 384개 시료까지도 분석할 수 있다. 따라서, 세포배양기로부터 채취한 세포 용해물로부터 세포가 단백질을 정상적으로 발현하고 있는지 빠르고 간편하게 확인할 수 있으므로, 재조합 단백질의 생산 과정에서 품질관리를 위한 수단으로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 단백질의 대량 생산을 위한 특정 단백질을 과발현하는 세포주 선별을 스크리닝하는 방법에도 적용할 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry; DSF)을 이용한 단백질 정량방법으로서,

(a) 목적 단백질, 및 단백질의 소수성 부분에 대해 향상된 결합력을 갖는 염료를 포함하는 시료용액을 준비하는 단계;

(b) 20 내지 100℃의 범위에서 온도를 변화시키면서 상기 염료의 형광파장에서 상기 시료용액으로부터의 형광세기를 측정하는 단계; 및

(c) 상기 측정된 형광세기의 최대값과 최소값의 차이를 도출하는 단계를 포함하는 단백질 정량방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 정량은 정량하고자 하는 단백질을 2개 이상의 상이한 기지농도로 포함하는 시료에 대한 측정값으로부터 작성한 표준곡선과 비교하여 수행되는 것인 단백질 정량방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질은 정제된 단백질 또는 세포 용해물에 포함된 단백질인 것인 단백질 정량방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 세포는 특정 단백질을 과발현하는 것인 단백질 정량방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 특정 단백질은 외래 도입된 단백질인 것인 단백질 정량방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 정량은 효소활성에 의해 측정된 농도와 비교하여 0 내지 10% 이내의 오차범위로 측정되는 것이 특징인 단백질 정량방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 정량은 분석하고자 하는 단백질의 정제과정 없이 세포 용해물로부터 직접 측정되는 것이 특징인 단백질 정

량방법.

청구항 8

(a) 세포를 배양하여 재조합 단백질을 발현시키는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 세포 배양으로부터 세포를 포함하여 시료를 채취하는 단계;

(c) 상기 채취한 시료를 용해시킨 세포 용해물의 시차 주사 형광(DSF)을 측정하는 단계; 및

(d) 상기 측정한 DSF로부터 세포 용해물 내의 재조합 단백질을 정량하는 단계를 포함하는, 재조합 단백질 생산 공정의 품질관리(quality control; QC) 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 세포는 특정 단백질을 과발현하도록 조작된 것이 특징인 품질관리 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 (b) 단계 내지 (d) 단계는 전체 세포 배양기간 동안 1회 내지 10회 반복하여 수행되는 것이 특징인 품질관리 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 품질관리는 측정시점까지 배양기간을 고려하여 (d) 단계에서 재조합 단백질 정량값이 일정 기준 미만인 경우, 세포의 재조합 단백질 생산능이 불량한 것으로 판단하는 것이 특징인 품질관리 방법.

청구항 12

(a) 분석하고자 하는 세포를 배양하는 단계;

(b) 상기 세포 배양으로부터 세포를 포함하여 시료를 채취하는 단계;

(c) 상기 채취한 시료를 용해시킨 세포 용해물의 시차 주사 형광(DSF)을 측정하는 단계; 및

(d) 상기 DSF 곡선으로부터 T_m값(녹는점; melting temperature)의 존재 여부를 판단하는 단계

를 포함하는 DSF를 이용하여 특정 단백질을 과발현하는 세포의 스크리닝 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 제4단계로부터 T_m값이 존재하는 것으로 판단된 시료에 대해 상기 T_m값으로부터 과발현되는 단백질의 후보군을 선발하는 단계를 추가로 포함하는 것인 스크리닝 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 선발된 단백질 후보군에 대한 활성평가를 추가로 수행하여 단백질을 동정하는 단계를 추가로 포함하는 것이 특징인 스크리닝 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry)을 이용한 단백질 정량방법, 이를 이용한 재조합 단백질 생산 공정의 품질관리(quality control; QC) 방법 및 특정 단백질을 과발현하는 세포의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 생명과학분야에서 재조합 단백질의 이용에 대한 관심이 농학 및 의학분야에서 뿐만 아니라 학술적 연구를 위해 급증하고 있다. 현재 이용 가능한 재조합 DNA 기술은 파아지(phage), 세균, 효모, 곰팡이, 식물, 곤충 및 포유류 세포를 포함하는 다양한 숙주 시스템이 있다. 이와 같은 재조합 단백질 발현을 위한 숙주 시스템의 선택은 일반적으로 배출, 당쇄화 및 응용분야와 같은 표적 단백질의 특이적인 요구에 의존한다. 그러나, 이종단백질 발현시스템(heterologous protein expression system)으로서 제일 먼저 선택되는 것은 일반적으로 *E. coli*이다. *E. coli*에서의 이종단백질 발현의 가장 중요한 목표는 최대화된 수율로 수용성 및 활성 단백질을 수득하는 것이다.

[0003] 따라서, 이종숙주세포에서 발현된 표적 세포의 상태를 결정하기 위하여 직접 또는 간접적으로 정량하는 방법은 매우 중요하다. 종래 재조합 단백질을 검출하기 위한 방법은 웨스턴 블롯 분석 및 효소결합면역흡착분석법(enzyme linked immunosorbent assay)이다. 이들 방법은 높은 수준의 기술 및 상대적으로 긴 실험시간뿐만 아니라 표적 단백질 특이적인 항체 또는 단백질 태그를 필요로 한다. 뿐만 아니라 세포 용해물로부터 재조합 단백질을 직접 정량적으로 검출하는 것은 불가능하다. 이에 따라, 세포 용해물에서 재조합 단백질을 직접적으로 분석하기 위한 다양한 방법들이 개발되고 있다.

[0004] 종래 재조합 단백질을 정량하기 위한 방법의 예로는 재조합 단백질 발현을 용이하게 검출하기 위하여 GFP와 같은 표지 단백질을 표지하는 방법이 있다. 상기 GFP-표지는 재조합 단백질 발현을 확인하기 위한 강력한 수단임에도 불구하고 발현된 단백질은 GFP 첨가를 위하여 물리적으로 개질되어야 하며 이에 따라 단백질 원래의 형태로 사용이 요구되는 경우 추후 응용을 위하여 결합된 GFP를 제거하는 과정을 필요로 한다는 단점이 있다. 또한 GFP의 상대적으로 거대한 크기는 재조합 단백질의 접힘 및 기능에 영향을 주기도 한다.

[0005] 다른 방법으로는 최근 Xiaohong 등에 의해 보고된 항-히스 태그 분자 비콘 앱타머(anti-His tag molecular beacon aptamer; HMBA)를 이용하는 방법이다. 히스-태그와 융합된 재조합 단백질은 히스-태그와 HMBA 간의 상호작용에 의해 직접적으로 측정될 수 있다. 히스-태그된 단백질에 결합되었을 때, HMBA의 줄기 부분은 소광체(quencher)로부터 형광체가 물리적으로 분리되어 광조사에 의해 형광신호를 방출할 수 있도록 재조직된다. 이와 같이 HMBA 방법이 재조합 단백질 검출하기에 충분히 강력함에도 불구하고 히스-태그된 재조합 단백질 및 HMBA 모두를 필요로 하는 등의 단점을 갖는다.

[0006] 한편, 단백질의 녹는점(melting temperature; T_m)은 천연형 및 변성된 상태의 단백질이 평형에서 동일하게 존재하는 온도로 정의된다. 이는 접힘(folding) 및 풀림(unfolding) 상태에 온전히 의존하는 단백질의 중요한 특성이다. T_m은 원평광 이색성 분광법(circular dichroism spectrometry; CD), 시차 주사 열량측정법(differential scanning calorimetry; DSC), 시차 정지 광산란(differential static light scatter; DSLS) 및 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry; DSF)를 포함하는 다양한 분석기기를 사용하여 측정할 수 있다. 이 중 DSF는 다양한 조건에서 단백질-리간드 결합 및 단백질의 안정성을 연구하기 위하여 사용되는 빠르고 비용-효율적인(cost-effective) 방법이다. DSF를 이용하여, 풀림 과정 동안 노출되는 단백질의 소수성 부분에 대해 향

상된 결합력을 갖는 특정 염료의 형광세기 증가에 의해 단백질 풀림을 모니터할 수 있다. 이는 상용화된 RT-PCR(real-time PCR) 기기를 이용하여 용이하게 수행될 수 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 재조합 단백질의 생산에 있어서, 세포로부터 발현되는 단백질의 양을 빠르게 정량화할 수 있는 방법을 찾기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 종래 단백질의 안정성 평가에 사용되는 DSF를 이용하면 표적 단백질의 표지나 별도의 정제과정 없이 세포 용해물로부터 직접 생산된 단백질의 정량이 가능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry)을 이용한 단백질 정량방법, 이를 이용한 재조합 단백질 생산 공정의 품질관리(quality control; QC) 방법 및 특정 단백질을 과발현하는 세포의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry; DSF)을 이용한 단백질 정량방법으로서, (a) 목적 단백질, 및 단백질의 소수성 부분에 대해 향상된 결합력을 갖는 염료를 포함하는 시료용액을 준비하는 단계; (b) 20 내지 100℃의 범위에서 온도를 변화시키면서 상기 염료의 형광파장에서 상기 시료용액으로부터의 형광세기를 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 형광세기의 최대값과 최소값의 차이를 도출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0010] 바람직하게, 상기 정량은 정량하고자 하는 단백질을 2개 이상의 상이한 기지농도로 포함하는 시료에 대한 측정값으로부터 작성한 표준곡선과 비교하여 수행되는 것인 방법일 수 있다.

[0011] 바람직하게, 상기 단백질은 정제된 단백질 또는 세포 용해물에 포함된 단백질인 것인 방법일 수 있다.

[0012] 바람직하게 상기 세포는 특정 단백질을 과발현하는 것인 방법일 수 있다.

[0013] 바람직하게 상기 특정 단백질은 외래 도입된 단백질인 것인 방법일 수 있다.

[0014] 바람직하게 상기 정량은 효소활성에 의해 측정된 농도와 비교하여 0 내지 10% 이내의 오차범위로 측정되는 것이 특징인 방법일 수 있다.

[0015] 바람직하게 상기 정량은 분석하고자 하는 단백질의 정제과정 없이 세포 용해물로부터 직접 측정되는 것이 특징인 방법일 수 있다.

[0016] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 세포를 배양하여 재조합 단백질을 발현시키는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 세포 배양으로부터 세포를 포함하여 시료를 채취하는 단계; (c) 상기 채취한 시료를 용해시킨 세포 용해물의 시차 주사 형광(DSF)을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 측정한 DSF로부터 세포 용해물 내의 재조합 단백질을 정량하는 단계를 포함하는, 재조합 단백질 생산 공정의 품질관리(quality control; QC) 방법을 제공한다.

[0017] 바람직하게 상기 세포는 특정 단백질을 과발현하도록 조작된 것이 특징인 방법일 수 있다.

[0018] 바람직하게 상기 (b) 단계 내지 (d) 단계는 전체 세포 배양기간 동안 1회 내지 10회 반복하여 수행되는 것이 특징인 방법일 수 있다.

[0019] 바람직하게 상기 품질관리는 측정시점까지 배양기간을 고려하여 (d) 단계에서 재조합 단백질 정량값이 일정 기준 미만인 경우, 세포의 재조합 단백질 생산능이 불량한 것으로 판단하는 것이 특징인 방법일 수 있다.

[0020] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 분석하고자 하는 세포를 배양하는 단계; (b) 상기 세포 배양으로부터 세포를 포함하여 시료를 채취하는 단계; (c) 상기 채취한 시료를 용해시킨 세포 용해물의 시차 주사 형광(DSF)을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 DSF 곡선으로부터 T_m값(녹는점; melting temperature)의 존재 여부를 판단하는 단계

를 포함하는 DSF를 이용하여 특정 단백질을 과발현하는 세포의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0021] 바람직하게 상기 제4단계로부터 T_m값이 존재하는 것으로 판단된 시료에 대해 상기 T_m값으로부터 과발현되는 단백질의 후보군을 선발하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법일 수 있다.

[0022] 바람직하게 상기 선발된 단백질 후보군에 대한 활성평가를 추가로 수행하여 단백질을 동정하는 단계를 추가로 포함하는 것이 특징인 방법일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 일 실시예에 의하면 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry; DSF)을 이용한 단백질 정량방법은 표적 단백질의 표지나 이에 특이적인 항체 등이 없이도 종래의 단백질 변성을 측정하는 시약 및 기기를 사용하여 단백질의 정량을 할 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 실시예에 의하면 상기 DSF를 이용한 단백질 정량방법은 재조합 단백질 생산에 있어서, 별도의 정제과정 없이도 세포 용해물로부터 직접 목적단백질을 정량할 수 있으므로 재조합 단백질 생산 공정의 품질관리(quality control; QC)에 유용하게 사용할 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면 상기 DSF를 이용한 단백질 정량방법은 별도의 정제과정 없이도 세포 용해물로부터 직접 목적단백질을 정량할 수 있으므로 상기 측정으로부터 T_m값(녹는점; melting temperature)의 존재 여부를 판정하여 특정 단백질을 과발현하는 세포를 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 α-아밀라제에 대한 융해곡선(melting curve)을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 의한 α-아밀라제의 단백질 농도에 대한 Δ(형광세기)의 복합 플롯(composite plot)을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 의한 셀로비아제에 대한 융해곡선을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 의한 셀로비아제의 단백질 농도에 대한 Δ(형광세기)의 복합 플롯을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 의한 pHCXHD을 포함하는 *E. coli* MC1061(빨간 선) 및 pHCDGAS을 포함하는 *E. coli* MC1061(파란 선)의 세포 용해물에 대한 융해곡선을 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 의한 pHis119를 포함하는 *E. coli* DH10B(빨간 선) 및 pHisThMA를 포함하는 *E. coli* DH10B(파란 선)의 세포 용해물에 대한 융해곡선을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 의한 DGAS에 대한 융해곡선을 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 의한 DGAS의 단백질 농도에 대한 Δ(형광세기)의 복합 플롯을 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 의한 ThMA에 대한 융해곡선을 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 의한 ThMA의 단백질 농도에 대한 Δ(형광세기)의 복합 플롯을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry; DSF)을 이용한 단백질 정량방법으로서, (a) 목적 단백질, 및 단백질의 소수성 부분에 대해 향상된 결합력을 갖는 염료를 포함하는 시료용액을 준비하는 단계; (b) 20 내지 100℃의 범위에서 온도를 변화시키면서 상기 염료의 형광파장에서 상기 시료용액으로부터의 형광세기를 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 형광세기의 최대값과 최소값의 차이를 도출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명에서 용어 "시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry; DSF)"은 표적 단백질의 열안정성 및 리간드 결합을 측정하는 열-변성 분석법(thermal-denaturation assay) 중의 하나로, 달리 열이동 분석법

(thermal shift assay), 형광 열이동 분석법(fluorescence thermal shift assay) 또는 형광기반 열이동 분석법(fluorescence-based thermal shift assay)이라고도 한다. 구체적으로, 표적 단백질의 소수성 부분, 예컨대 접힌 상태에서 단백질의 내부에 위치하는 부분에 대해 결합력을 갖는 염료를 도입하고, 상기 염료가 결합된 단백질의 온도를 증가시키면서 염료의 형광을 측정함으로써 수행된다. 일반적으로 단백질은 온도가 증가함에 따라 고유의 접힘 상태로부터 풀림 상태로 구조가 변화된다. 이와 같이 단백질의 구조가 풀림 상태로 전환됨에 따라 단백질 내부 즉, 소수성 부분에 결합된 염료가 노출되고 이의 형광세기는 증가한다. 상기 접힘 상태로부터 풀림 상태로의 전환은 수 ℃ 이내의 범위에서 급격히 일어난다. 이때, 접힘 상태와 풀림 상태가 평형을 이룬 온도를 단백질의 녹는점(melting point; T_m)이라 한다. 상기 녹는점은 단백질 고유의 물리적 특성 중 하나로 각각의 단백질은 고유의 녹는점 값을 갖는다. 상기 녹는점은 온도에 따른 형광세기 곡선의 일차미분 값이 최대이고 이차미분 값이 0인 온도이다.

[0029] 자연계에 존재하는 대부분의 단백질은 20 내지 100℃ 범위에 녹는점을 갖는다. 따라서, 상기 (b) 단계의 형광세기의 측정은 20 내지 100℃ 범위에서 수행하는 것이 바람직하다.

[0030] 한편, 상기 측정된 형광세기는 온도, pH, 염 등 다양한 조건에 따라 다른 바탕세기를 나타낼 수 있다. 따라서, 정량을 위해서는 이러한 바탕세기 변화를 보정하기 위하여 순수한 염료의 형광세기에 의존하는 형광세기의 최대값으로부터 최소값 즉, 바탕세기를 제거한 차이값을 이용하여 정량을 수행하는 것이 바람직하다.

[0031] 상기 DSF를 이용하여 단백질에 대한 리간드 결합의 측정은 단백질에 이에 특이적인 리간드가 결합한 경우 일반적으로 리간드가 결합하지 않은 단백질에 비해 녹는점이 증가한다는 사실을 기초로 한다. 이는 저분자량 리간드의 결합이 단백질 구조변화(conformational change)를 야기할 수 있으며, 이러한 변화는 단백질의 열적 안정성의 변화를 유발할 수 있다는 개념에서 출발한다. 이때, 상기 열적 안정성 변화는 열에 의해 유도되는 단백질 변성에 의해 측정될 수 있다.

[0032] 실험적인 면에서 상기 DSF는 용기에 시료와 염료를 혼합한 후 온도를 증가시키면서 특정 파장 예컨대, 상기 염료의 형광 방출 파장에서 형광세기를 검출하여 온도에 대하여 플롯함으로써 수행될 수 있다. 예컨대, 정제된 표적 단백질 용액 또는 표적단백질을 포함하는 세포 용해물일 수 있으며, 상기 염료는 단백질의 소수성 부분에 높은 결합력을 갖는 염료인 것이 바람직하다. 상기 염료의 비제한적인 예에는 Sypro 루비, Sypro 오렌지, Sypro 텐저린 및 Sypro 레드 등이 있다. 상기 염료들은 자외선 내지 가시광선 범위에서 고유의 흡수 스펙트럼을 가지며, 가시광선 영역에서 고유의 형광 스펙트럼을 갖는다. 이들 염료의 최대 흡수 및 형광 파장은 염료의 종류에 따라 상이하며, 따라서 사용하는 염료의 종류에 따라 흡수 및 형광 파장을 선택하는 것이 바람직하다. 예컨대, Sypro 루비는 280 및 450 nm에서 흡수 피크를 610 nm에서 형광 피크를 갖는 스펙트럼을 가지므로 430 내지 470 nm 범위의 파장으로 여기시키고 600 내지 620 nm 범위의 파장에서 형광을 검출할 수 있다. 마찬가지로, Sypro 오렌지는 470 nm의 최대 흡수 및 570 nm의 최대 형광파장을 가지므로 450 내지 490 nm 범위의 파장으로 여기시키고 560 내지 580 nm 범위의 파장에서 형광을 검출할 수 있다. Sypro 텐저린은 490 nm의 최대 흡수 및 640 nm의 최대 형광파장을 가지므로 470 내지 510 nm 범위의 파장으로 여기시키고 610 내지 630 nm 범위의 파장에서 형광을 검출할 수 있다. 또한 Sypro 레드는 550 nm의 최대 흡수 및 630 nm의 최대 형광파장을 가지므로 530 내지 570 nm 범위의 파장으로 여기시키고 620 내지 640 nm 범위의 파장에서 형광을 검출할 수 있다.

[0033] 바람직하게 상기 DSF는 온도 조절기를 구비한 형광분광계를 이용하거나, 이와 유사한 상용화된 기기인 RT-PCR 기기를 사용하여 수행될 수 있다. 이때 온도는 0.1 내지 10℃/분의 속도로 변화시킬 수 있으며, 바람직하게는 1℃/분의 속도로 변화시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 범위를 벗어나는 속도로 변화시키면서 측정하는 경우 정확한 융해곡선을 얻을 수 없으며, 이에 따라 이러한 속도로 측정된 융해곡선으로부터 도출된 녹는점 값은 신뢰하기 어렵다.

[0034] 본 발명에서 용어 "세포 용해물(cell lysate)"은 용해된 세포 함유물(contents of lysed cells)을 포함하는 유체(fluid)를 지칭하며, 상기 용해(lysis)는 세포를 파괴시키는 과정을 의미하는 것으로, 상기 용해는 바이러스, 효소 또는 삼투압 등에 의해 유발되는 것일 수 있다. 본 발명에서는 단백질을 포함한 세포 함유물이 분해되지 않고 고유의 특성을 유지하는 한 당업계에 공지된 용해방법을 제한없이 사용하여 세포 용해물을 수득할 수 있다. 바람직하게는 세포 및 배양액을 포함하는 세포 배양물을 채취하여 공지의 세포 용해 완충액을 가하여 세포를 용해시킴으로써 세포 용해물을 수득할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 세포 용해 완충액은 급격한 pH 변화로 인한 세포 함유물의 변성을 억제하기 위한 트리스-HCl 등의 완충액, 세포벽 완전성 유지에 필수적인 칼슘이온을 제거하여 세포벽을 붕괴시키고 단백질을 분해하는 메탈로프로테아제 활성을 억제하기 위한 EDTA, EGTA 등의 금속 킬레이트, 단백질을 변성은 유발하지 않으면서 단백질을 분리시키기 위한 SDS, 디옥시콜레이트,

트리톤 X 및/또는 NP-40 등의 비이온성 또는 양쪽이온성 계면활성제(non-ionic or zwitter ionic surfactant)를 포함함거나, 또는 삼투압에 의해 세포를 용해시키기 위해 NaCl 등의 염을 고농도로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 구체적으로 본 발명의 일 실시예에 따른 DSF를 이용한 단백질의 정량은 온도에 따른 형광세기로 주어지는 측정된 융해곡선에서 최대 형광세기와 바탕 형광세기의 차이 즉, Δ(형광세기)가 시료에 함유된 단백질의 농도에 비례한다는 사실에 기초하여 측정된 융해곡선으로부터 Δ(형광세기)를 계산하여 단백질의 농도를 유추할 수 있다.

[0036] 바람직하게 상기 정량은 정량하고자 하는 표적 단백질을 2개 이상의 상기한 기지농도로 포함하는 시료에 대한 측정값으로부터 작성한 표준곡선과 비교하여 수행될 수 있다. 전술한 바와 같이 Δ(형광세기)는 단백질의 농도와 비례하므로 2개 이상의 상이한 기지농도의 단백질 시료에 대해 측정된 Δ(형광세기)를 농도에 대하여 플롯하면 이들 플롯은 선형적 비례관계를 가지므로 최소 자승법을 이용하여 최적화된 농도 대 Δ(형광세기)에 대한 직선에 대한 방정식을 얻을 수 있다. 나아가, 상기 방정식에 동일 단백질을 미지농도로 포함하는 시료로부터 측정된 Δ(형광세기) 값을 대입함으로써 시료 중 단백질의 농도를 계산할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 정량방법은 정제된 단백질뿐만 아니라 세포 용해물에 포함된 단백질도 정량가능한 것이 특징이다. 바람직하게 상기 세포는 내재적으로 또는 외래 도입에 의해 특정 단백질을 과발현하는 세포일 수 있다.

[0038] 세포 용해물은 정량하고자 하는 표적 단백질뿐만 아니라 각기 다른 녹는점을 갖는 다양한 성분의 세포 함유물을 포함하므로 이들에 의한 간섭으로 정제된 단백질에 대한 것과는 달리 고유한 녹는점이 부재하는 넓게 확산된 형태의 융해곡선이 얻어질 수 있다. 그러나 특정 단백질을 고발현하는 세포의 용해물은 해당 단백질을 다른 세포 함유물보다 현저히 높은 농도로 포함하므로, 해당 단백질의 녹는점에 해당하는 온도에서 정제된 단백질에서와 유사한 형태의 피크를 가질 수 있다. 다만, 여전히 상대적으로 낮은 농도로 존재하는 다양한 다른 세포 함유물로 인해 높은 바탕세기를 나타내기는 하지만, 본 발명의 일 실시예에 따른 정량방법은 측정된 절대적인 형광세기를 이용하는 것이 아니라 융해곡선에서 최대 형광세기로부터 바탕 형광세기를 제거한 차이를 이용하므로 상기 불특정한 세포 함유물에 의한 바탕세기의 증가 효과를 상쇄할 수 있다.

[0039] 나아가 본 발명의 일 실시예에 따른 DSF를 이용한 단백질의 정량은 효소활성에 의해 측정된 농도와 비교하여 0 내지 10% 이내의 오차범위로 측정되는 것이 특징이다.

[0040] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 각각 DGAS와 ThMA를 과발현하는 발현 벡터를 포함하는 재조합 *E. coli* 세포의 용해물에 대하여 DSF 분석을 적용한 결과, 상기 발현 벡터를 포함하지 않는 세포의 용해물(도 2 빨간 점선)에서와 달리 특정 온도에서 형광세기의 급격한 증가가 관찰되는 것을 확인하였으며(도 2 파란 실선), 이들 스펙트럼은 바탕세기가 높은 것을 제외하고는 정제된 단백질에 의해 측정된 스펙트럼(도 1)과 유사한 형태를 나타내며, 상기 급격한 형광세기의 증가가 관찰되는 온도는 별도로 측정한 DGAS 및 ThMA의 녹는점과 각각 일치함을 확인하였다. 또한 상기 DSF를 이용하여 세포 용해물로부터 재조합 DGAS 및 ThMA를 정량하여 얻은 단백질 농도는 효소활성에 의해 계산된 단백질 농도와 각각 9.1%(0.11 mg/ml 대 0.12 mg/ml) 및 5.6%(0.54 mg/ml 대 0.51 mg/ml)의 차이로 측정되었다.

[0041] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 DSF를 이용한 단백질의 정량은 분석하고자 하는 단백질의 정제과정 없이 이를 과발현하는 세포 용해물로부터 직접 측정할 수 있는 것이 특징이다.

[0042] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 세포를 배양하여 재조합 단백질을 발현시키는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 세포 배양으로부터 세포를 포함하여 시료를 채취하는 단계; (c) 상기 채취한 시료를 용해시킨 세포 용해물의 시차 주사 형광(DSF)을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 측정한 DSF로부터 세포 용해물 내의 재조합 단백질을 정량하는 단계를 포함하는, 재조합 단백질 생산 공정의 품질관리(quality control; QC) 방법을 제공한다.

[0043] 상기 재조합 단백질 생산 공정은 이에 제한되지 않으나, 의약품 등의 용도로 특정 단백질을 대량생산하기 위한 방법으로 사용되는 공정으로서, 유전자 조작 또는 형질감염 등을 통해 해당 단백질을 과발현하는 세포를 생물반응기 등을 이용하여 일정 기간 동안 대량으로 배양하는 공정이며, 추가적으로 배양 후 회수 및/또는 정제하는 과정을 포함할 수 있다. 상기 공정은 대량으로 세포를 배양하는 것이 특징이므로 다량의 배지 및 기타 배양 첨가물을 이용하게 되며, 세포의 생존, 증식 및 상기 세포로부터 단백질의 발현을 촉진시키기 위한 배양조건은 실험실 수준의 그것과는 상이하다. 1회 생산에 소비되는 배지의 양만 고려하더라도 생산규모에 따라 수십 리터에서 수천 리터에 달하며, 배양기간도 수일에서 수십일까지 소요된다. 특히, 외관상으로 오염이나 별다른 이상 징

후없이 세포가 생장을 진행하더라도 원하는 단백질의 발현이 정상적으로 이루어지고 있는지는 별개의 문제이다. 그러므로, 배양 중간에 품질관리 과정 없이 공정을 진행하는 것은 시간적 및/또는 비용적인 면에서 큰 손해를 초래할 수 있다. 따라서, 전 공정을 통해 일정주기로 세포 배양물을 채취하여 공정이 제대로 이루어지고 있는지 확인하는 것은 중요하다.

[0044] 또한, 배양일에 비해 비정상적으로 낮은 단백질 발현율을 나타내는 것은 생산성을 저하시키는 원인이 되는 한편, 비정상적으로 높은 발현은 세포생장을 저해하거나 발현되는 단백질의 질을 저하시킬 수 있다. 이에 따라 생산 공정 중에 주기적으로 세포 배양물을 채취하여 세포생장율 뿐만 아니라 발현된 재조합 단백질의 농도를 확인하여 생장환경을 조절해 줄 수 있다. 즉, 단백질 발현율이 비정상적으로 낮은 경우 배지, 첨가물, 온도 및 용존 가스 농도 등의 배양조건을 적절히 조절하거나 불필요한 시간 및 비용소모를 줄이기 위하여 배양을 중단하는 등의 판단을 내릴 수 있다. 또는 과도하게 발현이 진행된 경우 배지나 첨가물의 양을 조절하거나, 조기 회수하는 등의 판단을 내릴 수 있다. 이와 같이 재조합 단백질 생산 공정에 있어서 공정 중간에 단백질의 발현 정도를 확인하는 것은 중요하다.

[0045] 그러나, 기존에 존재하는 단백질 발현을 정량하기 위한 방법은 해당 단백질에 특이적인 항체를 이용하거나 별도의 표지물질을 표지하는 단계를 필요로 하므로 비용과 시간이 소요되어 반복하여 수행하거나 즉시 판단하기 어려운 단점이 있었다. 본 발명의 일 실시예에 따른 DSF를 이용한 단백질 정량법은 배양기로부터 채취한 세포 배양물을 용해시킨 세포 용해물에 직접 적용가능하므로 적은 비용으로 빠르고 쉽게 분석할 수 있으며, 단회에 약 백 내지 수백개의 시료까지 동시에 처리가능한 특징이 있다. 재조합 단백질 생산이라는 목적상 상기 세포는 특정 단백질을 과발현하도록 조작된 세포인 것이 바람직하다. 이것이 전술한 바와 같이 세포 용해물로부터 직접 정량가능한 이유이다.

[0046] 일반적으로 재조합 단백질을 위한 세포 배양은 수일 내지 수십일에 걸쳐 진행되므로 상기 (b) 단계 내지 (d) 단계는 전체 세포 배양기간 동안 1회 내지 10회 반복하여 수행되는 것이 바람직하다. 즉, 1 내지 5일 간격으로 수행되는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니며, 측정간격이나 횟수는 세포 종류, 발현 단백질, 배양배지, 총 세포 배양기간 등에 따라 정할 수 있으며, 특히 한 번의 배양과정 내에서도 이전 측정결과에 따라 유동적으로 조절할 수 있다.

[0047] 전술한 바와 같이 특히, 상기 품질관리는 측정시점까지 배양기간을 고려하여 (d) 단계에서 재조합 단백질 정량값이 일정 기준 미만인 경우, 해당 세포의 재조합 단백질 생산능이 불량한 것으로 판단할 수 있다.

[0048] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 분석하고자 하는 세포를 배양하는 단계; (b) 상기 세포 배양으로부터 세포를 포함하여 시료를 채취하는 단계; (c) 상기 채취한 시료를 용해시킨 세포 용해물의 시차 주사 형광(DSF)을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 DSF 곡선으로부터 T_m값(녹는점; melting temperature)의 존재 여부를 판단하는 단계를 포함하는 DSF를 이용하여 특정 단백질을 과발현하는 세포의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0049] 이에 제한되는 것은 아니나, 단백질의 대량 생산을 위하여, 내재적으로 특정 단백질을 높은 수준으로 발현하는 세포를 탐색하거나, 발현을 향상시킬 수 있을 것으로 예상되는 유전자를 외래로부터 도입시켜 발현시키거나, 유전자에 돌연변이를 유발하거나 하는 등의 다양한 노력이 진행되고 있다.

[0050] 이러한 노력에 있어서, 특정 단백질을 과발현할 것으로 예상되는 또는 과발현하도록 제조된 후보 세포군으로부터 발현되는 단백질 양을 측정하여 원하는 단백질을 과발현하는 세포를 선별하는 과정 즉, 스크리닝 과정을 필요로 한다.

[0051] 전술한 바와 같이 정제된 단백질이 아닌 기타 세포 함유물을 포함하는 세포 용해물에 대해 DSF에 의해 작성된 융해곡선에서 T_m값의 존재는 다른 세포 함유물에 비해 상대적으로 높은 수준으로 발현되는 특정한 단백질이 존재함을 암시한다. 따라서, T_m값의 존재 여부를 확인하여 일차적으로 특정 단백질을 과발현하는 세포군을 선별할 수 있다.

[0052] 나아가 상기 제4단계로부터 T_m값이 존재하는 것으로 판단된 시료에 대해 상기 T_m값으로부터 과발현되는 단백질의 후보군을 선발하는 단계를 추가함으로써 특정 단백질을 과발현하도록 제조된 세포에서 과발현되는 단백질이 표적 단백질과 일치하는지 여부를 판단하거나, 내재적으로 또는 외래 도입에 의해 과발현되는 미지의 단백질을 동정할 수도 있다. 상기 융해곡선으로부터 계산된 T_m값은 단백질의 고유한 특성이므로 이와 유사한 T_m값을 갖는 단

백질군을 검색하여 해당 시스템에서 과발현되고 있는 것으로 판단할 수 있는 단백질 후보군으로 설정할 수 있다. 또는 기지의 단백질을 과발현하도록 제조된 시료인 경우 측정된 T_m값이 해당 단백질의 T_m값과 일치하는지 여부를 확인하여 판단할 수 있다.

[0053] 바람직하게는 상기 선발된 단백질 후보군에 대한 활성평가를 추가로 수행함으로써 과발현되는 단백질을 구체적으로 동정할 수 있다. 상기 활성평가는 후보 단백질에 적합하게 당업계에 공지된 방법을 제한없이 이용하여 수행될 수 있다.

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0055] **실시예 1: 물질**

[0056] α-아밀라제(α-amylase; EC 3.2.1.1, A6380) 및 셀로비아제(cellobiase; EC 3.2.1.4, A6105)는 시그마-알드리치 케미컬 컴퍼니(Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Life Technologies(Carlsbad, CA, USA)로부터 SYPRO 오렌지염료(orange dye; DMSO에 5,000× 농축), MicroAmp® 신속 광학 96-웰 반응접시(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 MicroAmp® 광학 접착필름(Applied Biosystems)을 DSF(differential scanning fluorimetry; 시차 주사 형광측정법) 분석에 사용하였다. 다른 모든 화합물은 시약급을 사용하였고, 시그마-알드리치 케미칼 컴퍼니와 Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, The Netherlands)로부터 구입하였다.

[0057] **실시예 2: 형광 측정**

[0058] 단백질의 보체(complement) 풀림점(unfolding point)을 DSF로 측정하였다. 시료는 10 ㎕의 SYPRO 오렌지(10×)와 10 ㎕의 효소용액 또는 *E. coli* 세포 용해물(lysate)(10×)을 혼합하여 준비하였다. 단백질과 SYPRO 오렌지 혼합물을 실시간-PCR(RT-PCR) 시스템에서 30℃로부터 99℃까지 1℃ 씩 증가하는 온도 구배를 사용하여 인큐베이션하였다. 모든 형광측정은 Applied Biosystems 7500 Fast RT-PCR 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 수행하였다. 모든 그래프 분석과 데이터 통계처리에 시그마플롯 12.0 소프트웨어(Systat Software, San Jose, USA)와 마이크로소프트 엑셀 프로그램(Redmond, WA, USA)을 사용하였다.

[0059] **실시예 3: *E. coli*에서 재조합 단백질의 발현 및 정제**

[0060] *E. coli*에서 재조합 단백질 발현을 정량하는 데 있어서, DSF 방법의 효율을 확인하기 위하여, 모델 단백질로서 데이노코커스 제오써말리스(*Deinococcus geothermalis*) DSM 11300으로부터 발현되는 아밀로수크라제(amylosucrase)(DGAS)와 써머스 종(*Thermus sp.*)으로부터 발현되는 말토게닉아밀라제(Maltogenic amylase)(ThMA)를 사용하였다. 항시적(constitutive) DGAS 및 ThMA 발현 벡터인 pHCDGAS와 pHisThMA는 공지된 구조로 구축하였다. pHCDGAS를 포함하는 재조합 *E. coli* MC1061[F^- araD139 Δ(ara-leu)7696 *gal*E15 *gal*K16 Δ(*lac*)X74 *rps*L(Str^r) *had*R2 (r_k-m_k^+) *mrc*A *mrc*B1] 세포와 pHisThMA를 포함하는 재조합 *E. coli* DH10B[F^- Φ80*lacZ* M15 (*lacZYA-argF*) U169 *rec*A1*end*A1 *hsd*R17(r_k^+, m_k^+) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ^-] 세포를 100 ml의 LB 배지(broth)에 200 rpm으로 교반하면서 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 원심분리(7,000×g, 4℃에서 20분)하여 세포를 수득하고 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl 및 20 mM 이미다졸(pH 7.0)을 포함하는 결합 완충액으로 세척하였다. 세균 펠렛을 결합 완충액에 재현탁시키고, 얼음 수조에서 초음파(Sonifier 450, Branson, Danbury, CT, USA; 출력 4, 6×10초, 일정충격(constant duty))처리하여(sonication) 분해하였다. 원심분리

(10,000×g, 4℃에서 10분)로 수득한 상층액을 재조합 단백질과 세포 용해물 시료를 얻기 위한 시작 물질로 사용하였다.

[0061] HisTrap HP 컬럼(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 구비한 고속 액체 크로마토그래피(fast performance liquid chromatography, FPLC) 시스템을 사용하여 재조합 DGAS 및 ThMA의 정제를 수행하였다. 세포 용해물을 HisTrap HP 컬럼에 주입하고, 용출 완충액(elution buffer; 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl 및 500 mM 이미다졸(pH 7.0)])으로 1.0 ml/min의 유속으로 용출시켰다. 모든 분획을 회수하여, 10% (w/v) 아크릴아미드 겔(acrylamide gel)을 이용한 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 확인하였다. 단백질 농도는 표준으로 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 포함하는 BCA™ 단백질 분석 키트(BCA™ protein assay kit, Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, USA)를 이용하여 결정하였다.

[0062] **실시예 4: DGAS 및 ThMA에 대한 활성 분석**

[0063] DGAS 활성은 디니트로살리실릭산(dinitrosalicylic acid, DNS) 방법에 의해 가수분해 활성을 결정하여 측정하였다. 반응 혼합물은 20 ㎕ 5% sucrose, 20 ㎕ 탈이온수 및 50 ㎕ 100 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 구성되었다. 반응은 기질 용액에 효소 용액 10 ㎕를 첨가함으로써 개시되었고, 45℃에서 10분 동안 지속되었다. 300 ㎕의 DNS 용액을 첨가하고 이어서 5분 동안 비등시킴으로써 반응 혼합물 중의 환원당(reducing sugar)의 존재를 결정하였다. 울트라 다기능성 마이크로플레이트 리더(ultra multifunctional microplate reader, InfinteM200, Tecan, Durham, NC, USA)를 사용하여 마지막 반응용액의 흡광도를 측정하였다. 환원당 농도는 프락토스(fructose)를 표준으로 사용하여 계산하였다. DGAS의 단위 유닛은 분석조건에서 분당 프락토스 1 μmole을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

[0064] ThMA의 효소 활성은 50 mM 구연산나트륨 완충액(sodium-citrate buffer, pH 6.0)에 녹인 1% 말토트리오스(maltotriose; G3)를 사용하여 결정하였다. 동일한 완충액에 희석시킨 ThMA(50 ㎕)를 2% G3 50 ㎕와 60℃에서 10분 동안 반응시켰다. 10분 동안 비등시켜 반응을 멈추고 G3으로부터 글루코스의 방출을 글루코스 산화효소-과산화효소(Glucose oxidase-peroxidase, GOD-POD) 방법을 사용하여 측정하였다. 900 ㎕ GOD-POD 용액을 첨가하고 37℃에서 5분 동안 인큐베이션하여 반응 혼합물 중의 D-글루코스의 존재를 확인하였다. UV/VIS 분광 광도계(DU 730, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 505 nm에서 최종 혼합물 용액의 흡광도를 측정하였다. ThMA의 단위 유닛은 분석조건에서 분당 1 μmole의 D-글루코스 생산을 촉매작용하는 효소의 양으로 정의하였다.

[0065] **실험예 1: DSF를 이용한 단백질 정량**

[0066] DSF를 이용한 단백질 정량이 가능함을 확인하기 위하여 2개의 상업적으로 이용 가능한 효소 α-아밀라제와 셀로비아제를 이용하였다. 먼저, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*)로부터 분리된 아밀라제는 약 50 kDa의 분자량 및 65℃의 최적온도를 가졌다. RT-PCR 기기로부터 얻은 α-아밀라제에 대한 대표적인 DSF 그래프를 도 1A에 나타내었다. 단백질의 T_m(melting temperature)은 DSF 곡선의 일차 미분 플롯(first derivative plot)의 가장 낮은 지점으로부터 얻을 수 있으며, 64.2±0.4℃로 계산되었다(도 1A). 가장 높은 형광세기는 1.0 mg/ml의 α-아밀라제 농도에서 1.6×10^5 임의 단위(arbitrary units; A.U.)였다. 형광세기는 증가하는 단백질 농도와 함께 증가되었다. Δ(형광세기)와 단백질 농도 사이의 관계는 도 1B에 나타난 바와 같이 0.986의 R^2 값을 갖는 우수한 상관관계를 나타내었다(도 1B). 이는 단백질 농도가 DSF 그래프의 Δ(형광세기)로부터 측정될 수 있음을 시사한다.

[0067] 셀로비오스를 두 개의 글루코스 분자로 가수분해하는 셀로비아제(또한 노보자임 188(Novozyme 188)로 불림)로 동일한 실험을 수행하였다. 상기 셀로비아제는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)의 액침발효(submerged fermentation)에 의해 획득하였다. 곡선의 가장 높은 형광세기의 값은 동일하지 않을지라도, 셀로비아제에 대해 관찰된 DSF 곡선의 패턴은 α-아밀라제의 그것과 일치하였다. 셀로비아제의 T_m은 66.7±0.2℃로 계산되었다(도 1C). 가장 높은 형광세기는 0.6 mg/ml의 셀로비오스 농도에서 2.9×10^4 A.U.였다. α-아밀라제에서 나타난 바와

같이, Δ(형광세기)와 셀로비아제의 단백질 농도 사이에 강한 상관관계가 존재하였으며, R^2 값은 0.994였다(도 1D). 상기 결과는 DSF에 의해 높은 신뢰도로 단백질 농도를 분석할 수 있음을 나타낸다.

[0068] DSF는 단백질에 결합하며 안정성을 촉진하는 낮은 분자량의 리간드를 동정하기 위한 빠르고 매력적인 스크리닝 방법으로 사용되어 왔다. 또한, 계면활성제의 존재 하에 DSF에 의해 단클론 항체의 높은 처리율(high-throughput)로 T_m을 분석하였다. DSF 분석에서, 단백질의 소수성 부분에 결합력(affinity)을 갖는 특정 염료, 예컨대 SYPRO 오렌지의 형광 증가에 의해 단백질 풀림을 분석할 수 있다. 상기 염료는 물 또는 친수성 환경의 자유 상태에서 약한 형광을 가지나, 변성된 단백질에서 노출된 소수성 부위에 결합했을 때는 강하게 형광을 나타낸다. 비록 실제적인 형광세기는 다를지라도, α-아밀라제와 셀로비아제는 모두 RT-PCR로부터 얻은 DSF 플롯에서 전형적인 단백질 변성 곡선을 나타내었다. 형광세기의 차이는 단백질의 소수성에서의 차이에 기인할 수 있다. α-아밀라제 보다 소수성인 내부를 갖는 변성된 셀로비아제에 보다 많은 SYPRO 오렌지가 결합하며, 이는 DSF에서 보다 높은 형광세기를 나타낸다. 그러나, 가장 중요한 특징은 Δ(형광세기)가 두 가지 단백질 모두의 농도와 밀접하게 관련되었다는 것으로, 이는 DSF가 용액 내의 단백질에 대한 정량적 검출 방법으로 사용될 수 있음을 뒷받침한다.

[0069] **실험예 2: *E. coli* 용해물에서 재조합 단백질의 DSF 분석**

[0070] 재조합 DNA 기술에서 사용된 수종의 *E. coli* 균주(strain)의 세포 용해물을 DSF 분석에 사용하였다. 사용된 *E. coli* 균주는 *E. coli* DH10B, MC1061 및 BL21이었으며, 이들은 유사한 DSF 곡선 패턴을 나타내었다. pUC19나 pGEM3Z와 같은 전형적인 클로닝 벡터의 존재는 DSF 분석에 영향을 주었다. 그러나, 완충액에서 α-아밀라제와 셀로비아제의 DSF 분석에서 관찰된 것과 비교하여 바탕선 형광세기(ca. 3.0×10^5-4.0×10^5 A.U.)가 높은 것은 세포 용해물의 다양한 구성요소에 기인할 수 있다.

[0071] 재조합 *E. coli* 세포로부터 획득한 세포 용해물을 DSF 분석에 적용하였다. DGAS에 대한 항시적 발현 벡터인 pHCDGAS를 포함하는 *E. coli*는 65℃ 근처에서 형광세기의 큰 증가를 나타내는 대조군 *E. coli*와는 다른 DSF 곡선 패턴을 나타내었다(도 2A). DGAS의 T_m은 59.3±0.7℃이며, 이는 65℃ 근처에서 형광의 증가가 *E. coli* 세포 용해물 중의 재조합 DGAS의 변성에 기인함을 시사한다. 실제로, 정제된 DGAS를 이용한 DSF의 가장 높은 형광세기는 DGAS를 포함하는 재조합 *E. coli* 세포의 DSF 곡선에서 최대값과 동일한 온도에서 관찰되었다. 다른 *E. coli* 숙주 시스템에서 이종 단백질(foreign protein)의 다른 발현 수준으로 인한 Δ(형광세기)에서 일부 차이가 존재함에도 불구하고, 사용된 *E. coli* 숙주 균주와 무관하게 DSF 그래프의 패턴은 동일하였다.

[0072] 또한 ThMA에 대한 항시적 발현 벡터(constitutive expression vector)인 pHisThMA를 포함하는 *E. coli* DH10B 세포를 DSF로 확인하였다(도 2B). DSF 곡선은 ThMA의 T_m인 75℃ 근처에서 큰 돌출을 나타내었다(T_m=74.5±0.3℃). 이는 DGAS 연구와 유사하게 돌출부가 *E. coli*에서 발현된 재조합 ThMA의 변성을 나타냄을 시사한다. *E. coli* MC1061와 BL21로부터 동일한 결과를 얻었으며, 이는 DSF 방법이 대부분의 *E. coli* 세포에 적용될 수 있음을 나타낸다.

[0073] **실험예 3: DSF를 이용한 *E. coli*에서 발현되는 재조합 단백질의 정량**

[0074] 정제된 DGAS를 모델 단백질로서 이용하여 Δ(형광세기)와 단백질 농도 사이의 관계에 대한 표준 곡선을 얻었다(도 3A 및 B). 사용된 단백질 농도는 11.3 μg/ml 내지 0.133 mg/ml 범위였다. 이때, 형광세기 차이는 단백질의 농도가 증가함에 따라 증가하였으며, Δ(형광세기)와 단백질 농도 사이의 결정계수(coefficient of determination; R^2 값)는 0.986이었다. 이는 상기 2개의 변수 간에 서로 밀접한 연관성이 있음을 나타낸다. DSF를 이용하여 결정한 재조합 세포 용해물 중 발현된 DGAS의 0.12±0.01 mg/ml이었다. 또한, 정제된 DGAS의 특이적 활성은 59.09±2.49 U/mg로 계산되었으며, 세포 용해물의 활성은 6.75±0.06 U/ml로, 0.11±0.00 mg/ml의 농도로 재조합 세포 용해물 중에 발현된 DGAS를 수득하였다. 상기 수치는 DSF 분석으로부터 획득한 농도에 매우 근접하며, 이는 DSF 방법에 의해 효율적으로 *E. coli*에서 발현되는 재조합 단백질의 직접적인 정량이 가능함을

암시한다.

[0075] ThMA로 동일한 실험을 수행하였다(도 3C 및 D). Δ(형광세기)와 단백질 농도 사이 관계의 R^2 값은 0.988이었으며, 이는 DGAS에 대한 결과에 매우 근접한 것이었다. 따라서, Δ(형광세기)와 단백질 농도는 또한 ThMA 발현에 대해 강한 상관관계를 나타내었다. 정제된 ThMA의 특이적 활성은 24.49±1.20 U/mg이었으며, 세포 용해물로부터 결정된 활성은 13.16±0.36 U/ml로, 재조합 세포 용해물에서 발현된 ThMA의 농도는 0.54±0.02 mg/ml이었다. 상기 수치는 DSF 실험으로부터 획득한 ThMA 농도 0.51±0.07 mg/ml와 일치하였다.

[0076] 본 발명에 따른 정량 방법으로서, 세포 용해물을 이용한 DSF 측정에 의해 *E. coli*로부터 발현된 재조합 DGAS 및 ThMA 단백질에 대한 활성 및 정량데이터를 정리하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0077]

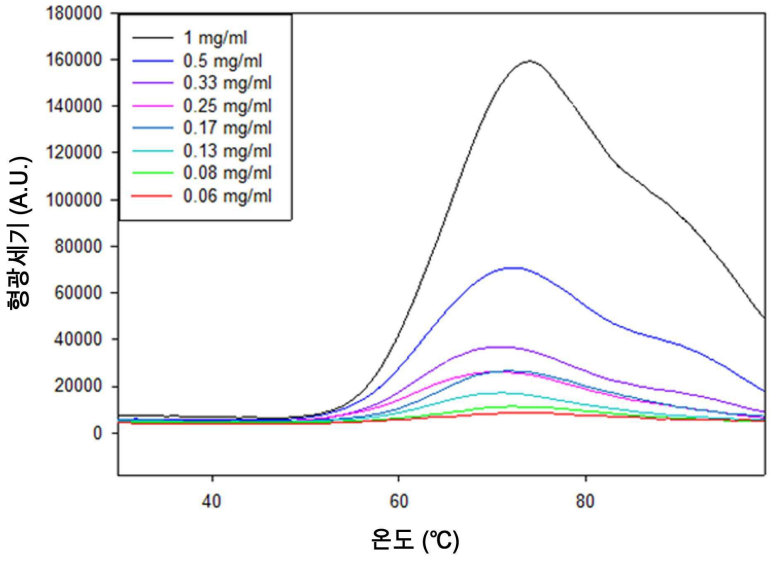
	Δ(형광세기)(Y)와 단백질 농도(X) 간의 관계식	Δ(형광세기)	DSF에 의한 단백질 농도 (mg / mL)	재조합 단백질 특이적 활성 (μmole / min·mg)	세포 용해물 활성 (μmole / min·mL)	효소 활성에 의한 단백질 농도 (mg / mL)
DGAS	Y = 4,345,524×X − 13,239 (R^2=0.986)	555,177.3 ± 47,259.9	0.12 ± 0.01	59.09 ± 2.49	6.75 ± 0.06	0.11 ± 0.00
ThMA	Y = 976,693×X − 6,785 (R^2=0.988)	489,467.7 ± 73,344.3	0.51 ± 0.07	24.49 ± 1.20	13.16 ± 0.36	0.54 ± 0.02

[0078] 상기 결과를 종합하면, 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorometry; DSF)을 이용하여, 특정 단백질을 정량할 수 있으며, 특히 단백질의 정제과정 없이도 정량이 가능함을 확인하였다.

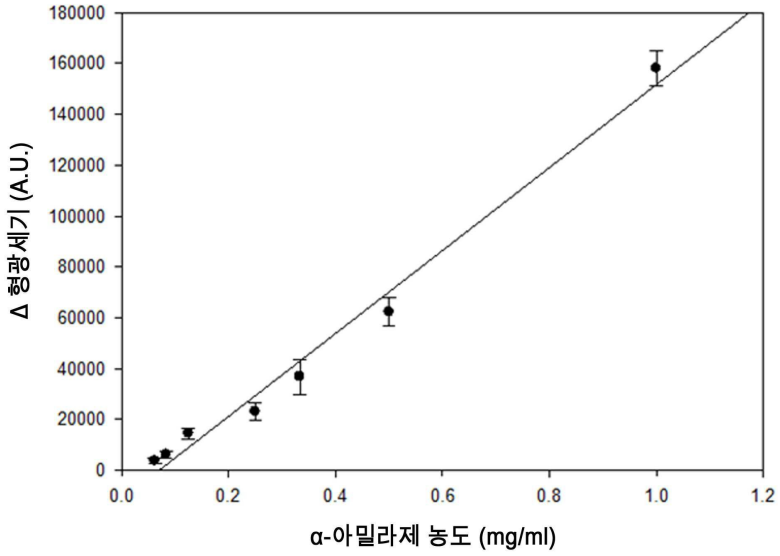
[0079] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당 업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

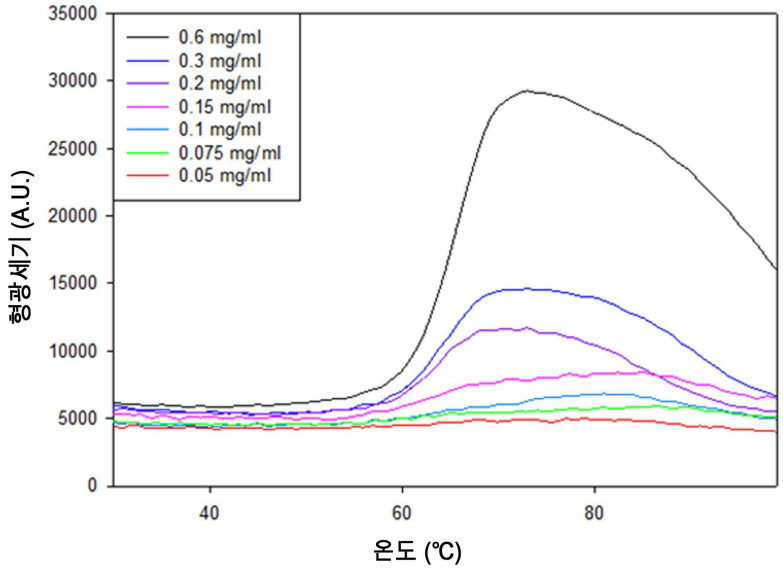
도면1



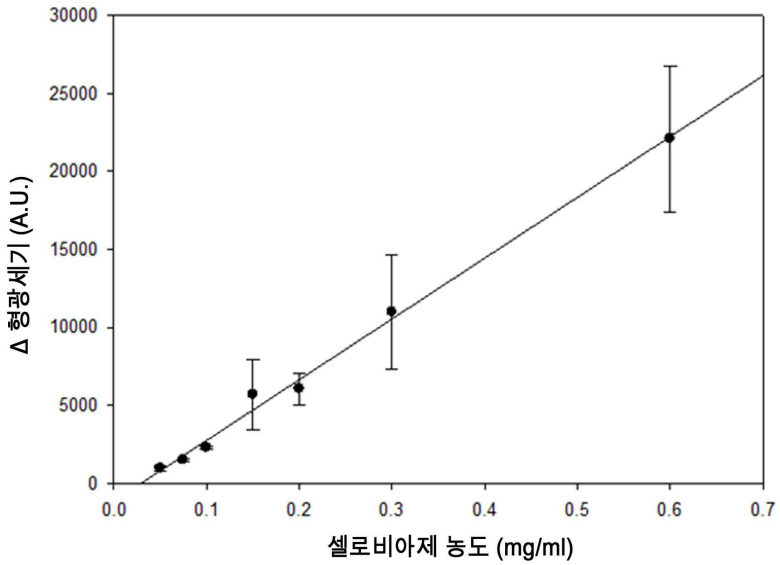
도면2


Δ 형광세기 (A.U.)
α-아밀라제 농도 (mg/ml)
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2

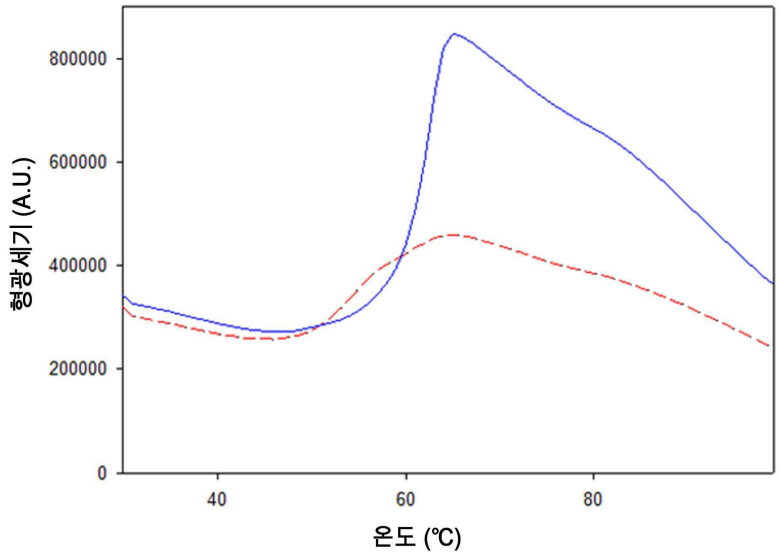
도면3


형광세기 (A.U.)
온도 (℃)
0.6 mg/ml
0.3 mg/ml
0.2 mg/ml
0.15 mg/ml
0.1 mg/ml
0.075 mg/ml
0.05 mg/ml
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
40
60
80

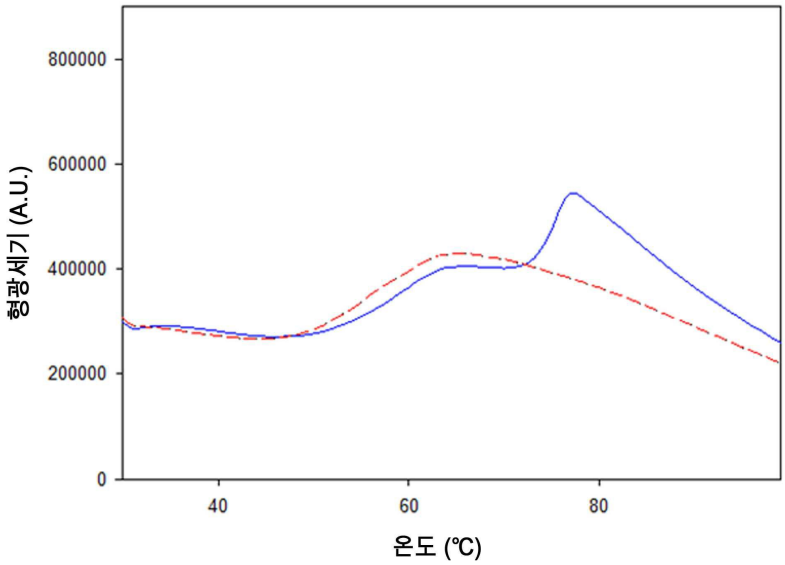
도면4


30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Δ 형광세기 (A.U.)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
셀로비아제 농도 (mg/ml)

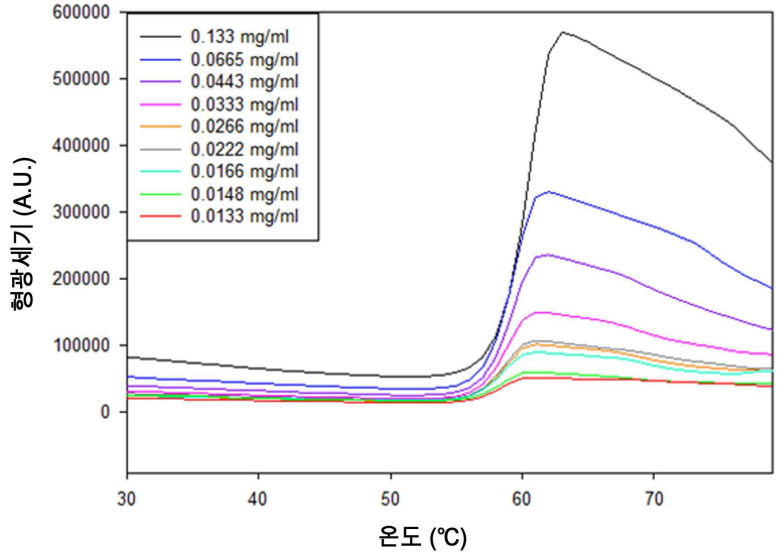
도면5


800000
600000
400000
200000
0
형광세기 (A.U.)
40
60
80
온도 (℃)

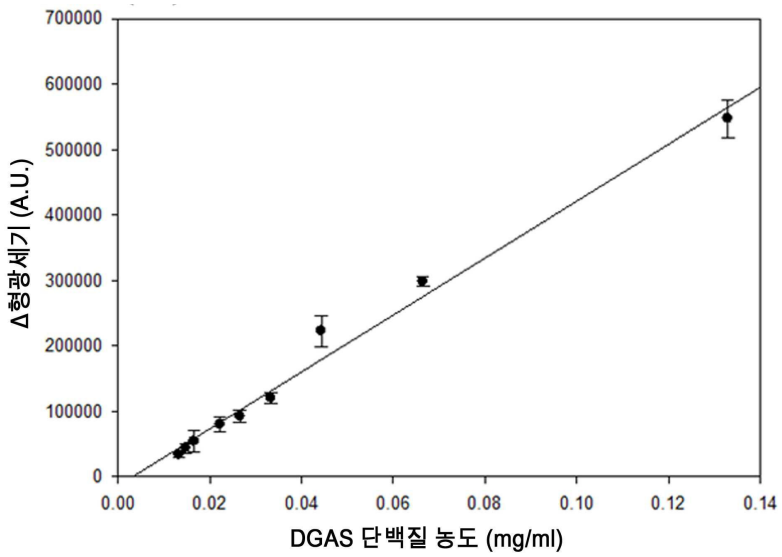
도면6


800000
600000
400000
200000
0
형광세기 (A.U.)
40
60
80
온도 (℃)

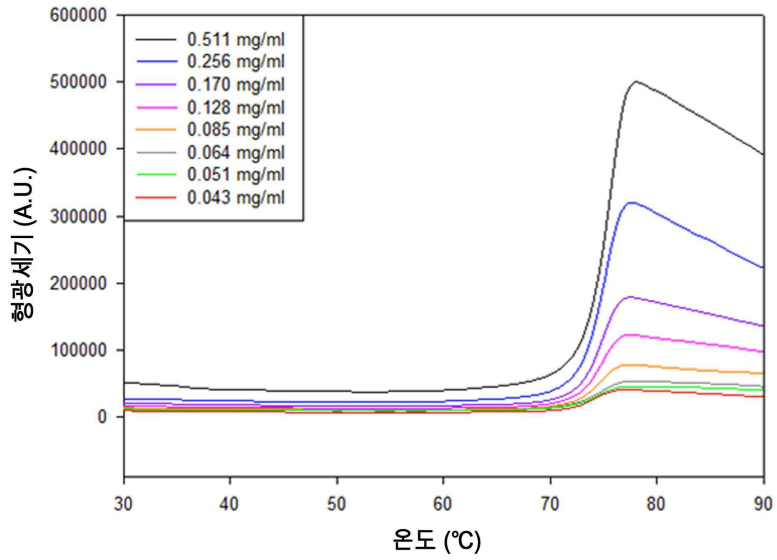
도면7


600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
형광세기 (A.U.)
0.133 mg/ml
0.0665 mg/ml
0.0443 mg/ml
0.0333 mg/ml
0.0266 mg/ml
0.0222 mg/ml
0.0166 mg/ml
0.0148 mg/ml
0.0133 mg/ml
30
40
50
60
70
온도 (℃)

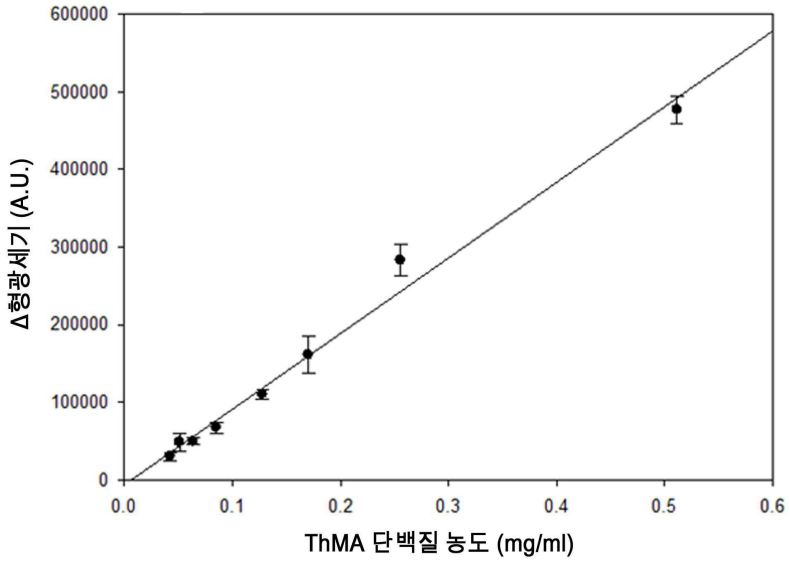
도면8


700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Δ형광세기 (A.U.)
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0.14
DGAS 단백질 농도 (mg/ml)

도면9


600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
형광세기 (A.U.)
0.511 mg/ml
0.256 mg/ml
0.170 mg/ml
0.128 mg/ml
0.085 mg/ml
0.064 mg/ml
0.051 mg/ml
0.043 mg/ml
30
40
50
60
70
80
90
온도 (℃)

도면10


600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Δ형광세기 (A.U.)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
ThMA 단백질 농도 (mg/ml)