



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월22일
(11) 등록번호 10-1298203
(24) 등록일자 2013년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/12 (2006.01) *C12N 5/12* (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0124733

(22) 출원일자 2012년11월06일

심사청구일자 2012년11월06일

(56) 선행기술조사문헌

J. Appl. Biol. Chem. Vol. 53, No. 2, Pages 112-115(2010.).*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

명지대학교 산학협력단

경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

부성희

경기도 용인시 기흥구 보라동 민속마을 쌍용아파트 109-1003호

한태룡

경기도 용인시 수지구 상현1동 금호베스트빌 251동 1803호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

고영갑, 이창희, 김성태, 권정기, 임상엽

전체 청구항 수 : 총 11 항

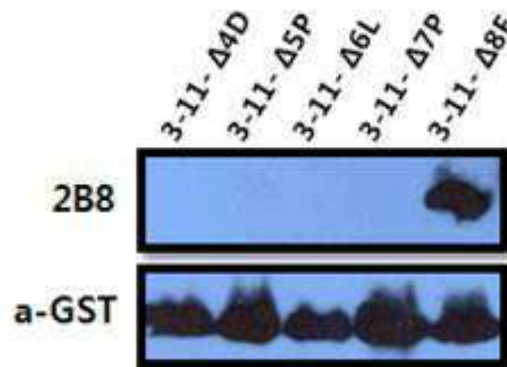
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **에피토프 태깅용 항체, 하이브리도마 세포주 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 데이노코커스 라디오듀렌스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)으로 유래된 펩티드 태그 및 상기 펩티드 태그들을 특이적으로 인식할 수 있는 항체 내지 이를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포주, 상기 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 내지 이를 포함하는 벡터 또는 형질전환체, 상기 펩티드 태그를 포함하는 융합 단백질을 내지 이의 제조, 검출 및 정제 방법 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규 펩티드 태그는 짧은 길이를 가지면서도 종래의 c-myc 태그 및 FLAG 태그 등이 가지고 있는 비특이적 반응을 완전히 제거할 수 있는 장점을 가진다. 또한, 본 발명에 따른 신규 펩티드 태그 및 이에 대한 항체를 이용하는 경우 재조합 세포 내에서 발현된 융합 단백질을 매우 효율적으로 검출 또는 정제할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 신규 펩티드 태그 및 이에 대한 항체를 포함하는 에피토프 태깅 시스템은 특정 단백질의 세포 내 위치 확인, 기능성 규명, 검출, 정제 및 단백질 간의 상호작용 연구 등 다양한 분야에 적용이 가능하다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

김태림

경기도 용인시 기흥구 농서동 서천마을 휴먼시아
310동 1004호

서주원

경기도 용인시 처인구 포곡읍 마성리 616-1 에버힐
1단지 1호

양승환

경기도 용인시 기흥구 중동 어은목마을 한라비발디
4002-1904호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ009007
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대 바이오그린21 사업
연구과제명	생체 기능성 물질 선발 및 epitope tag 개발 연구
주관기관	명지대학교 산학협력단
연구기간	2012.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

펩티드 태그에 대한 항체 또는 상기 펩티드 태그에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 포함하는 융합 단백질의 검출용 또는 정제용 키트로서,

상기 펩티드 태그는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되고,

상기 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩티드 태그 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩티드 태그를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 펩티드 태그에 대한 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 수탁번호가 KCTC 12283BP인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 단일클론 항체의 중쇄 아이소타입이 IgG 2a인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 단일클론 항체의 경쇄 아이소타입이 κ (kappa)인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 하이브리도마 세포주는 수탁번호가 KCTC 12283BP인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 태그에 대한 항체의 검출 수단을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 펩티드 태그에 대한 항체의 검출 수단은 이차 항체인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 이차 항체는 효소, 방사성 물질 또는 형광물질에서 선택되는 표지 물질과 접합된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 10

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 태그에 대한 항체는 지지체에 고정된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 11

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질에 포함된 펩티드 태그는 목적 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 12

삭제

명세서**기술분야**

[0001] 본 발명은 목적 단백질의 검출 또는 정제 등을 위한 에피토프 태깅 시스템에 이용 가능한 신규 펩티드 태그, 이에 대한 항체 및 이들의 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 데이노코커스 라디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)으로 유래된 펩티드 태그 및 상기 펩티드 태그들을 특이적으로 인식할 수 있는 항체 내지 이를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 내지 이를 포함하는 벡터 또는 형질전환체, 상기 펩티드 태그를 포함하는 융합 단백질 및 상기 융합 단백질을 제조, 검출 또는 정제하기 위한 방법 내지 키트 등에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유용한 단백질 또는 폴리펩티드는 합성에 의해 생성되거나 천연 공급원으로부터 분리될 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 비용, 시간 면에서 비경제적이고, 생산량이 제한적이라는 단점이 있다. 따라서, 목적 단백질 또는 목적 폴리펩티드를 과다발현하도록 재조합에 의해 제작된 형질전환체의 배양을 통해 목적 단백질 및 목적 폴리펩티드를 생산하는 것이 바람직하다. 그러나, 그러나, 세포 환경에서 생산된 폴리펩티드(특히 짧은 폴리펩티드)는 세포에 존재하는 프로테아제의 작용으로 인한 분해(degradation)에 민감할 수 있고, 또한 모든 목적 단백질에 대한 항체가 존재하는 것은 아니어서 대응되는 항체가 존재하지 않는 목적 단백질을 정제하는 것이 용이하지 않을 수 있다.

[0003] 이러한 문제점을 극복하기 위하여 단백질 태깅 또는 에피토프 태깅이 사용되어왔다. 단백질 태깅(protein tagging) 또는 에피토프 태깅(epitope tagging)은 에피토프 태그의 코딩 서열을 목적 단백질의 코딩 서열에 연결한 재조합 핵산 분자를 제작하고, 이를 적당한 숙주 세포 안에서 발현시킨 후 에피토프 태그에 대한 항체를 이용하여 목적 단백질을 검출, 정량화, 정제하거나 목적 단백질의 세포 내 위치 파악, 기능성 규명 등에 사용하는 재조합 DNA 방법이다. 상업적으로 수많은 에피토프 태그와 이에 대한 리간드인 항체가 존재하며, 항체 적절한 에피토프 태그와 이에 대한 항체를 선택하는 경우 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis), 면역침강(immunoprecipitation), 면역형광(immunofluorescence), 면역세포화학(immunocytochemistry), 면역친화성 정제(immunoaffinity purification) 방법 등으로 목적 단백질을 검출 또는 정제할 수 있기 때문에 목적 단백질에 대한 항체 생성의 필요성을 제거할 수 있다.

[0004] 현재 단백질 태깅(protein tagging) 또는 에피토프 태깅(epitope tagging)에 사용되는 에피토프 태그로는 6개 아미노산 잔기 정도의 짧은 펩티드 내그(예, 6×His 태그) 내지 40kDa 예, MBP) 정도의 큰 단백질에 이르는 많은 독특한 태그가 이용가능하며(Stevens, R.C., (2000) Structure Fold Des 8:R177-85 참조) 통상적으로 3 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 태그가 사용된다. His-태깅된 단백질은 Ni-NTA (니켈-니트릴로트리아세트산) 수지상에 특이적으로 트랩핑되며, 이는 EDTA 또는 이미다졸에 의해 용출될 수 있다. 그 외, 말토오스-결합 단백질(MBP, 396개 아미노산, 40 kDa), 스타필로코커스 단백질 A, 칼모둘린-결합 펩티드(CBP, 26개 아미노산, 2.96 kDa), GFP(238개 아미노산, 27 kDa) 및 글루타티온-S-트랜스퍼라아제 (GST, 211개 아미노산, 26 kDa)

a)가 또한 원핵생물 및 진핵생물 단백질 모두에 사용될 수 있다. 또한, 일반적으로 가장 자주 사용되는 에피토프 태그로는 c-myc 태그, HA 태그, FLAG 태그 등을 들 수 있다. c-myc 태그는 사람 c-myc 단백질로부터 유래된 10개의 아미노산 길이의 에피토프 태그이고 (Evans et al., (1985) Mol. Cell. Biol., 12 : 3610-3616), HA 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌(influenza hemagglutinin) HA-1 단백질로부터 유래된 9개의 아미노산 길이의 에피토프 태그이다(Field et al., (1988) Mol. Cell. Biol., 8 : 2159-2165). FLAG 태그는 박테리오파아지 T7로부터 유래된 8개의 아미노산 길이의 에피토프 태그이다(Hopp et al., (1988) Bio/Technology, 6 : 1204-1210).

[0005] 한편, 에피토프 태깅시 사용되는 에피토프 태그는 목적 단백질과 융합되었을 때 목적 단백질의 3차원적 구조와 생물학적 활성에 최소한의 영향을 주는 것이 바람직한데, 일반적으로 길이가 긴 에피토프 태그(예를 들어 GST 태그 또는 MBP 태그)는 목적 단백질의 기능을 변경시키는 등의 문제점을 가진다. 반면, 상대적으로 길이가 짧은 에피토프 태그들, 예를 들어 FLAG 태그, c-myc 태그 등은 그와 융합된 목적 단백질의 특성에 거의 영향을 미치지 않고 그에 대한 항체와 매우 특이적으로 결합이 가능하며, 어떤 경우에는 융합 단백질에서 제거될 필요가 없기 때문에 현재 주로 사용되고 있다. 그러나, c-myc 태그와 FLAG 태그의 아미노산 서열은 현재까지 알려진 생물체 세포 내의 단백질 중 다수의 단백질에 동일한 서열이 포함되어 있어서 태그를 인지하는 항체의 비특이적 반응을 유도하고, 이러한 비특이적 항체 반응은 특정 목적 단백질의 분리 및 확인에 방해가 되어 실험의 신뢰성을 떨어뜨리는 문제가 있다(Ksenija Gasic et al., (2005) Plant molecular biology reporter 23:9-16). 이러한 비특이적 반응 문제를 극복하기 위해, 단백질의 N-말단에 연속적으로 2개의 상이한 태그 융합하여 사용하는 친화 정제 시스템이 개발된 바 있다 (Rigaut, G., et al. (1999) Nat Biotechnol 17:1030-2).

[0006] 따라서, 종래의 에피토프 태그 및 이에 대한 항체를 이용한 에피토프 태깅 시스템에서 문제가 되는 비특이적인 반응을 제거하면서 동시에 짧은 아미노산 서열을 가진 신규 펩티드 태그 및 이와 짝을 이루어 재조합 숙주 세포 내에서 발현된 융합 단백질을 검출하고 정제하는 데에 사용할 수 있는 항체의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 목적은 목적 단백질의 검출 또는 정제 등에 유용한 신규 펩티드 태그 및 이의 용도 등을 제공하는 데에 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 신규 에피토프 태그를 특이적으로 인식하거나 신규 에피토프 태그에 선택적으로 결합할 수 있는 신규 항체 및 이의 용도 등을 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 발명자들은 목적 단백질의 검출 또는 정제에 유용한 펩티드 태그 및 이에 대한 항체를 개발하기 위해 연구를 진행하던 중, 종속영양 진정세균인 데이노코커스 라디오듀렌스(Deinococcus radiodurans)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP) 또는 이의 단편을 면역원으로 사용하여 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 얻고, 생산된 항체를 이용하여 데이노코커스 라디오듀렌스(Deinococcus radiodurans)의 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)을 대상으로 에피토프 맵핑(epitope mapping)을 수행하여 8개 내지 9개의 아미노산을 가진 펩티드 태그를 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명은 상기 목적을 해결하기 위하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩티드 태그 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩티드 태그에 대한 항체를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩티드 태그 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩티드 태그에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기의 펩티드 태그 또는 하이브리도마 세포주를 포함하는 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 신규 펩티드 태그는 짧은 길이를 가지면서도 종래의 c-myc 태그 및 FLAG 태그 등이 가지고 있는 비특이적 반응을 완전히 제거할 수 있는 장점을 가진다. 또한, 본 발명에 따른 신규 펩티드 태그 및 이에 대한 항체를 이용하는 경우 재조합 세포 내에서 발현된 융합 단백질을 매우 효율적으로 검출 또는 정제할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 신규 펩티드 태그 및 이에 대한 항체를 포함하는 에피토프 태깅 시스템은 특정

단백질의 세포 내 위치 확인, 기능성 규명, 검출, 정제 및 단백질 간의 상호작용 연구 등 다양한 분야에 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 His 태그 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 DrBphP 및 DrBphN을 정제한 결과를 나타내는 그림이다. 도 1의 (A)는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질 및 BphN 단백질을 발현시키는 데 사용한 유전자 작제물을 개략적으로 나타낸 모식도이다. FL, 전장 (1-755 아미노산, BphP); ΔPHY/HKD (1-321 아미노산, BphN); 도 1의 (B)는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 아포단백질 및 BphN 아포단백질을 Ni^{2+} -NTA 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하고 BV와 20분 동안 배양한 후, SDS-PAGE 수행하고, 아연(zinc)-유도 형광에 의한 BV 결합을 탐지한 결과(오른쪽) 및 Coomassie Blue로 염색한 결과(왼쪽)를 나타낸다. 1: BphP 조추출물, 2: 정제된 BphP, 3: BphN 조추출물, 4: 정제된 BphN. 정제 조건 - 결합 & 세척: pH 8.0, 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM 이미다졸/용출: pH 8.0, 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 150 mM 이미다졸

도 2는 정제된 BphP 및 BphN를 이용하여 선택된 단일클론 항체를 웨스턴 블롯 분석한 결과를 나타내는 그림이다. 정제된 BphP 및 BphN에 대해 SDS-PAGE를 수행하고 BphP의 정제된 단일 클론항체(2B8, 2C11, 3B2, 3D2, 3H7)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. P; BphP, N; BphN. 단일 클론항체 중 2B8 항체가 BphP 단백질의 N-말단에 존재하는 에피토프를 인식하는 것을 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

도 3은 N-말단 부위를 구성하는 PCD 구조가 DrBphP와 유사한 오토 피토크롬 단백질인 Oat PhyA가 BphP의 단일클론 항체 5가지와 반응하는지 여부를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 2B8 항체에 대한 1차 에피토프 맵핑의 결과를 웨스턴 블롯을 통해 나타낸 것이고, 도 5는 2B8 항체에 대한 2차 에피토프 맵핑의 결과를 웨스턴 블롯을 통해 나타낸 것이다. 도 4 및 도 5에서 "a-GST"는 anti-GST 항체를 나타낸다.

도 6은 BRT 태그를 GST 단백질의 N-말단에 붙인 융합 단백질이 대장균 상에서 정상적으로 발현되고 2B8 항체에 의해 융합 단백질의 검출이 가능함을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다. 도 5에서 "a-myc"는 anti-myc 항체를 나타내고, "a-GST"는 anti-GST 항체를 나타낸다.

도 7은 BRT 태그를 GFP의 N-말단에 붙인 융합 단백질이 식물 세포에서 정상적으로 발현되고 2B8 항체에 의해 융합 단백질의 검출이 가능함을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다. 도 7에서 "Myc"는 anti-myc 항체를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 일 측면은 목적 단백질의 정제 또는 검출 등을 위한 에피토프 태깅시 이용될 수 있는 신규 펩티드 태그에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규 펩티드 태그는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드로 이루어진다. 본 발명의 명세서에서 펩티드 태그는 단백질 태그 또는 에피토프 태그와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 발명에서 용어 "펩티드 태그"는 목적 단백질에 융합되어 태그로 사용될 수 있는 펩티드를 의미한다. 또한, 본 발명에서 용어 "에피토프"는 특정 항체에 의해 인식되는 항원결합부위나 B 세포나 T 세포와 반응하는 항원의 일정 부위를 의미한다. 본 발명에서 펩티드 태그는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경우 그 길이는 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 통상적으로 사용되는 에피토프 태그의 아미노산 잔기 수를 고려할 때 8 내지 30개의 아미노산 잔기를 가진 펩티드인 것이 바람직하며, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드인 것이 더 바람직하다. 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)으로부터 유래된 것이다. 구체적으로, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3번째 위치부터 11번째 위치에 해당하는 아미노산 잔기들로 이루어진 펩티드이다. 또한, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 광 수용 단백질인 박테리오피토크롬(Bacteriophytochrome, BphP)의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3번째 위치부터 11번째 위치에 해당하는 아미노산 잔기들에서 8번째 위치 또는 9번째 위치에 해당하는 아미노산 잔기인 페닐알라닌 하나가 결실된 아미노산 잔기들로 이루어진 펩티드이다.

- [0016] 본 발명에 따른 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 태그 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 태그는 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 박테리오피토크롬을 면역원으로 하여 통상의 방법으로 하이브리도마 세포주를 선별하고, 상기 하이브리도마 세포주로부터 정제된 항체를 얻은 후, 상기 항체를 이용하여 에피토프 맵핑(epitope mapping)을 수행함으로써 결정하였다. 이하, 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 박테리오피토크롬을 "DrBphP"로 표시한다. 데이노코커스 라디오듀런스는 극저온, 건조, 저산소, 강산 환경에서도 성장할 수 있는 극한 미생물의 일종이다. 피토크롬은 외부의 빛 신호를 흡수하여 하부에 신호를 전달할 수 있는 광 수용 단백질로서, 기존의 이론에서는 고등식물에만 존재한다고 알려져 있었으나 최근 시아노박테리아, 프로테오박테리아, 악티노박테리아, 균류(fungi) 등에서 여러 가지 피토크롬 유사 광 수용체들이 발견되었다. 특히, 그 중 데이노코커스 라디오듀런스와 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등에서 발견된 피토크롬 유사 광 수용체들은 BphP이라 명명되었으며, 이들 중 DrBphP는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 755개의 아미노산으로 구성되어 있다[Davis SJ, et al., (1999) *Science* 286, 2517-2520]. BphP는 식물 피토크롬과 유사한 N-말단 부위 구조로 구성되어 있으나 C-말단 부위에는 식물 피토크롬과는 다른 히스티딘 키나제 도메인 (HKD)이 존재하고 있다[Karniol R, et al., (2005) *Photosynth Res* 392, 103-116; Giraud E et al., (2008) *Photosynth Res* 97, 141-153]. 그리고 DrBphP는 빌리베르딘(BV)과의 결합시 다른 요소의 도움이 없이 결합하여 가역적인 Pr/Pfr 이소폼을 형성한다[Vierstra RD et al., (2000) *Semin Cell Dev Biol* 11, 511-521; Bhoo SH, et al., (2001) *Nature* 414, 776-779; Rockwell NC, et al., (2006) *Annu Rev Plant Biol* 57, 837-858].
- [0017] 이하, 본 발명에 따른 신규 펩티드 태그를 결정하기 위한 에피토프 맵핑의 단계를 구체적으로 설명한다. 먼저, 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 전체 길이에 해당하는 유전자(서열번호 4)와 DrBphP의 N-말단을 기준으로 1~321 위치의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드(이하, BphN이라 함)에 해당하는 유전자(서열번호 5)를 작제하고(도 1의 (A) 참조), 이를 pET28a(+) 벡터에 삽입한 후, BL21 컴피턴트 세포를 이용하여 발현시켰다. 그 후 pET28a(+) 벡터에 포함된 His 태그를 이용하여 Ni²⁺-NTA 친화성 크로마토그래피(QIAGEN)로 단백질 정제를 수행하였다. 상기 발현된 BphP 단백질(서열번호 3)과 BphN 단백질(서열번호 6)에는 BV의 결합에 중요한 역할을 하는 PAS와 GAF 도메인 및 Cys-24 잔기가 모두 포함되어 있기 때문에 그 자체로만으로 BV와의 결합이 가능하다. 따라서, BphP, BphN 단백질의 발현 및 정제를 확인하기 위하여, 정제된 BphP 단백질과 BphN 단백질에 BV를 첨가하고 10분간 상온에서 항온처리시킨 후 SDS-PAGE를 수행하였고 그 후 coomassie 염색과 zinc 블롯을 실시한 결과, BphP 단백질 및 BphN 단백질의 발현 및 정제를 확인할 수 있었다(도 1의 (B) 참조). 다음으로, BphP에 대한 단일클론 항체를 제작하기 위하여, 생후 6주된 암컷 BALB/c 마우스의 복강에 항원으로 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질 또는 BphN 단백질을 Complete Freund's 어주번트와 혼합하여 복강 내 주사를 실시한 후 마우스를 희생시켜 B 림프구를 얻었다. 이후 B 림프구와 골수종 세포를 혼합하고 세포융합시켜 배양하였다. 그 후 HAT배지와 HT배지를 갈아주며 ELISA에 의해 융합세포의 항체 생성을 확인하고 총 24개의 하이브리도마 세포주 후보 클론을 선별하였다. 총 24개의 후보 하이브리도마 세포주 클론에 대하여 항원으로 주사하였던 BphP 단백질과 BphN 단백질로 Fusion plate ELISA 테스트를 실시하여 그 결합 정도를 확인하였다(표 3). 그 결과, 2B8 클론과 2C11 클론은 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질과 BphN 단백질에서 모두 높은 수치로 발색되는 것으로 보아 BphP 단백질의 N-말단 부위를 인식하는 것으로 추정되었다. 하지만 3B2 클론 및 3D2 클론은 BphP 단백질에서는 높은 수치를 보이고, BphN 단백질에서는 0에 가까운 수치를 나타내는 것으로 보아 BphP 단백질의 C-말단 부위를 인식하는 것으로 추정되었다. 이들과는 다르게 3H7 클론의 경우에는 BphP단백질에서 높은 수치를 보이고 BphN 단백질에서도 어느 정도의 낮은 수치를 나타내는 것으로 보아 BphP 단백질 C-말단 쪽 외에 N-말단 부위도 어느 정도 인식하는 것으로 추정되었다. 그 후 상기 5개의 하이브리도마 세포주 클론에 대하여 1차 cloning plate ELISA 테스트, 2차 cloning plate ELISA 테스트를 실시하였고 최종적으로 ascites를 생성하여 항체의 정제를 진행하였다. 그 결과 5개의 단일 클론항체인 2B8 항체, 2C11 항체, 3B2 항체, 3D2 항체 및 3H7 항체를 확보하였다. 다음으로 정제가 된 항체들이 기발현 및 정제한 BphP 단백질과 BphN 단백질에 대해서도 같은 결과를 나타내는지 확인해보기 위하여 Western blot을 실시하였다. 정제된 BphP 단백질과 BphN 단백질 5 μ g에 대해 각각의 단일클론 항체들을 1차 항체로서 2% 스킵밀크에 대해 1:1000의 비율로 사용한 후 2차 항체로서 HRP-마우스 항체(SIGMA)를 1:10000 비율로 처리하여 웨스턴 블롯을 실시하였다. 그 결과, 2B8 항체와 2C11 항체는 하이브리도마 세포주 클론에 대한 ELISA 테스트와 마찬가지로 BphP 단백질과 BphN 단백질에 모두 결합하는 결과가 나왔다(도 2). 따라서 상기 2가지 항체는 모두 BphP의 N-말단 부위에 결합하는 것이라고 생각할 수 있었다. 그리고 3B2 항체 및 3D2 항체는 BphP 단백질에 대해서는 밴드가 나왔으나 BphN 단백질에 대해서는 밴드가 나오지 않는 것으로 보아 BphP 단백질의 C-말단 부위에 결합할 것이라는 결과를 얻을 수 있었다. 하지만 3H7 항체의 경우에는 ELISA

테스트에서의 결과와는 다르게 오로지 BphP 단백질만을 인식하는 결과가 나왔다. 또한 각각의 항체들의 결합 정도는 N-말단 부위에 결합하는 2B8 항체 및 2C11 항체가 가장 강하게 결합하였으며 C-말단 부위를 인식한다고 생각되는 3D2 항체는 그보다도 약하게 인식하는 밴드를 보였다. 그 다음으로 3H7 항체 및 3B2 항체 순으로 강하게 결합하는 밴드가 나왔다. 한편, DrBphP는 식물 피토크롬과 유사한 구조를 가지고 있는데, 특히 N-말단 부위를 구성하는 PCD는 둘 다 모두 PAS, GAF, PHY 도메인을 포함하는 매우 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 상기 항체들이 오토(oat) 피토크롬 단백질과 반응하는지 여부를 확인해보았다. 하지만 상기 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질에 대한 단일 클론항체들 5가지 모두 오토 피토크롬 단백질(Oat PhyA)에는 결합하지 않는 결과를 보였다(도 3). 따라서 상기 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질에 대한 단일 클론항체들은 기존의 Oat 피토크롬 단백질에 대한 항체들과는 다른 에피토프를 인식하는 BphP 특이적인 새로운 항체임을 확인할 수 있었고, 본 발명자는 상기 항체들이 인식하는 에피토프를 단리함으로써, 기존에 알려진 생물체의 어느 단백질에도 포함되어 있지 않은 특이적 펩티드 태그로 사용할 수 있음을 밝혀내었다. 구체적으로 상기 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질에 대한 단일 클론항체들 중 가장 강하게 결합한 2B8 항체의 에피토프를 확인하기 위하여 DrBphP 재조합 부분 펩티드(recombinant partial peptide)를 제작하고, 에피토프 맵핑을 실시하였다. 구체적으로 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3-12 위치의 아미노산 서열, 3-11 위치의 아미노산 서열(서열번호 1), 3-10 위치의 아미노산 서열, 4-12 위치의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 단편들을 각각 제작하고, 웨스턴 블롯을 통해 결합 가능 여부를 확인하였다. 그 결과, 2B8 항체는 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치에 해당하는 9개의 아미노산(서열번호 1)만 존재하면 이를 정확하게 인식하여 결합하는 것을 확인하였다. 이로부터 2B8 항체의 에피토프는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩티드임을 확인하였고, 이를 펩티드 태그로 사용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 하나의 아미노산 잔기가 결실된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 단편들을 각각 제작하고, 2B8 항체를 이용하여 에피토프 맵핑을 실시하였다. 그 결과, 2B8 항체의 또 다른 에피토프가 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩티드임을 확인하였다.

[0018] 또한, 본 발명의 펩티드 태그는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열 외에 다양한 기능을 확보하기 위해 공지된 다른 에피토프 태그와 결합된 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 펩티드 태그는 목적 단백질의 검출 능력, 정제 능력, 가용성 등을 향상시키기 위해 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열에 HA 태그, FLAG 태그, His 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein) 또는 MBP(maltose binding protein)가 결합된 이중 태그의 형태로 제공될 수 있다(미국공개특허공보 제20050221308호, 미국공개특허공보 제20060099710호, 미국등록특허공보 제6462254호 참조). 또한, 본 발명의 펩티드 태그는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열에 HA 태그, 6×His 태그, c-myc 태그 및 V5 태그 중에서 선택된 2개 이상의 태그가 결합된 삼중 태그 또는 다중 태그의 형태로 제공될 수 있다(미국공개특허공보 제20100184612호 참조). 또한, 본 발명의 펩티드 태그는 3×FLAG 태그와 같이 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열이 반복된 형태 또는 반복된 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 치환 결실된 형태로 제공될 수 있다(미국등록특허공보 제7135624호 참조).

[0019] 본 발명에 따른 펩티드 태그가 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경우에 이에 대응하는 항체의 이용이 가능하다. 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 태그에 대한 항체로는 전술한 2B8 항체가 있다. 한편, 본 발명에 따른 펩티드 태그에는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 구성하는 일부 아미노산이 개별적으로 치환, 결실, 첨가 또는 변형되면서도 동시에 2B8 항체에 대한 결합 활성을 소정 수준, 예를 들어 본래 결합 활성을 기준으로 적어도 75% 이상으로 보유하는 변이체 등을 포함할 수 있다. 상기 아미노산의 치환은 바람직하게는 펩티드의 특성이 바뀌지 않는 보존적 아미노산 치환(conservative amino acid replacement)에 의해 이루어진다. 또한, 상기 아미노산의 변형은 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등에 의해 이루어질 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩티드 태그는 표지된 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩티드 태그는 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 항체에 대한 활성이 증가한 펩티드를 포함할 수 있다. 하기 표 1은 보존적 아미노산 치환에 의해 펩티드 내 아미노산을 대체할 수 있는 아미노산들을 보여준다.

표 1

[0020]

펩티드 내 아미노산 잔기	보존적 치환기
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Gln	Asn
Cys	Ser
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr, Gly
Thr	Ser, Val
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0021]

본 발명의 다른 측면은 전술한 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다. 본 발명에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 비변형(non-modified) 또는 변형된(modified) 모든 폴리리보뉴클레오티드(RNA) 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(DNA)를 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일- 또는 이중-가닥 DNA, 단일-및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 단일- 및 이중-가닥영역의 혼합물인 RNA, 단일- 또는 이중 가닥, 또는 단일- 및 이중 가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥의 RNA 또는 DNA로서 전술한 신규 펩티드 태그를 합성하는데 사용되는 프라이머를 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 핵산 분자 또는 올리고뉴클레오티드와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0022]

펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 비변역된 서열 (예를 들어, 인트론)을 포함할 수 있거나, 포함하지 않을 수 있다 (예를 들어, cDNA). 펩티드가 코딩되는 정보는 코돈을 사용하여 구체화된다. 전형적으로, 아미노산 서열은 유니버설 유전자 코드를 사용하여 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다. "코돈"은 폴리펩티드 사슬에서 아미노산 서열을 결정하는 뉴클레오티드의 트리플렛(triplet)을 나타낸다. 대부분의 유기체는 단백질 또는 단백질 전구체인 이들의 폴리펩티드를 제조하는데 20 또는 21개 아미노산을 이용한다. DNA에는 4개의 가능한 뉴클레오티드인 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C) 및 티민 (T)이 존재하기 때문에, 20개 아미노산과 말단 시그널을 코딩할 수 있는 64개의 가능한 트리플렛이 존재한다. 이러한 중복성으로 인해, 대부분의 아미노산은 1개 이상의 트리플렛에 의해 코딩된다. 이에 따라, 코딩되는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 영향을 주지 않으면서 뉴클레오티드 서열의 변화를 허용할 수 있고, 이를 "코돈 축퇴성(codon degeneracy)"에 의한 "침묵 변이"라 한다. 본 발명의 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 모든 침묵 변이는 본 발명의 범위 내에 있다. 한편, 단일 아미노산을 구체화하는 코돈은 동일한 빈도로 사용될 수 없고, 각 유기체는 종종 동일한 주어진 아미노산을 코딩하는 수개의 코돈 중 하나에 대해 특정한 "선호(codon-bias)"를 나타낸다. 코딩 영역이 희귀 코돈 또는 희귀 코돈의 클러스터 (cluster)를 다수 함유하는 경우, 유전자의 재합성 또는 돌연변이 유발을 이용하여 희귀 코돈을 제거함으로써 발현 수준을 증가시킬 수 있다. [J. Sambrook and D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), at 15.12 참조]. 따라서, "코돈 선택"은 선택된 숙주에서 발현을 최적화시키는데 이용될 수 있다. 가장 바람직한 코돈은 고도로 발현되는 유전자에서 주로 발견된 코돈이다. E.coli에서 "코돈 선호"는 Konigsberg, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 80:687-91 (1983)을 참조할 수 있다.

[0023]

뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에서 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌 (Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체

상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.

[0024] 따라서, 본 발명의 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 다양한 염기 서열로 구성될 수 있으며, 예를 들어 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 7의 염기 서열로 구성될 수 있고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 8의 염기 서열로 구성될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 재조합 벡터는 서열번호 7의 염기 서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 서열번호 8의 염기 서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 공지의 표준 방법을 사용하여 클로닝 벡터나 발현 벡터 내로 삽입한 형태로 제공될 수 있다. 되어 재조합 벡터의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에서 용어, "벡터"는 숙주 세포로 염기의 클로닝 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말한다. 벡터는 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있다. "복제단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 말한다. 용어 "벡터"는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기를 도입하기 위한 바이러스 및 비 바이러스 매개물을 포함한다. 용어 "벡터"는 또한 미니구형 DNA를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 벡터는 박테리아 DNA 서열을 갖지 않는 플라스미드일 수 있다. CpG 영역에서 풍부한 박테리아 DNA 서열의 제거는 전이유전자 발현 사일런싱을 감소시키고 플라스미드 DNA 벡터로부터 보다 지속적인 발현을 가져오기 위해 행해지고 있다. 용어 "벡터"는 또한 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty)같은 트랜스포존(Izsvak et al. J. Mol. Biol. 302:93-102 (2000)), 또는 인공 염색체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어 "클로닝 벡터"는 숙주 세포 내로 DNA 단편을 운반하고 이를 재생산할 수 있는 물질로 정의된다. 본 발명에서 클로닝 벡터는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal), 전사 종결 서열(transcription termination sequence) 및 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)는 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)를 포함한다. 또한, 클로닝 벡터는 프로모터를 더 포함할 수 있다. 일 예로, 본 발명에서 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있고, 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)가 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있다. 또한, 본 발명에서 용어 "발현 벡터"는 적절한 숙주 안에서 클로닝된 DNA의 전사와 번역을 위해 필요한 DNA 서열로 정의된다. 또한, 본 발명에서 용어 "발현 벡터"는 개체의 세포 내에 존재하는 경우 삽입물이 발현되도록 삽입물에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 표준적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 상기 발현 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고, 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다. 발현 벡터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 원하는 단백질을 코딩하는 유전자, 및 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 그 외에 시그널 펩티드를 코딩하는 DNA, 추가적 발현 조절 서열, 원하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 선택마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. "프로모터"는 전사를 지시하기에 충분한 최소 서열을 의미한다. 또한, 세포 유형 특이적 또는 외부의 신호 또는 제제에 의해 유도되는 조절 가능한 프로모터 의존적 유전자를 발현하도록 하는 데 충분한 프로모터 구성이 포함될 수 있으며, 이러한 구성들은 유전자의 5' 또는 3' 부분에 위치할 수 있다. 보존적 프로모터 및 유도적 프로모터 둘 다 포함된다. 프로모터 서열은 원핵생물, 진핵생물 또는 바이러스로부터 유래될 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 단일 폴리뉴클레오타이드 상의 폴리뉴클레오타이드 서열 연관성으로 하나의 기능이 다른 것에 의해 조절된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 발현을 제어할 수 있는 경우(즉, 코딩 서열이 프로모터의 전사 조절하에 있는 경우) 프로모터는 코딩 서열과 연결되어 작동되거나, 리보솜 결합 자리가 번역을 촉진시킬 수 있도록 위치하고 있다면, 리보솜 결합 자리는 코딩 서열에 연결되어 작동되는 것이다. 코딩 서열은 센스 방향 또는 안티센스 방향에서 조절 서열에 연결되어 작동될 수 있다. 본 발명에 따른 발현 벡터는 바람직한 일 예로 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드로서 서열번호 7의 염기 서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 서열번호 8의 염기 서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드 및 목적 단백질을 코딩하는 목적 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 측면은 전술한 신규 펩티드 태그를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명에서 용어 "융합 단백질"은 기능이 다른 2 개 이상의 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질이 서로 연결된 형태의 중합체를 의미한다. 본 발명에서 융합 단백질은 융합 폴리펩티드, 융합 올리고펩티드, 재조합 폴리펩티드, 재조합 올리고펩티드 또는 재조합 단백질과 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질의 제 1 부분은 전술한 신규 펩티드 태그를 적어도 하나 포함하고, 융합 단백질의 제2 부분은 목적 단백질을 적어도 하나 포함한다. 본 발명에서 목적 단백질은 목적 펩티드, 목적 올리고펩티드 또는 목적 폴리펩티드와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 신규 펩티드 태그가 목적 단백질의 코돈 영역에 연결된 융합 단백질은 신규 펩티드 태그에 대한 항체를 이용하여 효율적으로 검출 또는 정제될 수 있다. 본 발명에 따른 펩티드 태그는 목적 단백질의 C-말단뿐만 아니라, N-말단 또는 단백질의 기능성에 실질적인 영향을 미치지 않는 한 단백질 내부의 어느 곳이라도 삽입될 수 있다. 여기에서 단백질의 기능성에 실질적인 영향을 미치지 않는다는 것은 상기 펩티드 태그를 융합시키기 전에 단백질이 갖는 활성을 80% 이상, 바람직하게는 95% 이상 유지한다는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 목적 단백질로는 임의의 단백질이 사용될 수 있으며, 예를 들어 암 관련 항원인 TAG-72에 대한 인간화항체 AKA/Hzk의 단쇄 FV(ScFv), 트롬보포이에틴(TPO), B-림프구 자극인자(B-lymphocyte stimulator) 등을 예시할 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질은 2 이상의 펩티드 조합, 예를 들어 펩티드 태그 및 목적 단백질의 조합을 포함하며, 상기 2 이상의 펩티드는 공유결합 또는 비공유결합으로 연결될 수 있다. 이때, 상기 펩티드 태그 및 목적 단백질은 어떠한 매개자 없이 서로 직접적으로 연결될 수도 있고, 펩티드 링커와 같은 매개자에 의해 간접적으로 연결될 수도 있다. 바람직한 일 예로, 융합 단백질은 적어도 하나의 절단가능한 펩티드 링커를 포함하여 이후에 절단가능한 링커를 화학적으로 및/또는 효소에 의해 절단하여 목적 단백질이 융합 단백질로부터 회수될 수 있도록 설계될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 융합 단백질은 바람직하게는 하나 이상의 태그, 절단가능한 펩티드 링커 및 목적 단백질을 포함하도록 설계될 수 있다. 링커는 일반적으로 단백질들을 연합시키거나 이들 단백질간의 최소 간격 또는 기타 공간적 관계를 유지시키는 것 이외에는 특이적인 생물학적 활성을 갖지 않지만, 펩티드 링커의 구성 아미노산은 분자의 특성 예컨대, 폴딩, 순전하, 또는 소수성에 일부 영향을 끼치도록 선택될 수 있다. 펩티드 링커는 선택적으로, 융합된 구성 폴리펩티드의 분리를 위한 부위, 예를 들어 프로테아제에 의한 절단될 수 있는 부위를 포함할 수 있다. 절단 가능한 펩티드 링커는 길이가 1개 내지 약 50개의 아미노산, 바람직하게는 1개 내지 약 20개의 아미노산일 수 있다. 효소에 의해 절단가능한 펩티드 링커의 예로서 카스파아제-3 절단 서열을 포함할 수 있고, 산에 의해 절단가능한 아스파르트산-프로린 다이펩티드 (D-P) 모이어티를 포함할 수 있다. 절단가능한 펩티드 링커는 당업계에서 잘 알려진 많은 기술들을 사용하여 융합 단백질 중에 혼입시킬 수 있다. 또한, 잘 구부러지는(flexible) 펩티드 링커를 사용할 수 있고, GGSGGT 아미노산 서열, GGGGS 아미노산 서열, GGGGSGGGGS 아미노산 서열을 가지는 펩티드 링커를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 펩티드 링커는 상기 펩티드 링커를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 융합 단백질의 각 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드들 사이에 인프레임(in frame)으로 작동 가능하게 연결하고, 발현 벡터를 통해 발현시킬 수 있다.

[0027] 본 발명에서 펩티드(펩티드 태그, 절단가능한 펩티드 링커, 목적 펩티드, 및/또는 융합 펩티드)를 제조하기 위한 수단은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, [Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984]; [Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York, 1984]; 및 [Pennington et al., Peptide Synthesis Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 1994] 참조). 본 명세서에 기재된 융합 펩티드의 다양한 구성요소들(태그 펩티드, 목적 펩티드, 및 절단가능한 링커 등/절단 서열)은 공지된 화학적 합성법으로 제조될 수 있으나(예를 들어, 문헌[Hermanson, Greg T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, New York (1996)] 참조), 화학적 합성은 흔히 비용 및/또는 불순물 때문에 길이가 약 50개의 아미노산 미만인 펩티드로 제한된다. 본 명세서에 기재된 펩티드는 바람직하게는 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기술을 사용하여 제조될 수 있다.[Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)]; 및 문헌 [Silhavy, T. J., et al., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Press Spring Harbor, NY (1984)]; 및 문헌[Ausubel, F. M. et. al., Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed. Current Protocols and John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 2002]

[0028] 본 발명의 다른 측면은 전술한 발현 벡터를 포함하는 형질전환체에 관한 것이다. 본 발명에서 용어, "형질전환체"는 하나 이상의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 갖는 발현 벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전

환된 세포를 의미한다. 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하기 위한 방법으로는 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리방법, 유전자 총(gene gun) 등을 이용하는 방법 등이 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 상기 발현 벡터가 발현되는 형질전환체를 영양 배지에서 배양하면 융합 단백질을 대량으로 제조할 수 있고, 분리도 가능하다. 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적절히 선택하여 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절하여야 한다. 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 숙주 세포로는 원핵 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 세포 등 당업계에서 공지된 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 예를 들어, 숙주 세포로 에شري키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스와 같은 주지의 원핵 숙주들이 사용될 수 있고, 바람직하게는 대장균이 사용될 수 있다. 숙주 세포에 의한 단백질의 발현은 유도 인자인 IPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside)를 사용하여 발현을 유도할 수 있고, 유도시간은 단백질의 양을 최대화되게 조절할 수 있다. 본 발명에서 재조합적으로 생산된 단백질은 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있다. 막 결합형인 경우, 적합한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하거나 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터 유리될 수 있다. 단백질 발현에 사용된 세포는 동결-해동 반복, 음파처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리 또는 정제가 가능하다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990). 예를 들어 숙주 세포에 의해 발현된 단백질의 분리 또는 정제 방법으로는 전기영동, 원심분리, 겔여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 면역흡착 친화력 크로마토그래피, 역상 HPLC, 겔 침투 HPLC), 등전성 포커스 및 이의 다양한 변화 또는 복합 방법을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 한편, 본 발명에 따른 펩티드 태그를 포함하는 융합 단백질은 상기 펩티드 태그에 대한 항체를 이용한 면역흡착 친화력 크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제될 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 측면은 전술한 신규 펩티드 태그에 대한 항체 및 이를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩티드 태그 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩티드 태그를 특이적으로 인식하거나 이에 특이적으로 또는 선택적으로 결합할 수 있는 항체이다. 본 발명에서 용어 "항체"는 면역계 내에서 특정한 항원의 자극에 의하여 생성되는 물질을 의미하는데, 상기 특정한 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체반응을 일으킬 수 있고, 면역계에서 생성되는 천연 형태뿐만 아니라, 상기 천연 형태와 동등한 활성을 가지는 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 상기 천연 형태의 항체는 일반적으로 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드 결합으로 연결되어 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위를 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv단편을 생성하는 재조합 기술은 국제공개 특허 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩티드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수 분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 항체는 본 발명의 펩티드 태그와 특이적으로 결합할 수 있는 항체일 수 있고, 바람직하게는 Fab 형태이거나 전체 항체 형태일 수 있고, 더 바람직하게는 단일클론 항체 형태일 수 있다. 또한, 본 발명은 전술한 신규 펩티드 태그에 대한 단일클론 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포주를 제공한다. 상기 하이브리도마 세포주는 2012년 9월 24일자로 한국생명공학연구원 생명자원센터(KCTC)에 기탁되었으며, 수탁번호는 KCTC 12283BP이다.

[0030] 본 발명의 펩티드 태그에 대해 특이적 결합성을 가지는 단일클론 항체는 상기 펩티드 태그 또는 이를 포함하는 폴리펩티드를 면역원으로 이용하여 제조할 수 있다. 보다 상세하게는, 우선 면역원으로서 상기 펩티드 태그를 인간을 제외한 포유동물의 피하, 근육, 정맥, 또는 복강 내에 1회 내지 그 이상 주사하여 면역 감작을 시킨다. 이때, 펩티드 태그는 필요에 따라서 후로인트 아주반트(Freund adjutant)와 혼합된 형태로 사용된다. 상기 인간을 제외한 포유동물은 바람직하게는, 마우스, 래트, 햄스터, 물모트, 토끼, 고양이, 개, 돼지, 염소, 양, 당나귀, 말 또는 소(인간 항체를 생산하는 형질 전환(transgenic) 마우스와 같은 다른 동물 유래의 항체를 생산하도록 조작된 형질 전환(transgenic) 동물을 포함한다)이며, 보다 바람직하게는, 마우스, 래트, 햄스터, 물모트 또는 토끼이다. 첫 번째 면역으로부터 약 1~21일 마다 1~4회 면역을 실시하여, 최종 면역으로부터 약 1~10일 후에 면역 감작된 포유동물로부터 항체를 생산하는 세포를 수득할 수 있다. 면역을 시키는 회수 및 시간적 간격은 사용하는 면역원의 특징 등에 의하여 적당히 변경할 수 있다. 단일클론 항체를 분비하는 하이브리도마(hybridoma)의 제조는 케이라 및 미르슈타인 등의 방법(Nature, 1975, Vol. 256, p. 495-497) 및 이에 준하는 방법에 따라 실시할 수 있다. 상기와 같이 면역 감작된 인간을 제외한 동물로부터 채취한 비장, 림프절, 골수 또는 편도로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나, 바람직하게는 비장에 포함되는 항체 생산하는 세포와 자가 항체 생산 능력이 없는 포유동물 유래의 골수종 세포(myeloma cells)를 세포 융합시키는 것에 의해 하이브리도마 세포(hybridoma cell)를 제조할 수 있다. 상기 세포 융합에 이용되는 골수종 세포(myeloma cells)로서는 마우스 유래 골수종 P3/X63-Ag8. 653(653), P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1), P3/X63-Ag8. U1(P3U1), SP2/0-Ag14(Sp2/0, Sp2), PAI, F0 또는 BW5147; 래트 유래 골수종 210 RCY3-Ag. 2.3; 또는 인간 유래 골수종 U-266 AR1, GM1500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11 또는 CEM-T15를 사용할 수 있다. 세포 융합은, 예를 들면, 폴리에틸렌글리콜이나 센다이 바이러스를 비롯한 융합 촉진제나 전기 필스에 의한 방법이 이용되고, 일례를 들면, 융합 촉진제를 함유하는 융합 배지에 항체 생산 세포와 무한 증식 가능한 포유류 유래의 세포를 약 1:1 내지 1:10의 비율로 부유시켜, 이 상태로, 약 30 내지 40℃로 약 1 내지 5분간 배양한다. 융합 배지에는, 예를 들면, MEM 배지, RPMI1640 배지 및 이스코브 변형 둘베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)를 비롯한 통상의 일반적인 것을 이용하면 좋고, 소 혈청 등의 혈청류는 제외해 두는 것이 바람직하다. 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포 클론을 스크리닝하는 방법은 획득한 융합 세포를 HAT 배지 등의 선택용 배지에 옮기고, 약 30 내지 40℃로 약 3일 내지 3주일 배양해서 하이브리도마 세포 이외의 세포를 사멸시킨다. 이어서, 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate) 등에서 하이브리도마 세포를 배양한 후, 위에서 기술한 인간을 제외한 동물의 면역반응에 사용한 면역원과 배양 상청액과의 반응성을 RIA (radioactive substance-marked immuno antibody) 또는 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 같은 면역분석 방법을 통하여 확인하고, 반응성이 증가한 하이브리도마 세포를 찾는다. 상기에서 찾은 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포 클론은 상기 면역원에 대하여 특이적인 결합력을 보여준다. 본 발명의 단일클론 항체는 하이브리도마 세포주를 생체 내외에서 배양함으로써 얻을 수 있다. 배양에는, 포유동물 유래의 세포를 배양하기 위한 통상의 방법이 이용되며, 배양물 등으로부터 단일클론 항체를 채취하기 위해서는, 항체 일반을 정제하기 위한 이 분야에서의 통상의 방법이 이용된다. 항체를 정제하기 위한 방법으로는 예를 들어, 염석(鹽析), 투석, 여과, 농축, 원심분리, 분별 침전, 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 어피니티 크로마토그래피, 고속액체 크로마토그래피, 겔 전기영동 및 등전점 전기영동 등을 들 수 있고, 이들은 필요에 따라서 조합해서 적용된다. 정제한 단일클론 항체는, 그 후, 농축, 건조하여, 용도에 따라서 액상 또는 고상으로 보관한다. 또한, 본 발명의 단일클론 항체는, 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 DNA를 각각, 중쇄 및 경쇄의 정상 영역을 코딩하는 기지의 DNA(예를 들면, 일본공개특허공보 제2007-252372호)와 각각 연결한 유전자를 PCR법 또는 화학 합성에 의해 합성하고, 합성한 유전자를 공지의 발현 벡터(예를 들어 pcDNA 3.1(Invitrogen사 판매) 등에 도입한 후 상기 발현 벡터를 이용하여 형질 전환체를 제조하고, 형질전환된 CHO 세포나 대장균 등의 숙주 세포를 배양하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 배양액으로부터, Protein A 칼럼 등을 이용해서 발현된 항체를 정제함으로써 얻을 수 있다.

[0031] 본 발명의 또 다른 측면은 전술한 신규 펩티드 태그, 상기 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 펩티드 태그에 대한 항체의 용도에 관한 것이다.

[0032] 예를 들어, 본 발명의 일 예는 전술한 융합 단백질의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 단백질의 제조방법은 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 형질 전환체를 배양하여 융합 단백질을 발현하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 재조합 벡터에 포함된 형태로 형질 전환체에 도입된다. 또한, 본 발명에 따른 융합 단백질의 제조방법은 발현된 융합 단백질을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 재조합 벡터는 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및

이에 연결된 목적 단백질을 코딩하는 목적 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 이때 상기 2개의 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 단백질 분해 효소 등에 의해 절단될 수 있는 부위를 포함하는 펩티드 링커의 코딩 서열에 의해 연결된다.

[0033] 또한, 본 발명의 일 예는 전술한 융합 단백질의 검출방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 단백질의 검출방법은 펩티드 태그 및 목적 단백질이 연결된 융합 단백질을 상기 펩티드 태그에 대한 항체에 접촉시켜 결합시키는 단계; 및 상기 항체에 결합된 융합 단백질의 존재를 확인하거나 양을 분석하는 단계를 포함한다. 이때, 본 발명의 일 예에 따른 융합 단백질의 검출방법은 구체적으로 웨스턴 블롯, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), 면역침강(immunoprecipitation), 면역형광(immunofluorescence), 면역세포화학(immunocytochemistry) 또는 단백질 마이크로 어레이 등을 이용할 수 있다. 이때 단백질 마이크로 어레이는 유리 또는 실리콘 기질 상에 본 발명의 펩티드 태그에 대한 특이 항체를 고정시킨 것으로 대규모 샘플의 분석에 사용될 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 일 예는 전술한 융합 단백질의 정제방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 단백질의 정제방법은 펩티드 태그 및 목적 단백질이 연결된 융합 단백질을 상기 펩티드 태그에 대한 항체에 접촉시켜 결합시키는 단계; 및 상기 항체에 결합된 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다. 이때, 항체는 지지체, 바람직하게는 고체 지지체에 고정되어 있다. 항체를 고정화하기 위한 지지체의 예로는 칼럼, 비드, 흡착제, 니트로셀룰로오스 페이퍼 등이 있으며, 공지된 다양한 고정화 방법을 통해 항체를 지지체에 고정화시킬 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질의 정제방법에 대한 구체적인 예는 태깅된 단백질을 포함하는 샘플을 항체가 고정된 지지체에 접촉(contact)시키는 것을 포함하고, 상기 태깅된 단백질은 펩티드 태그에 공유결합으로 연결된 단백질이고, 펩티드 태그는 항체에 대한 특이적 결합 활성을 가지며, 상기 접촉은 항체가 펩티드 태그에 결합하는 조건 하에서 이루어지고, 결합되지 않은 성분들은 제거하는 것 및 지지체로부터 태깅된 단백질을 분리하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 지지체 및 이에 고정된 항체는 면역 친화성 크로마토그래피의 매질로 사용되며, 상기 매질이 팩킹(pack)된 칼럼을 이용하여 면역 친화성 칼럼 크로마토그래피를 수행할 수 있다. 본 발명의 정제방법에 의해 고순도로 정제된 융합 단백질을 얻을 수 있고, 나아가 목적 단백질의 기능에는 전혀 영향을 미치지 않는다.

[0035] 또한, 본 발명의 일 예는 융합 단백질의 발현, 검출 또는 정제용 키트를 제공한다. 본 발명에 따른 융합 단백질의 발현, 검출 또는 정제용 키트는 전술한 신규 펩티드 태그, 상기 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 합성하기 위한 프라이머 쌍, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 폴리뉴클레오티드나 재조합 벡터로 형질 전환된 형질 전환체에서 선택되는 어느 하나를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 융합 단백질의 발현, 검출 또는 정제용 키트는 전술한 신규 펩티드 태그에 대한 항체 또는 상기 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주에서 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 융합 단백질의 발현용 키트는 바람직하게는 본 발명의 신규 펩티드 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 포함하고, 본 발명에 따른 융합 단백질의 검출 또는 정제용 키트는 바람직하게는 본 발명의 신규 펩티드에 대한 항체를 포함한다. 이때 키트를 구성하는 재조합 벡터는 사용자가 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제조할 수 있는 형태로 제공되는 것이 바람직하다. 상기 융합 단백질은 펩티드 태그와 목적 단백질이 연결된 폴리펩티드이다. 또한, 키트를 구성하는 항체는 적절한 지지체 상에 고정된 형태로 제공되는 것이 바람직하다. 또한, 융합 단백질 검출용 키트는 펩티드 태그에 대한 항체를 검출할 수 있는 수단을 더 포함하는 것이 바람직하다. 이때, 본 발명의 항체를 검출할 수 있는 수단은 바람직하게는 이차 항체이다. 또한, 상기 융합 단백질 검출용 키트를 구성하는 본 발명의 항체 또는 이차 항체는 바람직하게는 효소, 방사성 물질, 형광물질 등과 같은 표지 물질로 표지될 수 있고, 표지 방법은 접합(conjugation)인 것이 바람직하다. 또한, 융합 단백질 정제용 키트는 펩티드 태그의 분리를 위한 단백질 분해 효소를 더 포함할 수 있다. 아울러, 본 발명에 따른 키트는 설명서, 제한 효소, 리가제, 버퍼 용액 등을 더 포함할 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만 하기 실시예는 본 발명을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 보호범위를 제한하는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1: 데이노코커스 라디오듀란스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 유전자 및 BphN 유전자의 클로닝

[0038] 데이노코커스 라디오듀란스(Deinococcus radiodurans) 박테리오피토크롬 단백질(BphP) 전체 길이를 코딩하는

유전자(서열번호 4)와 DrBphP의 N-말단을 기준으로 1~321 위치의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드(BphN)를 코딩하는 유전자(서열번호 5)를 PCR을 이용하여 클로닝하였다. 구체적으로 데이노코커스 라디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*) 박테리오피토크롬 단백질(BphP) 전체 길이를 코딩하는 유전자(서열번호 4)를 주형으로 하고, BphP 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머 또는 BphN 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머 및 Ex-Taq(TAKARA) 중합효소를 이용하여 PCR을 30 사이클 전후로 수행하고, 증폭된 BphP DNA 산물과 BphN DNA 산물을 얻었다. 하기 표 2는 증폭된 BphP DNA 산물과 BphN DNA 산물을 얻기 위해 사용된 프라이머를 나타낸 것이다. 하기 표 2에 나타난 프라이머 및 후술하는 모든 프라이머는 Bioneer co.,KR에 의뢰하여 제작하였다.

표 2

[0039]

서열 번호	프라이머 종류	염기서열(5'→3')	프라이머에 포함된 제한 효소 인식 부위
9	BphP 클로닝용 forward primer	GCCATATGATGAGCCGGGACCCGTTGCC	Nde I
10	BphP 클로닝용 reverse primer	GCCTCGAGTCAGGCATCGGCGGCTCCCGG	Xho I
11	BphN 클로닝용 forward primer	GCCATATGATGAGCCGGGACCCGTTGCC	Nde I
12	BphN 클로닝용 reverse primer	GCCTCGAGCGCTTCCTTGACCTGAACTTG	Xho I

[0040]

증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel(QA-Agarose gel TM, Q-BIO, CAT#AGAH0250)에서 running하고, 자외선 조사기를 통하여 증폭시킨 DNA의 크기를 확인하였다. 그 후 DNA 증폭 산물에 해당하는 gel상의 band만을 오려내고 gel elution kit(FavorPrep GEL/PCR purification mini kit, FAVORGEN, CAT#FAGCK001-1)를 이용하여 원하는 DNA만을 분리한 후 Easy T-벡터(promega)에 결합하고, Bioneer co.,KR에 위탁하여 염기 서열을 측정하였다. 그 결과, PCR을 통해 생성된 DNA 산물이 원하는 목적 염기 서열인 BphP DNA와 BphN DNA를 가지는 것을 확인하였다.

[0041]

이후, 제한효소 Nde I과 Xho I을 이용하여 증폭된 BphP DNA 산물과 BphN DNA 산물을 각각 pET28a(+) 벡터(제조사 : Novagen)에 삽입하고, 대장균인 BL21 컴피턴트 세포(제조사 : RBC, Taipei, Taiwan)에 42℃에서 1분 동안 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환시키고, 이를 카나마이신이 포함된 LB 배지 상에서 배양하여 BphP 단백질과 BphN 단백질을 발현시켰다.

[0042]

실시예 2 : 데이노코커스 라디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질 및 BphN 단백질의 발현

[0043]

BL21 컴피턴트 세포에 형질전환되어 LB 배지 상에서 자란 콜로니(colony)들을 카나마이신이 포함된 LB 배지에 접종하고 37℃에서 약 8시간 이상 종배양(seed culture)하였다. 종배양한 세포를 카나마이신이 포함된 LB 배지에 접종하고 OD₆₀₀에서의 값이 0.6이 될 때까지의 농도로 키운 후 전체 농도가 0.5mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 25℃에서 6시간 동안 단백질 발현을 유도했다. 그 후 세포들을 원심분리하여 상층액을 버리고 펠렛을 바인딩 버퍼(100mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 및 10mM 이미다졸, pH 8.0)로 재현탁 시켰다. 다음으로 펠렛 재현탁을 소니케이션하여 세포를 깨뜨리고, 다시 원심분리하여 상층액을 따로 분리한 후 Ni²⁺-NTA 칼럼(QIAGEN)을 이용하여 단백질을 정제하였다. 그 이후 정제된 단백질을 -70℃에서 보관하였다.

[0044]

BphP 단백질과 BphN 단백질에는 BV의 결합에 중요한 역할을 하는 PAS와 GAF 도메인 및 Cys-24 잔기가 모두 포함되어 있기 때문에 그 자체로만으로 BV와의 결합이 가능하다. holo-BphP 단백질을 획득하기 위해 정제된 Apo-BphP 단백질과 Apo-BphN 단백질에 빌리버딘(BV, 2μg/ml, Frontier, Scientific, Carnforth, UK)을 첨가하고 10분간 실온에서 반응시켰다. 이후 반응 샘플들에 대해 SDS-PAGE를 실시한 다음 zinc acetate 용액(20mM zinc acetate, 150mM Tris-Cl, pH 7.0)에 20분간 반응시킨 후 UV 아래서 단백질의 형광 신호를 관찰하였다. 또한, 반응 샘플들에 대해 SDS-PAGE를 실시한 다음 coomassie 염색을 실시하였다. 도 1의 (B) 중 왼쪽은 coomassie 염색의 결과를 나타낸 것이고, 도 1의 (B) 중 오른쪽은 zinc 블롯의 결과를 나타낸 것이다. 도 1의 (B)에서 보이는 바와 같이 BphP 단백질 및 BphN 단백질의 발현 및 정제가 원활하게 이루어짐을 확인할 수 있었다.

- [0045] 실시예 3: 데이노코커스 라디오듀란스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질 및 BphN 단백질에 특이적으로 결합하는 단일 클론항체의 제조
- [0046] 3-1 : 면역처리
- [0047] 정제된 BphP 단백질 또는 BphN 단백질을 항원으로 하고, 여기에 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 생후 6주된 암컷 BALB/c 마우스의 복강 내에 주사하였다. Immersion은 vortexer로 1시간 혼합 후 같은 방법으로 Incomplete Freund's adjuvant와 항원을 혼합하여 복강 내에 주사하였다. 2주 후에 마우스의 꼬리로부터 채혈하여 ELISA 테스트 후 항체의 역가가 1/1000에서 1.0 이상이면 세포 융합에 사용하였다. 세포융합을 위한 2차 면역 처리로부터 4주째에 동량의 항원을 PBS에 희석하여 복강 내에 주사하였다. 3일 후에 마우스를 희생시켜 세포 융합시켰다.
- [0048] 3-2 : 단일 클론항체 생산을 위한 세포융합
- [0049] B 림프구 세포원으로서, 복부 절개 후 지방이나 다른 장기가 최대한 분리되도록하며 과다출혈되지 않도록 비장을 무균적으로 적출하여 세포 strainer로 균질화한 후 기본 배지로 희석하고 원심분리를 2회 반복하여 세척하였다. B 림프구와 골수종 세포를 적정비율로 혼합하고 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 남은 세포 혼합물을 가볍게 흔들어 주고, 미리 데워놓은 RBC lysis 완충용액 10ml를 넣고 현탁시킨 후 20분간 37℃에 배양한 후 FBS를 넣고 원심분리하였다. 세포융합은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 원심분리된 세포 혼합물에 PEG(polyethylene glycerol) 1500 용액을 37℃를 유지한 상태에서 천천히 첨가하고, 다시 기본 배지를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이후, 신속하게 원심분리하여 상층액을 버리고 남은 세포 혼합물을 마크로파지 배지에 조심스럽게 현탁시키고 96 well 조직배양판에 분주한 후 37℃의 조건으로 이산화탄소 항온배양기에서 배양하였다.
- [0050] 3-3 : 융합세포의 선택
- [0051] 세포융합 실시 5일 후에 융합세포의 선택배지인 HAT배지를 각 well에 첨가하였다. 그 후 3일 간격으로 HAT 배지를 같은 방법으로 첨가해주고, 세포융합 11일 후 완전 배지에 HT supplement를 첨가한 HT 배지로 갈아주며 현미경으로 매일 관찰하여 융합세포의 성장 정도를 확인하였다. 성장이 확인된 well의 상층액을 취해 ELISA에 의해 항체 생성을 확인하고, 일단 원하는 항체를 분비한다고 판단되는 융합 세포주는 제한 희석법으로 1,2,3차 클로닝을 수행하여 융합 세포 집단이 하나의 세포주로부터 유래되는 클론이 되게 하였다.
- [0052] 3-4 : ELISA에 의한 융합세포 선별
- [0053] 면역시킨 항원에 대한 면역성 여부와 단일 클론항체의 제작을 위한 세포융합 후 융합세포 선별을 위해 96 well 조직 배양판에 ELISA 코팅 완충용액으로 희석시킨 항원 단백질 용액을 가하고 4℃에서 반응시켰다. 이후 항원 단백질 용액을 흡입하여 제거하고 각 well의 나머지 표면에 블로킹 용액을 가하고 1시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 그 후 블로킹 용액을 제거하고, PBST 용액으로 3회 세척하였다. 융합세포 배양 상층액을 각 well에 가하고 37℃에서 반응시킨 후, 그 용액을 제거하고 PBST 용액으로 3회 세척하였다. Horseradish peroxidase(HRP) conjugated anti-mouse immunoglobulin(anti-mouse IgG)을 PBS로 희석한 용액을 각 well에 첨가하였다. OPD(orthophenylenediamine dihydrochloride) 기질 용액을 well에 넣고 상온에서 10분간 반응하고, stop 용액으로 반응을 정지시켰다. 이때 반응하여 발색된 정도를 확인하기 위하여 ELISA 판독기로 흡광도를 492nm에서 측정하였고, 측정된 결과를 기초로 총 24개의 후보 하이브리도마 세포주 클론을 선별하였다.
- [0054] 3-5 : Fusion plate ELISA 테스트를 통한 항원과의 결합 정도 재확인 및 항체의 정제
- [0055] 총 24개의 후보 하이브리도마 세포주 클론에 대하여 항원으로 주사하였던 BphP 단백질과 BphN 단백질로 Fusion plate ELISA 테스트를 실시하여 그 결합 정도를 확인하였고, 그 결과를 하기의 표 3에 나타내었다. 하기의 표 3에서 보이는 바와 같이 2B8 클론과 2C11 클론은 데이노코커스 라디오듀란스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질과 BphN 단백질에서 모두 높은 수치로 발색되는 것으로 보아 BphP 단백질의 N-말단 부위를 인식하는 것으로 추정되었다. 하지만 3B2 클론 및 3D2 클론은 BphP 단백질에서는 높은 수치를 보이고, BphN 단백질에서는 0에 가까운 수치를 나타내는 것으로 보아 BphP 단백질의 C-말단 부위를 인식하는 것으로 추정되었다. 이들과는 다르

계 3H7 클론의 경우에는 BphP단백질에서 높은 수치를 보이고 BphN 단백질에서도 어느 정도의 낮은 수치를 나타내는 것으로 보아 BphP 단백질 C-말단 쪽 외에 N-말단 부위도 어느 정도 인식하는 것으로 추정되었다.

표 3

[0056]

하이브리도마 세포주 클론	항원 단백질과의 결합 정도(492nm에서의 흡광도)	
	BphN	BphP(full)
1B6	0.0660	1.3190
1B11	0.1560	2.3700
1D6	0.0550	2.3180
2B8	2.3400	2.4200
2C11	2.3480	2.4040
2D9	0.1430	2.2730
2E3	2.1720	1.8020
2F7	0.1220	2.4430
2H8	0.0650	1.3440
3A4	1.9180	2.3770
3B2	0.0980	2.2900
3B3	0.0700	2.1650
3C11	1.9730	2.2590
3D2	0.0640	2.2830
3D10	0.1180	2.4280
3D11	1.6850	2.3130
3F10	0.0730	2.3570
3G2	0.0880	2.0510
3G9	0.0800	1.5580
3H1	1.7840	2.0950
3H7	0.4640	2.3490
4B7	1.9730	2.2620
4E2	0.2050	2.3770
4E3	0.0550	2.2650

[0057]

그 후 상기 5개의 하이브리도마 세포주 클론에 대하여 1차 cloning plate ELISA 테스트, 2차 cloning plate ELISA 테스트를 실시하였고 최종적으로 ascites를 생성하여 항체의 정제를 진행하였다. 그 결과 5개의 단일 클론항체인 2B8 항체, 2C11 항체, 3B2 항체, 3D2 항체 및 3H7 항체를 확보하였다. 항체의 정제는 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 8주 이상 된 BALB/c 마우스에 pristane 0.5ml를 복강주사 한 후, 1주 내지 10일 뒤에 하이브리도마 세포를 배양하여 PBS로 3회 세척하고 5×10^6 cell/0.5ml의 농도가 되도록 PBS로 희석한 후 주사기를 사용하여 복강에 주사하였다. 1주에서 10일 후 복수가 차오르는 것을 관찰하여 마우스를 경추탈골로 희생시켜 복부에 작은 구멍을 내고 복수가 흐르지 않도록 유의하면서 혈청 분리관을 이용하여 복수를 채취하였다. 실온에서 약 1 시간 정도 정치하고 원심분리하여 RBC를 제거하였다. 채취한 복수에 적당량의 PBS를 넣은 후, 4℃에서 ammonium sulfate와 서서히 혼합하였다. 4℃에서 원심분리한 후, 필터를 통과시켰다. Protein A와 DFMF 섞은 비드를 적당량 넣은 다음, Tris 완충용액을 bed vol의 10배로 세척하였다. 항체를 넣어서 protein A/G와 잘 섞이면 fraction을 받고, Tris 완충용액으로 세척한 뒤, glycine을 넣어 여러 번에 걸쳐 elution하였다. 이렇게 정제된 항체를 dialysis bag에 넣고 PBS 완충용액에서 3시간 동안 투석하고, PBS 완충용액으로 다시 교체하여 하룻밤 동안 투석하고, 투석이 끝난 항체는 정량하여 보관하였다.

[0058]

실시예 4 : 단일 클론항체의 특이성 분석

[0059]

상기 확보한 항체들이 기발현 및 정제한 BphP 단백질과 BphN 단백질에 대해서도 같은 결과를 나타내는지 확인해 보기 위하여 웨스턴 블롯(Western blot)을 실시하였다. 정제된 BphP 단백질과 BphN 단백질 $5\mu\text{g}$ 대에 1차 항체로서 농도가 1mg/ml인 각각의 단일클론 항체들을 2% 스킵밀크에 대해 1:1000의 비율로 사용한 후 2차 항체로서 HRP-마우스 항체(SIGMA)를 1:10000 비율로 처리하여 웨스턴 블롯을 실시하였다. 그 결과, 2B8 항체와 2C11 항체는 하이브리도마 세포주 클론에 대한 ELISA 테스트와 마찬가지로 BphP 단백질과 BphN 단백질에 모두 결

합하는 결과가 나왔다(도 2). 따라서 상기 2가지 항체는 모두 BphP의 N-말단 부위에 결합하는 것이라고 생각할 수 있었다. 그리고 3B2 항체 및 3D2 항체는 BphP 단백질에 대해서는 밴드가 나왔으나 BphN 단백질에 대해서는 밴드가 나오지 않는 것으로 보아 BphP 단백질의 C-말단 부위에 결합할 것이라는 결과를 얻을 수 있었다. 하지만 3H7 항체의 경우에는 ELISA 테스트에서의 결과와는 다르게 오로지 BphP 단백질만을 인식하는 결과가 나왔다. 또한 각각의 항체들의 결합 정도는 N-말단 부위에 결합하는 2B8 항체 및 2C11 항체가 가장 강하게 결합하였으며 C-말단 부위를 인식한다고 생각되는 3D2 항체는 그보다는 약하게 인식하는 밴드를 보였다. 그 다음으로 3H7 항체 및 3B2 항체 순으로 강하게 결합하는 밴드가 나왔다.

[0060] 한편, DrBphP는 식물 피토크롬과 유사한 구조를 가지고 있는데, 특히 N-말단 부위를 구성하는 PCD는 둘 다 모두 PAS, GAF, PHY 도메인을 포함하는 매우 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 상기 항체들이 오토(oat) 피토크롬 단백질과 반응하는지 여부를 확인해보았다. 하지만 상기 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질에 대한 단일 클론항체들 5가지 모두 오토 피토크롬 단백질(Oat PhyA)에는 결합하지 않는 결과를 보였다(도 3). 따라서 상기 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질에 대한 단일 클론항체들은 기존의 Oat 피토크롬 단백질에 대한 항체들과는 다른 에피토프를 인식하는 BphP 특이적인 새로운 항체임을 확인할 수 있었다.

[0061] 본 발명자들은 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질에 대한 단일 클론항체들 중 가장 강하게 결합한 2B8 항체의 하이브리도마 세포주 2B8을 2012년 9월 24일자로 한국생명공학연구원 생명자원 센터(KCTC)에 기탁하였고, 하이브리도마 세포주 2B8의 수탁번호는 KCTC 12283BP이다. 그리고, 2B8 항체의 아이소타입(isotype)을 마우스 항체를 이용한 ELISA 방법으로 결정하였다. 2B8 항체의 중쇄 아이소타입은 IgG 2a이었고, 경쇄 아이소타입은 κ (kappa)이었다.

[0062] 실시예 5 : 2B8 단일클론 항체의 에피토프 확인을 위한 에피토프 맵핑

[0063] 5-1 : 1차 에피토프 맵핑

[0064] 상기 데이노코커스 라디오듀런스(*Deinococcus radiodurans*)의 BphP 단백질에 대한 단일 클론항체들 중 가장 강하게 결합한 2B8 항체의 에피토프를 확인하기 위하여 DrBphP 재조합 부분 펩티드(recombinant partial peptide)를 제작하고, 에피토프 맵핑을 실시하였다.

[0065] 먼저, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3-12 위치의 아미노산 서열(서열번호 13)을 코딩하는 DNA, 3-11 위치의 아미노산 서열(서열번호 1)을 코딩하는 DNA, 3-10 위치의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA, 4-12 위치의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 클로닝하기 위하여 각각에 대한 프라이머를 제작하였다. 제작한 프라이머 및 PrimeSTAR HS(TAKARA, R040) 중합효소를 이용하여 PCR을 30 사이클 전후로 수행하고, 증폭된 DNA 산물을 얻었다. 상기 DNA 클로닝을 위한 PCR 반응은 별도의 주형을 필요로 하지 않으며, 1 사이클의 PCR 시 순방향 프라이머(Forward Primer)와 역방향 프라이머(Reverse primer)의 결합에 의해 증폭을 위한 주형을 얻을 수 있다. 하기 표 4는 상기 4개의 DrBphP 재조합 부분 펩티드(recombinant partial peptide)를 코딩하는 DNA 증폭 산물을 얻기 위해 PCR 시 사용한 프라이머를 나타낸 것이다.

표 4

서열 번호	프라이머 종류	염기서열(5'→3')	프라이머에 포함된 제한효소 인식 부위
14	BphP 3-12 a.a. 클로닝용 forward primer	GC CTCGAG GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I
15	BphP 3-12 a.a. 클로닝용 reverse primer	GC GAGCTC GAATTC TCA AAGCGGTGAAAAAAGGGCAA	EcoR I
16	BphP 3-11 a.a. 클로닝용 forward primer	GC CTCGAG GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I
17	BphP 3-11 a.a. 클로닝용 reverse primer	GC GAGCTC GAATTC TCA CGGTGAAAAAAGGGCAACGG	EcoR I
18	BphP 3-10 a.a. 클로닝용 forward primer	GC CTCGAG GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I

19	BphP 3-10 a.a. 클로닝용 reverse primer	GC GAGCTC GAATTC TCA TGGAAAAAGGGCAACGGGTC	EcoR I
20	BphP 4-12 a.a. 클로닝용 forward primer	GC CTCGAG GGATCC ATG GACCCGTGCCCCTTTTTC	BamH I
21	BphP 4-12 a.a. 클로닝용 reverse primer	GC GAGCTC GAATTC TCA AAGCGGTGGAAAAAGGGCAA	EcoR I

[0067] 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel(QA-Agarose gel TM, Q-BIO, CAT#AGAH0250)에서 running하고, 자외선 조사를 통하여 증폭시킨 DNA의 크기를 확인하였다. 그 후 DNA 증폭 산물에 해당하는 gel상의 band만을 오투내고 gel elution kit(FavorPrep GEL/PCR purification mini kit, FAVORGEN, CAT#FAGCK001-1)를 이용하여 원하는 DNA만을 분리한 후 pJET(CloneJET PCR cloning kit, Fermentas, #K1232) 벡터에 결합(ligation) 시켰다. 이후, 10~20 μ l 정도의 결합 벡터에 30~50 μ l 정도의 대장균인 DH5 α 컴피턴트 세포(제조사 : Invitrogen)를 첨가하고, 20분 동안 얼음 상에서 배양한 후 42℃에서 1분간 열 충격(heat shock)을 준 후 다시 20분 동안 얼음 상에서 회복시키고, 암피실린이 포함된 LB 배지 플레이트에 스프레딩(spreading) 한 후 37℃에서 하룻밤 동안 배양하여 형질전환이(상) incubation 시키는 방법으로 형질전환시켰다. 이 후, 콜로니(colony)가 자라면 암피실린이 포함된 LB 배지에 접종하고 하룻밤 동안 37℃에서 배양하여 세포를 키운 후 플라스미드 추출 키트(FavorPrep Plasmid Extraction kit, FAVORGEN, cat#FAPDE300)를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 이후, 추출된 플라스미드(plasmid)를 Bioneer co.,KR에 위탁하여 염기 서열을 측정하였다. 그 결과, PCR을 통해 생성된 DNA 산물이 원하는 목적 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.

[0068] 또한, 제한효소 BamH I 과 EcoR I 을 이용하여 추출된 플라스미드 및 pGEX4T1 벡터((GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)를 절단한 후 목적 DNA인 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3-12 위치의 아미노산 서열(서열번호 13)을 코딩하는 DNA, 3-11 위치의 아미노산 서열(서열번호 1)을 코딩하는 DNA, 3-10 위치의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA, 4-12 위치의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 각각 단백질 발현 벡터인 pGEX4T1 벡터에 결합(ligation) 시켰다. 이후, 목적 DNA를 포함하는 pGEX4T1 벡터로 대장균인 BL21 컴피턴트 세포(제조사 : RBC, Taipei, Taiwan)를 형질전환시킨 후 암피실린이 포함된 LB 배지 상에서 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 이후, 배양된 세포를 소니케이션을 이용하고 파쇄하고 원심분리에 의해 얻은 상층액을 따로 분리한 후 GST resin(Glutathion Sepharose™ High Performance, GE Healthcare)을 이용하여 단백질을 정제하였다. 정제된 단백질 및 데이노코커스 라디오듀런스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질에 대해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이때 1차 항체로는 2B8 단일 클론항체 및 anti-GST 항체를 사용하였고, 2차 항체로는 Horseradish peroxidase(HRP) conjugated anti-mouse immunoglobulin(anti-mouse IgG; Sigma)를 사용하였다. 또한, SDS-PAGE 후 셀룰로오스 맴브레인 에 트랜스퍼된 샘플을 현상하기 위해 Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents(GE Healthcare, RPN21060L/AF)를 사용하였다. 도 4는 2B8 항체에 대한 1차 에피토프 맵핑의 결과를 웨스턴 블롯을 통해 나타낸 것이다. 도 4에서 보이는 바와 같이 2B8 항체의 에피토프는 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치에 해당하는 9개의 아미노산(서열번호 1)이고, 이를 펩티드 태그로 사용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 태그를 "BRT 태그"로 명명하였다.

[0069] 5-2 : 2차 에피토프 맵핑

[0070] 상기 1차 에피토프 맵핑을 통해 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 BRT 태그가 2B8 항체의 에피토프임을 확인하였다. 본 발명자들은 BRT 태그를 구성하는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 하나의 아미노산이 결실된 펩티드인 DrBphP 변형 부분 펩티드(modified partial peptide)에 대해서도 2B8 항체가 인식하는지를 알아보기 위해 2차 에피토프 맵핑을 실시하였다.

[0071] 먼저, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열을 포함하고 동시에 4번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 결실된 펩티드(3-11- Δ 4D로 표시함)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열을 포함하고 동시에 5번째 아미노산 잔기인 프롤린이 결실된 펩티드(3-11- Δ 5P로 표시함)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열을 포함하고 동시에 6번째 아미노산 잔기인 루신이 결실된 펩티드(3-11- Δ 6L로 표시함)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기

준으로 3-11 위치의 아미노산 서열을 포함하고 동시에 7번째 아미노산 잔기인 프롤린이 결실된 펩티드(3-11- Δ 7P로 표시함)를 코딩하는 DNA, DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3-11 위치의 아미노산 서열을 포함하고 동시에 8번째 아미노산 잔기인 페닐알라닌이 결실된 펩티드(3-11- Δ 8F로 표시함)를 코딩하는 DNA를 클로닝하기 위하여 각각에 대한 프라이머를 제작하였다. 제작한 프라이머 및 PrimeSTAR HS(TAKARA, R040) 중합효소를 이용하여 PCR을 30 사이클 전후로 수행하고, 증폭된 DNA 산물을 얻었다. 상기 DNA 클로닝을 위한 PCR 반응은 별도의 주형을 필요로 하지 않으며, 1 사이클의 PCR 시 순방향 프라이머(Forward Primer)와 역방향 프라이머(Reverse primer)의 결합에 의해 증폭을 위한 주형을 얻을 수 있다. 하기 표 5는 상기 5개의 DrBphP 변형 부분 펩티드(modified partial peptide)를 코딩하는 DNA 증폭 산물을 얻기 위해 PCR 시 사용한 프라이머를 나타낸 것이다. PCR에 의해 DNA 증폭 산물을 얻은 이후의 과정은 1차 에피토프 맵핑과 동일하므로 설명을 생략한다.

표 5

[0072]

서열 번호	프라이머 종류	염기서열(5'→3')	프라이머에 포함 된 제한효소 인식 부위
22	3-11- Δ 4D 클로닝용 forward primer	GCGGATCCATGCGGCCGTTGCCCTTTTTCACCG	BamH I
23	3-11- Δ 4D 클로닝용 reverse primer	GCGAATTCTCACGGTGGAAAAAGGGCAACGGCCG	EcoR I
24	3-11- Δ 5P 클로닝용 forward primer	GCGGATCCATGCGGGACTTGCCCTTTTTCACCG	BamH I
25	3-11- Δ 5P 클로닝용 reverse primer	GCGAATTCTCACGGTGGAAAAAGGGCAAGTCCCG	EcoR I
26	3-11- Δ 6L 클로닝용 forward primer	GCGGATCCATGCGGGACCCGCCCTTTTTCACCG	BamH I
27	3-11- Δ 6L 클로닝용 reverse primer	GCGAATTCTCACGGTGGAAAAAGGGCGGTCCCG	EcoR I
28	3-11- Δ 7P 클로닝용 forward primer	GCGGATCCATGCGGGACCCGTTGTTTTTCACCG	BamH I
29	3-11- Δ 7P 클로닝용 reverse primer	GCGAATTCTCACGGTGGAAAAACAACGGGTCCCG	EcoR I
30	3-11- Δ 8F 클로닝용 forward primer	GCGGATCCATGCGGGACCCGTTGCCCTTTCACCG	BamH I
31	3-11- Δ 8F 클로닝용 reverse primer	GCGAATTCTCACGGTGGAAAGGGCAACGGGTCCCG	EcoR I

[0073]

도 5는 2B8 항체에 대한 2차 에피토프 맵핑의 결과를 웨스턴 블롯을 통해 나타낸 것이다. 도 5에서 보이는 바와 같이 2B8 항체의 다른 에피토프는 DrBphP의 전체 아미노산 서열(서열번호 3) 중 N-말단을 기준으로 3번째 위치부터 11번째 위치에 해당하는 아미노산 잔기들에서 8번째 위치 또는 9번째 위치에 해당하는 아미노산 잔기인 페닐알라닌 하나가 결실된 펩티드(서열번호 2)인 것으로 확인되었고, 상기 2B8 항체의 다른 에피토프도 펩티드 태그로 사용될 수 있다. 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 태그를 "BRT- Δ F 태그"로 명명하였다.

[0074]

실시예 6 : BRT 태그를 이용한 융합 단백질의 제조 및 BRT 태그에 대한 항체를 이용한 융합 단백질의 검출

[0075]

본 발명의 BRT 태그를 이용하여 융합 단백질을 제조하고, 상기 융합 단백질을 BRT 태그에 대한 단일클론 항체인 B28 항체를 이용하여 검출하였다.

[0076]

6-1 : E.coli에서의 융합 단백질 발현 및 검출

[0077]

본 발명의 BRT tag를 포함하는 융합 단백질이 대장균(*E.coli*) 상에서 정상적으로 발현하는지를 확인하고, 발현된 융합 단백질을 2B8 단일클론 항체로 검출할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 GST(Glutathion-S-Transferase) 단백질 앞에 BRT 태그가 연결된 융합 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 제조하였다. 본 발명의 BRT 태그를 코딩하는 DNA 및 c-myc 태그를 코딩하는 DNA를 클로닝하기 위하여 각각에 대한 프라이머를 제작하였다. 제작한 프라

이며 및 PrimeSTAR HS(TAKARA, R040) 중합효소를 이용하여 PCR을 30 사이클 전후로 수행하고, 증폭된 DNA 산물을 얻었다. 상기 DNA 클로닝을 위한 PCR 반응은 별도의 주형을 필요로 하지 않으며, 1 사이클의 PCR 시 순방향 프라이머(Forward Primer)와 역방향 프라이머(Reverse primer)의 결합에 의해 증폭을 위한 주형을 얻을 수 있다. 하기 표 6은 상기 2개의 DNA 증폭 산물을 얻기 위해 PCR 시 사용한 프라이머를 나타낸 것이다. 증폭된 PCR 산물로부터 원하는 DNA만을 분리한 후 pJET(CloneJET PCR cloning kit, Fermentas, #K1232) 벡터에 결합(ligation)시켰다. 이후, 상기 결합 벡터를 Bioneer co.,KR에 위탁하여 염기 서열을 측정하였다. 그 결과, PCR을 통해 생성된 DNA 산물이 원하는 목적 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.

표 6

[0078]

서열 번호	프라이머 종류	염기서열(5'→3')	프라이머에 포함된 제한효소 인식 부위
32	BRT 태그 클로닝용 forward primer	GCCTCGAGGGATCCATGCGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I
33	BRT 태그 클로닝용 reverse primer	GCGAGCTCGAATTCTCACGGTGGAAAAAGGGCAACGG	EcoR I
34	c-myc 태그 클로닝용 forward primer	GCGGATCCATGGAACAAAATTAATTTCTGAAGAAGATTTA	BamH I
35	c-myc 태그 클로닝용 reverse primer	GCGAATTCTCATAAATCTTCTTCAGAAATTAATTTTGTTC	EcoR I

[0079]

이후 분리된 DNA 산물을 발현 벡터이면서 자체적으로 GST(Glutathion-S-Transferase) 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하고 있는 pGEX4T1 벡터((GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)에 결합시켰다. 구체적으로 분리된 DNA 산물과 pGEX4T1 벡터((GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)를 제한효소 BamH I과 EcoR I을 이용하여 절단하고, 리가아제를 이용하여 연결시켰다. 이후, 목적 DNA를 포함하는 pGEX4T1 벡터로 대장균인 BL21 컴피턴트 세포(제조사 : RBC, Taipei, Taiwan)에 42℃에서 1분 동안 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환시키고, 이를 암피실린이 포함된 LB 배지 상에서 배양하여 GST 단백질에 BRT 태그가 연결된 융합 단백질(3-11::GST로 표시함)과 GST 단백질에 c-myc 태그가 연결된 융합 단백질(Myc::GST로 표시함)을 각각 발현시켰다. 구체적으로 BL21 컴피턴트 세포에 형질전환되어 LB 배지 상에서 자란 콜로니(colony)들을 암피실린이 포함된 LB 배지에 접종하고 37℃에서 약 8시간 이상 증배양하였다. 증배양한 세포를 암피실린이 포함된 LB 배지에 접종하고 OD₆₀₀에서의 값이 0.6이 될 때까지의 농도로 키운 후 전체 농도가 0.5mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 25℃에서 6시간 동안 단백질 발현을 유도했다. 이후 상업적으로 판매하는 GST resin(Glutathion Sepharose™ High Performance, GE Healthcare)을 이용하여 단백질을 정제하였다. 정제된 단백질 및 데이노코커스 라디오듀란스(Deinococcus radiodurans)의 BphP 단백질에 대해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이때 1차 항체로는 2B8 단일 클론항체 및 anti-myc 항체를 사용하였고, 2차 항체로 Horseradish peroxidase(HRP) conjugated anti-mouse immunoglobulin(anti-mouse IgG; Sigma)를사용하였다. 또한, SDS-PAGE 후 셀룰로오스 멤브레인에 트랜스퍼된 샘플을 현상하기 위해 Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents(GE Healthcare, RPN21060L/AF)를 사용하였다. 도 6은 BRT 태그를 GST 단백질의 N-말단에 붙인 융합 단백질이 대장균 상에서 정상적으로 발현되고 2B8 항체에 의해 융합 단백질의 검출이 가능함을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다. 도 6에서 보이는 바와 같이 GST 단백질의 N-말단에 BRT 태그를 붙인 융합 단백질은 대장균(*E.coli*)에서 원활하게 발현되었고, 발현된 단백질은 2B8 항체에 의해 비특이적 결합이 없이 잘 검출되었다. 또한, BRT 태그 및 2B8 항체를 이용한 에피토프 태깅 시스템은 통상적으로 사용되는 태그인 c-myc 태그 및 이에 대한 항체를 이용한 에피토프 태깅 시스템과 비교하였을 때 거의 동등한 수준의 효과를 보였다.

[0080]

6-2 : 식물 세포에서의 융합 단백질의 발현 및 검출

[0081]

본 발명의 BRT tag를 포함하는 융합 단백질이 식물 세포 상에서 정상적으로 발현하는지를 확인하고, 발현된 융합 단백질을 2B8 단일클론 항체로 검출할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 GFP(Green Fluorescent Protein) 앞에 BRT 태그가 연결된 융합 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 제조하였다. GFP에 본 발명의 BRT 태그가 연결된 융합 단백질(BRT::GFP로 표시함)을 코딩하는 DNA 및 GFP에 c-myc 태그가 연결된 융합 단백질(Myc::GFP로 표시함)을 코딩하는 DNA를 클로닝하기 위하여 각각에 대한 프라이머를 제작하였다. 제작한 프라이머 및

PrimeSTAR HS(TAKARA, R040) 중합효소를 이용하여 PCR을 30 사이클 전후로 수행하고, PCR 을 위한 주형으로 GFP를 코딩하는 DNA(서열번호 36)를 사용하였다. 하기 표 7은 상기 2개의 DNA 증폭 산물을 얻기 위해 PCR 시 사용한 프라이머를 나타낸 것이다. 증폭된 PCR 산물로부터 원하는 DNA만을 분리한 후 pJET(CloneJET PCR cloning kit, Fermentas, #K1232) 벡터에 결합(ligation) 시켰다. 이후, 상기 결합 벡터를 Bioneer co.,KR에 위탁하여 염기 서열을 측정하였다. 그 결과, PCR을 통해 생성된 DNA 산물이 원하는 목적 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.

표 7

[0082]

서열 번호	프라이머 종류	염기서열(5'→3')	프라이머에 포함 된 제한효소 인식 부위
37	BRT::GFP 클로닝용 forward primer	GCCTCGAGATGAGGGATCCACTTCCATTCTTCCCTCCAATGGTGAGC AAGGGCGAG	Xho I
38	BRT::GFP 클로닝용 reverse primer	GCGAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT	Sac I
39	Myc::GFP 클로닝용 forward primer	GGAGAGGACCTCGAGATGGAACAAAAGCTTATTTCTGAAGAAGATCT TATGGTGAGCAAGGGCGAG	Xho I
40	Myc::GFP 클로닝용 reverse primer	GCGAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT	Sac I

[0083]

이후 분리된 DNA 산물을 발현 벡터인 pBY030.2R 벡터에 결합시키고, 상기 벡터를 이용하여 Agrobacterium LBA4404 세포를 형질전환시켰다. 이후, 시커서 *Nicotiana benthamiana*(담배) 식물체에 잎의 아랫면에 Agrobacterium LBA4404를 시린지(syringe)로 주입(infiltration)하고, BRT 태그가 연결된 융합 단백질(BRT::GFP로 표시함) 및 GFP에 c-myc 태그가 연결된 융합 단백질(Myc::GFP로 표시함)을 각각 담배 식물체에서 일과성 발현(transient expression)을 시켰다. 자세한 실험 방법은 Imogen *et al* (NATURE PROTOCOL, 2006, Vol.1, NO.4, 2019-2025)을 참조하였다. Agrobacterium을 OD₆₀₀에서의 값이 0.7이 될 때까지의 농도로 키운 후 식물체에 주입하였고, 이후 배양실에서 식물체를 5일 동안 유지시킨 후 샘플을 수확하였다. 형질전환 유무는 자외선(UV)을 처리하여 GFP 형광을 띄는 식물체로 확인할 수 있었다. 수확한 샘플들을 액체 질소로 급속 냉동하고 -80℃에서 보관하였다. 이후, TissueLyser(QIAGEN)로 담배 잎 샘플을 분쇄하고 추출용 버퍼(125mM Tris-HCL pH 8.8, 1% SDS, 10% Glycerol, and 50mM Na₂S₂O₅)를 첨가한 후 원심분리기를 이용하여 상층액(supernatant)만을 분리하고, 이를 웨스턴 블롯 분석에 사용하였다. 도 7은 BRT 태그를 GFP의 N-말단에 붙인 융합 단백질이 식물 세포에서 정상적으로 발현되고 2B8 항체에 의해 융합 단백질의 검출이 가능함을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다. 도 7에서 보이는 바와 같이 GFP의 N-말단에 BRT 태그를 붙인 융합 단백질은 식물 세포에서 잎의 성장에 상관없이 원활하게 발현되었고, 발현된 단백질은 2B8 항체에 의해 비특이적 결합이 없이 잘 검출되었다. 또한, BRT 태그 및 2B8 항체를 이용한 에피토프 태깅 시스템은 통상적으로 사용되는 태그인 c-myc 태그 및 이에 대한 항체를 이용한 에피토프 태깅 시스템과 비교하였을 때 거의 동등한 수준의 효과를 보였다.

[0084]

이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 태양을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0085]

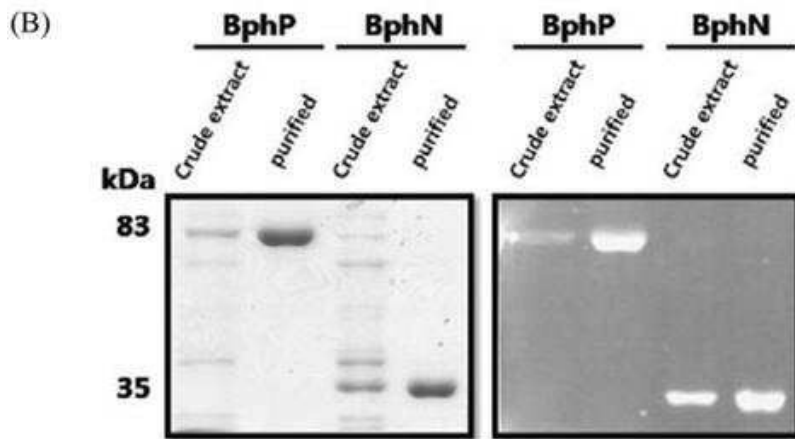
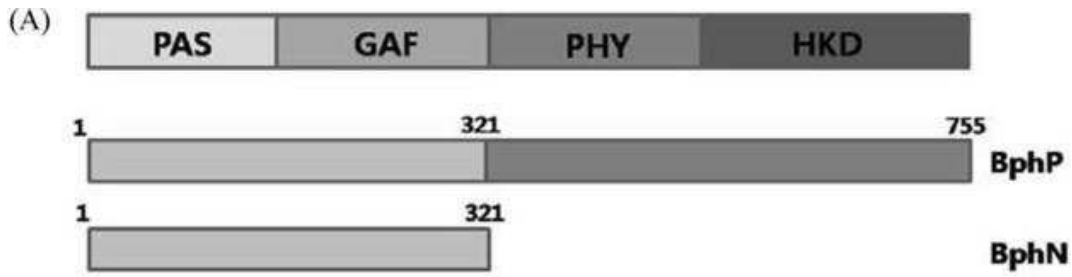
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12283BP

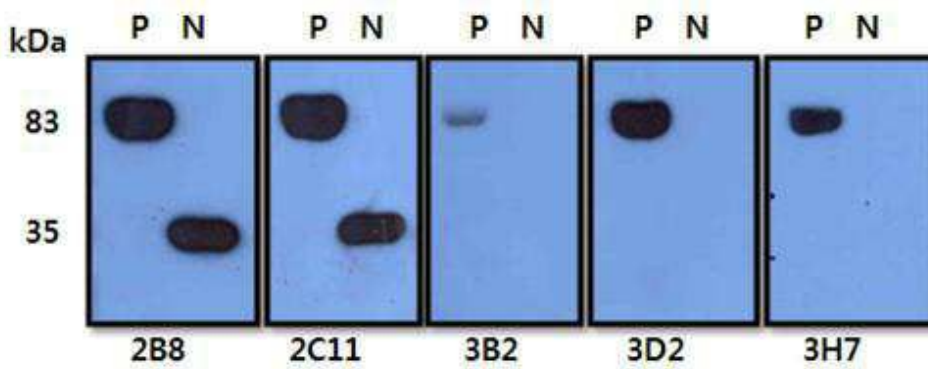
수탁일자 : 20120924

도면

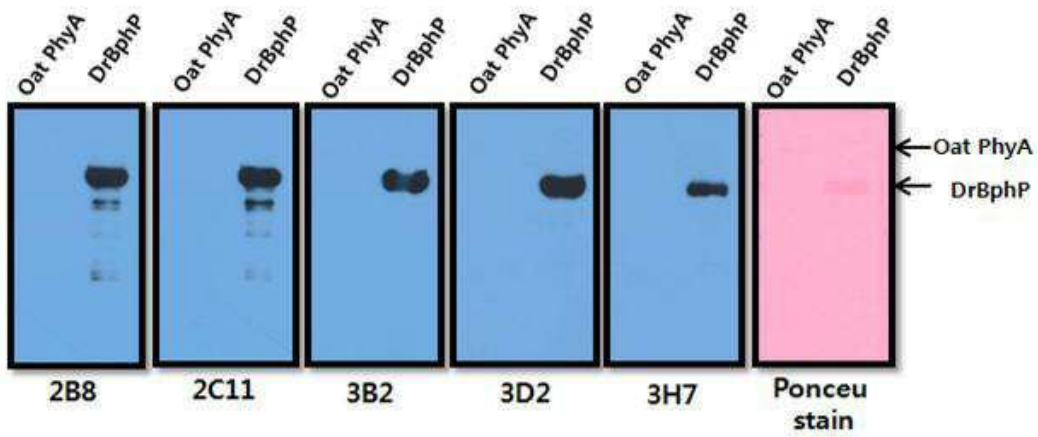
도면1



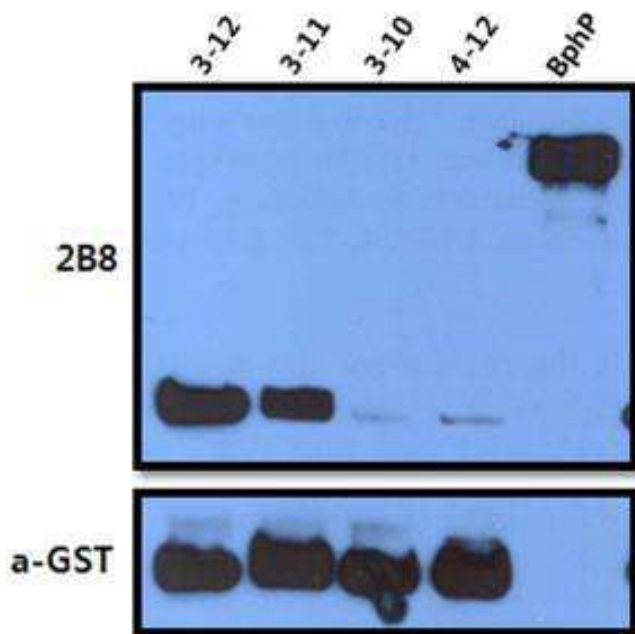
도면2



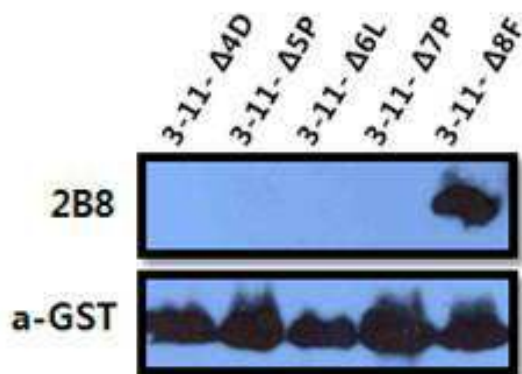
도면3



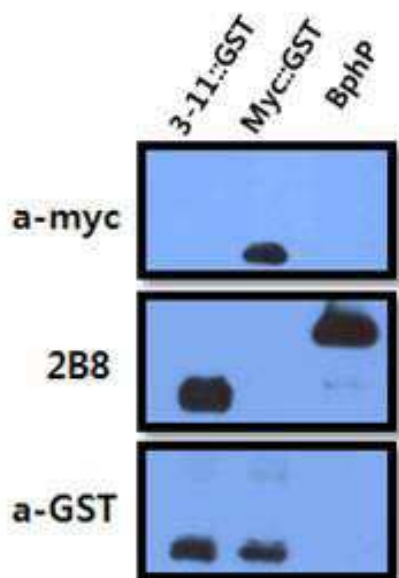
도면4



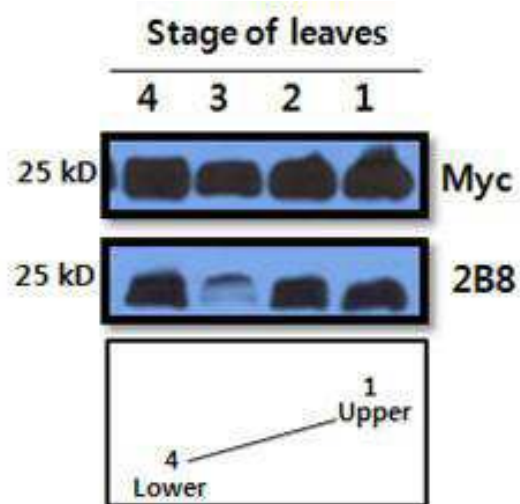
도면5



도면6



도면7



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)