(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0034756
(43) 공개일자 2013년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/02 (2006.01) *C07K 1/107* (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
(21) 출원번호 10-2011-0098794
(22) 출원일자 2011년09월29일
심사청구일자 2011년09월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이지원
서울특별시 광진구 아차산로70길 62, 현대아파트 301동 204호 (광장동)
(74) 대리인
특허법인다나

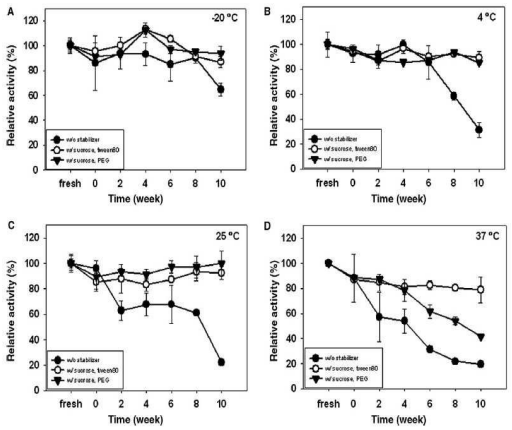
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 나노입자의 장기 보존 및 안정성 증대 방법**

(57) 요 약

본 발명은 단백질 나노입자의 장기 보존 및 안정성 증대를 위한 동결건조 방법 및 보관 조건의 확립에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20110020464
부처명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원_도약연구
연구과제명	생체나노프로브를 활용한 초고감도 나노바이오센서 기술
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.07.01 ~ 2012.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PA100026M0211612
부처명	서울특별시
연구사업명	특허기술상품화기술개발지원사업
연구과제명	[1차년도] 구강 점막/타액 내 항체 검출 기반 고감도 AIDS 진단키트 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.10.01 ~ 2012.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0029409
부처명	교육과학기술부
연구사업명	선도연구센터육성(ERC)
연구과제명	실시간 체외검지용 기능성 소재연구
주관기관	성균관대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

단백질 나노입자를 동결건조하는 단계를 포함하는 단백질 나노입자의 안정적인 장기간 보존 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질 나노입자는 단백질 단량체(monomer)의 자가조립 (self-assembly) 특성에 의해 형성된 단백질 다량체(multimer) 입자인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 안정적인 장기간 보존 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 방법은 안정제를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 안정적인 장기간 보존 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 안정제는 트윈 80, 폴리에틸렌 글리콜, 수크로오스,마니톨, 덱스트란, 소르비톨, 락토오스, 말토오스, 트리할로오스, 글라이신, 및 소혈청 알부민로 구성된 군으로부터 선택된 물질 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 안정적인 장기간 보존 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 안정제는 트윈 80 및 수크로오스의 조합인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 안정적인 장기간 보존 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 단백질 나노입자는 자가조립(self-assembly) 특성을 지닌 단백질 단량체와 특정 단백질이 융합된 융합단백질의 나노입자인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 안정적인 장기간 보존 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 단백질 나노입자의 융합 단백질은 자가조립(self-assembly) 특성을 지닌 단백질 단량체와 녹색 형광 단백질의 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 안정적인 장기간 보존 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단백질 나노입자의 장기 보존 및 안정성 증대를 위한 동결건조 방법 및 보관 조건의 확립에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 단백질은 소재 고유의 다양한 장점에도 불구하고 구조적 불안정성으로 인해 장기 보존이 어렵다는 기술적 한계를 지니고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 주로 사용되는 기술로 동결건조 방법을 들 수 있으며, 효율적인 동결건조를 위해서 다양한 안정제의 조합, 보관 조건의 확립 등이 필수적인 요소라 할 수 있다.

[0003] 관련 선행특허로는 대한민국 특허공개번호 제1020090079251호는 조직 보존 및 고정 방법에 관한 것으로, 실온에서, 인단백질(phosphoprotein)을 포함하는 샘플과 접촉시, 상기 인단백질을 고정 및 안정화시킬 수 있고, 세포 형태를 보존시킬 있고, 상기 샘플이 동결되게 하여 분자 분석에 적합한 크라이오스태트(cryostat) 동결 섹션을 생성시킬 수 있는 조성물로서,a. 상기 인단백질을 고정시키는데 효과적이고, 안정화제(stabilizer) 및/또는 투과성 증강제(permeability enhancing agent)가 가용성이 되도록 하는데 충분한 물 함량을 지니는 고정제(fixative);b. (ⅰ) 키나아제 억제제, (ii) 포스파타아제 억제제, 및 임의로 (iii) 프로테아제 억제제를 포함하는 안정화제; 및 c. 투과성 증강제를 포함하는 조성물이 기재되어 있으며,

[0004] 또 다른 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제1020030074389호는 동결건조된 단백질의 재구성 방법에 관한 것으로, 재구성이 기체압이 1mbar 내지 대기압인 용기내에서 일어나는, 동결건조된 단백질의 재구성 방법이 기술되고, 동결건조된 단백질 함유 용기에서, 본 발명에 따라서 요구되는 1mbar 내지 대기압의 기체압은 공기 또는 불활성 기체를 도입함으로써 설정하고, 단백질을 용해시키는데 필요한 양의 주사용수를 첨가하는 것이 기재되어 있다.

[0005] 동결건조 방법은 단백질과 같은 생체소재의 장기 보존을 위해 사용되는 대표적인 기술로써, 현재 의약품, 식품 등 다양한 분야에 적용되고 있다. 하지만 동결건조 과정 중의 급격한 온도, pH, 압력 변화 등으로 인해 단백질의 구조적 변형이 가능하다는 단점을 지니고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 적용되는 방법으로 안정제를 첨가하여 단백질의 구조적 변형을 최소화하는 방법을 들 수 있다.

[0006] 이러한 안정제의 첨가는 단백질과의 상호 결합을 통해서 단백질의 구조적 안정성이 유지되며, 또한 다양한 안정제의 조합을 통해서 그 효용성이 극대화된다. 단백질의 동결건조 조건의 확립과 더불어 장기 보존을 위해 중요한 요소 중의 하나로 보관 조건을 들 수 있다. 동결건조를 통해 생산된 단백질이 향후 제품화될 경우 보관 조건은 유통 과정 및 관리 유지비와 직접적으로 연관되기 때문에 중요한 요소라 할 수 있다.

[0007] 본 발명에서는 이러한 배경 기술을 바탕으로 단백질 나노입자에 특화된 동결 건조 조건을 확립하고, 이를 기반으로 장기 보존이 가능한 보관 조건을 확립하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 단백질 나노입자의 장기 보존 및 안정성 증대를 위한 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 단백질 나노입자의 장기 보존 및 안정성 증대를 위한 보관 조건을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 단백질 나노입자를 동결건조하는 단계를 포함하는 단백질 나노입자의 안정적인 장기간 보존 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단백질 나노입자는 단백질 단량체(monomer)의 자가조립 (self-assembly) 특성에 의해 형성된 단백질 다량체(multimer) 입자인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 방법은 안정제를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하며, 상기 안정제는 트윈 80, 폴리에틸렌 글리콜, 수크로오스,마니톨, 덱스트란, 소르비톨, 락토오스, 말토오스, 트리할로오스, 글라이신, 및 소혈청 알부민로 구성된 군으로부터 선택된 물질 또는 이들의 조합인 것이 더욱 바람직하며, 상기 안정제는 트윈 80 및 수크로오스의 조합인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 단백질 나노입자는 자가조립(self-assembly) 특성을 지닌 단백질 단량체와 특정 단백질이 융합된 융합단백질의 나노입자인 것이 바람직하고,

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 단백질 나노입자의 융합단백질은 자가조립(self-assembly) 특성을 지닌 단백질 단량체와 녹색 형광 단백질의 융합단백질인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0015] 이하 본 발명을 설명한다.

[0016] 본 발명에서는 자가조립 과정을 통해서 나노미터 크기의 구형 입자를 형성하는 단백질 나노입자를 대상으로 장기 보존이 가능한 최적의 동결건조 조건 및 보관 조건을 확립하고자 한다. 단백질 나노입자는 자가조립 과정으로 인해 단량체로 존재하는 단백질에 비해 상대적으로 구조적 안정성이 높은 것으로 알려져 있다. 또한 구조적 특징으로 인해 진단 센서 프로브, 3차원 나노구조체 기반 소재, 자기공명장치에 적용 가능한 조영제 등으로 많은 응용 연구가 진행되고 있다. 이러한 다양한 기능적 특성을 지닌 단백질 나노입자의 응용 분야를 확대하기 위해서 본 발명에서는 단백질 나노입자에 최적화된 동결건조 조건을 확립하여 장기 보존이 가능한 기반 기술을 확립하고자 한다.

[0017] 본 발명자들은 단백질 나노입자의 모델로 녹색 형광 단백질 나노입자(Green fluorescent protein nanoparticles, 이하, 'gFPNPs'라 함)을 사용하여, 단백질 나노입자의 장기간 안정성을 위한 동결건조의 효과 및 단백질 나노입자의 안정성을 평가하였다. gFPNPs의 TEM 이미지와 형광강도를 그들의 기능적 및 구조적 안정성을 모니터하기 위하여 분석하였다. 수용액에서 점차적으로 불활성화되는 녹색형광 단백질 모노머(eGFP)와 다르게, 동일한 수용액에서 gFPNP는 4℃에서 심지어 2주 동안 초기 형광 활성 및 구형 나노입자 구조를 유지하였다. gFPNPs의 안정한 장기간 보존을 보장하기 위하여, 수용액 내의 gFPNPs를 동결건조를 통해서 건조된 고체 형태로 전환시켰다. 80 및 수크로오스와 함께 동결건조된 gFPNPs의 나노입자 구조 및 형광 활성을 여러 저장 온도(-20 ℃, 4 ℃, 25 ℃, 및 37 ℃)에서 심지어 10주 동안 매우 안정하게 유지되었다. 10 주의 기간 동안, gFPNP의 형광은 늘 넓은 범위의 온도에서 초기 형광의 80% 수준 이상이었다.

[0018] 단백질 나노입자(PNPs)는 고유한 생물학적 기능을 가지는 나노구조 생체물질이고 민감성 생체분석, MRI 대조도(contrast), 반도체 장치, 하이브리드 물질용 주형 등과 같은 넓은 범위의 적용분야에 성공적으로 채택되어지고 있다. PNPs의 안정성을 증가시키고 유지시키는 최적 조건을 발견하기 위하여, 본 발명자들은 장기간 보존 기간 동안 gFPNPs의 기능 및 구조적 안정성을 조사하였다.

[0019] 장기간 안정성을 평가하기 전에, 본 발명자들은 상대적으로 짧은 기간 동안 수용액 내에서 gFPNPs의 안정성을 분석하였고, 형광성 단백질 모노머(eGFP)와 다르게 그들은 4 ℃에 저장시에 2 주 동안 그들의 구조적 안정성을 유지하며 형광 활성을 잘 보존하였다. gFPNPs의 안정적이고 장기간 보존을 확신하기 위하여, 본 발명자들은 동결건조를 통하여 gFPNPs를 건조된 고체 형태로 제형화하였다. 그 동결건조된 gFPNPs는 초기 4 주 동안 안정하게 유지되었지만 그 후에는 안정제가 없는 경우에는 그들의 기능 및 구조적 안정성을 현저하게 상실하였다. 안정제 첨가에 의하여, 특히 Tween 80 및 수크로오스(sucrose) 첨가 시에, 동결건조된 gFPNPs의 형광 및 구조는 심지어 37 ℃에서 저장시에도 변성이나 변형없이 10주까지 성공적으로 보존되었다.

[0020] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0021] 수용액 내에서 gFPNP의 안정성

[0022] gFPNP의 안정성 및 기능에서 시간 경과 변화를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 2 주 동안 2일 마다 4 ℃에서 저장된 gFPNPs의 형광 강도를 측정하였고 야생형 eGFP의 형광 강도와 그들을 비교하였다. 도 1A에 나타난 것과 같이, gFPNP의 형광 강도는 초기 형광의 80% 수준 이상을 유지하였지만 eGFP의 강도는 초기 형광의 20%까지 점차적으로 감소하였다. 본 발명자들은 또한 gFPNP의 구조적 안정성을 조사하기 위하여 TEM 분석을 수행하였고 gFPNP가 2 주 동안 구형 나노 크기 구조(10-15 nm 직경)를 유지하였다는 것을 발견하였다(도 1B 및 C). 도 1의 결과는 gFPNP가 수용액(4 ℃)에서 심지어 2 주 동안 구조의 변성없이 활성적으로 유지될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0023] 장기간 안정한 유지를 위한 gFPNP의 동결건조화

[0024] 10주까지 안정한 gFPNP의 유지를 확장하기 위한 방법으로서 동결건조화를 채택하였고 동결건조된 gFPNP의 다양한 저장 온도 조건(-20 ℃, 4 ℃, 25 ℃, 및 37 ℃)이 조사되었다. 안정제 없이 동결건조된 각 gFPNP를 탈이온수(DW)로 재수화하고, 각 저장온도에서 시간경과 형광변화를 비-동결건조된 gFPNP의 초기 형광과 비교하였다.

[0025] 처음 4 주 동안, -20 ℃ 및 4 ℃에서 저장된 동결건조된 gFPNP의 형광 강도는 초기 강도의 90% 수준 이상까지 유지되었지만(도 2A 및 B), 상온 근처(25 ℃ 및 37 ℃)에서 저장된 동결건조된 gFPNP의 것은 약 60% 수준까지 감소하였다(도 2C 및 D). 형광 및 구조 안정성의 상관관계를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 TEM 분석을 수행하였다. -20 ℃에서 4 주 저장 후, 동결건조화된 gFPNP는 초기 gFPNP와 거의 동일한 구형 나노구조를 여전하게 가진다(도 1B 및 3A). 4 ℃에서 저장된 동결건조화된 gFPNP의 경우, gFPNP의 구형 나노입자도 비록 나노입자의 전체 수는 현저하게 감소하였지만 관찰된다(도 3B). gFPNP 입자의 단순한 해리가 gFPNP의 응집, 변성 및/또는 분해없이 4 ℃에서 일어나서 형광 방출이 현저한 감소없이 유지되는 것 같다. 반면에, 25 ℃ 및 37 ℃에서 보존된 거의 모든 동결건조화된 gFPNP는 초기 gFPNPs와 비교하여 아마 단백질 형태의 변성으로 인하여 4 주 후 고유한 나노구조를 상실한다(도 1B, 3C, 및 3D). 25 ℃ 및 37 ℃에서 10 주 보존 후, 안정제 없이 동결건조화된 gFPNP는 초기 형광의 20% 수준까지 그들의 형광을 잃는다(도 2C 및 D). 그리고 TEM 이미지는 그들이 10 주 후 고유한 나노입자 형태를 완전하게 잃는다는 것을 보여준다(도 4C 및 D), 이것은 동결건조 방법을 개량하기 위한 새로운 접근(즉. 안정제의 첨가)이 gFPNPs의 장기간 안정성을 증진시키기 위하여 필요하다는 것을 나타낸다.

[0026] 동결건조화된 gFPNP의 장기간 안정화에 대한 안정제의 효과

[0027] 안정제 없이 동결건조된 후 -20 ℃ 및 4 ℃에서 보존된 gFPNP는 4 주 동안 형광 및 나노입자 형태를 유지하지만 그 후 그들은 점차적으로 변성되고 생물학적 활성을 현저하게 상실하였다(도 2.4). 내부적인 기능 및 구조를 유지하는 기간을 증가시키기 위하여, sucrose,Tween 80, 및 polyethylene glycol (PEG)를 gFPNP의 동결건조화에서 안정제로 고려하였다.

[0028] 본 발명자들은 동일한 저장 온도에서 동결건조화된 gFPNP의 장기간 안정성을 증가시키기 위해서 PEG-sucrose 및 Tween 80-sucrose의 조합의 효과를 평가하였다.

[0029] 도 2에 나타낸 것과 같이, PEG-sucrose 또는 Tween 80-sucrose를 사용한 동결건조 방법에서, 동결건조화된 gFPNP의 초기 형광 강도는 37 ℃에서 저장한 경우를 제외하고는 심지어 10 주 동안 안정하게 유지되었다.

[0030] 본 발명자들은 또한 TEM 이미지 분석을 통해서 gFPNPs의 구조/형태에서 변화를 조사하였고 안정제 없는 경우와 다르게 안정제와 함께 동결건조된 gFPNPs는 10 주 동안 그들 자신의 구형 구조를 유지하였다(도 3 및 4), 그러나 PEG-sucrose 존재 하에서 동결건조된 gFPNP는 25 ℃ 또는 37 ℃ (도 3L, 4K, 및 4L)에서 저장할 때 그들의 나노입자 구조를 현저하게 잃었다.

[0031] 작은 나노크기로 인하여, gFPNPs는 높은 표면-부피 비를 가지고, 그들은 다른 gFPNPs와 비특이적으로 상호작용할 더 많은 기회를 가지는 것을 시사한다. 도 2에서 4로부터, 단백질의 표면 유도된 풀림을 효과적으로 저해하는 기능을 가지는 Tween 80은 동결건조 동안에 gFPNPs 사이에 상호작용을 감소시켜서 그들 자신의 기능 및 구조의 증가된 유지를 야기하는 것 같다.

[0032] 결론적으로, 안정제로 Tween 80 및 sucrose를 채택한 동결건조 방법은 구조적 및 기능적 변화를 회피하면서 gFPNPs의 안정적이면서도 장기간 보존을 위한 효과적이고 최적인 방법이다. 비록 본 발명에서는 gFPNPs를 중심으로 기술하였지만, 본 발명에서 개발된 동결건조 방법/조건은 많은 다른 PNP-유래 나노입자의 안정적이면서 장기간 보존에 일반적으로 적용될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0033] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이, 추가적인 보존 처리를 하지 않은 단백질 나노입자의 경우 4℃, 수용액 조건에서 2주 이상 기능성 및 고유의 구조가 유지됨을 확인하였다. 이는 단량체 형태의 단백질보다 자가조립 과정을 통해 형성된 단백질 나노입자의 구조적 안정성이 상대적으로 더 높다는 것을 의미한다.

[0034] 또한 보다 장기간의 보존을 위해서 안정제의 조합, 보관 온도 등에 따른 단백질 나노입자의 기능적, 구조적 안정성의 변화를 시간에 따라 분석하였으며, 그 결과 트윈 80 (Tween 80)과 수크로오스(sucrose)의 조합을 안정제로 사용하였을 경우 다양한 온도 조건에서도 12주 이상 구조적 안정성 및 기능성이 유지됨을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 (A) 수용액 내 4 ℃에서 보존된 eGFP 모노머(filled circle) 및 gFPNP (open circle)의 형광 강도의 시간 경과 프로파일을 나타낸 그림. 초기 gFPNP의 TEM 이미지(B) 및 4 ℃에서 2 주간 수용액 내에서 보존된 gFPNP (C). 스케일 바: 50 nm.

도 2는 재수화된 gFPNP의 형광 강도의 시간 경과 프로파일. 안정제 없는(filled circle), 그리고 1% Tween 80 및 5% sucrose (open circle), 그리고 1% PEG4000 및 5% sucrose (filled triangle)로 동결건조된 gFPNP의 형광 강도를 10 주 동안 2주 마다 측정하였다. 각 동결건조된 gFPNPs를 -20 ℃ (A), 4 ℃ (B), 25 ℃ (C), 및 37 ℃ (D)에서 저장하였다.

도 3은 4 주 저장 후 재수화된 gFPNPs의 TEM 이미지. gFPNPs 안정제 없는(A.D), 1% Tween 80 및 5% sucrose (E.H),그리고 1% PEG 및 5% sucrose (I.L)로 동결전조한 gFPNPs의 TEM 이미지. 저장 온도: -20 ℃, 4 ℃, 25 ℃, 및 37 ℃ (좌측에서 우측으로). 스케일 바: 50 nm.

도 4는 10 주 저장 후 재수화된 gFPNPs의 TEM 이미지. gFPNPs 안정제 없는(A.D), 1% Tween 80 및 5% sucrose (E.H),그리고 1% PEG 및 5% sucrose (I.L)로 동결전조한 gFPNPs의 TEM 이미지. 저장 온도: -20 ℃, 4 ℃, 25 ℃, 및 37 ℃ (좌측에서 우측으로). 스케일 바: 50 nm.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 비한정적인 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0037] 실시예 1:gFPNPs의 유전자 발현 및 정제

[0038] 인간 ferritin 중쇄(hFTN-H) 유전자를 인간 간 cDNA 라이브러리(Clontech, USA)로부터 클로닝하였고, enhanced 녹색 형광 단백질(eGFP) 전체 코딩 서열을 주형으로 플라즈미드 pEGFP를 사용하여 PCR에 의하여 얻었다. PCR 증폭 후, 각 hFTN-H::Linker(G3SG3TG3SG3)::eGFP 및 eGFP를 코딩하는 DNA 절편을 연속적인 라이게이션에 의하여 pT7-7 플라즈미드의 NdeI-HindIII 부위로 삽입시켰다. 금속 (Ni2+) 친화 정제를 위해 polyhistidine tag (His6)를 eGFP의 N-말단 및 FTN-H::Linker::eGFP (gFPNP)의 C-말단에 첨가하였다. 재조합 Escherichia coli 균주 BL21(DE3) [F⁻ompT*hsd*S_B($r_B^-m_B^-$)]를 플라즈미드 발현 벡터로 형질전환시키고 앰피실린 저항성을 가지는 37 ℃에서 배양하였다.

[0039] 배양 브로쓰의 흡광도(OD600)가 0.6~0.7에 도달한 때, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종 1.0 mM의 농도로 브로쓰에 첨가하였다. 유전자 발현을 유도한 후, 그 세포를 20 ℃에서 16시간 동안 더 배양하였다. 그 후 그 세포를 4 ℃에서 10분간 원심분리 (4500 rpm)하여 모았다.

[0040] 그 세포 펠렛을 10 mL 라이시스 버퍼(50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에서 재부유한 후 그 용액을 초음파 분쇄하였다(Branson Ultrasonics Corp., CT, USA). 그 세포 파쇄액을 10분간 13,000 rpm에서 원심분리하고 그 가용성 상등액을 얻어서 Ni^{2+} -NTA 컬럼(Qiagen, Germany)에 로딩하였다. 세척 버퍼(50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH. 8.0)로 충분히 세척한 후, 재조합 단백질을 용출 버퍼(50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl,250 mM imidazole, pH 8.0)를 사용하여 용출하고, 저장 버퍼를 PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH2PO4, pH 7.4)로 교환하였다.

[0041] 실시예 2:gFPNPs의 동결건조 및 재수화

[0042] PBS 버퍼에서 세 종류의 gFPNP 샘플(1.5 mg/mL)을 1 wt.% PEG 및 5 wt.% sucrose; 그리고 1 vol.% Tween 80 및 5 wt.% sucrose의 각 안정제 조합 또는 이러한 안정제 없이 제조하였다.

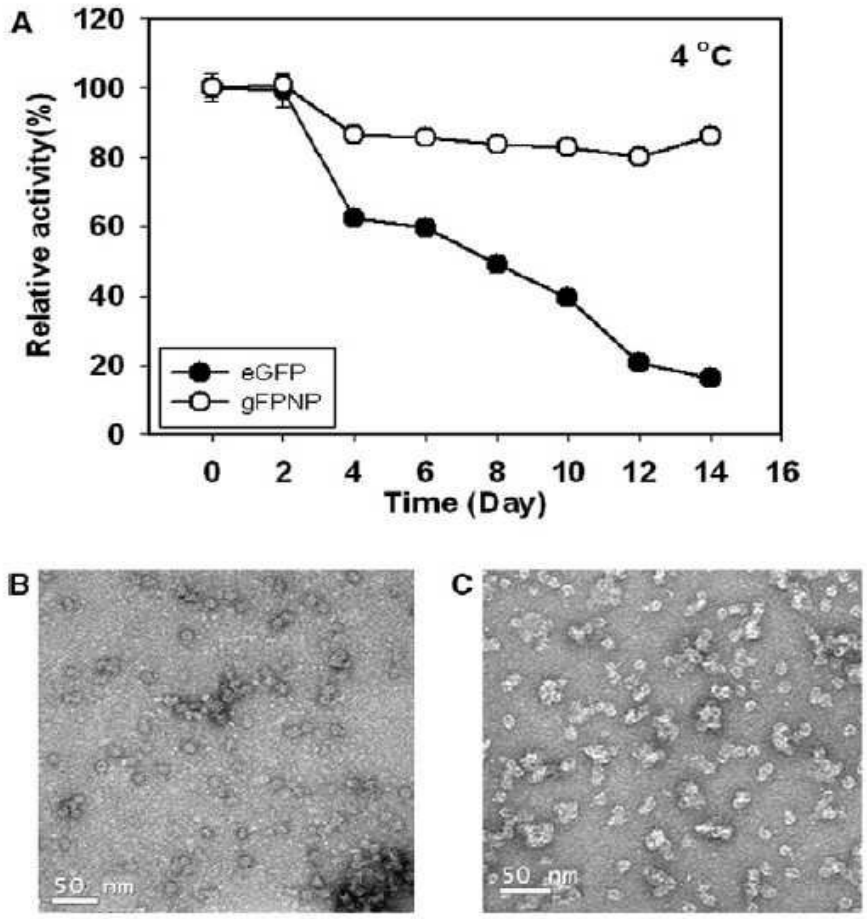
[0043] 샘플들을 -80 ℃에서 3시간 동안 천천히 예비 동결하고 그 동결 샘플을 -80 ℃에서 동결건조기(FDU-2100, DRC-1000, EYELA, Japan)에서 동결건조하였다. 1차 건조는 -10 ℃에서 1시간 동안 달성되었고, 2차 건조는 20 ℃에서 5 시간 동안 진공 상태에서 달성되었다. 그 후 동결건조된 샘플을 여러 다른 온도 조건: -20 ℃, 4 ℃, 25 ℃, 및 37 ℃에서 저장하였다. 각 샘플을 습기화를 억제하기 위하여 완전하게 밀봉하였다. 동결건조된 샘플을 탈이온수(deionized water)로 재수화하였다.

[0044] 실시예 3: 단기간 및 장기간 안정성을 모니터하기 위한 형광 강도 및 투과 전자 현미경법(TEM)

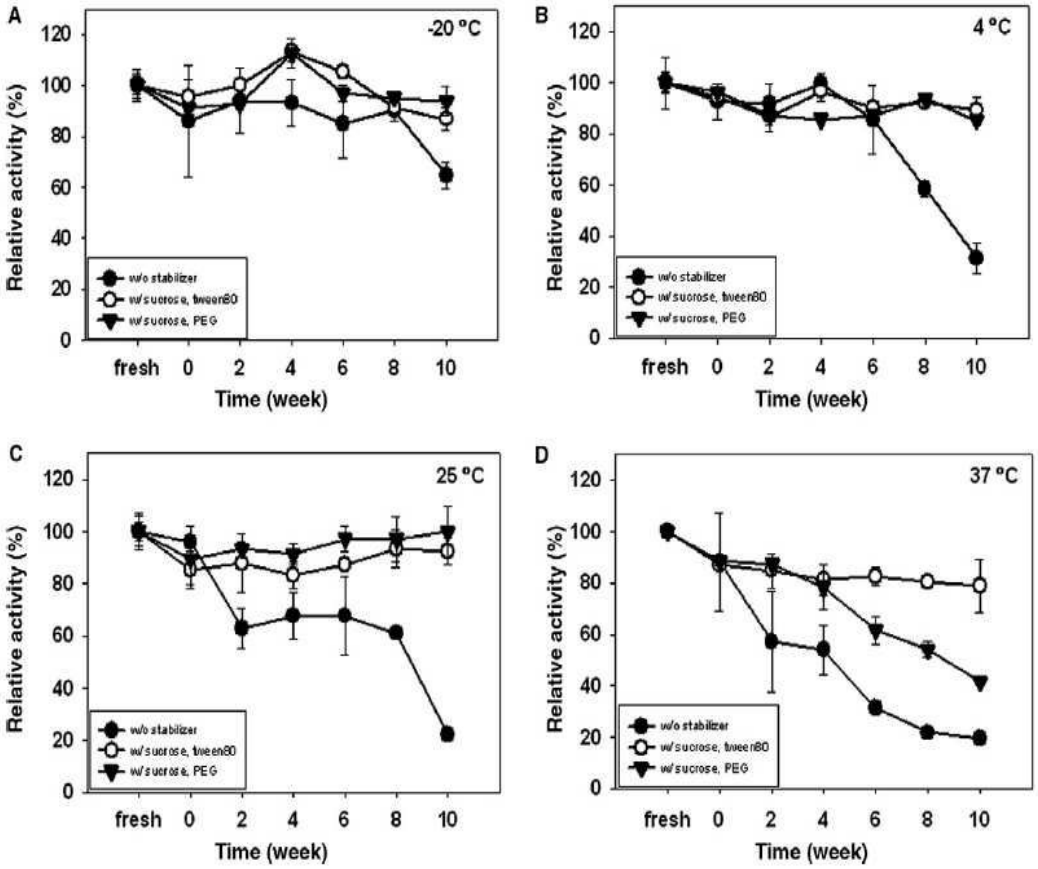
[0045] 형광 마이크로플레이트 리더(GENios, Tecan, Austria)를 단기간 및 장기간 안정성에 대한 eGFP 및 gFPNPs의 형광 강도를 측정하는데 사용하였다. eGFP 모노머 및 gFPNP 샘플의 농도를 Protein Assay Kit (Bio-Rad)에 의하여 결정하였고, 각 샘플을 최종 농도 10 pmol/L로 셋팅하였다. 약 50 ㎕의 샘플을 96-웰 플레이트(Cat. No. 137101, Nunc, Denmark)의 각 웰에 첨가하였다. 필터(485 nm에서 여기 및 535 nm에서 방출)를 사용하였다. 신선하고 재수화된 gFPNPs를 Philips Technai 120 kV 전자 현미경을 사용하여 이미지화하였다. 정제된 단백질을 2 wt.% 수용성 uranyl acetate 용액으로 음성적으로 염색하였다.

도면

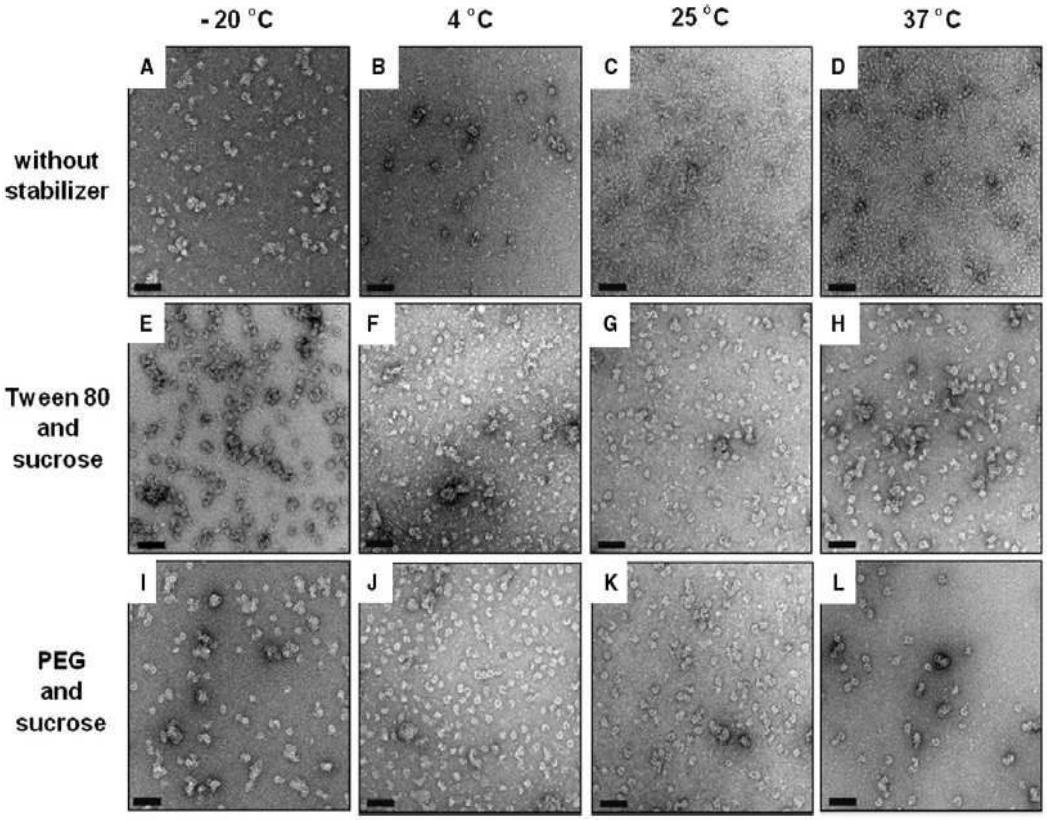
도면1


A
120
100
80
60
40
20
0
Relative activity(%)
4 °C
eGFP
gFPNP
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Time (Day)
B
50 nm
C
50 nm

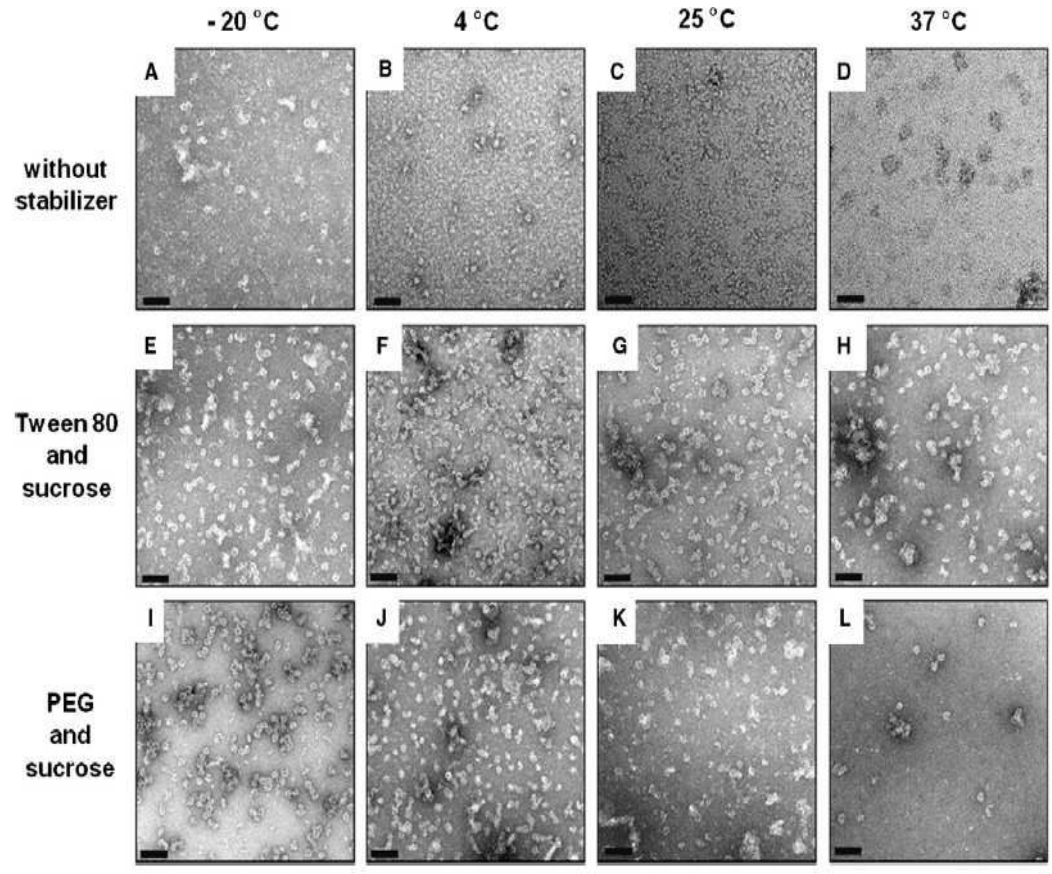
도면2


A
-20 °C
B
4 °C
C
25 °C
D
37 °C
Relative activity (%)
Time (week)
fresh
0
2
4
6
8
10
w/o stabilizer
w/ sucrose, tween80
w/ sucrose, PEG

도면3


- 20 °C
4 °C
25 °C
37 °C
A
B
C
D
without stabilizer
E
F
G
H
Tween 80 and sucrose
I
J
K
L
PEG and sucrose

도면4


- 20 °C
4 °C
25 °C
37 °C
A
B
C
D
without stabilizer
E
F
G
H
Tween 80 and sucrose
I
J
K
L
PEG and sucrose