(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0054574
(43) 공개일자 2012년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) *H01L 27/146* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0037540(분할)
(22) 출원일자 2012년04월10일
심사청구일자 2012년04월10일
(62) 원출원 특허 10-2011-0119198
원출원일자 2011년11월15일
심사청구일자 2011년11월15일
(30) 우선권주장
1020090019355 2009년03월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이지원
서울특별시 광진구 광장동 현대3차아파트 310-204
김영근
서울특별시 강남구 압구정동 528 한양아파트 72-1109
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

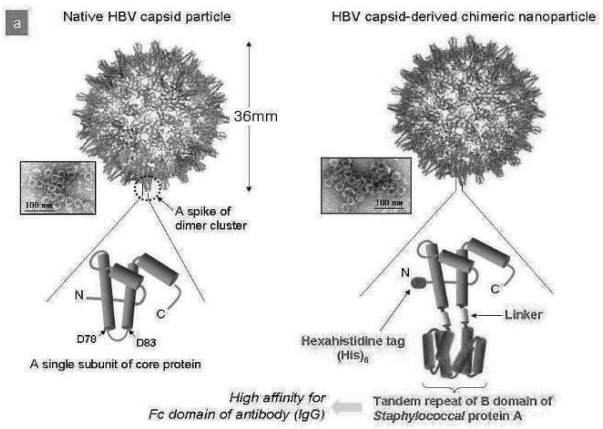
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **키메릭 단백질, 그 제조방법 및 그 키메릭 단백질이 고정화된 나노센서 및 그 응용**

(57) 요 약

본 발명은 키메릭 단백질, 그 제조방법 및 그 키메릭 단백질이 고정화된 나노센서 및 그 응용에 관한 발명이다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

조문규

서울특별시 마포구 창전동 서강해모로아파트 107동 702호

이은정

경기도 고양시 일산동구 풍동 현대아이파크 506동 203호

박진승

인천광역시 강화군 강화읍 관청리 833-6번지

특허청구의 범위

청구항 1

B형 간염 바이러스 캡시드 단백질; 및

적어도 하나의 스태필로코컬 프로틴 에이(*Staphylococcal* protein A)의 B 도메인(SPA_B)을 포함하는 키메릭 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

키메릭 단백질은 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분, 스태필로코컬 프로틴 에이(Staphylococcal protein A)의 B 도메인이 적어도 하나 포함되어 있는 부분, 및 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 81-149번째 아미노산 서열 부분을 포함하는 키메릭 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서,

B형 간염 바이러스 캡시드 단백질은 헥사 히스티딘 또는 바이오틴화된 펩타이드 서열을 더 포함하는 키메릭 단백질.

청구항 4

a) B형 간염 바이러스 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래한 유전자 클론을 얻는 단계;

b) 스타필로코커스 단백질 A(Staphylococcal protein A)의 B도메인(SPA_B)으로 HBVcAg의 부위를 대체하거나 HBVcAg의 부위에 삽입하기 위한 다른 클론을 제조하는 단계;

c) 상기 제조된 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여 발현 벡터를 제조하는 단계; 및

d) 상기 발현벡터를 숙주에 형질전환하여 키메릭 단백질의 유전자를 발현하는 단계를 거쳐 제조되는 것인 키메릭 단백질의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

단계 a)는 B형 간염 바이러스 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래하고, N-NdeI-hexahistidine-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-XhoI-C 및 N-BamHI-G4SG4-HBVcAg(81-149)-HindIII-C 의 합성을 코드하는 두 유전자 클론을 얻는 것인 키메릭 단백질의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

단계 b)는 스타필로코커스 단백질 A(Staphylococcal protein A)의 B도메인(SPA_B)의 209-271 잔기의 탠덤 리피트로 HBVcAg의 P79A80를 대체하기 위하여, 두 다른 클론, N-XhoI-SPA_B-EcoRI-C 및 N-EcoRI-SPA_B-BamHI-C를 제조하는 것인 키메릭 단백질의 제조방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

단계 c)는 상기 단계 a) 및 b)에서 얻은 유전자 클론들의 일련의 라이게이션을 통하여, N-His_6-HBVcAg(1-78)-SPA_B-SPA_B-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 플라즈미드 발현 벡터를 제조하는 것인 키메릭 단백질의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 키메릭 단백질, 그 제조방법 및 그 키메릭 단백질이 고정화된 나노센서 및 그 응용에 관한 발명이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 촉매에는 금속, 금속산화물, 고체산 등의 많은 종류가 있다. 또한 제조 방법도 크게 함침법 (지지체를 활성물질이 녹아있는 용액에 담근 후에 침전체를 가하거나 증발시켜 활성물질을 담지시킴), 이온교환법 (지지체를 활성물질이 녹아있는 용액과 접촉시켜 활성물질을 지지체에 교환시킴), 침전법 (용액상태 활성물질을 침전시켜 활성화과정을 거침) 등으로 나눌 수 있다. 이 중 본 발명은 금속촉매의 함침법 중에 특수한 방법으로 특히, 본 공정에서는 산화니켈 (NiO)은 촉매로서 활성이 없기 때문에 금속니켈이 촉매로 쓰인다. 또한 니켈은 산화니켈에 비해 나노틀을 이용하여, 원하는 모양과 크기로 만들기가 용이하기 때문에 니켈을 이용한 금속선, 금속박막, 금속결정 등이 촉매작용의 연구에 많이 이용되고 있다. 예를 들어, 니켈나노헤어 구조는 바이오분야 (BT)에의 응용성을 위해 생체기능성 (Biofunctionalization)을 부여할 수 있다. 특히 니켈나노선이 노출된 부분은 표면개질화 (surface modification)를 통하여, 바이오분자 (Biomolecules)-프로브 (Probe), 항체 (Antibody)-항원 (Antigen) 그리고 비오틴 (Biotin)-아비딘 (Avidin)의 결합력을 이용한 바이오센서에의 응용이 가능하다. 특히, 니켈은 아민 (amine)과 히스티딘 (histidine)의 선택적 결합이 가능하여 이에 대한 응용성을 더욱 고취시킨다. 또한 니켈의 자기적성질을 이용한 나노구조물의 움직임을 제어하는 것 또한 가능하다. 하지만, AAO에서 완전히 분리된 니켈나노선을 이용하는 데에는 자기적 성질과 반데르발스 힘 때문에 뭉침 (Agglomeration)현상이 발생하여 나노선 개별적인 특성의 결과를 얻기가 힘들다.

[0003] 여기서, 본 발명의 니켈헤어나노구조는 그 높이가 균일하며, 나노틀 내부에 있으므로 뭉침현상을 방지하며, 고밀도를 가짐으로 인해 화학적 검출에 있어서 매우 유용한 나노 소재이다. 따라서 이에 대한 연구를 위한 나노구조물의 합성방법이 요구된다.

[0004] 한편 고위험성의 급성 심근 경색을 가지는 환자에서 트로포닌 I (단백질 마커)의 조기 검출(Adams, J.E. et al. *Circulation* 88, 101-106 (1993);Adams, J.E., Schechtman, K.B., Landt, Y., Ladenson, J.H. & Jaffe, A.S. *Clin. Chem.* 40, 1291-1295 (1994);Thygesen, K., Alpert, J.S. & White, H.D. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 2173-2195 (2007);Morrow, D.A. et al. *Clin. Chem.* 53, 552-574 (2007);Gibler, W.B. et al. *Ann. Emerg. Med.* 46, 185-197 (2005))은 심장마비로부터 사망의 위험성을 감소시킬 수 있다(Antman, E.M. et al. *N. Engl. J. Med.* 335, 1342-1349 (1996);Wu, A.H.B. & Jaffe, A.S. *Am. Heart J.* 155, 208-214 (2008);Benamer, H. et al. *Am. Heart J.* 137, 815-820 (1999);Heeschen, C., van den Brand, M.J., Hamm, C.W. & Simoons, M.L. *Circulation* 100, 1509-1514 (1999);Wong, G.C. et al. *Circulation* 106, 202-207 (2002)).

[0005] 대부분의 트로포닌 분석은 현재 통상적인 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 방법에 기초하고 나노-및 피코-몰 범위의 검출 한계를 가진다(Rosi, N.L. & Mirkin, C.A. *Chem. Rev.* 105, 1547-1562 (2005))

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 키메릭 단백질을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 키메릭 단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메릭 단백질이 고정화된 기질을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 기질에 고정화된 키메릭 단백질에 특정물질이 고정화된 3차원 나노 구조 기반 초고감도 나노센서를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 3차원 나노 구조 기반 초고감도 나노센서를 이용한 질병 마커를 검출하는 것

이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 나노스케일의 기공(pore)을 함유한 나노틀(nanotemplate) 위로 복수개의 나노선(예를 들어 금속 나노선)이 노출된 구조를 갖는 나노헤어 구조물을 제공한다.

[0012] 본 명세서에서 '나노헤어'란 최광의 의미로 사용된 것으로, 나노틀(예를 들어, 양극산화 알루미늄 나노틀) 안에 금속 (예를 들어 Ni) 을 충진하고 화학기계연마 (chemical-mechanical polishing, CMP), 및 반응성이온식각(reactive ion etching, RIE) 등과 같은 반도체공정을 이용하여 매우 균일한 나노선 어레이를 노출시키는 구조를 의미한다.

[0013] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 노출된 나노선은 Ni, Fe, Co, Ni, Cu, Ag, Au, Pd, Pt을 포함하는 천이금속(transition metal) 류와 이들의 합금(alloy), 또는 전도성 고분자(polymer) 등과 같이 전기전도성(electrically conductive)을 갖는 물질로부터 유래한다. 이러한 금속, 합금 나노선을 기반으로 나노헤어를 제조한 후, 노출된 부분을 산화(oxidation), 질화(nitrification), 탄화(carbonization) 등 후처리(post-treatment) 금속(metal) 및 이의 합금(alloy), 그리고 이를 포함하는 산화물(oxide), 질화물(nitride), 및 탄화물(carbide)로 변성할 수 있다.

[0014] 본 명세서에 있어서, '전도성고분자'란 고분자의 본래 특성인 가볍고 가공이 쉬운 장점을 유지한 채 전기를 통하는 폴리머를 의미한다. 고분자(polymer)란 기존의 저분자 물질에 비하여 분자의 사슬이 대단히 긴 분자로 이와 같은 고분자 사슬들이 하나 둘 모여 응집체(결정)을 이루게 되면 비로소 고체형태를 이루게 된다. 본 발명의 일 구현예에서 적용가능한 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(polyacetylene), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리피롤(polypyrrole), 폴리티오펜(polythiophene), 폴리설퍼니트리드(poly sulfur nitride) 등이 있으나 이에 한정되지 아니한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 나노틀은 양극산화알루미늄 (anodized aluminum oxide, AAO)과 같은 hard한 소재의 나노틀 또는 Poly-Carbonate 같은 soft한 나노틀인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0016] 또한 본 발명은 (a) 복수개의 기공을 갖는 나노틀(nanotemplate)을 준비하는 단계;(b) 상기 나노틀의 일측면 상에 전극층을 형성하는 단계;(c) 상기 나노틀을 소정의 금속 이온을 포함하는 용액에 주입한 후 이를 캐소드(cathode)로 하는 전기도금 방식을 이용하여 상기 나노틀의 기공을 통하여 금속 나노선을 성장시키는 단계;(d) 상기 금속 나노선을 화학기계연마 (chemical mechanical polishing, CMP) 공정을 통하여 평탄화하는 단계; 및 (e) 상기 나노틀을 선택적으로 반응이온식각 (reactive ion etching, RIE)하는 단계를 포함하는 나노헤어 구조물의 제조방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 제조방법의 일 구현예에 있어서, 상기 (b)단계의 증착 두께는 250?350nm인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하며,

[0018] 본 발명의 제조방법의 일 구현예에 있어서, 상기 금속 이온은 Ni, Fe, Co, Ni, Cu, Ag, Au, Pd, 및 Pt 으로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0019] 본 발명의 제조방법의 다른 구현예에 있어서, 상기 c)단계의 금속 이온을 포함하는 용액은 금속 설페이트 및 금속 클로라이드 및 붕산(boric acid)의 혼합액인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하며,

[0020] 본 발명의 제조방법의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 e)단계의 반응이온식각 공정은 BCl_3 가스를 사용하여 0.25 ㎛/min의 식각율(etching rate)로 10분 간 AAO 나노틀을 식각하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0021] 본 발명의 제조방법의 또 다른 구현예에서 전극층은 Ag, Cu, Au, Pt 과 같은 귀금속을 주로 쓰나, 어떤 박막이던 전도성을 가지면 모두 전극층으로 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 제조방법의 다른 구현예에 있어서, Anode 층은 Pt가 지배적으로 쓰이지만 Pd, Ir 등도 가능하며, 이에 한정되지 아니한다.

[0023] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 금속 나노헤어 구조물에 키메릭(chimeric) 나노입자를 첨가하여 고정화한 3차원 나노구조 기반 나노센서를 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 키메릭 나노입자는 B형 간염 바이러스(HBV) 유래 키메릭 단백질인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0025] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 나노센서는 특정 질병 마커를 인지하는 항체를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 질병 마커는 트로포닌 I인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0027] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 본 발명의 키메릭 단백질 제조방법은 a) B형 간염 바이러스 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래하고, N-NdeI-hexahistidine-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-XhoI-C 및 N-BamHI-G4SG4-HBVcAg(81-149)-HindIII-C 의 합성을 코드하는 두 유전자 클론을 얻는 단계;b) 스타필로코커스 단백질 A(Staphylococcal protein A)의 B도메인(SPA_B)의 209-271 잔기의 탠덤 리피트로 HBVcAg의 P79A80를 대체하기 위하여, 두 다른 클론, N-XhoI-SPA_B-EcoRI-C 및 N-EcoRI-SPA_B-BamHI-C를 제조하는 단계; c) 상기 네 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여, N-His_6-HBVcAg(1-78)-SPA_B-SPA_B-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 플라즈미드 발현 벡터를 제조하는 단계; 및 d) 상기 발현벡터를 숙주에 형질전환하여 키메릭 단백질의 유전자를 발현하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0028] 본 명세서에 사용된 '키메릭 단백질' 또는 '키메릭 나노입자'는 최광의 의미로 사용된 것으로서 유전공학 또는 단백질공학 기술을 바탕으로 단백질 나노입자의 표면에 외래 생체 물질을 결합시킴으로써 다양한 기능성이 부여된 단백질 또는 단백질 나노입자를 의미한다. 비록 본 발명의 HBV 캡시드가 SPA_B의 표면 디스플레이를 위한 모델 바이러스 스카폴드(scaffold)로 사용되었지만, 다른 바이러스 또는 바이러스-유사 입자들도 표면 SPA_B를 디스플레이하는 키메릭 단백질 또는 키메릭 나노입자의 생성에 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명에서 'HBV 유래 키메릭 단백질'이란 최광의 의미로 사용된 것으로, HBV 유래 단백질에 외래 단백질을 결합시켜서 다양한 기능성이 부여된 단백질 또는 단백질 나노입자를 의미한다.

[0030] 본 발명에서 나노센서는 기체나 액체와 같은 유체 내 특정 화합물, 분자 또는 DNA, 단백질 등의 바이오물질을 감지하거나 특정분자의 분압 및 농도를 측정함과 더불어 진공장비 및 진공챔버의 진공도를 측정하거나 기체 누설위치를 파악하는데 사용되는 장치를 의미한다.

[0031] 이하 본 발명을 설명한다.

[0032] 본 발명의 실시예로 니켈나노헤어선 구조의 합성방법을 설명한다. 본 실시예 1의 전 과정은 도 1과 같다.

[0033] 본 발명의 실시예 1은 양극산화알루미늄 (anodized aluminum oxide, AAO) 나노틀 (nanotemplate) 내에서 1차원을 갖는 나노선의 합성에 이어, AAO 나노틀 위로 나노선이 노출된 구조를 갖는 나노헤어(Nanohair) 구조형성 방법에 관한 것으로서, 바이오분야에의 응용에 있어서 나노선을 촉매로 이용하여, 생체 외 (in vitro) 적용이 가능한 바이오 나노촉매소재 개발에 그 목적이 있다.

[0034] 본 실시예 1의 기술은 전기화학에 기반을 둔 기술로서, 반응물과 접촉해서 활성화에너지가 작은 반응을 만들어 주는 즉, 반응속도를 증진시키는 촉매 (catalyst)를 저비용의 대량생산이 가능한 제조방법에 관한 것이다. 이는 전해도금법에 의해 생성된 양극산화알루미늄 (AAO) 나노틀 (nanotemplate) 내에 니켈 나노선을 합성한 후, 선택적 (selective) 반응이온식각 (RIE)을 통한 니켈 나노선의 노출을 통해 구현된다.

[0035] 본 발명의 니켈나노구조의 제조과정은 나노선을 AAO 나노틀 내에 전기화학적 방법에 의해 합성한 후, 화학기계연마 (chemical mechanical polishing, CMP)를 통해 AAO와 나노선의 높이를 일정하게 평탄화시킨다. 이렇게 만들어진 시료는 반응이온식각 (reactive ion etching, RIE)장비를 이용한 식각공정을 통하여, AAO 나노틀을 선택적으로 식각처리한다. 위와 같은 공정을 통하여 최종적인 AAO 나노틀 표면에 머리카락처럼 노출된 나노헤어 구조 (nanohair structure)를 합성하게 된다. 이와 같이 구현된 나노헤어구조는 나노선끼리의 뭉침현상 없이, 매우 높은 밀도 (10^8개/cm^2)와 일정한 높이 (최대 60 ㎛)를 가지게 됨으로써, 나노뿐 아니라 바이오 및 환경분야에의 촉매로서의 응용성이 크게 도모된다.

[0036] '화학기계연마'란 평탄화 공정에 통상적으로 사용되는 방법 중 하나로 작용 표면에 회전 연마 패드에 대하여 압착되고, '슬러리'로 알려진 연마 및/또는 화학적 반응 용액이 연마 패드 위로 투입된다. 압력의 기계적인 효과가 연마 패드를 통하여 적용되고, 슬러리의 투입으로부터 야기된 화학반응이 작용 표면으로부터 물질들을

선택적으로 제거하여 층을 좀 더 균일하게 만든다. 전형적으로는 고순도를 가지는 탈이온수가 연마 용액에 기초로 적용되고, 여기에 연마 효과를 가지는 입자 및/또는 화학적 첨가제가 첨가된다. 화학기계연마 및 슬러리 등에 대한 더 많은 정보는 미국 특허 제 6,914,001호 및 제 6,887,137호에 기재되어 있다.

[0037] 본 발명의 명세서에 기재된 '트로포닌 I (Troponin)'은 심근경색증 환자의 혈중에서 발견되는 단백질의 종류로서, 이의 존재가 검지될 시에는 심장에 이상이 있는 것으로 판단된다.

[0038] 본 발명의 명세서에 기재된 '니켈 나노헤어구조 (Ni nanohair structure)'는 양극산화알루미늄(anodized aluminum oxide, AAO) 나노틀 안에 니켈 나노선을 합성한 후, 화학기계연마(chemical mechanical polishing, CMP)방법으로 나노선의 길이를 일정하게 만들고, AAO 나노틀을 반응성이온식각(Reactive ion etching, RIE) 공정을 이용하여 선택적으로 식각하여 나노선을 노출시킨 구조이며,

[0039] 본 발명의 명세서에 기재된 'PVDF 멤브레인 (Poly(vinyl difluoride) membrane)'은 소수성(물과의 친화성이 없음)과 작은 기공을 가진 폴리머 멤브레인으로서 본 발명에서는 450 nm 크기의 기공을 가진 멤브레인을 사용하였다.

[0040] 본 발명의 명세서에 기재된 '생체나노프로브'는 표적 검지용 프로브가 단백질 나노입자에 집적화된 센서소재로 사용된다.

[0041] 본 발명에서 본 발명자들은 항체와 니켈에 대한 이중 친화성을 가지게 고안된 바이러스 나노입자와 니켈 나노헤어를 포함하는 3차원 나노구조를 결합하여 통상의 ELISA 분석(Hirsch, L.R., Jackson, J.B., Lee, A., Halas, N.J. & West, J. *Anal. Chem.* **75**, 2377-2381 (2003);Nam, J.M., Park, S.J. & Mirkin, C.A. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3820-3821 (2002);Niemeyer, C.M. & Ceyhan, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 3685-3688 (2001);Chien, R.J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4984-4989 (2003);Wang, J., Polsky, R., Merkoci, A. & Turner, K.L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **43**, 2158-2161 (2004))을 사용한 경우보다 인간 혈청에서 10^{6}~10^{7} 낮은 트로포닌 수준을 검출할 수 있다는 것을 보였다. 바이러스 나노입자는 트로포닌 마커의 최대 캡쳐를 위하여 항체의 배향성을 돕는다. 나노구조에 결합된 고밀도에서 항체에 트로포닌 마커의 더 큰 결합은 검출 민감도를 크게 증가시킨다. 니켈 나노헤어는 재생가능하고 건강하지 않은 혈청으로부터 건강한 혈청을 재생적으로 구분할 수 있다. 본 발명자들은 여러 다른 단백질 마커에 대한 유사한 높은 민감성 진단 분석을 형성하는 다른 바이러스 나노입자를 예상한다.

[0042] 한편, HBV 코어 단백질은 4 긴 알파-나선 번들로 구성되고(도 3), 박테리아에서 발현 시, 바이러스의 천연 캡시드 구조(Bottcher, B., Wynne, S.A. & Crowther, R.A. *Nature* **386**, 88-91 (1997); Crowther, R.A. et al. *Cell* **77**, 943-950 (1994))와 매우 흡사한 코어 쉘 입자로 결합된다. 전자 저온 현미경 분석을 통하여, 브쳐 등은 149 잔기 이후가 트런케이트된 싱글 HBV 코어 단백질은 240 소단위체를 포함하는 코어 쉘 입자를 형성하고 전체 36 nm 직경을 가진다고 보고하였다(Bottcher, B., Wynne, S.A. & Crowther, R.A. *Nature* **386**, 88-91 (1997). 소단위체의 다이머 클러스터링은 쉘 입자의 표면 상에 스파이크를 형성하고, 그 면역성 에피토프는 돌기한 표면 스파이크에 위치한다(도 3). 그 표면 , 된 스파이크 팁은 단일 코어 단백질의 D78에서 D83 잔기로 구성된 루프 부위에 해당된다. 본 발명자들은 루프 부위의 P79A80를 탠덤 리피트된 SPA_B 서열로 대체하여, 결론적으로 고밀도를 가지는 입자된 키메릭 나노입자의 표면에 , 되게 하였다(도 3). 키메릭 나노입자 입자에서, 본 발명자들은 키메릭 나노입자가 니켈에 대하여 강한 친화성을 가지게 트런케이트된 HBV 코어 단백질의 N-말단에 헥사히스티딘을 첨가하였다(도 3). TEM 이미지 분석(도 3)은 대장균에서 발현된 HBV 캡시드-유래 나노입자가 거의 자연적인 직경을 가지는 구형 나노입자로 결합되는 것을 나타낸다. 결론적으로, 그 키메릭 나노입자는 항체의 (IgG)의 Fc 도메인과 니켈에 이중 친화성을 가진다. 이들 바이러스 나노 입자들은 관심이 있는 생체분자를 검출 및/또는 정량하기 위하여 사용되는 그들의 여러 표면 펩타이드 및 단백질 상에 나타낼 수 있다.

[0043] 도 4에 나타낸 바와 같이 3-차원 분석 시스템은 Ni 나노헤어 구조 또는 다공성(porous) 막과 키메릭 나노입자를 결합하고, 단백질 마커들을 특이적으로 결합하는 항체를 첨가하여 개발되었다. 본 발명에서 '나노헤어'란 일부 와이어들은 공기 중에 노출되고, 나머지는 서포팅 유기 또는 무기 템플레이트에 들어가 있는 나노와이어의 어레이를 의미한다(도 4). 이 구조에서 나노와이어의 공기-노출된 부분이 매우 증가된 표면 대 부피 비를 가진다.

[0044] 항체들이 헥사히스티딘과 니켈 사이의 친화성 상호작용에 의하여 니켈 나노헤어 표면 상에 이미 부착된 키메릭 나노입자에 첨가될 때(도 3), 항체(IgG)의 Fc 도메인이 특이적으로 키메릭 나노입자의 표면 SPA_B 에 특이

적으로 결합되고 따라서 IgG의 항원-특이적인 가변 도메인은 완전하게 단백질 마커에 접근할 수 있다. 결론적으로 도 4에 나타난 바와 같이, 효과적인 3-차원 분석 시스템은 다음과 같은 우수한 효과를 가지게 개발되었다: (i) 항체의 조절된 배향성 및 단백질 캡처의 3차원 방법에 기인하여 허용된 항체에 대한 단백질 마커의 최대 접근성 및 (ii) 3차원 나노 헤어 표면에 대한 단백질 마커에 대한 항체의 크게 증가된 밀도 및 비율. 그 포착된 마커들은 2차 항체에 부착된 양자 점들에 의하여 방사된 광루미네선스를 센싱하여 검출되었다(도 4).

[0045] 도 5로부터, ELISA-기반 분석(실시예 참고)은 대략 0.1 nM보다 낮은 농도에서 트로포닌 I(PBS 버퍼 또는 건강한 혈청에서)을 검출하지 않았고, 각 트로포닌 I 농도에서 매우 높은 재생성 신호를 가졌다. 본 발명에서 개발된 키메릭 나노입자 + Ni 나노헤어 시스템을 사용하면, 그 민감도는 최근 보고된(Apple, F.S., Smith, S.W., Pearce, L.A., Ler, R. & Murakami, M.M. *Clin. Chem.* **54**, 723-728 (2008)) 가장 높은 수준(0.25pM)보다 대략 100,000-배 더 높은 민감도를 가지고, 현재의 ELISA 분석(Rosi, N.L. & Mirkin, C.A. *Chem. Rev.* **105**, 1547-1562 (2005);Hirsch, L.R., Jackson, J.B., Lee, A., Halas, N.J. & West, J. *Anal. Chem.* **75**, 2377-2381 (2003);Nam, J.M., Park, S.J. & Mirkin, C.A. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3820-3821 (2002);Niemeyer, C.M. & Ceyhan, B. D*Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 3685-3688 (2001);Chien, R.J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4984-4989 (2003);Wang, J., Polsky, R., Merkoci, A. & Turner, K.L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **43**, 2158-2161 (2004))보다는 10^{6}~10^{7} 더 민감한 낮은 10^{-18} 수준으로 크게 상승한다(도 6). Ni 나노헤어의 세척된 표면에 키메릭 나노입자의 결합에서(즉 도 7의 B 단계), 그 Ni 나노헤어 표면은 도 6의 대조군의 결과에서 확인되는 것과 같이 광루미네선스의 가짜 신호를 야기하는 맨(bare) 니켈 표면에 Qdot-2차 항체의 특이적 결합을 저해하기에 충분한 양의 키메릭 나노입자로 도포되었다(도 13). 또 AMI 환자 혈청에서 트로포닌 I은 동일한 분석 시스템과 방법을 사용하여 성공적으로 검출할 수 있고, 트로포닌 I-없는 PBS 버퍼 및 건강한 혈청은 단지 무시할 정도의 신호를 준다(도 6).

[0046] 본 발명의 현저한 효과 중 하나는 동일한 Ni 나노헤어 구조를 다중 샘플에서 반복적으로 사용할 수 있다는 것이다. 세척과 헹굼 과정을 통하여(즉 도 7의 A 단계), 그 사용된 Ni 나노헤어는 재사용가능하고 다른 샘플분석에 재사용할 수 있다. 모든 세 분리된 Ni 나노헤어 구조들은 8 다른 샘플의 연속적인 분석에 성공적으로 사용되었다. 각 연속적인 분석은 테스트된 모든 샘플에 대한 재생적이고 일관된 신호를 보였다.

[0047] 평균 450 nm의 크기를 가진 PVDF 막은 키메릭 나노입자가 용이하게 고정되는 소수성 포어 표면을 가지는 적당한 나노구조체이고 따라서 또 다른 타입의 3차원 분석 시스템을 구축하는데 사용하였다. 도 9에서 알 수 있는 바와 같이, 키메릭 나노입자에 부착된 항체들은 모든 농도에서 트로포닌 I을 가지는 PBS 버퍼와 건강한 혈청 모두에서 트로포닌 I을 재생적으로 검출할 수 있었다. 트로포닌 I의 10^{-18} 검출 한계도 Ni 나노헤어 기반 분석에 비견될만한 한다. 또 PVDF 표면에 직접 고정된 항체를 가지는 분석은 키메릭 나노입자들을 사용한 분석에 비하여 현저하게 낮은 민감도를 보였다(도 10). 이것은 항체들의 배향성에 기인하는 것 같다. PVDF 표면에 직접 고정된 것들은 랜덤하고 트로포닌 I에 낮은 접근성을 가진다. 키메릭 나노입자에 고정된 항체의 배향성은 분석의 민감도에서 중요한 것으로 나타났다.

[0048] 본 발명자들은 AMI를 경험한 26 AMI 환자(표 1)의 임상 진단에서 PVDF-기반 시스템을 테스트하였고, 그 분석 결과를 ELISA-기반 분석과 비교하였다(도 11의 a 및 b). ELISA-기반 분석에서(도 11의 b), 세 (No. 4, 9, 및 18) AMI 환자 혈청은 양성으로 검출되지 않았고, 즉 흡광 신호가 임상 컷오프 값 이하였고(수평 점선으로 나타냄), 9명(No. 1,2,3,5,8,11,16, 17, 및 23) AMI 환자 혈청으로부터 온 신호들은 양성이었으나 임상 컷오프 바로 근처였지만, 키메릭 나노입자 + PVDF-기반 분석은 모든 26 AMI 환자 혈청에서 명확한 양성 신호를 나타냈고, 따라서 100 % 임상 성을 나타내었다(도 11). (상기 ELISA 분석결과는 제공업자들에 의하여 그 ELISA 키트의 임상성이 87.5%로 정의되었기 때문에 놀라지 않았다) 또 PVDF 표면에 직접 고정된 항체들은 1000-배 희석된 AMI 환자 혈청을 진단하는데 실패한 반면에, 키메릭 나노입자 + PVDF-기반 분석은 그 희석된 환자 혈청에서 트로포닌I를 검출할 수 있었서(도 12), 본 발명의 3차원 분석이 매우 적은 양의 환자 혈청에서도 AMI의 발병을 구분할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0049] HBV 캡시드-유래된 키메릭 나노입자 및 3-차원 나노구조체(Ni 나노헤어)을 사용하여 본 발명자들은 트로포닌 I 또는 특정의 AMI 마커에 대한 매우 큰 민감성과 특이성을 가지는 분석 시스템을 개발하였다. 비록 본 발명의 HBV 캡시드가 SPA_B의 표면 디스플레이를 위한 모델 바이러스 스카폴드로 사용되었지만, 다른 바이러스 또는 바이러스-유사 입자들도 표면 SPA_B를 디스플레이하는 키메릭 나노입자의 생성에 사용될 수 있다. 아마도 단백질 캡처의 3차원 방법과 고밀도 고정화된 항체들의 조절된 배향성으로 인하여 그 분석 민감도 및 임상 특이성은 통상의 ELISA 분석에 비교하여 크게 증가된 것이다.

발명의 효과

[0050] 본 발명의 나노헤어 구조는 나노선끼리의 뭉침현상을 배제하여, 고효율 수득률의 화학적 검출을 위한 공정방법으로써, 나노틀 외부로 노출된 부분에 생체기능성이 부여된 나노선 재료를 합성하여 나노기술(NT)뿐 아니라 바이오기술(BT)분야에서의 응용성이 크며, 키메릭 나노입자 및 3-차원 나노구조체(Ni 나노헤어 및 PVDF 막)을 사용한 본 발명의 분석 시스템은 질병진단 마커의 검출용의 용도로 매우 큰 민감성과 특이성을 가지며, 본 발명에서는 트로포닌 I 또는 특정의 AMI 마커와 같은 단백질 마커에 대한 매우 큰 민감성과 특이성을 가진다는 것을 보였다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 일련적인 공정모식도로 나노헤어 구조의 제조방법을 나타낸다. : 도1(a)는 양극산화알루미늄 나노틀의 합성, 도1(b)는 전자빔증착법에 의한 전도층 (Ag, 300~400 nm)의 증착, 도1(c)는 나노틀 내부에의 나노선의 합성, 도1(d)는 나노틀과 나노선의 평탄화공정, 도1(e)는 나노헤어 구조를 위한 나노틀의 선택적인 식각공정

도 2는 본 발명의 실시예인 니켈나노헤어 구조의 주사전자현미경 (Field Emission-Scanning Electron Microscope, FE-SEM) 사진을 나타낸다.:

도2(a)와 (b)는 화학기계연마 (CMP) 공정에 의해 평탄화된 평면도, 도2(c)와 (d)는 CMP 공정에 의해 평탄화된 단면도, 도2(e)와 (f)는 나노틀의 선택적 반응이온식각 (RIE) 공정에 의한 니켈나노헤어선 구조의 단면도.

도 3-4는 바이러스 나노입자에 기반한 3차원 진단 분석방법을 나타낸다. 도 3은 천연 B형 간염바이러스, (HBV) 캡시드 입자 및 대장균에서 합성된 키메릭 나노입자의 TEM 이미지 및 도식이며, 도 4는 96-웰 마이크로플에레이트에서 수행된 진단 시스템의 도식화 및 그 분석 원리이다, 요약하면, 그 질병 마커(이 경우에는 트로포닌 I)를 인지하는 항체들은 키메릭 나노입자에 결합하고 특정한 방법의 배향성을 가진다. 트로포닌 I이 항체에 결합하고, 검출은 양자 점과 컨쥬게이트된 2차 항체로 수행된다.

도 5-6은 트로포닌 I의 검출을 나타내는 그림이다. 도 5는 통상의 ELISA 분석이 0.1 nM보다 낮은 농도에서는 트로포닌 I을 검출하지 못한다는 것을 보여주고, 도 6은 키메릭 나노입자와 니켈 나노헤어를 사용한 분석은 PBS 및 인간 혈청 모두에서 10^{-18}(attomolar)의 민감도를 보여주는 것을 나타낸다. "대조군"은 충분한 양의 키메릭 나노입자(PBS 버퍼 50에 30nM)로 도포된 Ni 나노헤어 표면에 단지 Qdot-2차 항체만을 첨가한 실험을 의미한다.

도 7-8은 세척가능하고 재생가능한 분석 시스템을 나타낸다. 도 7은 검출을 위한 니켈 나노헤어의 세척과 재사용을 위한 4단계 프로토콜이다. 도 8은 세 분리된 시스템을 사용한 8 다른 트로포닌 I (Tn) 샘플의 연속적인 분석이 우수한 재생성을 나타내는 것을 보여준다. A, B, C, D, 점선과 실선 및 PL_1/PL_2는 a에 것에 해당한다. 검은 직사각형은 전체 PL 증가를 나타낸다.

도 9-10은 PVDF 막에 대한 트로포닌 I 분석을 나타낸다. 도 9는 PVDF 막에 고정된 키메릭 나노입자가 PBS 및 인간 혈청 모두에서 유사한 검출 민감도를 나타내는 것을 보여준다. 도 10은 PVDF 막에 직접 고정된 항체는 키메릭 나노입자에 고정된 것에 비하여 현저하게 낮은 민감도를 보여준다.

도 11-12는 바이러스 키메릭 나노입자 기반 분석의 임상 특이성 및 민감도를 나타낸 그림이다. 16 건강한 사람과 26 AMI 환자로부터 유래한 혈청 분석에서, PVDF 막의 키메릭 나노입자를 사용한 경우에는 모든 환자의 트로포닌 I이 명확하게 검출되었고(도 11의 a 참고). ELISA-기반 진단은 3 환자(4, 9, 18번)에서는 검출에 실패하였고, 9명은 진단 컷오프 신호(수평 점선)에 매우 근접한 모호한 신호를 나타냈다(도 11의 b). 도 12는 키메릭 나노입자에 부착된 항체에서는 1000X 배 희석된 샘플에서 트로포닌 I을 검출할 수 있었지만 PVDF에 직접 고정된 것에서는 검출할 수 없었다것을 보여준다. 74/M 및 75/F는 AMI 환자의 연령과 성별을 나타낸다.

도 13은 니켈 표면에 비특이적인 Qdot-2차 항체의 결합을 방해하는 맨(bare) 니켈 표면에 첨가된 HVB 캡시드-유래 키메릭 나노입자의 양을 결정하는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 예시의 목적으로 기재된 것으로, 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되지 아니한다.

[0053] 실시예 1:니켈나노헤어선 구조의 합성방법

[0054] - 니켈 나노선의 합성 -

[0055] 도 1(a)과 같이 균일한 구멍 직경 (수 십 nm~ 수 백 nm)을 가진 양극산화 알루미늄 나노틀 (AAO: Anodized Alumina Oxide)을 합성한다. 그 후 도 1(b)와 같이 작업전극 (working electrode)으로써 은 (Ag)을 전자빔증착기로 250~350 nm 두께로 AAO의 한쪽 면에 증착한다. 그 후 Nickel Sulfate ($NiSO_4$?$6H_2O$, 0.5M) + Nickel Chloride ($NiCl_2$?$6H_2O$, 0.1M) + Boric acid (H_3BO_3, 0.1M) 용액에 도 1(c)과 같이 AAO를 넣은 후, 상대전극 (counter electrode)을 백금 (Pt)으로 하여 니켈 나노선을 증착한다. 여기서 Nickel Sulfate는 도금의 주성분이며, Nickel Chloride는 전기적 전도성 증가, Boric acid는 pH의 항상성을 위한 버퍼 (Buffer)용액으로 쓰인다.

[0056] - 니켈 나노선의 평탄화 -

[0057] 그 후 도 1(c)와 같이 AAO내부에서 넘침 (overflow)이나 모자란 (underflow) 성장을 한 나노선의 높이를 AAO 나노틀과 동일시하기 위하여 화학적기계적연마 (CMP: Chemical Mechanical Polishing)공정을 통하여 대략 10 μm 정도 연마를 실시한다.

[0058] - 니켈 나노선의 AAO위로의 노출 -

[0059] 이후 마지막 단계인, 니켈 나노선의 노출을 위하여 AAO 나노틀의 선택적인 반응이온식각 (RIE: Reactive Ion Etching)공정이 이루어진다. 이 공정은 BCl_3 (100%) gas를 사용하여 0.25 μm/분의 식각률(etching rate)로 10분 간 AAO를 식각한다. 이후 수세공정 (DI water:초순수 물, Ethanol)을 마치면 표면이 깨끗한 니켈나노헤어선구조의 공정을 마무리하게 된다.

[0060] *실시예 2: HBV 캡시드-유래 키메릭 나노입자의 생합성

[0061] 하기 표 1에 기재된 프라이머를 사용한 어셈블리 PCR 후에, 본 발명자들은 HBV 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래하고, *N*-*Nde*I-hexahistidine-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-*Xho*I-*C* 및 *N*-*Bam*HI-G4SG4-HBVcAg(81-149)-*Hind*III-*C* 의 합성을 코드하는 두 유전자 클론을 얻었다. 또 SPA_B (209-271 잔기)의 탠덤 리피트로 HBVcAg의 P79A80를 대체하기 위하여, 두 다른 클론, *N*-*Xho*I-SPA_B-*Eco*RI-*C* 및 *N*-*Eco*RI-SPA_B-*Bam*HI-*C*를 제조하였다. 플라즈미드 pT7-7에 상기 네 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여, 본 발명자들은 *N*-His_6-HBVcAg(1-78)-SPA_B-SPA_B-HBVcAg(81-149)-*C*의 합성을 코딩하는 플라즈미드 발현 벡터 pT7-Chimera-HBV를 구축하였다. 젤-정제된 플라즈미드 발현 벡터의 완전한 DNA 시퀀싱 후, *E. coli* 균주 BL21(DE3)[F^- *ompT* *hsd*S_B(r_B^- m_B^-)]를 pT7-Chimera-HBV로 형질전환하고, 앰피실린-저항성 형질전환체를 선택하였다. 키메릭 나노입자의 유전자 발현, 정제 및 TEM 이미지 분석은 Ahn, J.Y. et al. *Nucl. Acids Res.* **33**, 3751-3762 (2005)에 기재된 것과 같은 방법으로 수행하였다.

[0062] HBV 캡시드 유래 키메릭 나노입자의 제조와 관련된 프라이머 서열과 주형에 대한 정보 및 이에 대한 좀 더 상세한 기재는 아래와 같다.

표 1

[0063]

유전자명		프라이머	서열번호	염기서열
Hepatitis B virus capsid	N-terminus of HBV capsid (유전자 서열 1-234)	센스	서열번호 1	**cat atg** *cat cac cat cac cat cac* gac att gac ccg tat aaa gaa
		안티센스	서열번호 2	ccc act ccc tcc gcc acc gtc ttc caa att act tcc cac cca
		안티센스	서열번호 3	**ctc gag** agt acc gcc tcc ccc act ccc tcc gcc acc
	C-terminus of HBV capsid (유전자 서열 241-447)	센스	서열번호 4	**gga tcc** gga tcc ggt ggc gga ggg tct ggg gga ggc ggt
		센스	서열번호 5	ggc gga ggg tct ggg gga ggc ggt tcc agg gga tta gta gtc agc tat
		안티센스	서열번호 6	**aag ctt** tta aac aac agt agt ttc cgg aag

Staphylococcal protein A의 B 도메인	센스	서열번호 7	**ctc gag** gca ccg aaa gct gat aac
	안티센스	서열번호 8	**gaa ttc** gtc agc ttt tgg tgc ttg
	센스	서열번호 9	**gaa ttc** gca ccg aaa gct gat aac
	안티센스	서열번호 10	**gga tcc** gtc agc ttt tgg tgc ttg

[0064] 표 1은 프라이머 서열을 나타내며, 볼드체는 제한효소 염기서열, 밑줄 : 링커(linker) 염기서열, *Italic* : 6개의 히스티딘 염기서열을 나타낸다.

[0065] HBV 캡시드 유래 키메릭 나노입자는 크게 캡시드 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분, 스태필로코컬 프로틴 에이(Staphylococcal protein A)가 연속적으로 2개 포함되어 있는 부분, 그리고 캡시드 단백질의 81-149번째 아미노산 서열부분으로 나눌 수 있다.(캡시드 단백질의 1-78번째 서열은 : NCBI Nucleotide accession number: AF286594의 염기서열 : 1901-2134(서열번호 12) 및 아미노산 서열(서열번호 13), 캡시드 단백질의 81-149번째 염기서열은 AF286594의 염기서열 2141-2347(서열번호 14) 및 아미노산 서열은 서열번호 15 그리고 프로틴 에이의 서열은 NCBI nucleotide accession No. M18264, nucleotide sequence 625-813(서열번호 11), 및 아미노산 서열은 서열번호 16)

[0066] 첫 번째 부분은 HBV 캡시드 단백질의 유전자 서열 (NCBI Nucleotide accession number: AF286594 서열 중 1901-2452 서열)을 주형으로 하여 6개의 히스티딘이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 1과 링커서열(아미노산 서열 GGGGSGGGGT)을 포함하고 있는 프라이머 서열 2,3을 이용하여 확장 PCR(extension PCR)을 진행하였다. 우선 프라이버 서열 1과 2를 이용해서 PCR을 진행한 후, 합성된 PCR 산물을 주형으로 프라이머 서열 1과 3을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 5 '-*Nde*I-HBV 캡시드 단백질(아미노산 서열 1-78)-링커서열(GGGGSGGGT)-*Xho*I-3' 으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0067] 두 번째 부분은 *Staphylococcus aureus*의 protein A(SPA) 염기서열 (NCBI Nucleotide accession number: M18264) 중 B 도메인 부분(SPA_B)을 주형으로 하여 프라이머 염기서열 7과 8, 그리고 9와 10을 이용하여 5 '-*Xho*I-SPA_B-*Eco*RI-3', 5'-*Eco*RI-SPA_B-*Bam*HI-3' 을 형성하는 두 개의 protein A B도메인을 PCR 산물을 확보하였다.

[0068] 세 번째 부분은 HBV 캡시드 단백질의 유전자 서열을 주형으로 하여 링커서열(아미노산 서열 GGGGSGGGG)을 포함하고 있는 프라이머 서열 4, 5와 프라이머 서열 6을 이용하여 확장 PCR을 수행하였다. 먼저 프라이머 서열 5와 6을 이용해서 PCR을 수행한 후, 합성된 PCR 산물을 다시 주형으로 하여 프라이머 서열 4와 6을 이용해서 PCR을 수행하였다. 그 결과 5 '-*Bam*HI-링커서열(GGGGSGGGG)-HBV 캡시드 단백질(아미노산 서열 81-149)-*Hind*IIII-3' 으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0069] 실시예 3:바이러스 나노입자을 사용한 3-차원 진단 시스템의 구축

[0070] Ni 나노헤어-기반 시스템: 상기 실시예 1에 의하여 제조된 니켈 나노헤어 구조를 Costar 96 웰 플레이트(Cat. No. 3599, Corning, NY, USA) 속에 위치시켰다. 키메릭 나노입자를 고정화하기 전, 각 웰 내의 Ni 나노헤어를 0.3 M 황산을 사용하여 15분 동안 4회 세척하고, 증류수를 사용하여 10분 동안 6회 세척한 후 완전하게 건조하였다. 다음, 각각 420와 650 nm의 여기 및 방사를 가지는 마이크로플레이트 리더(GENios, Tecan, Austria)를 사용하여 Ni 나노헤어 구조로부터 배경 광루미네선스를 측정하였다. 실시예 2에서 제조된 38-nM 키메릭 나노입자를 가지는 50㎕의 PBS 버퍼를 Ni 나노헤어 구조에 첨가하고, 50 mM Tris 버퍼(pH 7.4)로 세척한 후 30분 동안 천천히 교반하였다. 래빗 항-트로포닌 다클론 항체(5 /ml, Cat. No. ab470003, Abcam, Cambridge, UK)를 포함하고 있는 200 ㎕의 PBS 버퍼를 Ni 나노헤어 상에 이미 고정된 키메릭 나노입자에 첨가한 뒤, 2 시간 동안 천천히 교반하여 키메릭 나노입자 표면에 항체를 고정화 하였다.

[0071] PVDF-기반 시스템: Costar 96 웰 플레이트 내에 PVDF 막(Immobilion-FL, IPFL 10100, Millipore, MA, U.S.A.)을 1 분 동안 메탄올에 미리 담가 놓고, 5-10분 동안 PBS 버퍼(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, pH 7.4)로 세척하였다. 그 PVDF 막이 완전하게 건조되기 전에, 실시예 2에서 정제된 키메릭 나노입자를 포함한 PBS 버퍼 10 ㎕를 막의 정해진 지점에 떨어트렸다. 그 후에 그 막을 불럭킹 용액(1% 탈지유)에서 1시간 동안 천천히 교반하고, 30분 동안 PBS 버퍼로 2회 세척하였다. 키메릭 단백질 나노입자가 고정화되어 있는 PVDF 막을 염소 항-트로포닌 I 다클론 항체(PBS 버퍼 내 20 μg/ml; Cat. No. 70-XG82, Fitzgerald, MA, USA)가 포함되어 있는 200 ㎕의 PBS 버퍼에서 2시간 동안 천천히 교반하여 키메릭 나노입자 표면에 항체를 고정화 하였다.

[0072] 실험예 1: 트로포닌 I의 검출 및 AMI 환자의 진단

[0073] 항-트로포닌 I 항체, 실시예 2에서 제조된 HBV 캡시드-유래 키메릭 나노입자, 및 실시예 1에서 제조된 Ni 나노헤어 구조(또는 PVDF 막)으로 구성된 3차원 진단 시스템에, 200㎕의 인간 혈청(AMI 환자- 또는 건강한 혈청) 또는 트로포닌(인간 심장 트로포닌 I-T-C 복합체, Cat. No. 8T62, HyTest, Finland)이 포함된 PBS 버퍼를 첨가하고, 20 초간 교반하고 상온에서 1시간 배양하였다. PBS 버퍼를 사용하여 5분 세척 후, PBS 버퍼 내의 200 ㎕의 마우스 항-트로포닌 I 단클론 항체(3.2 ㎍/ml, Cat. No. 4T21, HyTest, Finland)를 첨가하고, 20 초간 교반하고 상온에서 1시간 배양한 후 PBS 버퍼를 사용하여 5분 세척하였다. 200 ㎕의 Qdot(CdSe)-2차 Ab 컨쥬케이트[1 nM, Qdot 655-염소 F(ab')$_2$ 항-마우스 IgG 컨쥬게이트, Cat. No. Q11021MP, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA]를 첨가하고, 20 초간 교반하고 상온에서 1 시간 배양하고 최종적으로 PBS 버퍼를 사용하여 10분 동안 세척하였다. 그 후 각각 420와 650 nm의 여기 및 방사를 가지는 마이크로플레이트 리더(GENios, Tecan, Austria)를 사용하여 광루미네선스를 측정하였다.

[0074] 본 발명에서 모든 ELISA 분석 실험은 인 비트로 진단용으로 개발된 통상적인 ELISA 트로포닌 에세이 키트(Troponin I EIA, Cat. No. 25-TR1HU-E01, 96 wells, ALPCO Diagnostics, NH, USA)을 사용하여 수행되었다. 간단하게 요약하면 첨부된 키트 프로토콜에 따라, 1) 100㎕의 인간 혈청(AMI 환자- 또는 건강한 혈청) 또는 트로포닌(인간 심장 트로포닌 I-T-C 복합체, Cat. No. 8T62, HyTest, Finland)이 포함된 PBS 버퍼를 제공업자가 제공한 96-웰 마이크로플레이트에 항체-코팅된 웰에 첨가하고; 2) 100 ㎕의 "효소 컨쥬케이트 시약(HRP 효소로 컨쥬케이트된 항-트로포닌 I 항체를 함유한)을 각 웰에 첨가 후, 30초간 충분하게 혼합한 후, 90분간 상온에서 배양한 후, 증류수로 5회 세척하였다; 3) 모든 잔류 물방울을 제거하기 위하여 흡수 페이터 상에 웰을 세게 두드린 후, 100 ㎕의 "TMB 시약(HRP 효소에 대한 기질을 함유)"을 각 웰 내에 첨가한 후, 5초간 혼합하고, 20분 동안 상온에서 배양하였다; 4) 효소 반응을 중지하기 위하여 100 ㎕의 "Stop 용액"을 각 웰에 첨가하고 30초간 혼합하고; 420nm에서 마이크로플레이트 리더(GENios, Tecan, Austria)를 사용하여 흡광도을 측정하였다.

[0075] 트로포닌 I EIA는 87.5%의 임상적 특이성을 가지는 인간 심장-특이적 트로포닌 I의 정량적 측정값에 대한 신뢰성 높은 분석을 제공한다. 트로포닌 I EIA 프로토콜에서 기재된 방법은 트로포닌 I 분석에 대하여 엄격하게 따랐고, 그 분석방법은 다음과 같았다. AMI 및 건강한 혈청의 전체 리스트는 하기 표 2에 기재된다.

표 2

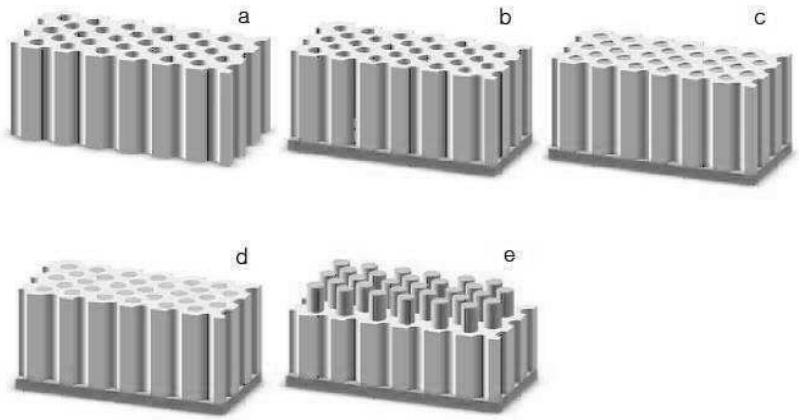
[0076]

AMI 환자 혈청			
No.	연령	성별	병원
1	74	M	강남 성심병원
2	75	F	
3	58	M	
4	68	M	
5	63	M	
6	80	M	
7	59	M	
8	68	M	
9	74	M	
10	77	F	
11	86	F	
12	85	F	
13	52	F	
14	43	M	
15	68	M	
16	59	F	
17	84	F	
18	58	M	
19	37	M	

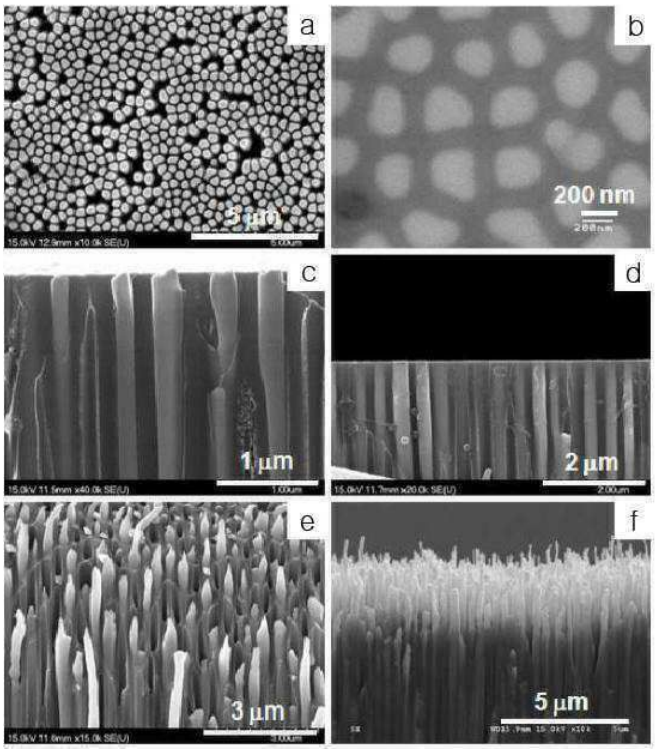
20	42	M	고려대 의료원 [*: 체외 순환법으로 심장중격 결손 수술로 인한 심근 손상 경험자]
21*	3	F	
22	91	M	
23	72	F	
24	79	F	
25	89	F	
26	57	M	
건강한 혈청			
No.	연령	성별	병원
1	34	M	고려대 의료원
2	24	M	
3	28	M	
4	25	F	
5	45	M	
6	24	M	
7	27	M	
8	24	F	
9	31	F	
10	25	M	
11	30	F	
12	24	M	
13	26	F	
14	48	M	
15	26	F	
16	29	M	

도면

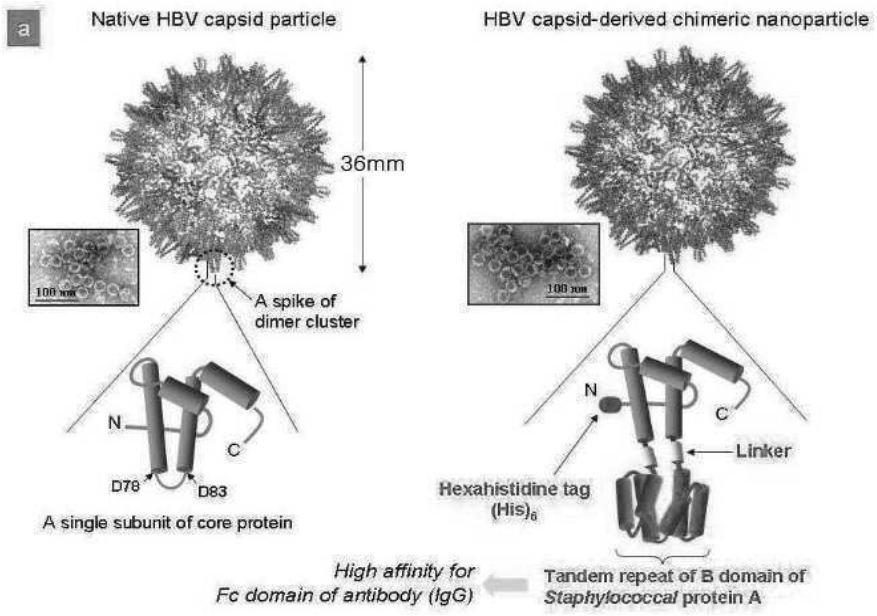
도면1



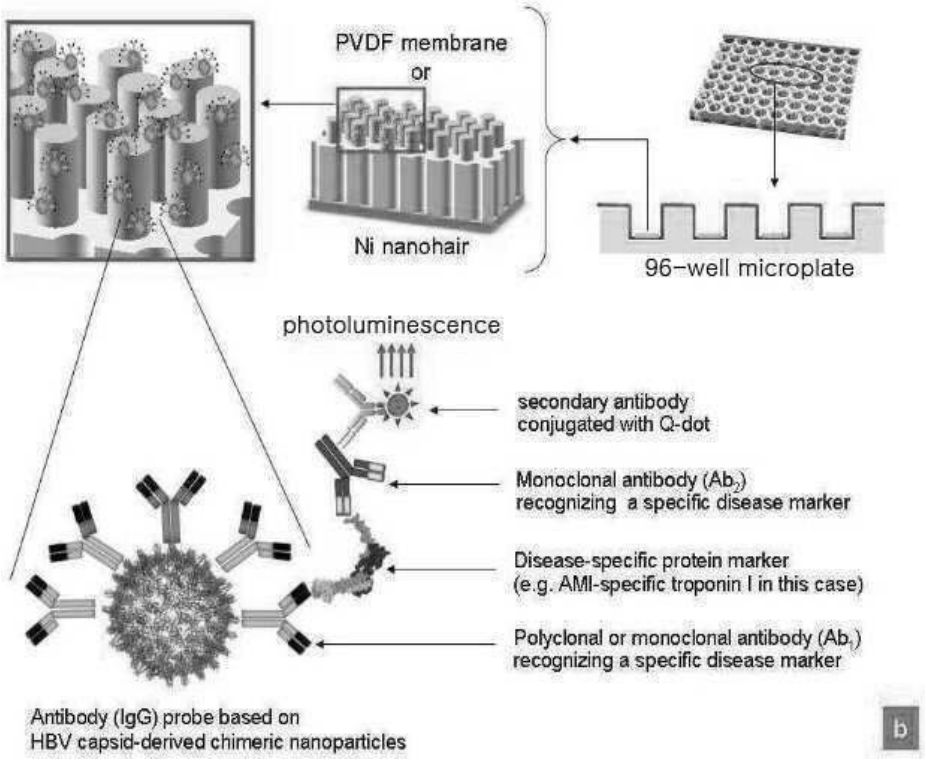
도면2


a
5 μm
b
200 nm
c
1 μm
d
2 μm
e
3 μm
f
5 μm

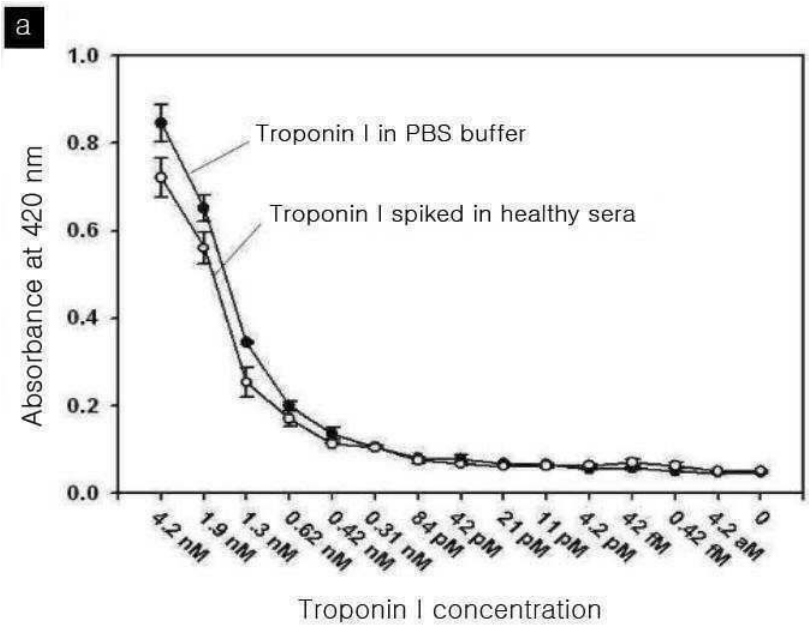
도면3


a
Native HBV capsid particle
HBV capsid-derived chimeric nanoparticle
36mm
100 nm
A spike of dimer cluster
N
C
D78
D83
A single subunit of core protein
100 nm
N
C
Linker
Hexahistidine tag
(His)6
High affinity for
Fc domain of antibody (IgG)
Tandem repeat of B domain of
Staphylococcal protein A

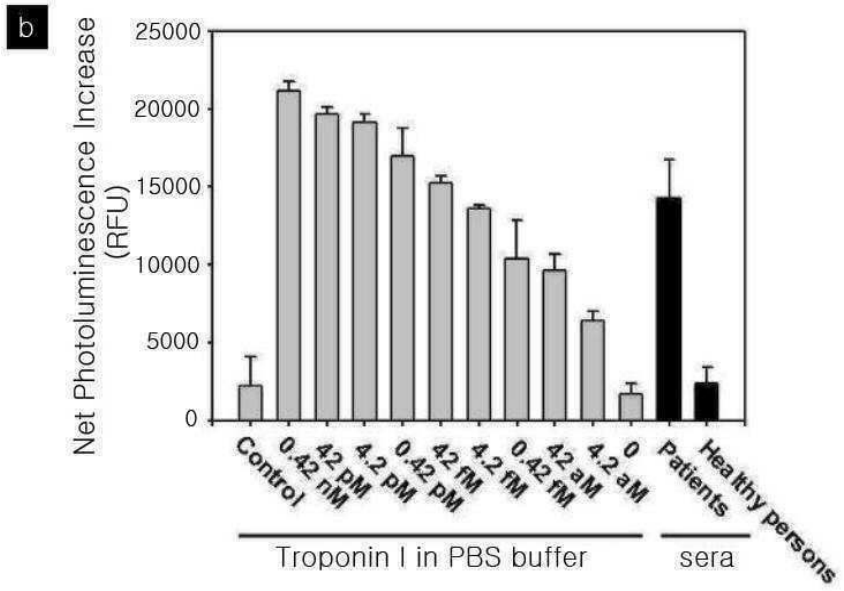
도면4


PVDF membrane
or
Ni nanohair
96-well microplate
photoluminescence
secondary antibody
conjugated with Q-dot
Monoclonal antibody (Ab2)
recognizing a specific disease marker
Disease-specific protein marker
(e.g. AMI-specific troponin I in this case)
Polyclonal or monoclonal antibody (Ab1)
recognizing a specific disease marker
Antibody (IgG) probe based on
HBV capsid-derived chimeric nanoparticles
b

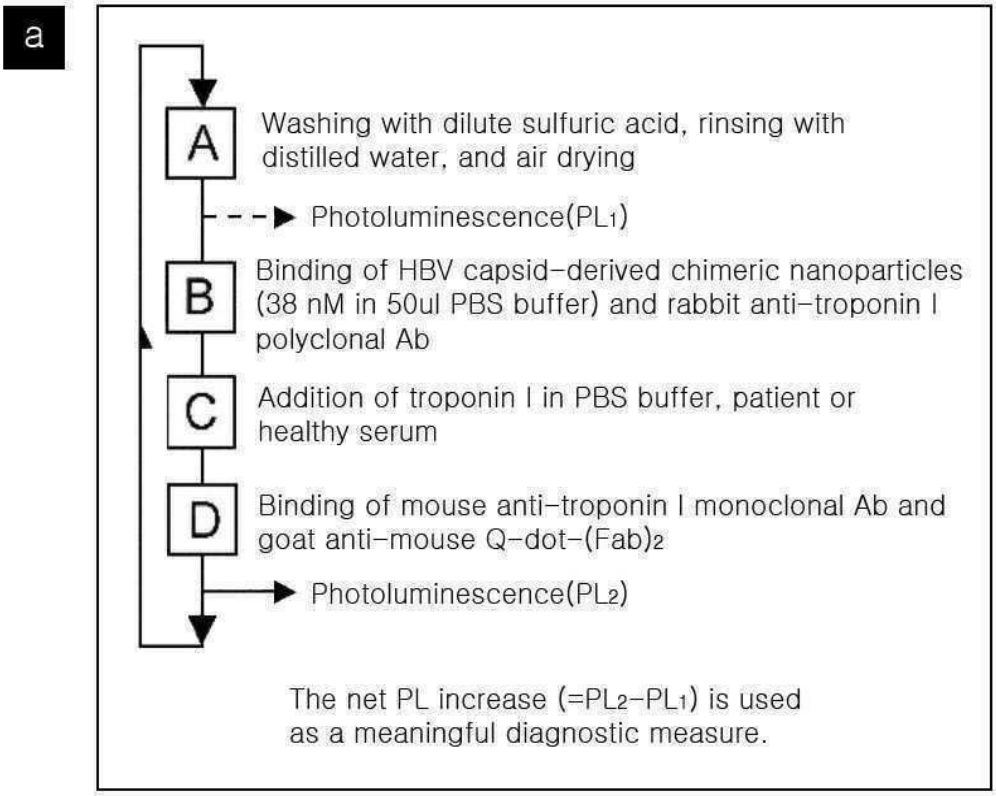
도면5


a
Absorbance at 420 nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Troponin I in PBS buffer
Troponin I spiked in healthy sera
4.2 nM
1.9 nM
1.3 nM
0.62 nM
0.42 nM
0.31 nM
84 pM
42 pM
21 pM
11 pM
4.2 pM
42 fM
0.42 fM
4.2 aM
0
Troponin I concentration

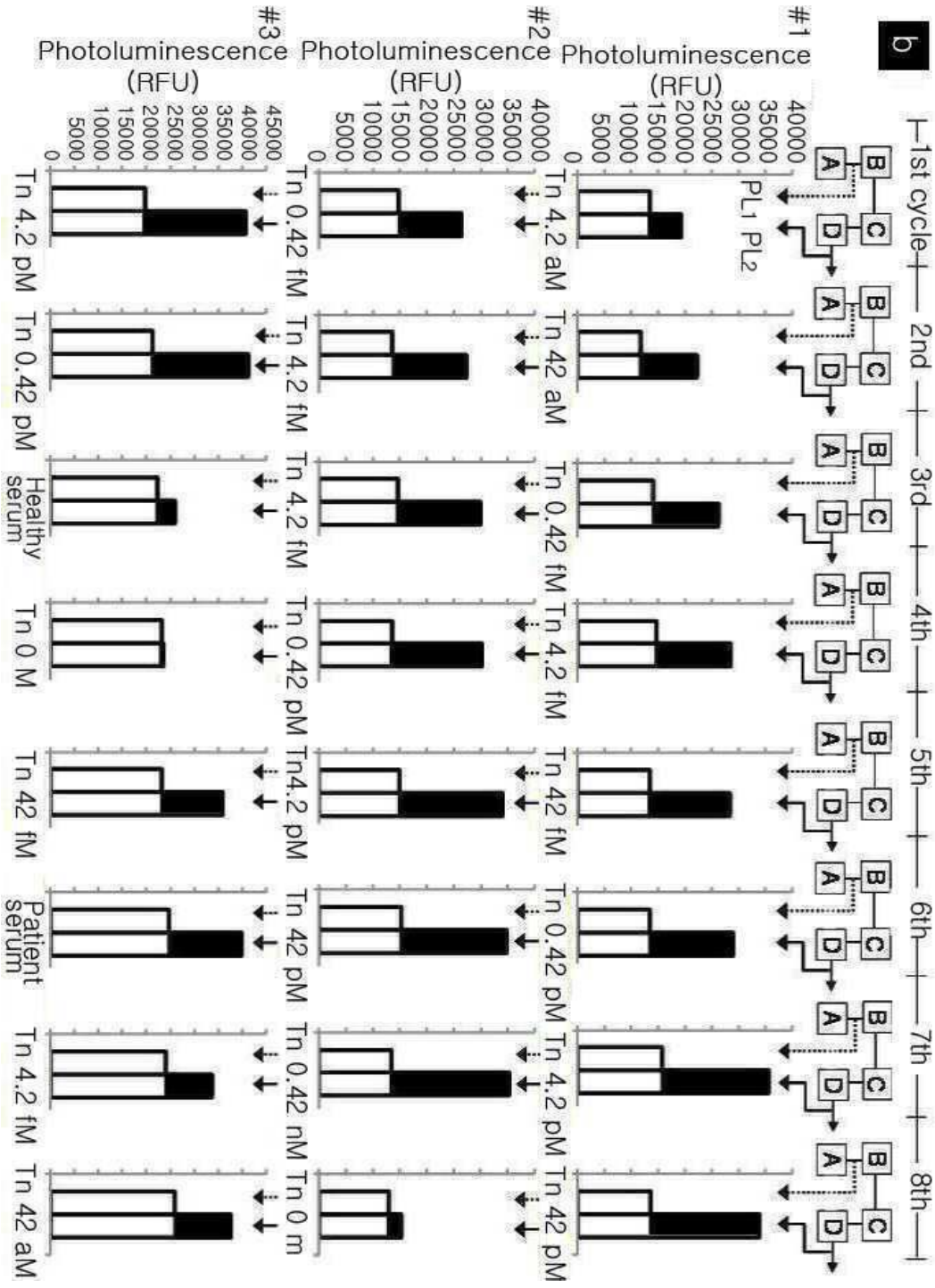
도면6


b
Net Photoluminescence Increase (RFU)
25000
20000
15000
10000
5000
0
Control
0.42 nM
42 pM
4.2 pM
0.42 pM
42 fM
4.2 fM
0.42 fM
42 aM
4.2 aM
0
Patients
Healthy persons
Troponin I in PBS buffer
sera

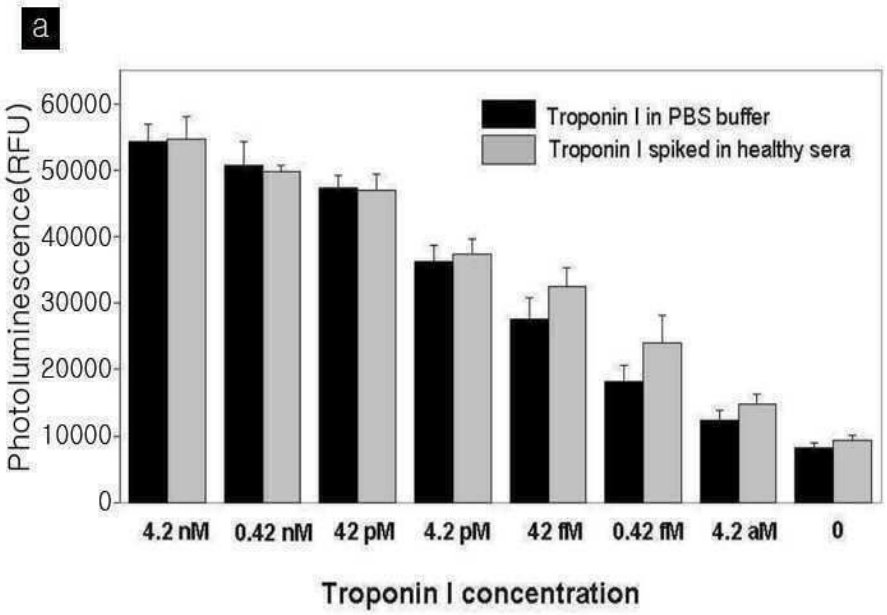
도면7


a
A
Washing with dilute sulfuric acid, rinsing with distilled water, and air drying
Photoluminescence(PL1)
B
Binding of HBV capsid-derived chimeric nanoparticles (38 nM in 50ul PBS buffer) and rabbit anti-troponin I polyclonal Ab
C
Addition of troponin I in PBS buffer, patient or healthy serum
D
Binding of mouse anti-troponin I monoclonal Ab and goat anti-mouse Q-dot-(Fab)2
Photoluminescence(PL2)
The net PL increase (=PL2-PL1) is used as a meaningful diagnostic measure.

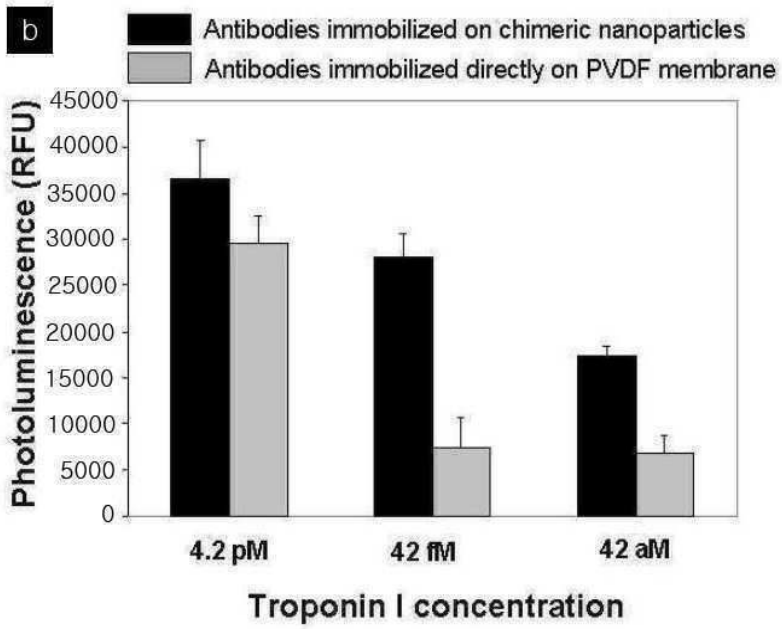
도면8


b
1st cycle
2nd
3rd
4th
5th
6th
7th
8th
A
B
C
D
#1
#2
#3
Photoluminescence (RFU)
PL1 PL2
Tn 4.2 pM
Tn 0.42 pM
Healthy serum
Tn 0 M
Tn 42 fM
Patient serum
Tn 4.2 fM
Tn 42 aM
Tn 0.42 fM
Tn 4.2 fM
Tn 42 aM
Tn 0.42 fM
Tn 4.2 fM
Tn 0.42 pM
Tn4.2 pM
Tn 42 pM
Tn 0.42 nM
Tn 0 m
Tn 4.2 pM
Tn 42 pM

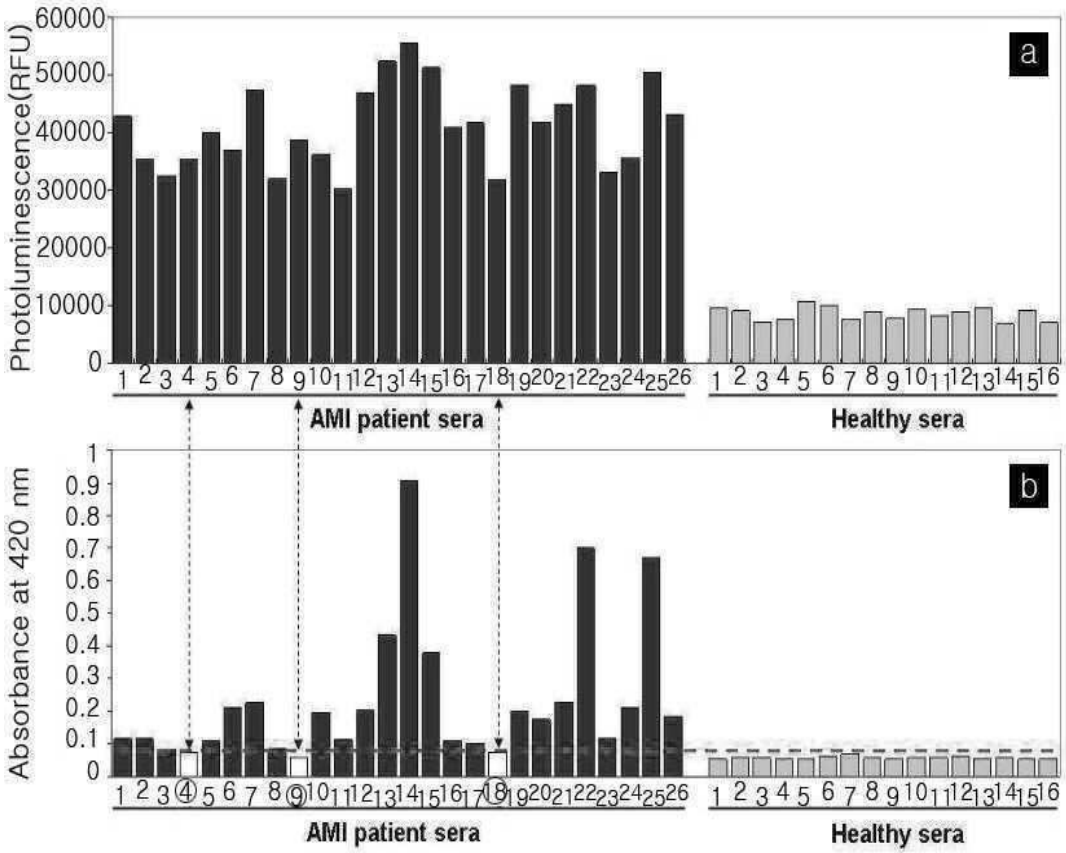
도면9


a
Photoluminescence(RFU)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Troponin I in PBS buffer
Troponin I spiked in healthy sera
4.2 nM
0.42 nM
42 pM
4.2 pM
42 fM
0.42 fM
4.2 aM
0
Troponin I concentration

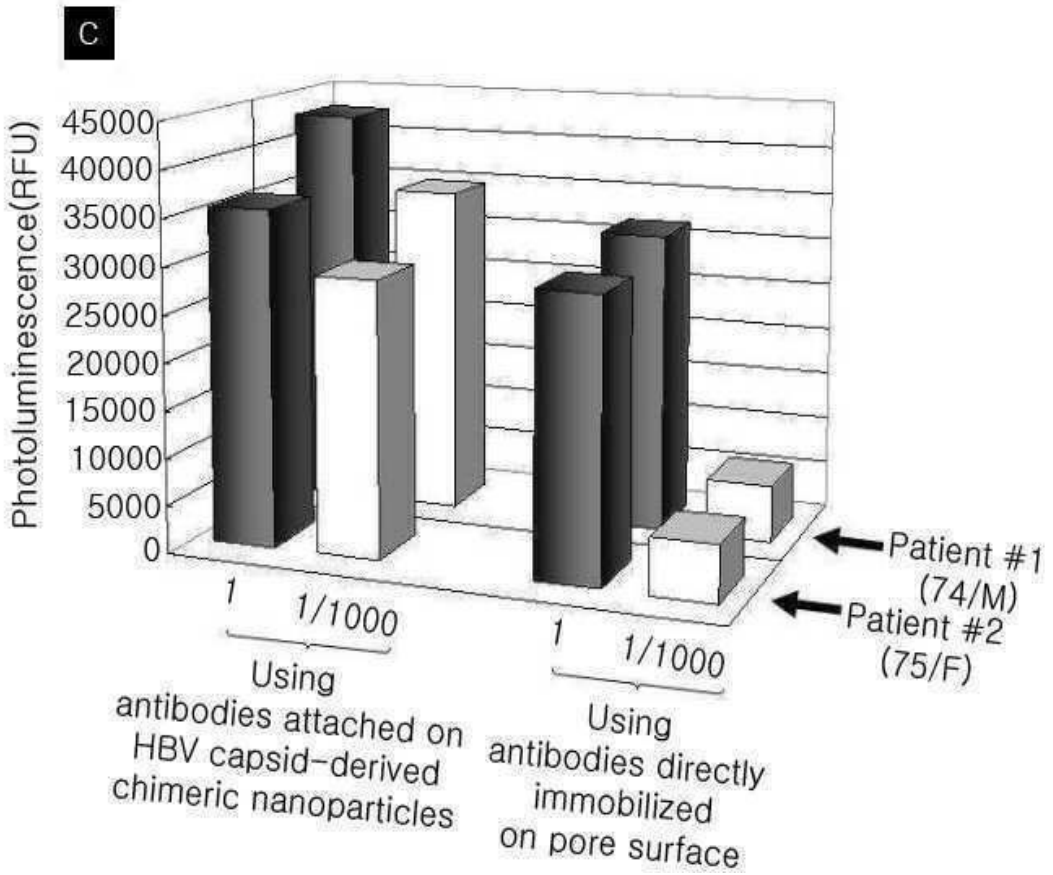
도면10


b
Antibodies immobilized on chimeric nanoparticles
Antibodies immobilized directly on PVDF membrane
Photoluminescence (RFU)
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
4.2 pM
42 fM
42 aM
Troponin I concentration

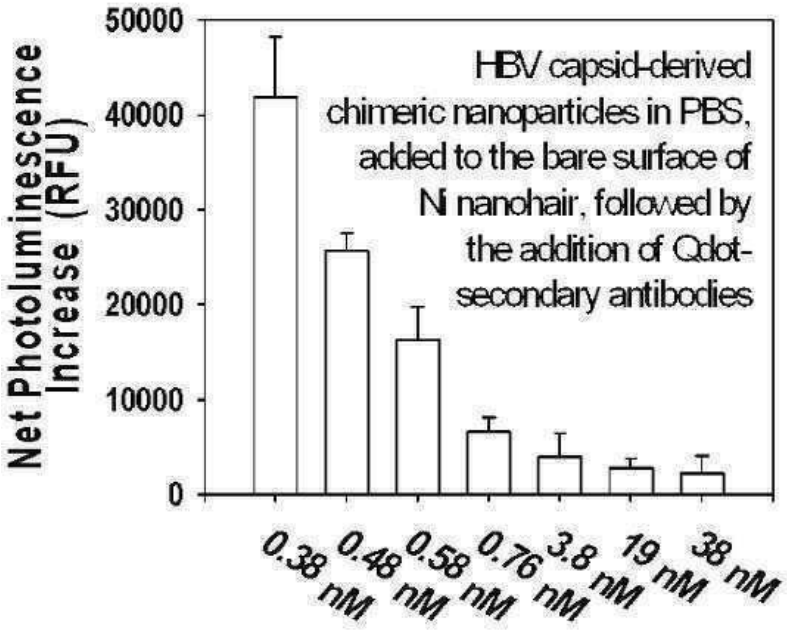
도면11


a
Photoluminescence(RFU)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26
AMI patient sera
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Healthy sera
b
Absorbance at 420 nm
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
AMI patient sera
Healthy sera

도면12


c
Photoluminescence(RFU)
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1
1/1000
Using
antibodies attached on
HBV capsid-derived
chimeric nanoparticles
1
1/1000
Using
antibodies directly
immobilized
on pore surface
Patient #1
(74/M)
Patient #2
(75/F)

도면13



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> A Chimeric protein, A Preparation method thereof, A Nanosenser fixed with the same and An application thereof

<130> P120383

<150> KR 10-2009-0019355

<151> 2009-03-06

<150> KR 10-2010-0019686

<151> 2010-03-05

<150> KR 10-2011-0119198

<151> 2011-11-15

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 1

catatgcatc accatcacca tcacgacatt gacccgtata aagaa 45

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

cccactccct ccgccaccgt cttccaaatt acttcccacc ca 42

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

ctcgagagta ccgcctcccc cactccctcc gccacc 36

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

ggatccggat ccggtggcgg agggtctggg ggaggcggt 39

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

ggcggagggt ctgggggagg cggttccagg ggattagtag tcagctat 48

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

aagcttttaa acaacagtag tttccggaag 30

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 7

ctcgaggcac cgaaagctga taac 24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 8

gaattcgtca gcttttggtg cttg 24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 9

gaattcgcac cgaaagctga taac 24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

ggatccgtca gcttttggtg cttg 24

<210> 11

<211> 189

<212> DNA

<213> SPAB

<400> 11

gcaccgaaag ctgataacaa attcaacaaa gaacaacaaa atgctttcta tgaaatctta 60

catttaccta acttaaatga agaacaacgc aatggtttca tccaaagctt aaaagatgac 120

ccaagccaaa gcgctaacct tttagcagaa gctaaaaagc taaatgatgc acaagcacca 180

aaagctgac 189

<210> 12

<211> 234

<212> DNA

<213> HBV capsid protein

<400> 12

atggacattg acccgtataa agaatttgga gcttctgtgg agttactctc ttttttgcct 60

tctgacttct ttccttctat tcgagatctc ctcgacaccg cctctgctct gtatcgggag 120

gccttagagt ctccggaaca ttgttcacct caccatacag cactcaggca agctattctg 180

tgttggggtg agttgatgaa tctggccacc tgggtgggaa gtaatttgga agac 234

<210> 13

<211> 78

<212> PRT

<213> HBV capsid protein

<400> 13

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp

20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp

65 70 75

<210> 14

<211> 207

<212> DNA

<213> HBV capsid protein

<400> 14

tccagggaat tagtagtcag ctatgtcaac gttaatatgg gcctaaaaat cagacaacta 60

ttgtggtttc acatttcctg tcttactttt ggaagagaaa ctgttcttga gtatttggtg 120

tcttttggag tgtggattcg cactcctccc gcttacagac caccaaatgc ccctatctta 180

tcaacacttc cggaaactac tgttgtt 207

<210> 15

<211> 69

<212> PRT

<213> HBV capsid protein

<400> 15

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys

1 5 10 15

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

20 25 30

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

35 40 45

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

50 55 60

Glu Thr Thr Val Val

65

<210> 16

<211> 63

<212> PRT

<213

> SPAB

<400> 16

Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe

1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly

20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu

35 40 45

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp

50 55 60