



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0096619
(43) 공개일자 2017년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 21/25 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
G01N 33/576 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6878 (2013.01)
G01N 21/25 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0102925(분할)
(22) 출원일자 2017년08월14일
심사청구일자 2017년08월14일
(62) 원출원 특허 10-2015-0118939
원출원일자 2015년08월24일
심사청구일자 2015년08월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이지원
서울특별시 서초구 남부순환로309길 38, 5동 522호 (방배동, 서초중앙하이츠빌라)
이종환
서울특별시 동대문구 무학로 184, 305호 (용두동)
서혁성
서울특별시 강동구 아리수로97길 20, 506동 1004호 (강일동, 강일리버파크5단지아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

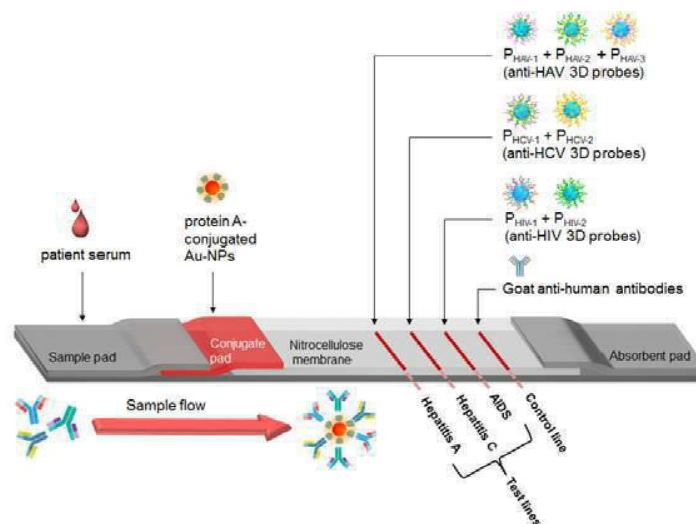
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 3차원 단백질 나노입자 프로브 기반 복수 질환의 동시검출 방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 고감도 3차원 단백질 나노입자 프로브 기반 복수 질환의 동시검출방법 및 고감도 3차원 단백질 나노입자 프로브를 이용한 복수 질환의 동시검출용 키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어레이 키트 및 상기 키트를 이용한 복수질환의 동시검출방법에 대한 것으로서, 본 발명에 따른 단백질 나노입자 프로브는 표면에 질병마커 특이적 에피토프들이 올바른 배향성을 갖고, 고집적으로 표출이 가능하고, 이들의 혼합비율을 조절하여 다양한 비율로 여러 종류의 질병마커 특이적 에피토프를 검출할 수 있으며, 이를 이용한 질병마커의 검출방법은 다양한 질병마커 특이적 에피토프가 단백질 나노입자의 표면에 표출되어 있어, 민감도와 정확성이 매우 뛰어나다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 21/763 (2013.01)

G01N 33/56988 (2013.01)

G01N 33/5767 (2013.01)

G01N 33/5768 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015001861

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자-도약 도전(추가지원)

연구과제명 의료기능 맞춤형 단백질 나노입자 기반 차세대 나노의료 혁신기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 제1 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합발현되어 있는 자가조립(self-assembly) 단백질 나노입자 프로브가 식재된 멤브레인; 동일 멤브레인의 별도부위에, 제2 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합발현되어 있는 자가조립(self-assembly) 단백질 나노입자 프로브를 식재하되, 제1 질병마커 및 제2 질병마커는 서로 상이한 질병에 관한 마커이고, 상기 질병마커는 샘플 내 항체와 결합하는 것을 특징으로 하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 2

샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 제1 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합발현되어 있는 자가조립(self-assembly) 단백질 나노입자 프로브가 식재된 멤브레인; 동일 멤브레인의 별도 부위에, 제2 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합발현되어 있는 자가조립(self-assembly) 단백질 나노입자 프로브 및 동일 멤브레인의 또다른 부위에, 제3 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합발현되어 있는 자가조립(self-assembly) 단백질 나노입자 프로브를 식재하되, 상기 제1질병마커; 제2질병마커 및 제3질병마커는 서로 상이한 질병에 관한 마커이고, 상기 질병마커는 샘플 내 항체와 결합하는 것을 특징으로 하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 질병은 에이즈, C형간염 및 A형간염을 포함하는 군에서 선택되고, 제1질병마커와 제2질병마커 및 제3질병마커는 상이한 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 에이즈의 마커 특이적 에피토프는 gp41 및 p24를 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 C형간염의 마커 특이적 에피토프는 c22p, c33p, 511p, c100p, 및 이들이 2이상 융합된 에피토프를 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33p, c22p-511p, c22p-c100p, c33p-511p, c33p-c100p, 511p-c100p 및 c22p-511p-c100p를 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 A형간염의 마커 특이적 에피토프는 E1, E2 및 E3를 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 인간 헤리틴 중쇄 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제2질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브는 서로 다른 제2질병마커 특이적 에피토프가 각각 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 10

제2항에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제3질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브는 서로 다른 제3질병마커 특이적 에피토프가 각각 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 단백질 나노입자 프로브는 표면에 질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 서로 다른 단백질 나노입자가 1:9 ~ 9:1의 비율로 혼합된 것을 특징하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 신호분자는 protein A-콜로이달 골드 나노입자 또는 proteinG-콜로이달 골드 나노입자인 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 멤브레인에 단백질 나노입자 프로브는 시험선(test line)을 형성하는 형태로 고정화 되는 것을 특징으로 하고, 컨트롤 항체가 고정화된 대조선(control line)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 측면 유동어세이 키트.

청구항 14

다음의 단계를 포함하는 측면 유동어세이를 이용한 복수 질환의 동시검출 방법:

- (a) 제1항 또는 제2항의 측면 유동어세이 키트와 검출 대상 시료를 반응시키는 단계; 및
- (b) 육안 또는 광도계(densitometer)를 이용하여 신호분자의 발색광을 측정하는 단계.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 발색광은 질병마커에 대한 항체가 시료에 존재하고, 이에 단백질 나노입자가 결합하는 경우, 신호분자에 의해 시험선에 나타나는 것을 특징으로 하는 동시검출 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 고감도 3차원 단백질 나노입자 프로브 기반 복수 질환의 동시검출방법 및 고감도 3차원 단백질 나노입자 프로브를 이용한 복수 질환의 동시검출용 키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 샘플패드; 신호분자가 식재된 전극배선패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어레이 키트 및 상기 키트를 포함하는 복수질환의 동시검출방법에 대한 것으로서, 본 발명에 따른 고감도 3차원 단백질 나노입자 프로브를 이용한 복수 질환의 동시검출방법은 한 질병에 대한 둘 이상의 에피토프를 각각 포함하는 단백질 나노입자를 사용함으로써, 복수질환의 동시검출에 대한 민감도와 정확성이 매우 뛰어나다.

배경기술

[0003] 에이즈, 간염, 폐렴, 결핵, 말라리아와 같은 감염성 질환은 연간 1500만 명의 죽음에 원인이 되고 있으며, 이는 전 세계 인구의 죽음에 25%에 해당하는 수치이다. 감염성 질환으로 인한 죽음은 대부분 의료시설 및 서비스가 열악한 개발도상국에서 일어나고 있으며, 그로 인해 저렴하고, 편리한, 환자친화적인 의료서비스 제공의 필요성이 대두되고 있다. 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)), 프로테옴 칩(proteome chips), 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction (PCR)), 미세유체시스템 기반 진단기법(microfluidic system-based assays) 등이 개발 되었지만, 고가의 장비 및 숙련된 의료진 등이 필수적으로 요구되어 개발도상국에서의 활용에 한계를 갖고 있다. 상기의 실험기법에 비해, 측면 유동어레이(Lateral Flow Assay(LFA)) 기법은 실험 방법이 단순하고, 경제적이며, 빠른 시간 내(약 30분)에 결과 확인이 가능한 환자친화적인 방법이지만, LFA 기법의 경우, 프로브와 타겟의 비 특이적 결합에 의한 위양성률이 높으며, 짧은 반응시간으로 인해, 그 민감도가 낮다는 한계를 갖고 있다. 또한 다양한 질환의 동시진단에 있어, 각각의 질환 진단을 위한 최적 조건이 상이하고, 질환사이의 교차반응성이 존재하여, 동시진단이 어렵다는 한계를 갖고 있다.

[0004] 수혈사고는 바이러스 감염질환의 중요한 전파경로이며, 현재 다양하게 진보된 형태의 진단기술이 개발되어 왔음에도 불구하고, 아직까지 심각한 사회적 문제를 일으키고 있다. 질환에 처음 감염 되면, 기술적 한계로 인한 진단 불가능 영역인, 'window period' 가 존재하고, 이러한 시기에는 시료 내 질병마커의 농도가 매우 낮아, 실제 양성 시료임에도 불구하고, 음성으로 판정하는 진단 오류가 빈번히 발생하고 있는 실정이다. 따라서, 환자들의 경제적심리적 고통이 가중 될 수밖에 없으며, 환자가 자신의 감염 사실을 모른 채 타인에게 2차 감염을 발생시킬 수 있어 사회적 문제로 대두되고 있다. 현재 핵산진단검사 (nucleic acid testing (NAT)) 와 같은 고민감도를 갖는 진단기술이 개발되었으나, 핵산진단검사의 경우, 추가적인 시료의 전처리 과정이 필수적으로 요구되며, 시료의 분석에 고가의 장비가 요구되는 등, 신원 및 의식이 불확실한 환자의 시료검사와 같은 응급상황에 적용하기 힘들며, 의료시설이 취약한 지역에서의 범용적 활용에 한계가 있다.

[0005] 인간 면역결핍 바이러스(Human immunodeficiency virus, HIV)와 C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus, HCV)는 같은 감염 루트를 갖고 있다고 알려져 있다. 대부분, 혈액을 매개로 감염되며, 성관계, 동일 주사기의 사용 및 수혈을 통해서 감염되는 것으로 알려져 있다. 위 두 가지 바이러스는 같은 감염루트를 갖고 있기 때문에, 두 바이러스에 동시감염 사례가 많이 보고되고 있으며, 약 500-1000만 정도의 환자가 동시감염 되어 있다고 알려져 있다. C형 간염환자가 HIV에 동시감염 되면, 간세포의 섬유화 진행을 앞당겨 빠른 간경변 또는 간암에 이르게 되며, AIDS환자가 HCV에 동시감염 될 경우, 더 빠른 면역 결핍상태로 도달 한다고 알려져 있다. 각각 서로 다른 바이러스 감염질환은 그 치료법 또한 달라져야 하며, 동시감염 시에는 그에 상응하는 치료법이 제공되어야 한다. 따라서 두 질환의 동시진단을 위한 동시 진단시스템의 개발이 필수적이다. 또한 A형간염의 경우엔, 효과적인 백신이 개발되어 있지만, 그 전파경로가 음식물이나, 단순접촉으로도 감염될 수 있으며 A형 간염 바이러스(Hepatitis A virus, HAV)의 경우, 비 생물학적 조건에서도 몇 달간 생존이 가능하며, 극한의 온도나 pH에서도 살아남을 수 있어 매년 150만 명의 새로운 환자가 발생하고 있는 실정이다. HAV 바이러스가 감염되게 되면, 5-10일 이후엔 IgM 형태의 항체가 몸에서 생성되고, 증상이 완화될 무렵 IgG형태의 항체가 생성되어 평생 동안 몸속에 머무르게 되므로, A형 간염의 진단방법으로 IgM와 IgG 두 가지 형태의 항체를 모두 검출하는 진단법이 활용되고 있는 실정이다.

[0006] 체외진단 분야는 보다 정확하고, 빠르며, 간편한 측정/분석을 지향하는 기술 개발이 이루어지고 있으며, 현재 고감도 진단센서 개발을 위해 주로 응용되는 인공적 합성 나노소재(금 나노입자, 실리콘 나노선, 자성 나노입자, 실리카 나노입자 등)는 합성 과정이 매우 복잡하며 일관성 있는 반응제어가 쉽지 않기 때문에 균일한

크기/입도분포를 갖는 나노소재/입자의 대규모/대량 생산이 어려우며, 입자 표면에 생물학적 기능성을 부여(항체, 펩타이드, 단백질 등의 표면 분포)하기 위해 표면의 화학적 개질이 필수적으로 요구되고 있다. 따라서 인공적 합성 나노소재 표면에서의 프로브 활성화, 프로브의 배향성 및 집적도 제어의 어려움 등으로 진단의 민감도, 특이도 및 재현성이 낮은 수준에 머물러 있으며, 이러한 기술적 한계로 인해 현재의 진단기술은 질환 마커의 민감도 및 특이도에 한계를 갖고 있는 실정이다.

[0007] 웨리틴(Ferritin)은 무거운 사슬과 가벼운 사슬로 구성된 24개의 동일한 단백질 서브유닛(subunit)으로 구성되며 생체내에서 중공 외피(hollow shell)를 형성한다. 철분과 결합하는 상기 단백질은 철 저장 기능을 가지며, 철 해독(iron detoxification) 기능을 한다(Harrison et al., Biochim Biophys Acta., 1275(3): 161-163, 1996). 상기 단백질은 대부분의 조직의 성장과 생존을 위해 세포 내의 철 균형을 유지하고, 세포 내의 철의 결합으로 인한 산소-자유 라디칼 형성을 최소화시키는 세포 보호 단백질로서 기능을 한다(Lawson et al., Nature, 349: 541-544, 1991). 웨리틴의 분자량은 약 500.000Da으로, 무거운 사슬(Heavy chain)과 가벼운 사슬(Light chain)로 구성되어 있고, 자가 조립 능력이 있어 구형 입자를 형성하는 독특한 특성을 나타낸다.

[0008] 인간 중쇄 웨리틴은(heavy chain, 21 kDa) 24개의 단량체가 세포 내에서 4-3-2 symmetry 위상으로 자가조립(self-assembly)되어 만들어지는 단백질 나노입자이며, 인간 중쇄 웨리틴(hFTH) 단량체는 대장균 세포 내에서도 높은 발현율과 수용도로 생합성 되면서도 자가조립 특성에 의해 약 12 nm 직경의 나노입자를 형성한다. 또한 안정성이 탁월하며 비교적 간단한 유전자 조작으로 입자의 표면 기능/특성을 용도에 따라 자유자재로 부여할 수 있으며, 각기 다른 외래 단백질을 단량체에 융합 발현하면 다수의 이중 외래 단백질을 포함하는 하나의 단백질 나노입자의 제조가 가능하다. 따라서, 단백질 나노입자를 기반소재로 활용하여 프로브의 활성화, 배향성, 합성 효율 문제를 근본적으로 해결하면서 단백질 나노입자의 자가조립 과정을 이용, 3차원 검출프로브를 제조함으로써 고집적도, 고민감도, 고특이도 구현이 가능하다.

[0009] 조기진단이 중요한 만성 질병 및 바이러스 감염 질병은 동일한 질병이라 하더라도 다양한 질병 표지 인자를 포함하고 있으며 환자 개별 간 체내 질병 표지 인자의 분포 정도가 상이하여 정확한 진단의 어려움이 있다. 또한 대다수의 환자에 존재하는 민감도와 특이도가 높은 질병 표지 인자가 발견되지 않은 경우 여러 질병 관련 표지 인자의 발견 빈도에 따라 질병을 진단하기도 한다. 따라서 정확한 조기 진단을 위해서는 체내의 다양한 질병 표지 인자를 동시에 검출할 수 있는 동시 다중 질병 표지 인자 검출 시스템의 개발이 요구된다.

[0010] 본 발명자들은 대한민국 특허 제10-2012-0126843호에서 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정화 된 하이드로젤을 사용하여 질환 마커의 고감도 검출이 가능한 시스템을 개발하였으며, 하나의 모델질환으로 AIDS 진단에 적용하였으나, 한 번에 하나의 질환 마커만 검출 가능하다는 단점이 있었다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 민감도와 정확성이 높은 복수 질환의 동시검출방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 동일 질병에 대한 서로 다른 에피토프를 융합한 인간 웨리틴 단백질 단량체를 암호화 하는 발현벡터를 각각 설계, 제작하여 대장균 내에서 동시발현 할 경우, 질병마커 측정에 유용한 민감도 높은 여러 중요 항원성 에피토프를 각각 단백질 나노입자 표면에 표출한 단백질 나노입자 프로브를 사용할 경우, 동시 다중 질병마커 검출이 가능할 뿐만 아니라, 혼합 비율을 조절하여 항원성 에피토프의 표출 빈도 조절이 가능해진 단백질 나노입자 프로브를 개발하였다. 또한 본 발명의 동시 다중 질병마커 검출이 가능한 고기능성 단백질 나노입자 프로브를 이용하여 에이즈, C형 간염 및 A형 간염의 동시검출에 이용한 결과, 민감도와 정확도가 펩타이드 프로브에 비해 획기적으로 뛰어남을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 다양한 질병마커 특이적 에피토프를 표면에 함유하고 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 측면 유동어레이 키트를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 측면 유동어레이 키트를 이용한 복수 질환의 동시검출방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제1질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어레이 키트를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제1질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제2질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어레이 키트를 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한, 샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제1질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제2질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 및 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제3질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어레이 키트를 제공한다.
- [0023] 본 발명은 또한, (a) 샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제1질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제2질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 및 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제3질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어레이 키트와 검출 대상 시료를 반응시키는 단계; 및 (b) 육안 또는 광도계(densitometer)를 이용하여 형광을 측정하는 단계를 포함하는 측면 유동어레이를 이용한 복수 질환의 동시검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 단백질 나노입자 프로브는 세포 내에서 자연 생합성 되는 3차원 나노구조체로서 항상 정확한 4차 구조와 입자 topology를 유지하며 합성되고, 프로브의 활성, 배향성, 합성 효율문제를 획기적으로 증가시켰을 뿐만 아니라, 나노독성 문제가 없는 안전한 3차원 생체 나노입자로서, 다수의 바이러스 감염성 질환의 고민감도와 높은 정확성으로 진단할 수 있는 장점이 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 단백질 나노입자 프로브를 이용한 복수 질환의 동시검출방법은 복수 질환의 동시검출 시, 민감도 및 특이도가 현격하게 향상되어, 감염질환에 대한 조기진단에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 에이즈, C형간염 및 A형간염 진단용 3차원 단백질 나노입자 프로브 개발을 위한 발현백터의 모식도, 발현된 단백질 나노입자 프로브 단량체의 모식도 및 3차원 구조체의 모식도로서 (A)는 에이즈 진단용 단백질 나노입자 프로브인 P_{HIV-1} 과 P_{HIV-2} 를 나타낸 것이고, (B)는 C형간염 진단용 단백질 나노입자 프로브인 P_{HCV-1} 과 P_{HCV-2} 를 나타낸 것이며, (C) A형간염 진단용 단백질 나노입자 프로브인 P_{HAV-1} , P_{HAV-2} 와 P_{HAV-3} 를 나타낸 것이다.
- 도 2는 Ni^{2+} -NTA affinity 크로마토그래피를 통한 정제된 단백질 나노입자 프로브의 SDS-PAGE 결과이다(M: 크기분자 표지인자, S: 수용성 단백질, IS: 불용성 단백질).
- 도 3은 정제된 단백질 나노입자 프로브의 투과전자현미경(TEM) 사진으로, (A)는 AIDS 진단용 단백질 나노입자 프로브를 나타낸 것이고, (B)는 C형간염 진단용 단백질 나노입자 프로브를 나타낸 것이며, (C)는 A형간염 진단용 단백질 나노입자 프로브를 나타낸 것이다.

도 4는 단백질 나노입자 프로브 기반 측면 유동어세이(Lateral Flow Assay, LFA) 시스템 모식도로서, LFA 시스템은 샘플패드(sample pad), 컨쥬게이션 패드(conjugation pad), 멤브레인(nitrocellulose membrane) 및 흡수패드(adsorbent pad)로 구성되어 있으며, 멤브레인 위에 AIDS, C형간염, A형간염 진단을 위한 단백질 나노입자 프로브가 시험선으로 고정화 되어있으며, 대조선으로 항-인간 이차항체가 고정화 되어 있다.

도 5는 신호분자로서 작동하는 콜로이달 골드 나노입자의 (A) 투과전자현미경 (TEM) 사진 및 (B) 동적광산란법 (DLS) 분석결과이다.

도 6은 자외선 및 가시광선 분광법(UV-vis absorption spectra analysis)을 활용한 콜로이달 골드에 결합 하는 protein A 양 최적화한 결과이다(최종적으로 40 nM의 protein A가 사용됨).

도 7은 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA와 펩타이드 프로브 기반 LFA의 검출한계를 비교한 것으로, (A)는 AIDS, (B)는 C형간염 및 (C)는 A형 간염에 대한 비교 결과이다.

도 8은 AIDS 환자 20명의 혈청시료를 대상으로 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA 시스템의 민감도를 검증한 결과이다.

도 9는 C형간염 환자 20명의 혈청시료를 대상으로 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA 시스템의 민감도를 검증한 결과이다.

도 10은 A형간염 환자 20명의 혈청시료를 대상으로 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA 시스템의 민감도를 검증한 결과이다.

도 11은 AIDS 환자 20명의 혈청시료를 대상으로 펩타이드 프로브 기반 LFA 시스템의 민감도를 검증한 결과이다.

도 12는 C형간염 환자 20명의 혈청시료를 대상으로 펩타이드 프로브 기반 LFA 시스템의 민감도를 검증한 결과이다.

도 13은 A형간염 환자 20명의 혈청시료를 대상으로 펩타이드 프로브 기반 LFA 시스템의 민감도를 검증한 결과이다.

도 14는 정상인 20명의 혈청시료 대상을 대상으로 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA 시스템의 특이도 검증한 결과이다.

도 15는 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA 시스템의 Duplex assay (2 종류의 바이러스 감염질환의 동시진단)로서, AIDS 및 C형간염을 검증한 결과이다.

도 16은 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA 시스템의 Duplex assay (2 종류의 바이러스 감염질환의 동시진단)로서, AIDS 및 A형간염을 검증한 결과이다.

도 17은 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA 시스템의 Duplex assay (2 종류의 바이러스 감염질환의 동시진단)로서, C형간염 및 A형간염을 검증한 결과이다.

도 18은 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA 시스템의 Triplex assay (3 종류의 바이러스 감염질환의 동시진단)를 검증한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029]

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0031]

인간 웨리틴은 중쇄(heavy chain, 21kDa) 및 경쇄(light chain, 19kDa) 웨리틴 단량체 24개가 세포 내에서 4-3-2 symmetry 위상으로 자가조립(self-assembly)되어 만들어지는 단백질 나노입자인데, 인간 중쇄 웨리틴 단량체는 대장균 세포 내에서도 높은 발현율과 수용도로 생합성 되면서도 자가조립 특성에 의해 약 12nm 직경의 나노입자를 형성한다. 나노입자를 형성하고 있는 활성형의 인간 중쇄 웨리틴은 아미노 말단(N-term.)이 입자 외부로 표출되어 있고, 카르복실 말단(C-term.)은 외래 단백질 또는 펩타이드를 융합시킬 경우 입자 외부로 쉽게 표출될 수 있는 구조적 flexibility를 가지고 있기 때문에 검출 프로브 기능의 펩타이드 또는 단백질을 아미노- 또는 카르복실 말단에 유전자 재조합 기술을 이용하여 융합시키면 웨리틴 나노입자의 표면특성 개질을 수행할

수 있다.

- [0032] 본 발명에서는 인간 중쇄 웨리틴의 카르복실 말단에 다양한 질병 특이적 마커 중, 특히 HIV, HCV 및 HAV의 항원 결정부위(immunodominant epitope)를 포함하는 특정 아미노산 배열에 대한 합성 펩타이드를 융합·발현시킴으로써 에이즈, C형간염 및 A형간염 특이적 에피토프가 나노입자 표면에 융합·발현되는 단백질 나노입자의 대량생산의 용이성, 균일한 입도 분포, 에피토프 밀도/구조/방향성 제어의 용이성 및 안정성을 확인하고자 하였다.
- [0033] 본 발명에서는 2종류의 HIV 중요 항원성 에피토프인 HIV envelope glycoprotein gp160 내 gp41 (I580 S613) 펩타이드(HIV1)와 HIV gag protein 내 p24(P166 G354) 단백질(HIV2)을 에이즈 진단용 질병 마커 특이적 에피토프로 결정하고, 4종류의 HCV 중요 항원성 에피토프인 core 부분의 c22p(K10~S53), NS3 부분의 c33c(A1192~C1457), NS4 부분의 511p(I1694~L1735) 및 c100p(I1920~V1935) 부위 유래의 펩타이드/단백질의 크기 및 구조를 고려하여, 에피토프 A [c33p(A1192~C1457), HCV1], 에피토프 B[511p(I1694~L1735)-c100p(I1920~V1935)-c22p(K10~S53), HCV2] 2가지로 분류하였으며, A형간염 진단을 위해서는 HAV 표면 항원 3A, 3B, 3C, 2B, 2C 유래 총 11 가지의 펩타이드 에피토프를 선정하여, 이들 펩타이드의 조합 형태인 3종류의 에피토프를 구성하였다:
- [0034] 에피토프 1 (E1): [(E64-F83)-(G289-Q308)-(D572-F591)-(V779-K829)]
- [0035] 에피토프 2 (E2): [(K961-Q980)-(S1421-K1449)-(H1500-Q1519)-(V1719-Q1738)]
- [0036] 에피토프 3 (E3): [(G119-G130)-(F355-V366)-(T502-I516)].
- [0037] 그 다음, 유전자 재조합 기술을 이용하여 각각의 에피토프가 웨리틴 단백질과 융합되어 발현되는 벡터를 이용한 대장균에서의 발현 시스템을 구축하였다(도 1). 이를 이용하여 단백질 나노입자의 표면에 anti-HIV, anti-HCV, anti-HAV 항체가 결합할 수 있는 중요 항원성 에피토프가 표출된 단백질 나노입자를 각각 제조하였다. 그 결과, 상기 단백질 나노입자가 대장균에서 수용성으로 발현되는 것을 확인하였고, Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 이용하여 정제한 결과, 수용성 상태로 존재하는 것을 확인하였다(도 2). 또한 정제된 단백질 나노입자를 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, TEM)을 이용하여 촬영한 결과, 구형의 단백질 나노입자가 형성됨을 확인하였다(도 3).
- [0038] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 발현 시스템에서 에이즈, C형간염 및 A형간염 특이적 에피토프가 나노입자 표면에 융합·발현되는 단백질 나노입자의 대량생산의 용이성, 균일한 입도 분포, 에피토프 밀도/구조/방향성 제어의 용이성 및 안정성을 확인할 수 있었다.
- [0039] 또한, 본 발명에서 제작한 단백질 나노입자 프로브를 측면 유동어세이(lateral Flow Assay, LFA) 스트립에 고정화할 경우, 온전한 3차원형태를 유지하고, 다양한 질병마커 특이적 에피토프가 발현되어 있으므로, 복수 질환의 동시검출의 고민감도 및 고특이도를 구현할 수 있을 것으로 예측하였다.
- [0040] 즉, 본 발명의 다른 실시예에서는 샘플패드; 컨쥬게이션 패드; 멤브레인; 및 흡수패드로 구성된 측면 유동어세이 스트립(도 4)에 최적의 신호분자량을 계산하기 위해, 황색포도상구균(*staphylococcus aureus*) 유래 protein A와 콜로이드 골드 나노입자의 투과전자현미경 및 동적광산란법 분석을 통해 최적화한 신호분자(도 5 및 도 6)를 컨쥬게이션 패드에 고정화 하였으며, 상기 멤브레인에 각각의 질병특이적 단백질 나노입자 프로브를 시험선(test line)을 형성하여 고정화하였고, 모든 인간항체에 결합할 수 있는 염소 유래 항-인간 이차항체로 대조선(control line)을 형성하여 제작하였다. 이렇게 제작한 LFA 스트립의 에이즈, C형간염 및 A형간염 마커의 검출 민감도가 펩타이드 프로브에 비하여 획기적으로 증가하는 것을 확인하였고(도 7), 각 질병 바이러스 감염질환 환자 20명의 혈청시료를 대상으로 상기 LFA 스트립과 펩타이드 프로브를 함유한 LFA 스트립의 검출 결과를 비교하여 그 정확도가 매우 뛰어나다는 것을 확인하였으며(도 8 내지 도 14), 하나의 LFA 스트립으로 두 질병 또는 세 질병을 동시에 높은 정확도와 민감도로 검출할 수 있다는 것을 확인하였다(도 15 내지 도 18).
- [0042] 따라서 본 발명은 일 관점에서, 샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제1질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어세이 키트에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명은 또한, 샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제1질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제2질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인; 및 흡수패드

를 포함하는 측면 유동어세이 키트에 관한 것이다.

- [0044] 본 발명은 또한, 샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제1질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제2질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 및 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제3질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어세이 키트에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 질병은 바이러스성 질병이면 종류에 상관없이 모두 가능하나, 바람직하게는 에이즈, C형간염 및 A형간염을 포함하는 군에서 선택되고 제1질병마커와 제2질병마커 및 제3질병마커는 서로 상이한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 제1질병마커 특이적 에피토프의 질병은 에이즈인 것을 특징으로 할 수 있고, 에이즈 마커 특이적 에피토프는 에이즈 항체가 인지할 수 있는 에피토프이면 모두 가능하나, 바람직하게는 gp41 및 p24를 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 제2질병마커 특이적 에피토프의 질병은 C형간염인 것을 특징으로 할 수 있고, C형간염 마커 특이적 에피토프는 C형간염 항체가 인지할 수 있는 에피토프이면 모두 가능하나, 바람직하게는 c22p, c33p, 511p, c100p 및 이들이 2이상 융합된 에피토프를 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33p, c22p-511p, c22p-c100p, c33p-511p, c33p-c100p, 511p-c100p 및 c22p-511p-c100p를 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 제3질병마커 특이적 에피토프의 질병은 A형간염인 것을 특징으로 할 수 있고, A형간염 마커 특이적 에피토프는 A형간염 항체가 인지할 수 있는 에피토프이면 모두 가능하나, 바람직하게는 E1[(E64-F83)-(G289-Q308)-(D572-F591)-(V779-K829)], E2[(K961-Q980)-(S1421-K1449)-(H1500-Q1519)-(V1719-Q1738)] 및 E3[(G119-G130)-(F355-V366)-(T502-I516)]를 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 세포 내에서 자가조립(self-assembly) 할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용가능하나, 바람직하게는 인간 웨리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 나노입자는 직경이 1-20nm인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제1질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브는 서로 다른 제1질병마커 특이적 에피토프가 각각 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 본 발명의 제1질병마커 특이적 에피토프의 질병이 본 발명의 일 실시예에 따라 에이즈일 경우, 본 발명의 단백질 나노입자 프로브는 gp41이 표출된 단백질 나노입자와 p24가 표출된 단백질 나노입자가 5:5로 혼합된 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제2질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브는 서로 다른 제2질병마커 특이적 에피토프가 각각 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 본 발명의 제2질병마커 특이적 에피토프의 질병이 본 발명의 일 실시예에 따라 C형간염일 경우, 본 발명의 단백질 나노입자 프로브는 HCV1이 표출된 단백질 나노입자와 HCV2가 표출된 단백질 나노입자가 7:3으로 혼합된 것일 수 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제3질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브는 서로 다른 제3질병마커 특이적 에피토프가 각각 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 본 발명의 제3질병마커 특이적 에피토프의 질병이 본 발명의 일 실시예에 따라 A형간염일 경우, 본 발명의 단백질 나노입자 프로브는 E1이 표출된 단백질 나노입자와 E2가 표출된 단백질 나노입자 및 E3가 표출된 단백질 나노입자가 3:3:3으로 혼합된 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 나노입자 프로브는 표면에 질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 서로 다른 단백질 나노입자가 1:9 ~ 9:1의 비율로 혼합된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 멤브레인은 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 3종류 뿐만 아니라, 4종류 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 신호분자는 protein A-콜로이달 골드 나노입자 또는 proteinG-콜로이달 골드 나노입자

인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0058] 본 발명에 있어서 상기 멤브레인에 단백질 나노입자 프로브는 시험선(Test line)을 형성하는 형태로 고정화 되는 것을 특징으로 할 수 있고, 컨트롤 항체가 고정화된 대조선(control line)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0060] 본 발명은 또한, (a)샘플패드; 신호분자가 식재된 컨쥬게이션패드; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제1 질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제2질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브; 및 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 제3질병마커 특이적 에피토프가 융합발현되어 있는 단백질 나노입자 프로브를 포함하는 멤브레인; 및 흡수패드를 포함하는 측면 유동어세이 키트와 검출 대상 시료를 반응시키는 단계; 및 (b)육안 또는 광도계(densitometer)를 이용하여 신호분자의 발색광을 측정하는 단계를 포함하는 측면 유동어세이를 이용한 복수 질환의 동시검출 방법에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명에서, 검출 대상 시료 내, 질환 특이적인 항체마커가 존재할 경우, 이 항체는 신호분자인 protein A-콜로이달 골드와 결합하고, 니트로 셀룰로오즈 멤브레인의 시험선에 고정화 되어있는 단백질 나노입자 프로브에 검출되게 되며, 신호 분자에 의해 붉은 색이 나타나게 된다. 한편, 신호 분자는 질환 특이적 항체 뿐 만아니라, 시료 내 존재하는 다른 항체와도 결합력이 있기 때문에, 항-인간 이차 항체가 고정화 되어있는 대조선에도 결합하여, 붉은색이 나타나게 되는 반면, 시료 내 질환 특이적 항체가 존재 하지 않을 시에는, 시험선엔 붉은 선이 나타나지 않으며, 대조선에만 붉은 선이 나타나게 된다. 본 발명에서, 검출 대상 시료가 샘플패드에 유입된 후, 30 분이 지난 시점에서, 시험선과 대조선에 나타나는 붉은 선의 유무로 질병마커 특이적 항체의 존재 유무를 판정하였으며, 붉은선의 강도(intensity)를 수치화 하고, 보다 더 정확한 분석을 위해, GS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD, Inc., Hercules, California, USA) 분석기와 분석 소프트웨어 (image analysis software, (Quantity One, BIO-RAD Inc., Hercules, California, USA))를 이용하여, 붉은 선 강도를 수치화된 신호세기로 변환하였다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 세포 내에서 자가조립(self-assembly) 할 수 있는 단백질이면 제한 없이 사용가능하나, 바람직하게는 인간 웨리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 질병마커 특이적 에피토프는 바이러스성 질병이면 종류에 상관없이 모두 가능하나, 바람직하게는 에이즈, C형간염 및 A형간염을 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0065] 위와 같이 본 발명에서는 인간 웨리틴 중쇄를 기초한 단백질 나노입자 표면에 항체 측정에 유용한 민감도 높은 중요 항원성 에피토프가 표출된 단백질 나노입자 프로브를 제조하였고 단순히 여러 종류의 항원성 에피토프를 동시에 검출하는 것으로 끝나는 것이 아니라, 혼합 비율을 달리하여 항원성의 중요도에 따라서 표출 빈도 또한 효과적으로 조절할 수 있는 프로브를 제작하였다. 본 발명에서는 상기 개발한 단백질 나노입자 프로브를 LFA 시스템과 효과적으로 융합하고, 이를 이용하여 복수 질환의 동시검출에 활용하여 초고감도 복수 질환 마커의 동시검출방법을 개발하였다.
- [0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0068] **실시예1: 바이러스 감염질환 진단용 에피토프가 표출된 단백질 나노입자의 생합성을 위한 발현 벡터 제조**
- [0069] 1-1. 바이러스 감염성 질환 진단용 에피토프 선정
- [0070] 다양한 문헌조사 및 선행연구를 통해, HIV envelope glycoprotein gp160 내 gp41(I580 S613) 펩타이드와 HIV gag protein 내 p24(P166 G354) 단백질을 AIDS 진단을 위한 에피토프로 선정하였으며, C형 간염 진단을 위해, 구조단백질인 core 부분의 c22p(K10 - S53), 비구조단백질(non-structural protein)인 NS3 내 c33c(A1192 - C1457), NS4 내 5-1-1p(I1694 - L1735)와 c100p(I1920 V1935) 펩타이드 또는 단백질을 에피토프로 선정하였음. 마지막으로, A형 간염의 진단을 위해, HAV 표면 항원 3A, 3B, 3C, 2B, 2C 유래 펩타이드 epitope을

선정하였으며, 이들의 펩타이드의 조합 형태인 3종류의 프로브를 선정하였다 (에피토프 1 (E1): [(E64-F83)-(G289-Q308)-(D572-F591)-(V779-K829)], 에피토프 2 (E2): [(K961-Q980)-(S1421-K1449)-(H1500-Q1519)-(V1719-Q1738)], 에피토프 3 (E3): [(G119-G130)-(F355-V366)-(T502-I516)]).

[0071] <바이러스 감염성 질환 진단용 에피토프 선정>

[0072] AIDS 진단용 에피토프:

[0073] gp41(I580-S613), p24(P166-G354)

[0075] *C형 간염 진단용 에피토프:

[0076] c22p(K10-S53), c33c(A1192-C1457), 5-1-1p(I1694-L1735), c100p(I1920-V1935)

[0077] A형 간염 진단용 에피토프 :

[0078] E1: [(E64-F83)-(G289-Q308)-(D572-F591)-(V779-K829)],

[0079] E2: [(K961-Q980)-(S1421-K1449)-(H1500-Q1519)-(V1719-Q1738)],

[0080] E3: [(G119-G130)-(F355-V366)-(T502-I516)]

[0082] 1-2. 바이러스 감염성 질환 진단용 유전자 클론 제조

[0083] 하기 표 1에 기재된 프라이머를 사용한 PCR 또는 assembly PCR를 활용하여 다음과 같은 각각의 질환 진단용 유전자 클론을 확보하였으며,

[0084] - 인간 중쇄 웨리틴(hFTH) 단량체 유전자 클론: NH₂-NdeI-(hFTH)-G₃SG₃TG₃SG₃(linker)-XhoI-COOH,

[0085] AIDS 진단용 에피토프 유전자 클론:

[0086] NH₂-XhoI-(gp41)₃-H₆-ClaI-COOH (이하 HIV1), NH₂-XhoI-p24-H₆-ClaI-COOH (이하 HIV2)

[0087] C형 간염 진단용 에피토프 유전자 클론:

[0088] NH₂-XhoI-c33c-H₆-HindIII-COOH (이하 HCV1),

[0089] NH₂-XhoI-511p-G₃SG₃TG₃SG₃-c100p-c22p-H₆-ClaI-COOH (이하 HCV2),

[0090] A형 간염 진단용 에피토프 유전자 클론:

[0091] NH₂-XhoI-(E1)₂-H₆-ClaI-COOH (이하 HAV1),

[0092] NH₂-XhoI-(E2)₂-H₆-ClaI-COOH (이하 HAV2),

[0093] NH₂-XhoI-(E3)₂-H₆-ClaI-COOH (이하 HAV3).

[0095] 인간 중쇄 웨리틴의 카르복실 말단에 각각의 바이러스 감염성 질환 진단을 위한 에피토프가 융합된 융합 단백질 생산을 위해, 플라스미드 pT7-7 에 상기 유전자 클론을 일련의 라이게이션을 통하여 합성하였으며, 다음과 같은 플라스미드 발현 벡터를 구축하였다(도 1).

[0096] AIDS 진단용 단백질 나노입자 프로브 발현벡터: pT7-hFTH-HIV1, pT7-hFTH-HIV2,

[0097] C형 간염 진단용 단백질 나노입자 프로브 발현벡터: pT7-hFTH-HCV1, pT7-hFTH-HCV2,

[0098] A형 간염 진단용 단백질 나노입자 프로브 발현벡터: pT7-hFTH-HAV1, pT7-hFTH-HAV2, pT7-hFTH-HAV3,

[0099] 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 젤-정제 후 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.

[0101] 1-3. 인간 웨리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자 합성용 발현 벡터 제조

[0102] 인간 웨리틴 중쇄 유전자 서열 (NCBI Nucleotide accession number: M97164 서열 중 130-681 서열)을 주형으로 하여 제한 효소 NdeI이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 1과 XhoI과 링커서열 (아미노산 서열 G3SG3TG3SG3)을 포함하고 있는 프라이머 서열 2, 3을 이용하여 PCR을 진행하였음. 그 결과 5'-NdeI-(hFTH)-G3SG3TG3SG3(linker)-XhoI-3' 으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소 NdeI과 XhoI으로 처리하여 pT7-7(Novagen, USA)의 제한효소 NdeI과 XhoI자리에 삽입하였고 이를 pT7-hFTH 이라고 명명하였다.

[0104] 1-4. 에이즈 진단을 위한 단백질 나노입자 합성용 발현 벡터 제조

[0105] 1) gp41(I580 S613) (NCBI Nucleotide accession number: NC 001802 서열 중 7507-7609 서열) 부위를 합성하기 위하여, 먼저 아민 말단쪽엔 XhoI 제한효소 절단부위(CTCGAG)가, 카르복실 말단엔 EcoRI 제한효소 절단부위(GAATTC)가 위치한 gp41 에피토프를 assembly PCR 방법을 사용하여 합성하였다. 총 4개의 프라이머 (프라이머 서열 4, 5, 6, 7)를 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 Taq DNA 중합효소를 넣어주어 94℃/1분 30초(변성), 54℃/2분(어닐링), 72℃/3분(신장)로 assembly PCR을 수행한 다음, assembly PCR 생산물을 주형으로 프라이머 8과 9를 이용하여, PCR을 수행하여, 최종적으로 XhoI-gp41-EcoRI의 PCR 생산물을 수득하였다. 본 발명에서는 gp41 에피토프를 연속적으로 위치시키기 위하여, 프라이머 10과 11을 이용하여 PCR을 수행하였으며 그 결과 아민말단을 EcoRI 제한효소 절단부위 카르복실 말단을 hexahistidine(H6), 종결코돈(stop) 및 ClaI 제한효소 절단부위를 포함하는 유전자를 합성하였다(EcoRI-gp41-H6-stop-ClaI). 이와 같이 합성한 유전자 클론 2개를 앞서 합성한 pT7-hFTH를 포함하는 발현벡터에 순차적으로 라이게이션 하였으며, 결과적으로 pT7-hFTH-XhoI-gp41-EcoRI-gp41-H6-stop-ClaI의 발현벡터를 획득하였다. 본 발명에서는 더 나아가, 질환마커의 검출 효과를 극대화 하기 위하여, gp41 에피토프를 한 개 더 삽입하고자, pT7-hFTH-XhoI-gp41-EcoRI-gp41-H6-stop-ClaI의 EcoRI 부위를 형질전환하여 EcoRI 제한효소 절단 부위를 기타 다른 뉴클레오타이드 서열(GGAGGC)로 치환해 주었으며, 이를 통해, XhoI-gp41-GGAGGC-gp41-H6-stop-ClaI 유전자 클론을 얻을 수 있었다. 이 유전자 클론을 다시 아민말단에는 EcoRI 제한효소 절단부위를 갖으며, 카르복실 말단엔 ClaI 제한효소 절단부위를 갖는 프라이머 10과 11을 이용하여 PCR을 수행하였으며, EcoRI-gp41-GGAGGC-gp41-H6-stop-ClaI 유전자 클론을 얻었으며 마지막으로, pT7-hFTH-XhoI-gp41-EcoRI-gp41-H6-stop-ClaI 발현벡터를 EcoRI 및 ClaI으로 처리하여 EcoRI-gp41-GGAGGC-gp41-H6-stop-ClaI를 라이게이션 시켜주었으며, 최종적으로 pT7-hFTH-XhoI-gp41-EcoRI-gp41-GGAGGC-gp41-H6-stop-ClaI 발현벡터를 확보하였다.

[0106] 2) p24(P166 G354) (NCBI Nucleotide accession number: NC 001802 서열 중 831-1397 서열)을 주형으로 사용하여, XhoI 제한효소 절단부위를 포함하고 있는 프라이머 서열 12와, hexahistidine(H6), 종결코돈(stop) 및 ClaI 제한효소 절단부위를 포함하는 프라이머 서열 13을 이용하여 PCR을 수행하였으며, XhoI-p24-H6-stop-ClaI의 유전자 클론을 확보하였다. 이를 pT7-hFTH를 포함하는 발현벡터에 라이게이션 하였으며, 결과적으로 pT7-hFTH-XhoI-p24-H6-stop-ClaI의 발현벡터를 제조하였다.

[0108] 1-5. C형간염 진단을 위한 단백질 나노입자 합성용 발현 벡터 제조

[0109] 1) c33c(A1192 C1457) (NCBI Nucleotide accession number: M62321 서열 중 3915-4712 서열)을 주형으로 사용하여, XhoI 제한효소 절단부위를 포함하고 있는 프라이머 서열 14와, hexahistidine(H6), 종결코돈(stop) 및 HindIII 제한효소 절단부위를 포함하는 프라이머 서열 15을 이용하여 PCR을 수행하였으며, XhoI-c33c-H6-stop-ClaI의 유전자 클론을 확보하였음. 이를 pT7-hFTH를 포함하는 발현벡터에 라이게이션 하였으며, 결과적으로 pT7-hFTH-XhoI-c33c-H6-stop-ClaI의 발현벡터를 제조하였다.

[0111] 2) NH3-511p-G3SG3TG3SG3-c100p-c22p-H6-ClaI-COOH의 클론을 확보하기 위하여, 511p-G3SG3TG3SG3-c100p와, c22p-H6은 각각 assembly PCR을 통해 합성하였다. 먼저, 511p-G3SG3TG3SG3-c100p를 합성 하기 위하여, 프라이머 서열 16 - 21을 사용하여 assembly PCR을 수행하였으며, 그 뒤, XhoI 제한효소 절단부위를 포함하고 있는 프라이머

서열 22와, EcoRI 제한효소 절단부위를 포함하고 있는 프라이머 서열 23을 사용하여, XhoI-511p-G₃SG₃TG₃SG₃-c100p-EcoRI를 합성하였다. 또한 c22p-H6을 합성하기 위하여, 프라이머 서열 24 27, 총 4종류의 프라이머를 사용하여, assembly PCR을 수행하였으며, EcoRI 제한효소 절단부위를 포함하고 있는 프라이머 서열 28과 hexahistidine(H6), 종결코돈(stop) 및 ClaI 제한효소 절단부위를 포함하는 프라이머 서열 29을 이용하여 PCR을 수행하였으며, EcoRI-c22p-H6-stop-ClaI 클론을 확보하였다. 위에서 확보한 두가지 유전자 클론(XhoI-511p-G₃SG₃TG₃SG₃-c100p-EcoRI, EcoRI-c22p-H6-stop-ClaI)을 pT7-hFTH를 포함하는 발현벡터에 순차적으로 라이게이션 하였으며, 최종적으로 pT7-hFTH-XhoI-511p-G₃SG₃TG₃SG₃-c100p-c22p-H6- stop-ClaI 발현벡터를 제조하였다.

[0112] 1-5. A형간염 진단을 위한 단백질 나노입자 합성용 발현 벡터 제조

[0113] 1) 에피토프 1 (E1) [(E64-F83)-(G289-Q308)-(D572-F591)-(V779-K829)]을 합성하기 위하여, 에피토프 서열을 코딩하며, Codon usage를 고려하여, 대장균 내에서 단백질 합성에 유리한 코돈으로 수정해 준 뒤, 프라이머 서열 30 37을 이용하여 assembly PCR 해주었으며, assembly PCR 생산물을 프라이머 서열 38, 39를 이용하여 PCR을 수행하여, XhoI-E1-EcoRI 유전자 클론을 확보하였다. 뿐만 아니라 이를 주형으로 하여, 프라이머 40, 41을 이용하여, PCR을 수행하여, EcoRI-E1-H6-stop-ClaI 유전자 또한 확보하였다. 확보한 두 유전자 클론(XhoI-E1-EcoRI, EcoRI-E1-H6-stop-ClaI)을 pT7-hFTH를 포함하는 발현벡터에 순차적으로 라이게이션 하였으며, 최종적으로 pT7-hFTH-XhoI-E1-E1-H6-stop-ClaI 발현벡터를 제조하였다.

[0114] 2) 에피토프 2 (E2) [(K961-Q980)-(S1421-K1449)-(H1500-Q1519)-(V1719-Q1738)]를 합성하기 위하여, 에피토프 서열을 코딩하며, Codon usage를 고려하여, 대장균 내에서 단백질 합성에 유리한 코돈으로 수정해 준 뒤, 프라이머 서열 42 47을 이용하여 assembly PCR 해주었으며, assembly PCR 생산물을 프라이머 서열 48, 49를 이용하여 PCR을 수행하여, XhoI-E2-EcoRI 유전자 클론을 확보하였다. 뿐만 아니라 이를 주형으로 하여, 프라이머 50, 51을 이용하여, PCR을 수행하여, EcoRI-E2-H6-stop-ClaI 유전자 또한 확보하였다. 확보한 두 유전자 클론(XhoI-E2-EcoRI, EcoRI-E2-H6-stop-ClaI)을 pT7-hFTH를 포함하는 발현벡터에 순차적으로 라이게이션 하였으며, 최종적으로 pT7-hFTH-XhoI-E2-E2-H6-stop-ClaI 발현벡터를 제조하였다.

[0115] 3) 에피토프 3 (E3) [(G119-G130)-(F355-V366)-(T502-I516)]을 합성하기 위하여, 에피토프 서열을 코딩하며, Codon usage를 고려하여, 대장균 내에서 단백질 합성에 유리한 코돈으로 수정해 준 뒤 프라이머 서열 52 55을 이용하여 assembly PCR 해주었으며, assembly PCR 생산물을 프라이머 서열 56, 57를 이용하여 PCR을 수행하여, XhoI-E3-EcoRI 유전자 클론을 확보하였다. 뿐만 아니라 이를 주형으로 하여, 프라이머 58, 59을 이용하여, PCR을 수행하여, EcoRI-E3-H6-stop-ClaI 유전자 또한 확보하였다. 확보한 두 유전자 클론(XhoI-E3-EcoRI, EcoRI-E3-H6-stop-ClaI)을 pT7-hFTH를 포함하는 발현벡터에 순차적으로 라이게이션 하였으며, 최종적으로 pT7-hFTH-XhoI-E3-E3-H6-stop-ClaI 발현벡터를 제조하였다.

표 1

[0116] 프라이머 서열

서열번호	염기서열
서열번호 1	5'-CATATGATGACGACCGCTCCACCTCG-3'
서열번호 2	5'-CTCGAGAGTGCCTCCCCACTTCCGCCACCGCTTTCATTATC-3'
서열번호 3	5'-CTCGAGCCACCGCGCTGCCACCTCCAGTGCCTCCCCACT -3'
서열번호 4	5'-CTCGAGATCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACA-3'
서열번호 5	5'-GAGCAACCCCAAATCCCCAGGAGCTGTGATCCTTTAGGTATCTTCCAC-3'
서열번호 6	5'-GGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAGTCAATTCACCACTGCTGTGC-3'
서열번호 7	5'-GAATTCAGTAGCATTCCAAGGCACAGCAGTGGTGCAT-3'
서열번호 8	5'-CTCGAGATCCTGGCTGTGG-3'
서열번호 9	5'-GAATTCAGTAGCATTCCAAGGCA-3'
서열번호 10	5'-GAATTCATCCTGGCTGTGG-3'
서열번호 11	5'-ATCGATTTAGTGATGGTGATGGTGATGACTAGCATTCCAAGGCA-3'
서열번호 12	5'-CTCGAGCCAGAAGTGATACCC-3'
서열번호 13	5'-ATCGATTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTACTCCCTGACAT-3'
서열번호 14	5'-CTCGAGGCGGTGGACTTTATCCCT-3'
서열번호 15	5'-AAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGACAGTATTGCAGTCTATCACCAGAGTC-3'
서열번호 16	5'-CTCGAGATCATCCCGATAGGGAAGTCTCTACCAGGAGTTCGACGAG-3'
서열번호 17	5'-TGTTTCGATGTAAGGGAGGTGTTGGGAACACTCCTCCATCTCGTGAACCTCGGTAG-3'

서열번호 18	5'-CACCTCCCTTACATCGAACAGGGAATGATGCTCGCCGAGCAATTCAAACAGAAGGCGC-3'
서열번호 19	5'-CTCCAGTGCCTCCCCACTTCCGCCACCAACCCGAGCGCTTCTGTTGAATTGC-3'
서열번호 20	5'-GGGGGAGGCACTGGAGGTGGCAGCGGCGTGGGATAGCGTTCCGCTCGCGGG-3'
서열번호 21	5'-GAATTCCACATAGTGCCTGGGGGAGACGTGGTTACCCCGCAGGCGA-3'
서열번호 22	5'-CTCGAGATCATCCCGATAGG-3'
서열번호 23	5'-GAATTCCACATAGTGCCTGGG-3'
서열번호 24	5'-AAAAACAAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGATATTAAGTT-3'
서열번호 25	5'-TAAACTCCACCAACGATCTGACCACCGCCCGGAACTTAATATCCTGTGGCGGGC-3'
서열번호 26	5'-GTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCGCAGGGGCCAGGTGG-3'
서열번호 27	5'-GGAAGTCTTCTAGTCGCGCGACACCAACCTGGGGCCC-3'
서열번호 28	5'-GAATTCAAAAACAAACGTAACACCAACCG-3'
서열번호 29	5'-ATCGATTTAGTGATGGTGATGGTGATGGGAAGTCTTCCTAGTCGCG-3'
서열번호 30	5'-CTCGAGGAACCTTTGAGAACCTCTGTTGATAAACCTGGTTCTAAGAAGACTCAG-3'
서열번호 31	5'-TGTCCAAGTAGTAAATGAGTAATTTAATTCCACCGAACTTCTCCCTGAGTCTTCTTAGAACAGGT-3'
서열번호 32	5'-GAATTAAATTAAGTACTCATTTTACTACTTGGACATCCATTCCAACCTTGGCTGCTCAGGATCATGTCTATT-3'
서열번호 33	5'-GAACGTAAGTACACAGAAAATGAGACCTTCCCATGAATTTATAAATAGACATGTGATCCTGAGCAGC-3'
서열번호 34	5'-TCTCATTTTCTGTGTACTTTTACGTTCTGGATGATCCTAGATCAGAGGAGGACAAAGATTGAGAG-3'
서열번호 35	5'-CCTCCAATCTCAATTCTTTGTATGGTTTCTACATTCTATAGACTCTCAAATCTTTGTCTCCTC-3'
서열번호 36	5'-CCATACAAAGAAATTGAGATTGGAGGTTGGGAAACAAAGACTCAAATATGCTCAGGAAGAGTTGTCAAAT-3'
서열번호 37	5'-GAATTCTTTCTAGGAGGTGGAAGCACTTCATTTGACAACCTCTCCTGAGCATATTG-3'
서열번호 38	5'-CTCGAGGAACCTTTGAGAACCTCTG-3'
서열번호 39	5'-GAATTCTTTCTAGGAGGTGGAAG-3'
서열번호 40	5'-GAATTGCAACCTTTGAGAACCTCTG-3'
서열번호 41	5'-ATCGATTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTTCTAGGAGGTGGAAG-3'
서열번호 42	5'-CTCGAGAAAATCAATTTGGCAGATAGAATGCTTGGATTGTCTGGAGTTCAGGAAATTA-3'
서열번호 43	5'-CAGCAGAGTCATTATCGTCATCTGAAATTCCTGAGATTGTTCTTTAATTTCTGAACTCCAGACAATCC-3'
서열번호 44	5'-GATGACGATAATGACTCTGCTGTGGCTGAGTTTTCAGTCTTTCCATCTGGTGAACCATCAAATTC-3'
서열번호 45	5'-ATCTGCATCCAATTAAATCACCTGTTTGGGCTTAGTCACGCCATGTTAGAATTTGATGGTTCACCAGATGG-3'
서열번호 46	5'-CAAACAGGTGATTAAATGGATGCAGATCCAGTAGAGTCTCAGGTAGCAAAGTTGGTTACTCAAGAAATGTTTC-3'
서열번호 47	5'-GAATTCTGACTTTCAATTTTCTTATCAATATTTTGAAACATTTCTTGAGTAACCAACTTTG-3'
서열번호 48	5'-CTCGAGAAAATCAATTTGGCAGATAG-3'
서열번호 49	5'-GAATTCCTGACTTTCAATTTTCTTATCAATATTT-3'
서열번호 50	5'-GAATTCAAAATCAATTTGGCAGATAG-3'
서열번호 51	5'-ATCGATTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTGACTTTCAATTTTCTTATCAATA-3'
서열번호 52	5'-CTCGAGGGTTTGTGAGATACCATACGTATGCAAGATTGGCTT-3'
서열번호 53	5'-CCTGGAATCGAAGACAAGATCTCCCTCCAGAAGCCAAATCTGCATACGTATGG-3'
서열번호 54	5'-AGATCTGTCTTCGATTCCAGGTTACAGTTTCTACAGAGCAGAAATGTTCTCTGAT-3'
서열번호 55	5'-GAATTCTATGCCGACTTGGGGATCAGGAACATTCTGCTCTGTAG-3'
서열번호 56	5'-CTCGAGGGTTTGTGAGATACC-3'
서열번호 57	5'-GAATTCTATGCCGACTTGGGG-3'
서열번호 58	5'-GAATTCGGTTTGTGAGATACC-3'
서열번호 59	5'-ATCGATTTAGTGATGGTGATGGTGATGTATGCCGACTTGGGG-3'

[0118] 실시예 2: 인간 헤리틴 중쇄 기반 3차원 단백질 나노입자 프로브 생합성

[0119] 바이러스 감염성 질환 진단을 위한 각각의 에피토프가 표출된 단백질 나노입자를 제조하기 위하여 대장균 균주 BL21(DE3)[F-ompThsdSB(rB-mB-)]를 상기 제조된 발현 벡터 pT7-hFTH-HIV1, pT7-hFTH-HIV2, pT7-hFTH-HCV1, pT7-hFTH-HCV2, pT7-hFTH-HAV1, pT7-hFTH-HAV2, pT7-hFTH-HAV3를 하나한(Hanahan)이 기술한 방법(Hanahan D, *DNA Cloning* vol.1 109-135, IRS press 1985)에 의해 각각 형질 전환하였다. 구체적으로 염화칼슘(CaCl₂)으로 처리한 대장균 BL21(DE3)에 상기 벡터들을 각각 열충격 방법으로 형질전환시킨 후, 앰피실린(ampicillin)이 포함된 배지에서 배양하여 상기 발현벡터가 형질전환되어 앰피실린 저항성을 나타내는 콜로니를 선별한 다음, 상기 콜로니를 하룻밤 동안 LB 배지에서 배양한 종균 배양액의 일부를 100mg/ml 앰피실린을 포함하는 LB(Luria-Bertani) 배지에 접종한 뒤, 37℃에서 130 rpm으로 배양하였음. 배양액의 배지탁도(OD₆₀₀)가 0.5~0.6에 이르렀을 때 IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)를 첨가(1 mM)하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. 이 후

20 °C에서 16~18 시간 더 배양 후 배양한 대장균을 4,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후, 7 ml의 파쇄 용액(10 mM Tris-HCl 완충액, pH 7.5, 10 mM EDTA)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였으며, 분리된 상등액을 이용하여 실시예 3에 따라 정제를 진행하였다.

[0121] **실시예 3: 인간 웨리틴 중쇄 기반 3차원 단백질 나노입자 프로브 정제**

[0122] 상기 실시예 2에서 발현된 재조합 단백질 중 자가 조립된 항원 에피토프 융합 단백질 나노입자를 정제하기 위하여 2단계의 정제 과정을 거쳐 진행하였다.

[0123] 1) 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 2) 재조합 단백질의 자가 조립 시 구조유지 안정성을 향상 시키기 위하여 Ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA) 를 이용하여 재조합 단백질이 포함된 수용액을 조성이 다른 PBS 버퍼 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4) 로 변경해 줌과 동시에 재조합 단백질을 농축하였다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.

[0124] 1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피

[0125] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 실시예2의 방법으로 배양한 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 7 mL 라 이시스 버퍼(pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄한 뒤, 파쇄된 세포액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후, 각 재조합 단백질을 Ni²⁺-NTA 컬럼(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다(세척 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 80 mM imidazole / 용출 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300mM NaCl, 200 mM imidazole).

[0127] 2) 버퍼 변경 및 농축

[0128] Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 거쳐 용출된 3ml의 재조합 단백질을 Ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA) 에 담아 5,000 g로 10분간 원심분리 한 후 컬럼 상부를 단백질 구조유지 안정용 PBS 버퍼 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4)로 가득 채운 후, 컬럼 안에 500 µl 의 용액이 남을 때까지 5,000 g 로 원심 분리를 진행하였다. 이를 3회 반복한 후, 최종 부피를 1ml로 맞춰 농축하였으며, 농축된 용액을 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다. 농축된 용액의 일부를 5×SDS(0.156M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)과 1:4로 섞어 100°C에서 10분간 끓인 뒤 12% 아크릴 아 마이드 겔의 웰에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 시료를 전개한 다음 겔을 쿠마시 염색 방법으로 염색한 후 탈 색하여 정제되고 농축된 단백질 나노입자를 도 2에서와 같이 확인하였다.

[0130] **실시예 4: 인간 웨리틴 중쇄 기반 3차원 단백질 나노입자 프로브의 발현양상 및 구조 분석**

[0131] 상기 실시예 3에서 정제한 재조합 단백질 나노입자의 구조 분석을 위하여 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 재 조합 단백질 나노입자를 촬영하였다. 먼저 염색하지 않은 정제한 단백질 샘플을 탄소 코팅된 구리 전자 현미경 그리드(grids) 올린 후 자연 건조하였으며, 단백질 나노입자의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2% (w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 10분 동안 실온에서 인큐베이션 하고, 증류수로 3-4회 세척하였다. 단백질 나노입자 이미지를 Philips Technai 120 kV 전자 현미경을 이용하여 관찰한 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 구형 나노입자가 형성된 것을 확인하였다.

[0133] **실시예 5: protein A 융합 콜로이드ال 골드나노입자(신호분자) 합성**

[0134] 20 mL의 hydrogen tetrachloraurate (III) trihydrate (HAuCl₄ · 3H₂O) (1%w/v)에 증류수 1.98 L를 넣어준 뒤 100 °C까지 가열한 다음, 36 mL의 sodium citrate solution를 넣어주면, 용액의 색은 노란색에서 어두운 붉은색 으로 변화된다. 색이 변화된 용액을 40-45 분 동안 더 끓여준 뒤, 30 °C 이하로 용액의 온도가 낮아질 때 까지 식혀준 뒤, 온도가 낮아진 용액에 100 mL의 protein A (0.05 mg/mL / Repligen, Waltham, USA) 단백질을 넣어

서 섞어 주었다. 이어 100 mL의 bovine serum albumin (BSA) (10 %w/v / Equitech-Bio, Inc., Texas, USA) 용액과 100 mL 의 sodium dodecyl sulfate (SDS) (0.4 %w/v / Sigma Aldrich Co., MO, USA)을 각각 넣어서 혼합하였다. 준비된 protein A 결합-콜로이달 골드 합성 용액을 농축하여 컨쥬게이트 패드에 뿌려준 뒤 50 °C 항온기에서 1시간 동안 건조시켰다. 발명에 사용된 콜로이달 골드는 직경 25 nm를 갖고, 이를 투과현미경 (transmission electron microscope (TEM))과 동적광산란법 (Dynamic Light Scattering (DLS))을 활용하여 분석한 결과, 도 5에 개시된 바와 같이 구형의 나노입자임을 확인하였으며, 콜로이달 골드에 결합 하는 protein A의 양을 최적화하기 위하여, 자외선 및 가시광선 분광법(UV-vis absorption spectra analysis)을 활용하여 분석한 결과, 도 6에 개시된 바와 같이 최적의 양은 최종적으로 40 nM인 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[0136] 실시예 6: 단백질 나노입자 프로브 제조

[0137] 도 4와 같은 LFA 시스템을 구축하기 위하여, 각 질병마커 특이적인 단백질 나노입자가 혼합된 단백질 나노입자 프로브를 제작하였다. 즉, 에이즈 특이적인 단백질 나노입자 프로브는 표면에 HIV-1 에피토프를 표출하는 단백질 나노입자 0.06mM과 표면에 HIV-2를 표출하는 단백질 나노입자 0.06mM을 혼합하여 제조하였고, C형간염 특이적 단백질 나노입자 프로브는 표면에 HCV-1 에피토프를 표출하는 단백질 나노입자 0.015mM과 표면에 HCV-2 에피토프를 표출하는 단백질 나노입자 0.06mM을 혼합하여 제조하였으며, A형간염 특이적 단백질 나노입자 프로브는 표면에 HAV-1 에피토프를 표출하는 단백질 나노입자 0.04mM, 표면에 HAV-2 에피토프를 표출하는 단백질 나노입자 0.04mM 및 표면에 HAV-3 에피토프를 표출하는 단백질 나노입자 0.04mM을 혼합하여 제조하였다.

[0139] 실시예 7: 측면 유동어세이(Lateral Flow Assay(LFA)) 스트립 구성 및 결과 판단

[0140] 도 4와 같은 LFA 시스템을 구축하기 위하여, 샘플패드(sample pad, Cat. No. 8115 2250, Whatman, UK), 컨쥬게이션패드(conjugation pad, Cat. 8131 1250, Whatman, UK), 니트로 셀룰로오즈 멤브레인 (nitrocellulose membrane, Cat. G344469, Whatman, UK), 흡수패드(adsorbent pad, Cat. 8115 1250, Whatman, UK)를 구성하였다.

[0141] 7-1. LFA 스트립 구성

[0142] 샘플패드는 진단프로브와 샘플 내 다양한 분자들 사이의 비 특이적 결합을 줄여주기 위해 블로킹 솔루션(blocking solution, 5 %w/v casein, 2 %w/v BSA, and 0.1 %w/v SDS)으로 처리하였다. 검출 대상 시료는 샘플패드로부터 컨쥬게이션패드에 전달되며, 컨쥬게이션패드에 건조되어 있던 신호분자인 콜로이달 골드와 만나게 된다. 다양한 종류의 인간유래 항체를 고정화하기 위해, 항체의 Fc도메인과 강한 친화력이 있다고 알려진 황색포도상구균 (*staphylococcus aureus*) 유래 Protein A 단백질을 콜로이달 골드 표면에 고정화 하였으며, 비 특이적 결합과 분산성을 높이기 위해 Bovine Serum albumin(BSA) 와 sodium dodecyl sulfate (SDS) 역시 고정화 하였다. 니트로 셀룰로오즈 멤브레인에, 질환마커 검출을 위한 시험선(test line)과 대조선(control line)을 제작하였다: 시험선은 실제 환자의 질환 유무를 확인하기 위한 선으로서 실시예 6에서 제조한 각 단백질 나노입자 프로브를 0.7 µL/cm 씩 사용하였으며, 대조선은 시스템의 작동이 정상적으로 이루어 졌는지 확인하는 것으로, 염소유래 항-인간 이차항체(goat anti-human secondary antibodies, Cat. 201-1006, KPL, Maryland, USA)를 0.5 µL/cm로 사용하였다. BIODOT dispensers (XYZ platform, AirJet Quanti 3000 Kit, BioJet 3000 kit, BioDot, Inc., CA, USA)를 활용하여, 단백질 나노입자 프로브와 항-인간 이차항체를 니트로 셀룰로오즈 멤브레인에 고정화 시켰으며, 그 이후 37 °C 항온기에서 4시간 동안 보관하여 건조시켰다. 흡수 패드는 스트립의 맨 끝에 위치하며, 검출 대상 시료가 원하는 모세관 현상에 의해 이동될 수 있도록 흡수하는 역할을 한다.

[0144] 7-2. 실험결과의 판정

[0145] 검출 대상 시료 내, 질환 특이적인 항체마커가 존재할 경우, 이 항체는 신호분자인 protein A-콜로이달 골드와 결합된 후 니트로 셀룰로오즈 멤브레인으로 이동한다. 이러한 신호분자와 결합한 질환 특이적 항체마커는 니트로 셀룰로오즈 멤브레인의 시험선에 고정화 되어있는 단백질 나노입자 프로브에 검출되게 되며, 신호분자(콜로이달 골드)에 의해 붉은 선이 나타남으로써 시료 내 질환마커의 유무를 확인할 수 있다. 또한, 대조선에는 인간 유래 모든 항체와 결합력이 있는 항-인간 이차 항체가 고정화 되어있어, 질환 특이적 항체마커의 존재 유무에 상관없이 대조선에서는 붉은 선이 나타나게 된다. 본 발명에서, 검출 대상 시료가 샘플패드에 유입된 후, 30 분이 지

난 시점에서, 시험선과, 대조선에 나타나는 붉은 선의 유무로 질환을 판정하였으며, 보다 더 정확한 분석과 붉은선의 강도(intensity)를 수치화하기 위해, GS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD, Inc., Hercules, California, USA) 분석기와 분석 소프트웨어 (image analysis software, (Quantity One, BIO-RAD Inc., Hercules, California, USA))를 이용하여, 붉은 선 강도를 수치화된 신호세기로 변환하였다. 또한 LFA 시스템의 검출신호(붉은선의 강도)는 실험에 실제 참여한 신호분자의 양에 의존적이기 때문에, 시험선과 대조선의 검출신호의 세기 비율(시험선 검출신호 세기/대조선 검출신호 세기)로 정의 되는 상대적 신호 세기(relative peak intensity (RPI))를 도입하여 보다 더 정확하게 분석하였다.

[0147] 실시예 8: 펩타이드 프로브 및 3차원 단백질 나노입자 프로브의 검출한계 비교

[0148] 단백질 나노입자 프로브와 펩타이드 프로브와의 검출한계 및 민감도 비교를 위해, 단백질 나노입자 프로브에 표출된 동일한 물농도의 펩타이드 프로브를 생산하여(AIDS 진단 펩타이드 프로브: (gp41)3 (0.06 mM) + p24 (0.06 mM), C형 간염 진단 펩타이드 프로브: 511p (0.015 mM) + c100p (0.015 mM) + c22p (0.015 mM) + c33c (0.06 mM), A형 간염 진단 펩타이드 프로브: (E1)2 (0.04 mM) + (E2)2 (0.04 mM) + (E3)2 (0.04 mM), 이를 이용해, 상기 실시예 7과 동일한 방식으로 LFA 시스템을 구축하였으며, 검출한계 및 민감도 분석에 대조군으로 활용하였다. 각 프로브의 검출한계는 연속희석법을 통해 분석하였는데, 50 μ L의 환자 혈청 시료를 50 μ L의 표준 혈청시료 (Cat. H4522, sigma-aldrich co., MO, USA)에 섞어 주는 방식으로 희석하였다. 위와 같은 희석 방식을 활용하여, 2배 ~ 128배 희석 시료를 준비하였고, 최종적으로 10 μ L의 희석 혈청시료를 실험에 사용하였다. 실험 결과의 판정은, 상기 실시예 7에 개시된 바와 같이, GS-800 Calibrated Densitometer 분석기와 분석 소프트웨어 (Quantity One) 활용하였다. 그 결과, 단백질 나노입자 프로브의 검출한계가 펩타이드 프로브의 검출한계보다 세 가지 질환모델(AIDS, C형 간염, A형 간염)에 모두에서 훨씬 더 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(도 7).

[0149] 즉, 단백질 나노입자 프로브를 사용하였을 경우, 검출 대상 혈청 시료의 희석 비율이 증가함에 따라 검출신호(RPI 시그널)는 점차 감소하였으며, 세 가지 질환모델 모두 64배 희석 혈청시료 까지 검출신호가 나타나는 반면, 펩타이드 프로브를 사용하였을 경우, AIDS 혈청시료의 경우 8배, C형 간염 혈청시료와 A형 간염 혈청시료의 경우 16배 희석시료까지만 검출신호가 나타나는 것을 확인하였다. 단백질나노입자 프로브를 활용함으로써, 기존의 펩타이드 프로브의 단점으로 지적 되어온 프로브의 비활성, 변성, 응집 문제를 해결하였으며, 프로브가 적절한 구조를 유지한 채로 균일하게 단백질 나노입자 표면에 3차원 표출되어 질환마커와의 접근성을 극대화시킴으로써 기존 펩타이드 프로브의 검출한계를 개선시킬 수 있는 것을 확인하였다.

[0151] 실시예 9: 단일질환 대상 펩타이드 프로브 및 3차원 단백질 나노입자 프로브의 민감도/특이도 검증

[0152] 먼저, 다양한 바이러스 감염질환의 혈청시료를 적용하기 전에 20명의 정상인 혈청을 대상으로 본 발명에서 구축한 LFA 시스템의 특이도를 검증하였다. 총 3 종류의 검출선(AIDS, C형간염, A형간염) 어느 곳에서도 비 특이적 결합에 의한 위양성 결과가 나타나지 않는 것을 확인하였다(도 14).

[0153] 세 종류의 바이러스 감염질환(AIDS, C형간염, A형간염)의 각각 20명의 환자 혈청시료를 대상으로 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA 시스템과 펩타이드 프로브 기반 LFA 시스템의 민감도를 비교분석 하였다. 실험에는 각각의 바이러스 감염성 질환 확진 환자 혈청시료가 10 μ L을 사용하였으며 30분 뒤 결과를 판정하였다. 그 결과, 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA의 경우 세종류의 바이러스 감염(AIDS, C형간염, A형간염) 질환의 모든 환자 혈청시료에서 검출선이 모두 붉은색으로 나타나 민감도가 100%인 것을 확인하였다(도 8 내지 도 10).

[0154] 이에 비해, 펩타이드 프로브 기반 LFA의 경우, AIDS환자 혈청시료의 경우 4명의 환자(P1, P5, P12, P18)(민감도: 80 %, 도 11), C형 간염 환자 혈청시료의 경우 2명의 환자 (P5, P15)(민감도: 90 %, 도 12), A형 간염환자 혈청 시료의 경우 7명의 환자((P1, P4, P7, P10, P11, P16, P18)(민감도: 65 %, 도 13)에서 검출선에서 검출 신호가 나타나지 않는 위음성 결과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0155] 이로써, 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA는 모든 환자의 질환마커를 검출해냈을 뿐만 아니라, 각각의 검출신호(RPI 시그널) 또한 펩타이드 프로브 기반 LFA에 비해 전체적으로 높게 나옴을 확인할 수 있었으며, 이는 단백질 나노입자 프로브가 기존의 펩타이드 프로브의 비활성, 변성, 펩타이드 내 응집현상 등의 한계를 극복하고, 프로브의 방향성, 밀도, 타겟과의 접근성 등을 획기적으로 개선한 결과임을 나타내는 것이다.

[0156]

[0157] 실시예 10: 복수질환 대상 3차원 단백질 나노입자 프로브의 동시진단 가능성 검증

[0158] 10-1. Duplex assay

[0159] 다수의 바이러스 감염성 질환의 동시진단 가능성을 확인하기 위하여, 2종류 또는 3종류의 AIDS, C형간염, A형간염 환자의 혈청을 동일 부피로 섞어주었으며 최종적으로 10 μ L의 혼합시료를 실험에 적용하였다. 2가지 질환의 동시진단 가능성을 확인하기 위하여, 총 3가지의 종류의 실험이 수행하였다: AIDS-C형 간염, AIDS-A형 간염, C형 간염-A형 간염. 두 가지 종류의 질환의 20명의 환자 혈청시료를 동일 볼륨을 섞어 주었으며, 이를 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA에 적용한 결과, 도 15 내지 도 17에 개시된 바와 같이, 각 질환별로 조합한 20개의 혼합 혈청시료 모두에서 각각의 질환에 해당하는 시험선에서만 검출신호가 나왔으며, 실험에 적용되지 않은 질환에 대해서는 어떠한 위양성 검출신호도 나타나지 않는 것을 확인하였다. 즉, 도 15의 A형 간염 시험선, 도 16의 C형 간염 시험선 및 도 17의 AIDS 간염 시험선에서는 어떠한 검출신호나 나타나지 않았다. 이는 질환 진단용 단백질 나노입자 프로브가 해당되는 질환에 대한 타겟 마커만을 선택적으로 검출하며, 교차반응성이 없는 특이도가 높은 프로브임을 입증한 것이다(민감도: 100%, 특이도: 100%).

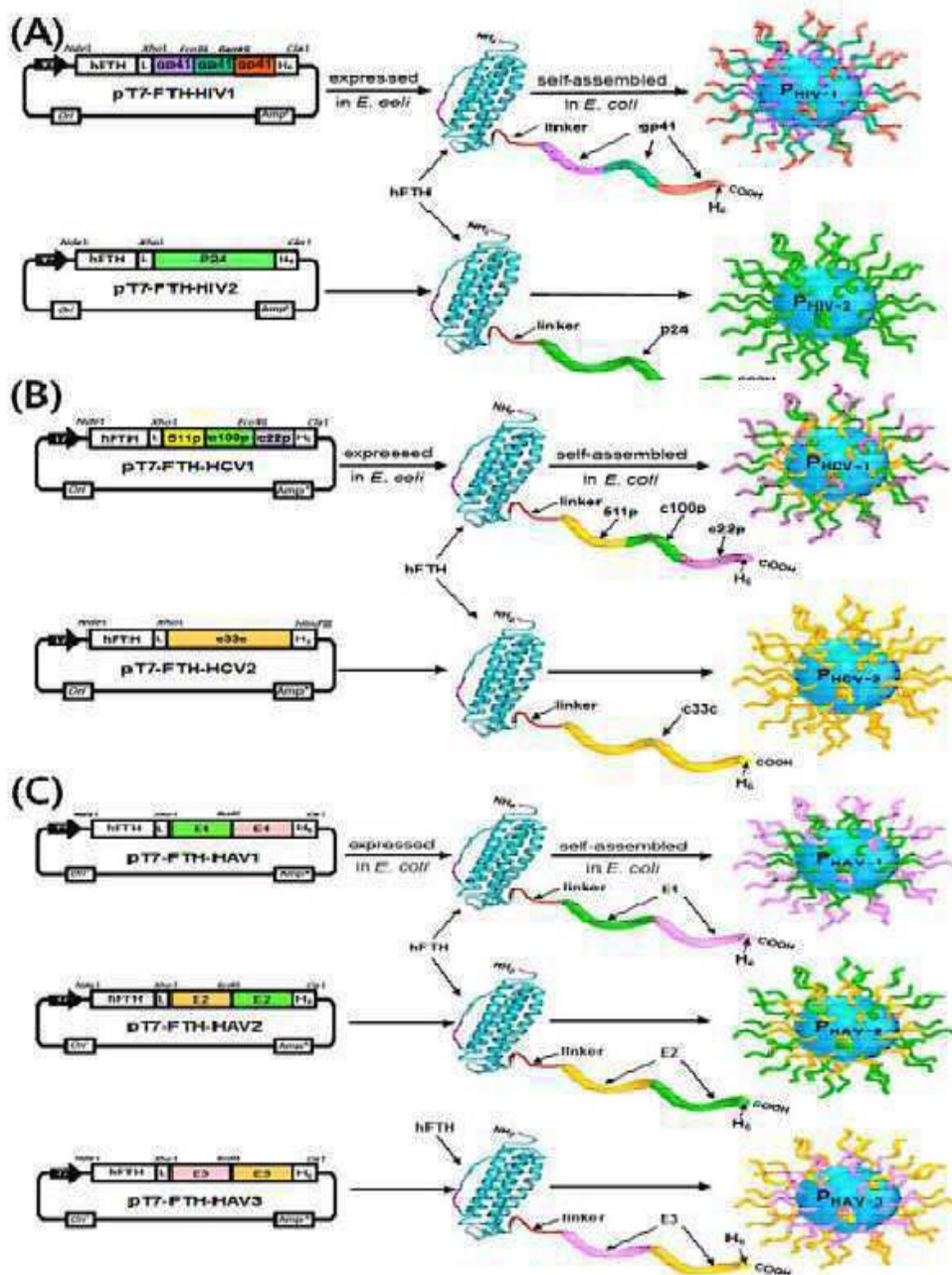
[0160] 10-2. Triplex assay

[0161] 세 가지 바이러스 감염성 질환의 동시진단의 가능성을 확인하기 위해, 세 가지 질환의 환자의 혼합 혈청 시료를 단백질 나노입자 프로브 기반 LFA에 적용하였다. 세 가지 질환의 환자 혈청을 동일 볼륨으로 섞어준 혼합혈청 시료 10 μ L를 사용하였다. 20개의 혼합 혈청시료를 LFA에 적용한 결과, 모든 시험선에서 검출신호가 발생되는 확인함으로써, 민감도 100 %의 결과를 얻었다(도 18). 이로서, 단백질 나노입자 프로브의 LFA 적용을 통해, 세 가지 바이러스 감염성 질환의 고민감도, 고특이도, 동시진단이 가능함을 확인하였다.

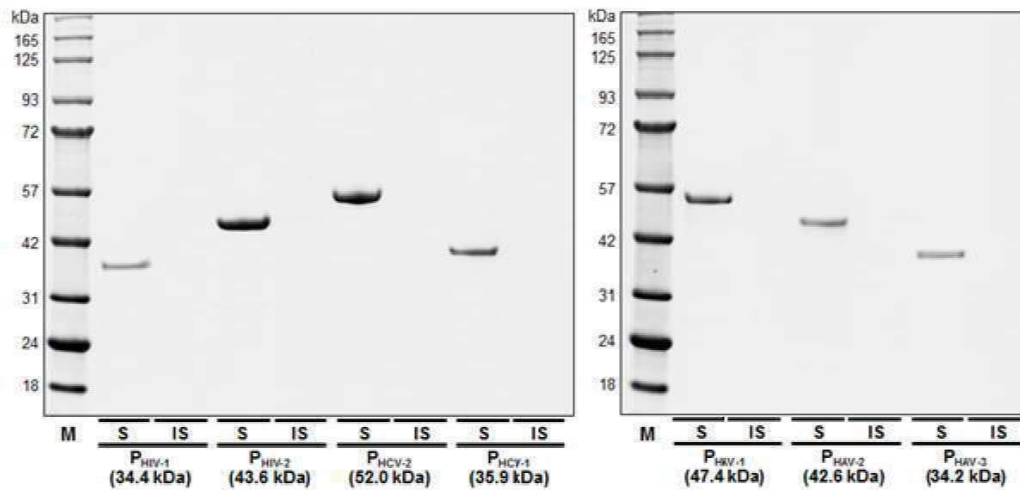
[0162] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

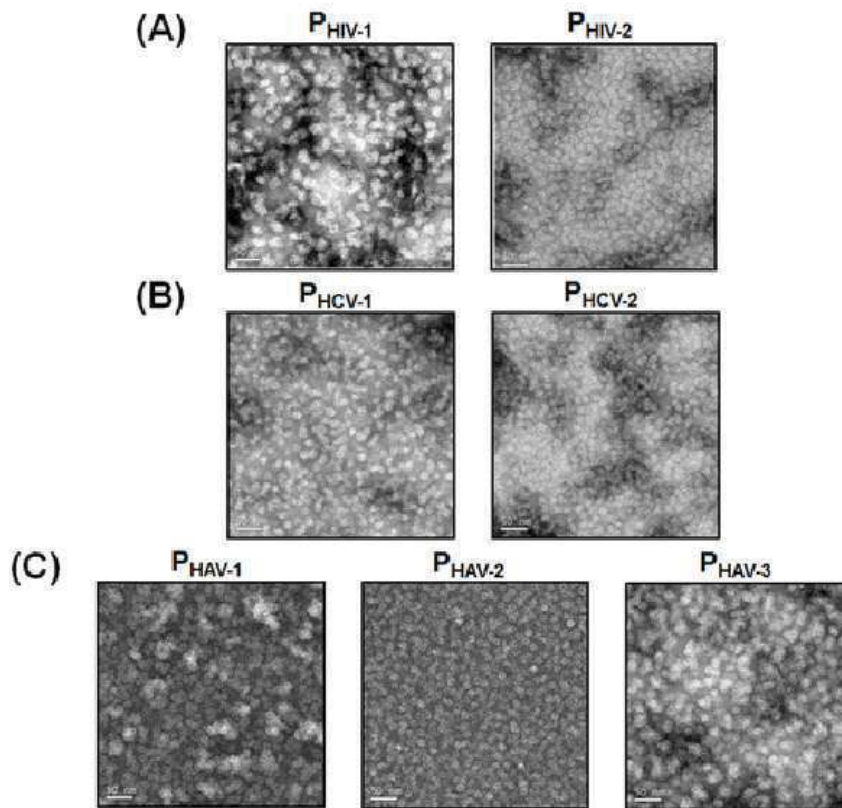
도면1



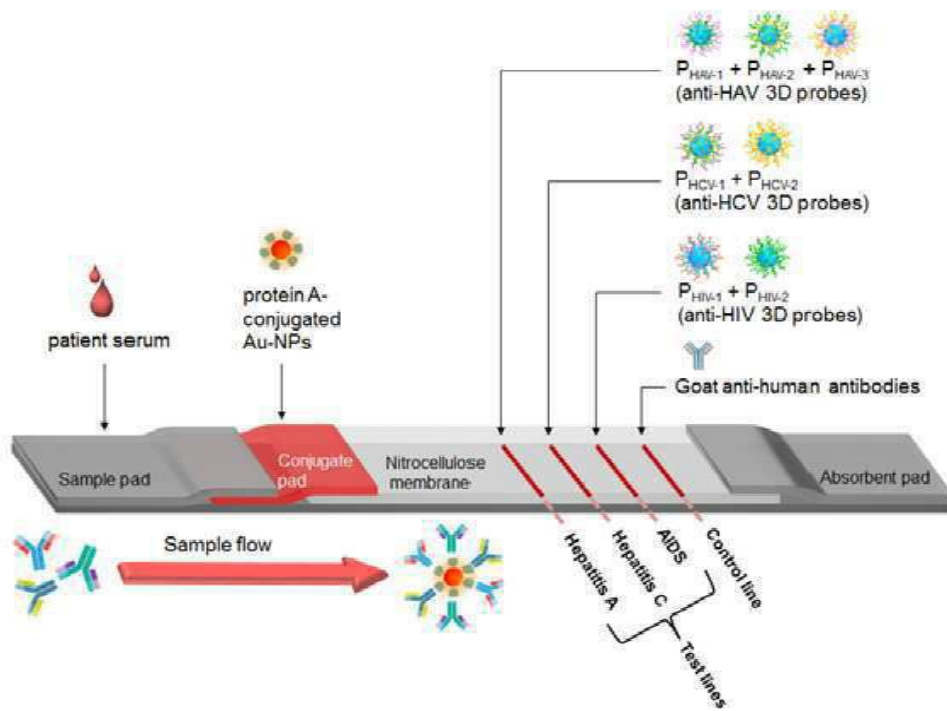
도면2



도면3

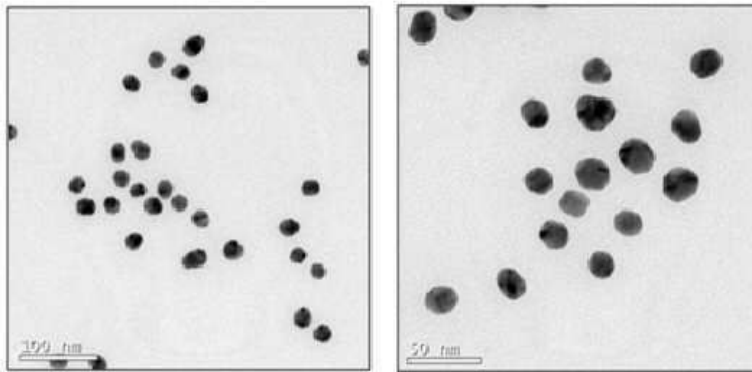


도면4

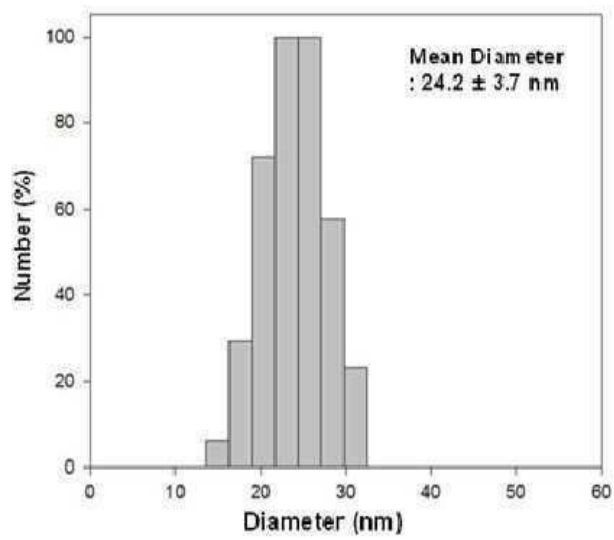


도면5

(A)



(B)

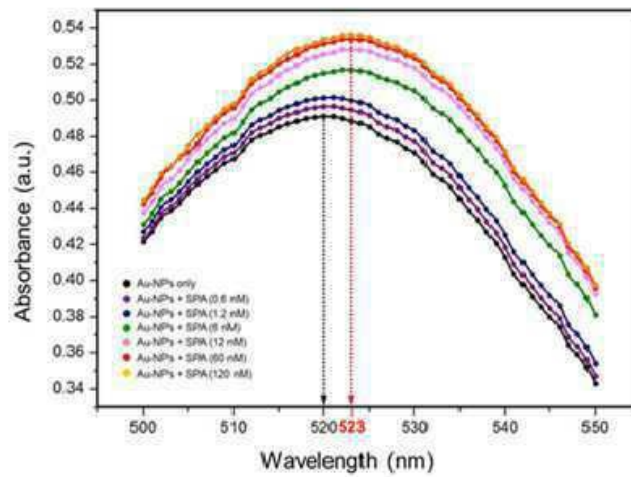


도면6

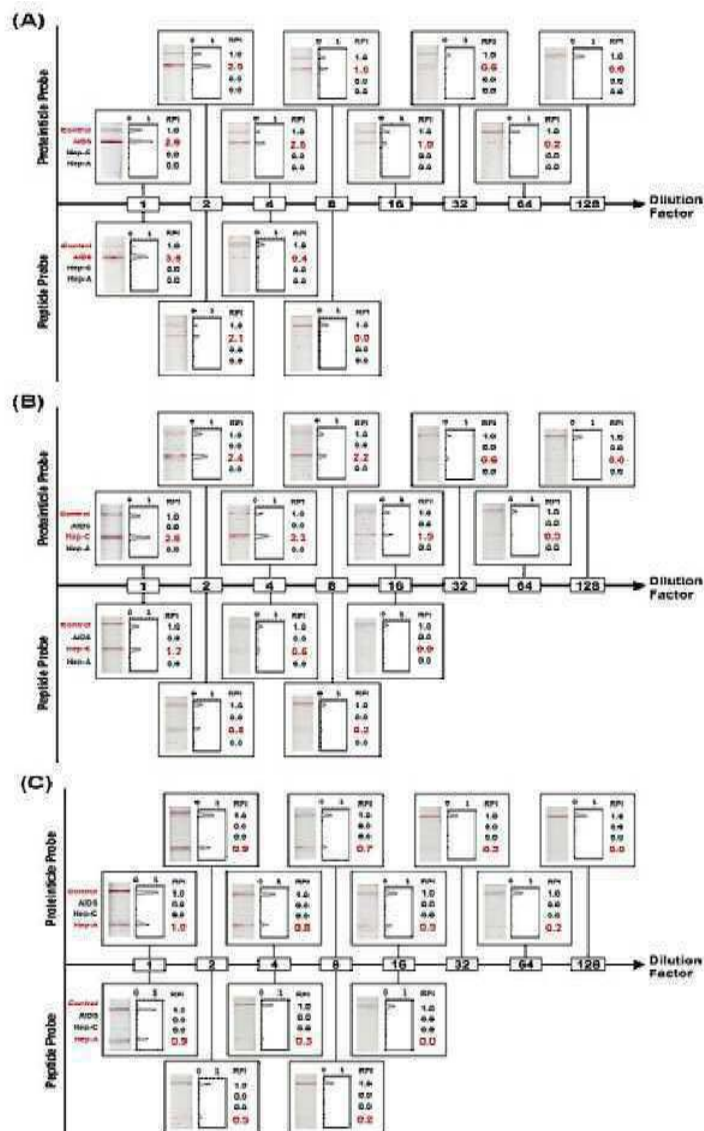
(A)

Wavelength(nm)	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527
● Au-NPs only	0.4870	0.4884	0.4899	0.4906	0.4911	0.4910	0.4900	0.4886	0.4873	0.4853	0.4813	0.4791
Wavelength(nm)	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527
● Au-NPs + SPA (0.6 nM)	0.4918	0.4934	0.4951	0.4959	0.4965	0.4966	0.4957	0.4947	0.4934	0.4915	0.4875	0.4853
Wavelength(nm)	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527
● Au-NPs + SPA (1.2 nM)	0.4964	0.4981	0.4999	0.5006	0.5013	0.5016	0.5010	0.5000	0.4988	0.4971	0.4933	0.4911
Wavelength(nm)	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527
● Au-NPs + SPA (6 nM)	0.5073	0.5095	0.5123	0.5138	0.5149	0.5159	0.5169	0.5168	0.5163	0.5153	0.5130	0.5114
Wavelength(nm)	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527
● Au-NPs + SPA (12 nM)	0.5169	0.5193	0.5225	0.5241	0.5254	0.5266	0.5281	0.5280	0.5279	0.5272	0.5251	0.5237
Wavelength(nm)	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527
● Au-NPs + SPA (60 nM)	0.5228	0.5253	0.5284	0.5300	0.5313	0.5324	0.5337	0.5339	0.5336	0.5329	0.5307	0.5291
Wavelength(nm)	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527
● Au-NPs + SPA (120 nM)	0.5259	0.5283	0.5299	0.5316	0.5335	0.5345	0.5358	0.5360	0.5357	0.5348	0.5325	0.5310

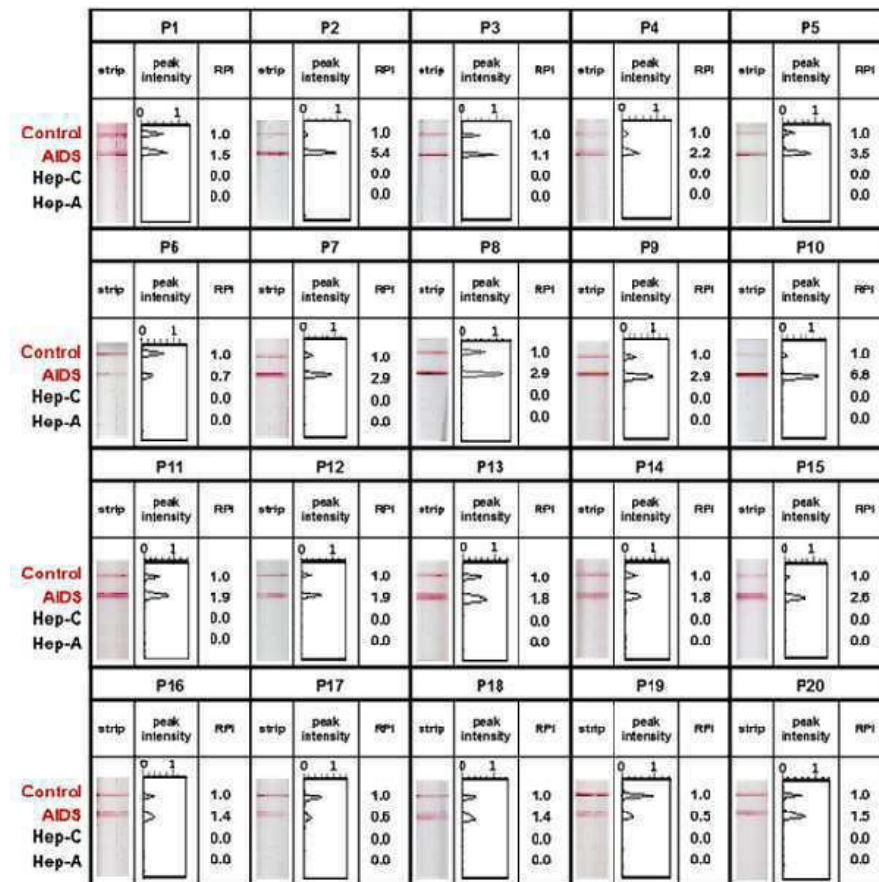
(B)



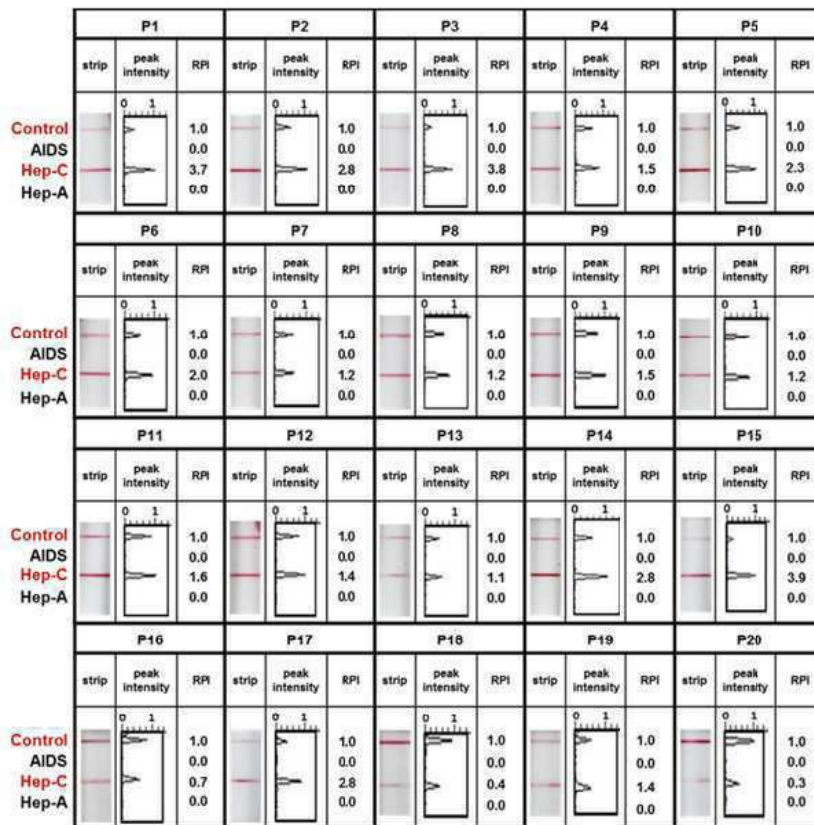
도면7



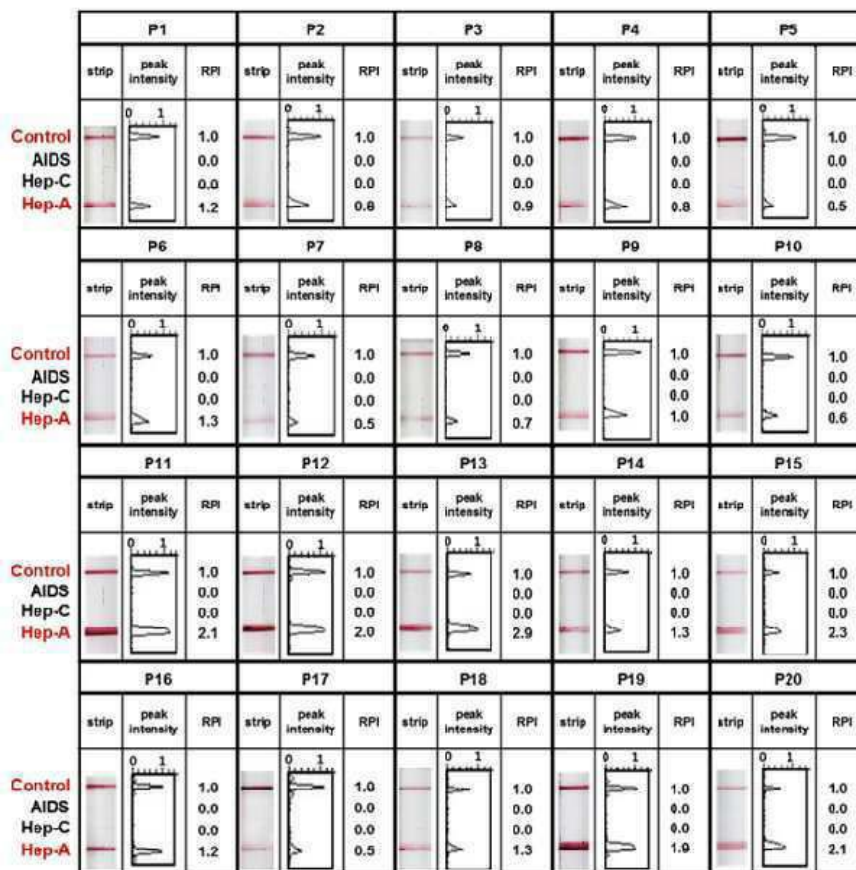
도면8



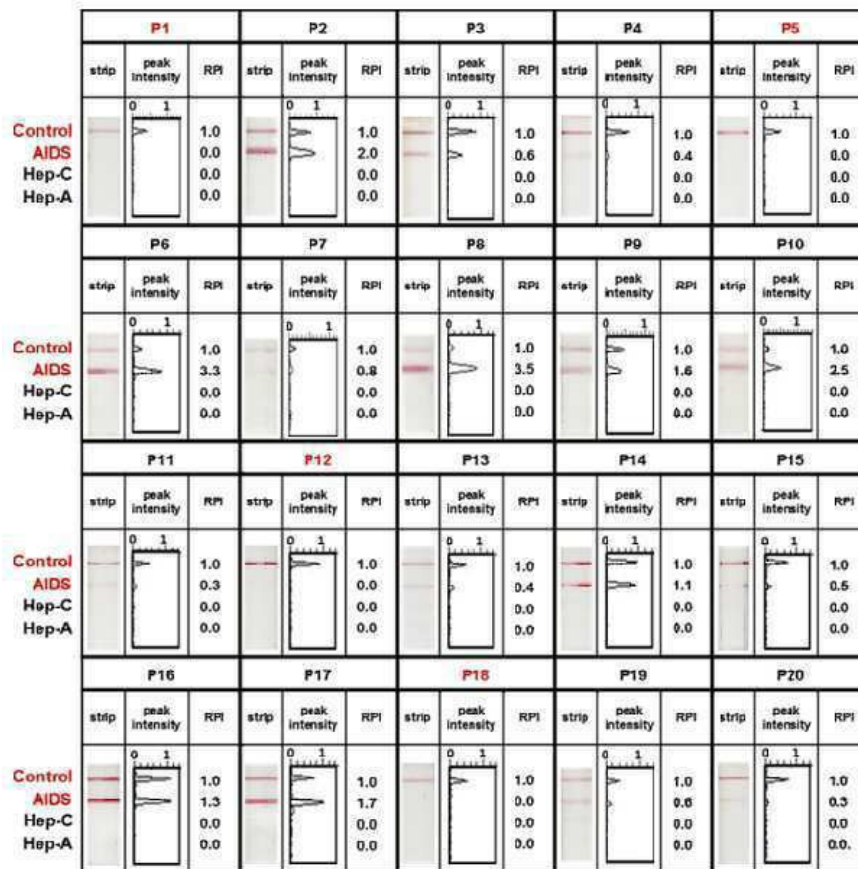
도면9



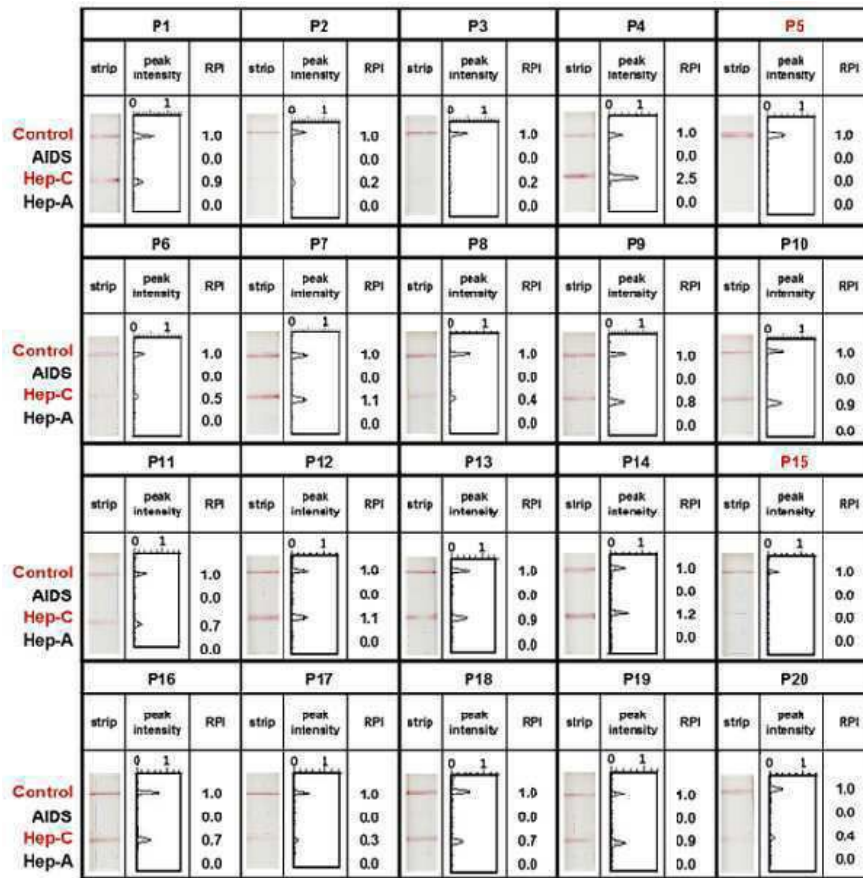
도면10



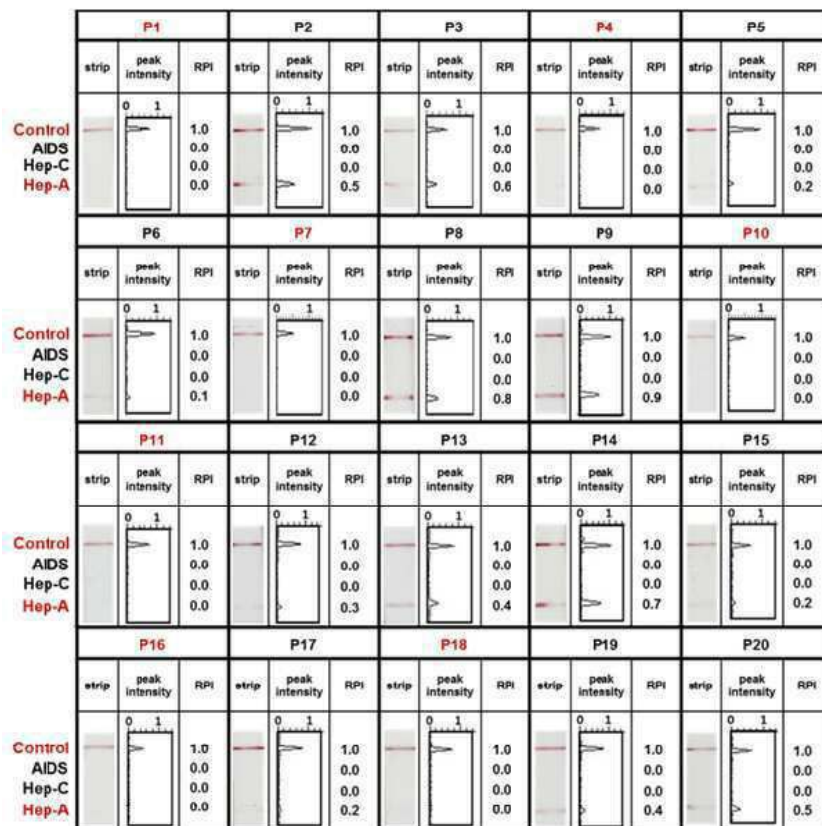
도면11



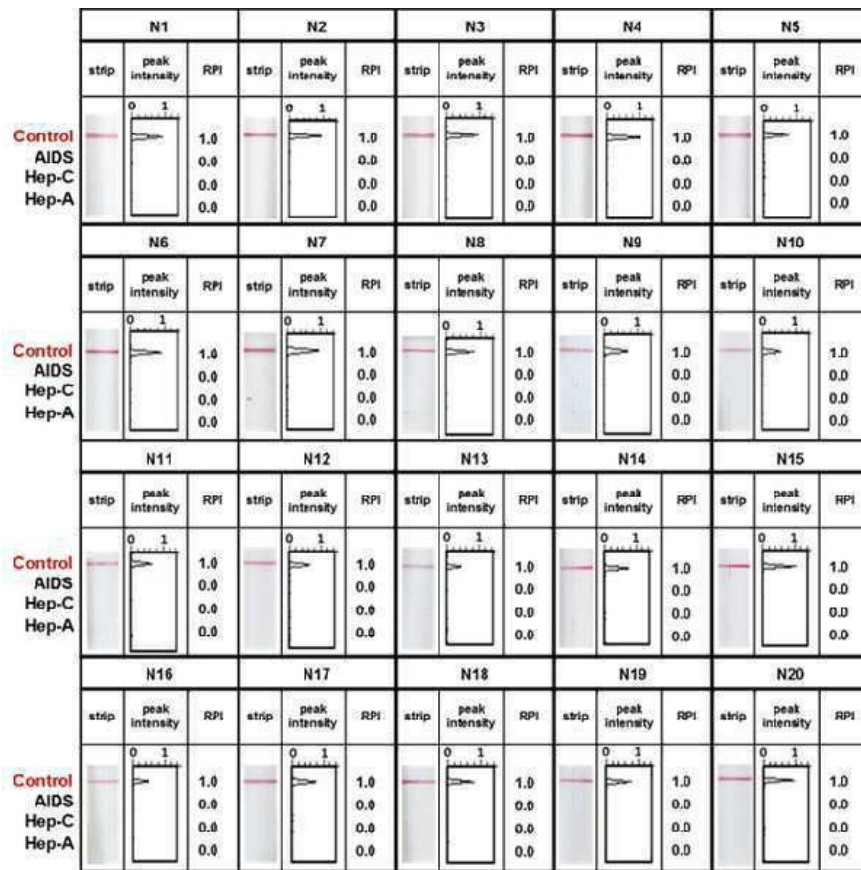
도면12



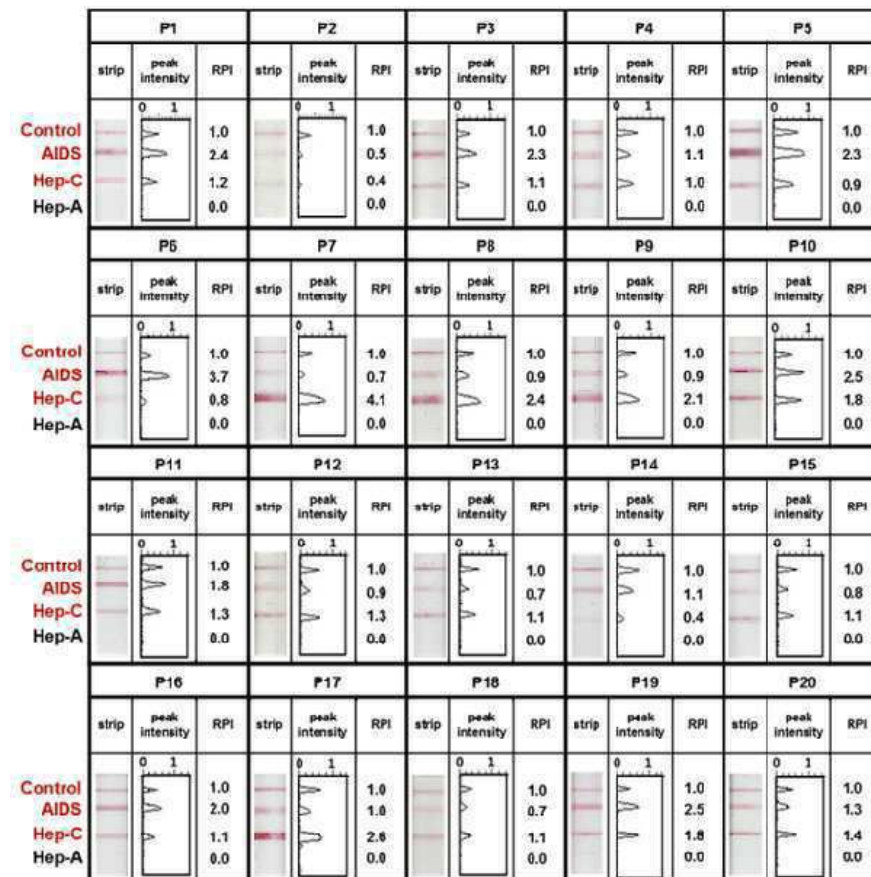
도면13



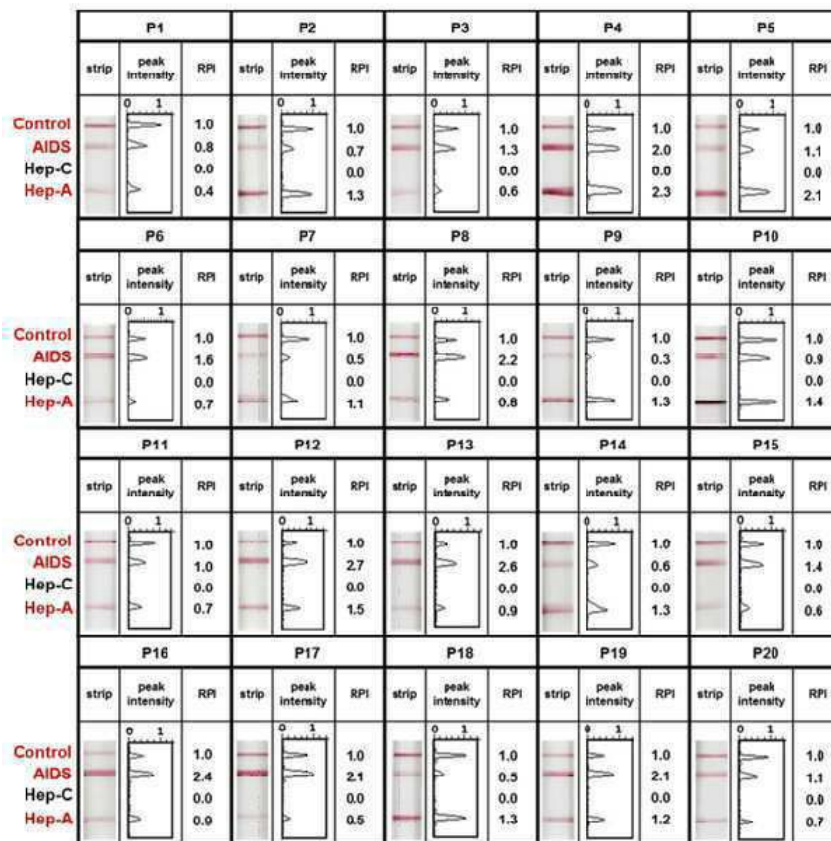
도면14



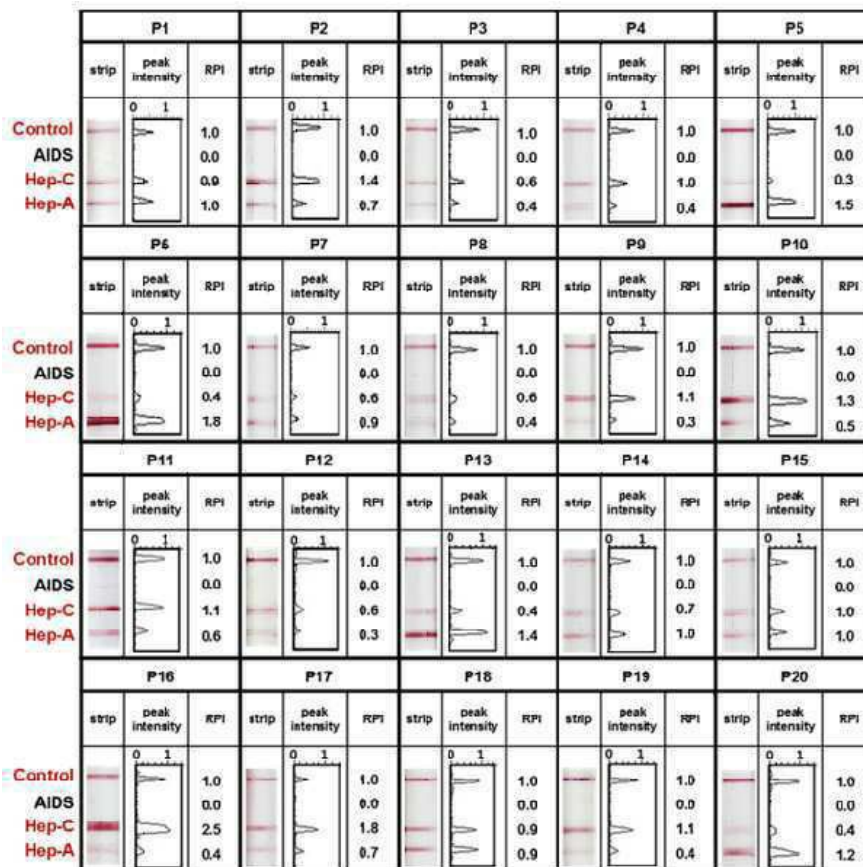
도면15



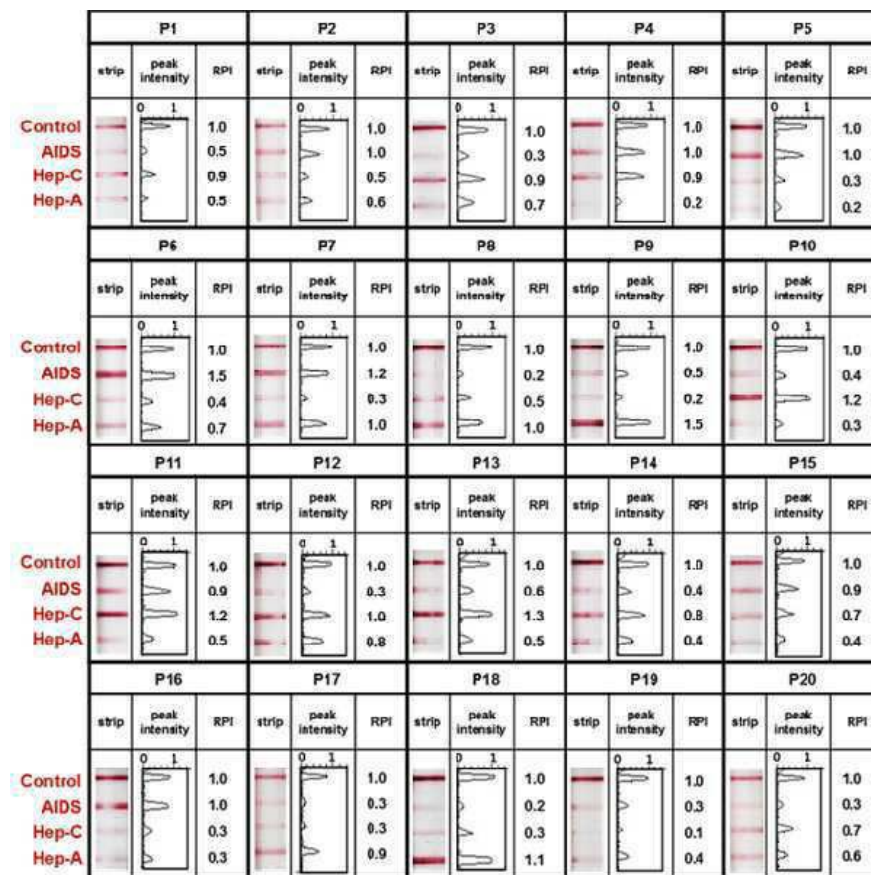
도면16



도면17



도면18



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> A Method and Kit for simultaneously detecting multiple diseases
based on 3D protein nanoparticle probes
- <130> P17-B191
- <160> 59
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 1
- <400> 1
catatgatga cgaccgcgtc cacctcg
- <210> 2
- <211> 42
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

2

<400> 2

ctcgagagtg cctccccac ttccgccacc gctttcatta tc 42

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3

<400> 3

ctcgagccca ccgccgtgc cacctccagt gcctcccca ct 42

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4

<400> 4

ctcgagatcc tggctgtgga aagataccta aaggatcaac a 41

<210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> 5

<400> 5

gagcaacccc aaatccccag gagctgttga tcctttaggt atctttccac 50

<210> 6

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6

<400> 6

ggggatttgg ggttgctctg gaaaactcat ttgcaccact gctgtgc 47

<210> 7

<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	7	
<400>	7	
gaattcacta gcattccaag gcacagcagt ggtgcaaat		39
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	8	
<400>	8	
ctcgagatcc tggctgtgg		19
<210>	9	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	9	
<400>	9	
gaattcacta gcattccaag gca		23
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	10	
<400>	10	
gaattcatcc tggctgtgg		19
<210>	11	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	11	
<400>	11	

atcgatttag tgatggtgat ggtgatgact agcattccaa ggca	44
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 12	
<400> 12	
ctcgagccag aagtataacc c	21
<210> 13	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 13	
<400> 13	
atcgatttag tgatggtgat ggtgatgtcc tactccctga cat	43
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 14	
<400> 14	
ctcgaggcgg tggactttat ccct	24
<210> 15	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 15	
<400> 15	
aagcttttag tgatggtgat ggtgatgaca cgtattgcag tctatcacgc agtc	54
<210> 16	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 16	

<400>	16	
ctcgagatca tccccgatag ggaagttctc taccaggagt tcgacgag		48
<210>	17	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	17	
<400>	17	
tgttcgatgt aaggagggtg ttgggaacac tcctccatct cgtcgaactc ctggtag		57
<210>	18	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	18	
<400>	18	
cacctccctt acatcgaaca gggaatgatg ctgccgagc aattcaaaca gaaggcgc		58
<210>	19	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	19	
<400>	19	
ctccagtgcc tcccactt ccgccacca acccgagcgc cttctgttg aattgc		56
<210>	20	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	20	
<400>	20	
gggggaggca ctggaggtgg cagcggcgt ggatagcgt tcgcctcgcg ggg		53
<210>	21	
<211>	47	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> 21

<400> 21

gaattccaca tagtgcgtgg gggagacgtg gttacccgc gaggcga 47

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 22

<400> 22

ctcgagatca tccccgatag g 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23

<400> 23

gaattccaca tagtgcgtgg g 21

<210> 24

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 24

<400> 24

aaaaacaaac gtaacaccaa ccgccgccca caggatatta agtt 44

<210> 25

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25

<400> 25

taaactccac caacgatctg accaccgccg gggaacttaa tatcctgtgg gcggc 55

<210> 26

<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	26	
<400>	26	
	gtcagatcgt tggtaggagtt tacttggtgc cgcgcagggg ccccaggttg g	51
<210>	27	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	27	
<400>	27	
	ggaagtcctt ctagtcgcgc gcacacccaa cctggggccc	40
<210>	28	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	28	
<400>	28	
	gaattcaaaa acaaacgtaa caccaaccg	29
<210>	29	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	29	
<400>	29	
	atcgatttag tgatggtgat ggtgatggga agtcttccta gtcgcg	46
<210>	30	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	30	
<400>	30	
	ctcgaggaac ctttgagaac ctctgttgat aaacctggtt ctaagaagac tcag	54

<210> 31
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 31
 <400> 31
 tgtccaagta gtaaatgag taattttaat tccaccgaac ttctccccct gagtcttctt 60

 agaaccaggt 70
 <210> 32
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 32
 <400> 32
 gaattaaaat tactcatttt actacttggga catccattcc aaccttggct gctcaggatc 60
 acatgtctat t 71
 <210> 33
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 33
 <400> 33
 gaacgtaaaa gtacacagaa aatgagacct tcccatgaat ttataaatag acatgtgatc 60

 ctgagcagc 69
 <210> 34
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 34
 <400> 34
 tctcattttc tgtgtacttt tacgttcgtg gatgatccta gatcagagga ggacaaaaga 60
 tttgagag 68
 <210> 35

<211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 35
 <400> 35
 cctccaatct caattctttg tatggtttcc tacattctat atgactctca aatcttttgt 60

 cctcctc 67
 <210> 36
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 36
 <400> 36
 ccatacaaag aattgagatt ggaggttggg aaacaaagac tcaaatatgc tcaggaagag 60
 ttgtcaaat 69
 <210> 37
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 37
 <400> 37
 gaattctttc ctaggaggtg gaagcattc attgacaac tcttcctgag catatttg 58

 <210> 38
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 38
 <400> 38
 ctcgaggaac ctttgagaac ctctg 25
 <210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223>	39	
<400>	39	
gaattctttc ctaggaggtg gaag		24
<210>	40	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	40	
<400>	40	
gaattcgaac ctttgagaac ctctg		25
<210>	41	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	41	
<400>	41	
atcgatttag tgatggtgat ggtgatgttt ctaggaggt ggaag		45
<210>	42	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	42	
<400>	42	
ctcgagaaaa tcaatttggc agatagaatg ctggattgt ctggagtta ggaaattaa		59
<210>	43	
<211>	70	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	43	
<400>	43	
cagcagagtc attatcgta tctgaaattc cctgagattg ttctttaatt tctgaactc		60
cagacaatcc		70
<210>	44	

<211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 44
 <400> 44
 gatgacgata atgactctgc tgtggctgag tttttccagt cttttccatc tggagaacca 60
 tcaaattct 69
 <210> 45
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 45
 <400> 45
 atctgcatcc aatttaatca cctgtttggg cttagtcacg ccatgtttag aatttgatgg 60
 ttcaccagat gg 72
 <210> 46
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 46
 <400> 46
 caaacaggatg attaaattgg atgcagatcc agtagagtct caggtagcaa agttggttac 60
 tcaagaaatg tttc 74
 <210> 47
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 47
 <400> 47
 gaattcctga ctttcaattt tcttatcaat attttgaaac atttcttgag taaccaactt 60
 tg 62
 <210> 48
 <211> 26

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 48
 <400> 48
 ctcgagaaaa tcaatttggc agatag 26
 <210> 49
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 49
 <400> 49
 gaattcctga ctttcaattt tcttatcaat atttt 35
 <210> 50
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> 50
 <400> 50
 gaattcaaaa tcaatttggc agatag 26
 <210> 51
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 51
 <400> 51
 atcgatttag tgatggtgat ggtgatgctg actttcaatt ttcttatcaa ta 52
 <210> 52
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 52
 <400> 52
 ctcgagggtt tgttgagata ccatacgtat gcaagatttg gctt 44
 <210> 53

<211> 56
<
212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 53
<400> 53
cctggaaatc gaagacaaga tctccctcc agaagccaaa tctgcatac gtatgg 56
<210> 54
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 54
<400> 54
agatcttgtc ttcgatttcc aggttacagt ttctacagag cagaatgttc ctgat 55
<210> 55
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 55
<400> 55
gaattctatg ccgacttggg gatcaggaac attctgtctt gtag 44

<210> 56
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 56
<400> 56
ctcgagggtt tgttgagata cc 22
<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 57
<400> 57

gaattctatg ccgacttggg g 21

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 58

<400> 58

gaattcgggtt tgttgagata cc 22

<210> 59

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 59

<400> 59

atcgatttag tgatggtgat ggtgatgtat gccgacttgg gg 42